

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

**Departamento de Química**



**CARACTERIZACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS DE  
LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA COMO FUENTE DE  
FIBRA DIETÉTICA Y COMPUESTOS FENÓLICOS.  
USO DE LOS ULTRASONIDOS DE POTENCIA PARA  
LA EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN FENÓLICA**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**M<sup>a</sup> Reyes González-Centeno**

**Dirigida por:**

**Dr. D. Antoni Femenia Marroig**

**Dra. Dña. Carmen Rosselló Matas**

**Palma de Mallorca, 2013**









Universitat de les Illes Balears

Departamento de Química

**DRA. CARMEN ROSSELLÓ MATAS Y DR. ANTONI FEMENIA MARROIG,  
CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA  
UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

**CERTIFICAN:** que la memoria titulada '*Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de los ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica*', ha sido desarrollada por M<sup>a</sup> Reyes González Centeno, bajo nuestra dirección en el grupo de investigación de Ingeniería Agroalimentaria para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Química por la Universitat de les Illes Balears con mención europea.

Palma de Mallorca, a 1 de julio de 2013.

Fdo. Dra. Carmen Rosselló Matas

Fdo. Dr. Antoni Femenia Marroig



*Es difícil decir lo que resulta imposible... pues el sueño de  
ayer es la esperanza de hoy y la realidad de mañana...*

R.H. Goddard

*A mis padres y a mi anita,  
por hacerme tener los pies en el suelo.*

*A Lilian,  
por enseñarme a volar.*



*Con estas palabras quiero dar las gracias a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han estado presentes estos últimos años y sin la mayoría de las cuales este trabajo no hubiera sido posible.*

*En primer lugar, a mis directores de tesis, por confiar en mí desde el principio y por enriquecerme día tras día con su experiencia y estímulo constante. Al Dr. Antoni Femenia, por introducirme en el grupo de Ingeniería Agroalimentaria como alumna colaboradora hace ya siete años. A la Dra. Carmen Rosselló, por darme plena libertad y flexibilidad para trabajar en lo que me gusta.*

*Y a la Dra. Susana Simal, por ser mi tercer co-director de tesis, por las mañanas interminables de estadísticas con el Matlab y por sus constantes palabras de ánimo.*

*Al Govern de les Illes Balears, por la beca FPI concedida para la realización de la presente tesis doctoral, en el marco de un programa operativo cofinanciado por el Fondo Social Europeo.*

*A tots els cellers de les Illes Balears que han fet possible aquest projecte gràcies a la seva col·laboració, amb un agraïment especial a n'Andreu Oliver de Ca'n Majoral, i a n'en Lluç Reus i en Jaume Bergadà de Pere Seda, per la seva paciència i el seu interès en el projecte verema rere verema.*

*Al meu company de laboratori, però sobretot amic Simó... per tenir la paciència de treballar amb jo colze a colze durant tots aquests anys, per compartir no només experiments sinó també rialles i preocupacions, per escoltar-me i estar a prop quan ho he necessitat i sobretot per empenyar-me sempre que pot i més, donant 'vidilla' al nostre dia a dia al laboratori... Enyoraré escoltar-te bufar cada dos minuts... qui m'ho hauria de dir fa uns anys... amb el que m'he queixat de que fessis això!!!*

*A Carmeta, África y Valeria, por acompañarme en este viaje desde el principio, por sus consejos y su apoyo moral. A Lucía, Esperança, Sadjia, Óscar, Rafa y Daniela, por haber compartido mi día a día en el Mateu Orfila, incluyendo mi mal humor y mis carreras por los pasillos, en algún momento de los últimos cinco años. Un gràcies molt especial a na Xesca, per haver-me ajudat amb la part experimental al darrer any i per donar-me ànims contínua i incansablement.*

*Al personal de los Servicios Científico-Técnicos (SCT-UIB), del Servei de Sistemes d'Informació Geogràfica i Teledetecció (SSIGT-UIB) y del Servei de l'Institut*

*de Recerca i Formació Agrària i Pesquera del Govern de les Illes Balears (IRFAP), por la ayuda prestada durante el doctorado.*

*Al Dr. Claudio Mirasso, por creer en mí y por hacerme sentir que soy capaz de todo si me lo propongo.*

*Al Dr. A. Riera y la Dra. C. López-Sabater, por acogerme en sus respectivos laboratorios y guiar mis primeros pasos a nivel investigador. A Lydia, Ana, María y Yi Ning del Parc Científic de Barcelona, por todas las risas que hemos echado juntas; y a Raúl, de la Facultat de Farmàcia, por todo su apoyo y sus prácticos consejos.*

*Au Pr. P.L. Teissèdre pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son groupe de recherche en de nombreuses occasions, ainsi qu'au Dr. M. Jourdes pour son aide constante depuis mes premiers pas à l'ISVV. Un grand merci également aux amis et collègues du labo, Nerea, Kléo, Julie, Rim, Takis, Gui, Julien, Isa, Béné, Alexandra et Laurent, avec qui je se me suis constamment battue pour l'extracteur, les rotavaps et l'HPLC, mais qui m'ont fait sentir comme chez moi dès le premier jour.*

*Thanks to Dr. K. Koerzer and Dr. H. Sabarez, for giving me the opportunity to be part of their research group and to experiment living in the Antipodes. Thanks to all the friends from CSIRO who made my stay in Australia more bearable... Joe, Marcel, Carol, Sandra, Sebastian and Gunnar. And also thanks to Pablo and Phil, for their smile and technical support. A Kathy y Javier, por hacer más cálido el frío invierno de Melbourne. Y sobre todo, a mi querida Eliana, por todas las horas pasadas cortando raspón, por nuestras mañanas de sábado en el Queen Victoria Market, por los trenes a las 6h25 en Flinders Station, por las historias inventadas de camino a CSIRO, por todos sus post-its de la más linda para la más guapa, por todas las palomitas en olla de tapa transparente y por ser la mejor 'novia CSIRO' que podía tocarme... Gracias loquita, porque sin ti no hubiera aguantado.*

*A Mar, por su interés en todo lo que hago, por su apoyo y comprensión, y por todas las quedadas culinarias para desahogarnos mutuamente.*

*A la meva Carmeta de Barcelona, per estar sempre fent-me costat encara que estiguem lluny. I també a la Chari i la Cinta, per acollir-me totes tres a casa seva sempre que ho he necessitat i per fer de les meves visites fugaces a Barcelona tota una aventura!*

*À Nerea, Luca, Jean-Paul et Jean-Baptiste, avec qui j'ai partagé des très bons moments sur Bordeaux autour d'une bonne bouteille de vin... Mais surtout à Sacha et Natalia, que je remercie énormément pour m'avoir accueillie dans leur petite famille biélorusse et pour avoir semé les graines de ma petite famille à moi... cette fois-ci, franco-espagnole. Спасибо большое друзья.*

*A los amigos de la roqueta, porque pese a no entender lo que he estado haciendo con tanto empeño y dedicación estos cuatro años de doctorado, han estado siempre cerca para animarme en las horas bajas.*

*A Toni... por enseñarme hace muchos años que 'sin riesgo no hay gloria'.*

*A mi yaya y mis lelos, por quererme tanto...*

*A mi hermana y a mis padres... por soportar mis malas caras, por estar siempre cerca pese a mis continuas escapadas, por darme la oportunidad de disfrutarlos cada día, pero sobre todo por enseñarme y alentarme a que siga adelante.*

*Et surtout... à Lilian... pour me montrer une autre façon de voir et faire les choses, pour simplifier ce qui semble compliqué... pour avoir cette capacité de toujours voir le verre à moitié plein... pour me faire sentir unique... pour tes petits détails du quotidien qui font notre vie différente... pour ton regard critique et ton encouragement sans faille... et pour faire partie de toutes et chacune des pages de cette thèse ainsi que de ma vie depuis un peu plus de trois ans...*







---

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
RESUMEN.....	1
RESUM.....	7
RÉSUMÉ.....	13
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUCCIÓN .....	27
1.1. LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA.....	27
1.1.1. El concepto de <i>terroir</i> .....	27
1.1.1.1. Clima .....	28
1.1.1.2. Suelo .....	29
1.1.1.3. Paisaje.....	30
1.1.1.4. Conjunción de factores .....	30
1.1.2. Indicaciones de calidad para el vino.....	32
1.1.3. Subproductos de vinificación .....	38
1.2. LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE INTERÉS EN LA VIÑA .....	45
1.2.1. La fibra alimentaria o dietética.....	45
1.2.1.1. Polisacáridos de la pared celular.....	46
1.2.1.2. Interés de la fibra alimentaria a nivel industrial .....	50
1.2.2. Metabolismo secundario de la viña: los compuestos fenólicos .....	52
1.2.2.1. Compuestos fenólicos no-flavonoides .....	53
1.2.2.2. Compuestos fenólicos flavonoides .....	55
1.2.2.3. Interés de los compuestos fenólicos a nivel industrial.....	61
1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO – LÍQUIDO ASISTIDA POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA.....	63
1.3.1. Los ultrasonidos de potencia .....	64
1.3.2. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida acústicamente.....	69
1.3.3. Modelización y simulación del proceso .....	70

1.3.3.1. Modelo de Weibull .....	72
1.3.3.2. Metodología de superficie de respuesta.....	74
2. OBJETIVOS .....	79
3. MATERIALES y MÉTODOS .....	83
3.1. MATERIA PRIMA .....	83
3.1.1. Uva .....	84
3.1.2. Orujo.....	84
3.1.3. Raspón.....	84
3.1.4. Suelo.....	85
3.2. METODOLOGÍA .....	85
3.2.1. Sistemas de muestreo .....	85
3.2.1.1. Muestreo de uva.....	85
3.2.1.2. Muestreo de suelo.....	86
3.2.2. Preparación de mosto y mosto macerado a partir de la uva .....	87
3.2.3. Análisis químico general .....	87
3.2.3.1. Humedad.....	87
3.2.3.2. Cenizas.....	87
3.2.3.3. Proteínas .....	88
3.2.3.4. Lípidos.....	88
3.2.3.5. Azúcares solubles .....	88
3.2.4. Parámetros enológicos.....	88
3.2.4.1. pH .....	88
3.2.4.2. Acidez total.....	88
3.2.4.3. Grado alcohólico probable.....	88
3.2.4.4. Características cromáticas .....	89
3.2.5. Extracción de la fibra dietética. Residuo insoluble en alcohol.....	89
3.2.6. Caracterización de la fracción de fibra dietética.....	90
3.2.6.1. Identificación y cuantificación de los azúcares neutros.....	90
3.2.6.2. Identificación y cuantificación de los ácidos urónicos .....	91

---

3.2.6.3. Determinación del grado de metil-esterificación de las pectinas.....	92
3.2.6.4. Propiedades funcionales .....	92
3.2.7. Extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes .....	93
3.2.7.1. Muestras U1 y U2.....	93
3.2.7.2. Muestras O1 y R1 .....	93
3.2.7.3. Muestras O2 y O3.....	94
3.2.8. Caracterización de la fracción fenólica .....	94
3.2.8.1. Fenólicos totales .....	94
3.2.8.2. Taninos totales.....	95
3.2.8.3. Flavonoles totales .....	95
3.2.8.4. Identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos .....	96
3.2.8.5. Determinación del grado medio de polimerización de los taninos condensados .....	97
3.2.8.6. Capacidad antioxidante.....	99
3.2.9. Análisis de textura y fertilidad del suelo .....	104
3.2.9.1. Textura.....	104
3.2.9.2. Fertilidad.....	104
3.3. EQUIPOS DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO .....	105
3.3.1. Equipo extractor I: plato transductor de ultrasonidos.....	105
3.3.2. Equipo extractor II: sonda de ultrasonidos .....	106
3.3.3. Equipo extractor III: agitador mecánico .....	107
3.4. SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA .....	107
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	108
3.5.1. Diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen geográfico .....	108
3.5.1.1. Estudio del terroir de las Islas Baleares .....	108
3.5.1.2. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva.....	110
3.5.2. Caracterización de los residuos de vinificación .....	112
3.5.3. Extracción acuosa de compuestos bioactivos asistida acústicamente .....	113

3.5.3.1. Determinación de la potencia de los equipos de ultrasonidos. Estudio calorimétrico.....	113
3.5.3.2. Experimentos de extracción acuosa de compuestos fenólicos asistida mediante el equipo extractor I (plato transductor de ultrasonidos). Estudio del efecto de la frecuencia y de la potencia de ultrasonidos sobre el proceso.....	114
3.5.3.3. Experimentos de extracción acuosa de compuestos fenólicos asistida mediante el equipo extractor II (sonda de ultrasonidos). Estudio de la cinética y del efecto de la temperatura sobre el proceso.....	117
3.6. MODELIZACIÓN .....	118
3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	118
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	123
4.1. DIFERENCIACIÓN DE LA CALIDAD VITIVINÍCOLA LIGADA AL ORIGEN GEOGRÁFICO .....	123
4.1.1. Estudio del <i>terroir</i> de las Islas Baleares .....	123
4.1.2. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva .....	136
4.1.2.1. Análisis de clusters .....	138
4.1.2.2. Análisis discriminante .....	140
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE VINIFICACIÓN .....	156
4.2.1. Composición general.....	156
4.2.2. Fracción de fibra dietética .....	158
4.2.2.1. Composición de los polisacáridos de la pared celular .....	160
4.2.2.2. Grado de metil-esterificación de las pectinas .....	167
4.2.2.3. Propiedades funcionales .....	167
4.2.3. Fracción polifenólica.....	172
4.2.3.1. Fenólicos totales .....	173
4.2.3.2. Taninos totales.....	177
4.2.3.3. Identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos .....	179

---

4.2.3.4. Grado medio de polimerización y composición de las proantocianidinas.....	184
4.2.3.5. Capacidad antioxidante.....	191
4.3. EXTRACCIÓN ACUOSA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS ASISTIDA ACÚSTICAMENTE .....	201
4.3.1. Experimentos de extracción asistidos mediante un plato transductor de ultrasonidos. Estudio del efecto de la frecuencia y de la potencia de ultrasonidos sobre el proceso.....	201
4.3.1.1. Modelización mediante metodología de superficie de respuesta.....	203
4.3.1.2. Optimización de las condiciones de extracción.....	214
4.3.2. Extracción de compuestos fenólicos asistida mediante una sonda de ultrasonidos. Estudio de la cinética y del efecto de la temperatura sobre el proceso.....	216
4.3.2.1. Modelización .....	220
4.3.2.2. Simulación de las curvas de extracción .....	228
5. CONCLUSIONES .....	237
6. RECOMENDACIONES .....	245
7. NOMENCLATURA .....	249
8. BIBLIOGRAFÍA .....	257
9. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL DESARROLLO DE LA TESIS .....	289



## ÍNDICE DE FIGURAS

### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.1.</b> Nociones básicas del concepto de <i>terroir</i> . .....	27
<b>Figura 1.2.</b> Indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares. ....	35
<b>Figura 1.3.</b> Mercados de comercialización de los vinos con indicación de calidad de las Islas Baleares en 2010. ....	36
<b>Figura 1.4.</b> Generación anual de residuos vitivinícolas a nivel mundial en el período 1995 – 2010. ....	38
<b>Figura 1.5.</b> Elaboración de vinos blancos. Etapas del proceso donde se generan los principales residuos vitivinícolas. ....	39
<b>Figura 1.6.</b> Elaboración de vinos tintos. Etapas del proceso donde se generan los principales residuos vitivinícolas. ....	40
<b>Figura 1.7.</b> Estructura de la celulosa. ....	46
<b>Figura 1.8.</b> Representación esquemática de los principales tipos de hemicelulosas. ....	47
<b>Figura 1.9.</b> Representación esquemática de los principales tipos de pectinas. ....	48
<b>Figura 1.10.</b> Esquema representativo de la estructura de la fibra alimentaria. ....	49
<b>Figura 1.11.</b> Clasificación de los compuestos fenólicos (extraído de Zamora (2003)). ....	53
<b>Figura 1.12.</b> Estructura química de los principales ácidos fenólicos de la uva. ....	54
<b>Figura 1.13.</b> Estructura química de los principales estilbenos de la uva. ....	54
<b>Figura 1.14.</b> Estructura química general de los compuestos fenólicos flavonoides. ....	55
<b>Figura 1.15.</b> Estructura química de los principales flavonoles de la uva. ....	56
<b>Figura 1.16.</b> Estructura química general de los flavanoles y las flavonas. ....	56
<b>Figura 1.17.</b> Estructura química de los principales antocianos de la uva. ....	57
<b>Figura 1.18.</b> Estructura química de los principales flavanoles monoméricos de la uva. ....	58
<b>Figura 1.19.</b> Estructura química general de los taninos condensados o proantocianidinas. ....	59
<b>Figura 1.20.</b> Estructura química de los principales flavanoles oligoméricos de la uva. ....	60
<b>Figura 1.21.</b> Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia. ....	64
<b>Figura 1.22.</b> Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido sobre el que se aplican ultrasonidos de potencia. ....	67

<b>Figura 1.23.</b> Formación de microinyecciones en una interfase sólido-líquido como consecuencia del fenómeno de cavitación producido por la aplicación de ultrasonidos de potencia. ....	67
<b>3. MATERIALES y MÉTODOS</b>	
<b>Figura 3.1.</b> Variedades de uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	83
<b>Figura 3.2.</b> Subproductos de vinificación.....	83
<b>Figura 3.3.</b> Diagrama de muestreo de uva en el viñedo (adaptado de Blouin and Peynaud (2004)). ....	85
<b>Figura 3.4.</b> Muestreo de uva a nivel de un carril del viñedo (adaptado de Hidalgo Togores (2006)). ....	86
<b>Figura 3.5.</b> Diagrama de muestreo de suelo en el viñedo (adaptado de Blouin and Peynaud (2004)).....	86
<b>Figura 3.6.</b> Detalle del prensado manual de la uva para la obtención de su zumo o mosto. ....	87
<b>Figura 3.7.</b> Lote de extractos obtenidos para el orujo de uva tinta y el raspón con el extractor ASE 350.....	94
<b>Figura 3.8.</b> Principio de la reacción de fluoroglucinólisis (adaptado de Tarascou <i>et al.</i> (2010)). ....	98
<b>Figura 3.9.</b> Principio químico del método ABTS (adaptado de Huang, Ou and Prior (2005)). ....	101
<b>Figura 3.10.</b> Principio químico del método CUPRAC (adaptado de Huang <i>et al.</i> (2005)).....	102
<b>Figura 3.11.</b> Principio químico del método FRAP (adaptado de Huang <i>et al.</i> (2005)).....	102
<b>Figura 3.12.</b> Principio químico del método ORAC (adaptado de Zulueta <i>et al.</i> (2009)). ....	103
<b>Figura 3.13.</b> Textura del suelo. Clasificación USDA.....	104
<b>Figura 3.14.</b> Generador de ultrasonidos multifrecuencia y plato transductor de inmersión.....	106
<b>Figura 3.15.</b> Equipo extractor I. ....	106
<b>Figura 3.16.</b> Equipo extractor II. ....	107
<b>Figura 3.17.</b> Equipo extractor III.....	107
<b>Figura 3.18.</b> Diseño experimental I. Diferenciación entre las <i>IGPs</i> de las Islas Baleares. ....	109
<b>Figura 3.19.</b> Geolocalización de los viñedos de las <i>IGPs</i> de las Islas Baleares considerados en el estudio. ....	110

<b>Figura 3.20.</b> Diseño experimental II. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva. ....	110
<b>Figura 3.21.</b> Geolocalización de los viñedos de las <i>DOs</i> de las Islas Baleares considerados en el estudio. ....	111
<b>Figura 3.22.</b> Diseño experimental III. Caracterización de los residuos de vinificación. ....	112
<b>Figura 3.23.</b> Diseño experimental IV. Estudio del efecto de la frecuencia y potencia acústicas sobre el proceso de extracción acuosa de compuestos bioactivos del orujo. ....	114
<b>Figura 3.24.</b> Diseño experimental V. Estudio del efecto de la temperatura sobre el proceso de extracción acuosa de compuestos bioactivos del orujo fermentado bajo condiciones control (con agitación) y acústicas. ....	117
 <b>4. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	
<b>Figura 4.1.</b> Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de <i>Merlot</i> de las indicaciones geográficas protegidas ( <i>IGPs</i> ) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. ....	130
<b>Figura 4.2.</b> Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de <i>Merlot</i> de las indicaciones geográficas protegidas ( <i>IGPs</i> ) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal. ....	131
<b>Figura 4.3.</b> Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de <i>Cabernet Sauvignon</i> de las indicaciones geográficas protegidas ( <i>IGPs</i> ) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. ....	133
<b>Figura 4.4.</b> Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de <i>Cabernet Sauvignon</i> de las indicaciones geográficas protegidas ( <i>IGPs</i> ) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal. ....	134
<b>Figura 4.5.</b> Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Variedad <i>Merlot</i> . Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante. ....	143

**Figura 4.6.** Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Variedad *Cabernet Sauvignon*. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante..... 144

**Figura 4.7.** Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Añada 2009. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante..... 146

**Figura 4.8.** Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Añada 2010. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante..... 147

**Figura 4.9.** Contenido de fibra dietética de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 158

**Figura 4.10.** Composición en celulosa, hemicelulosas y pectinas de la fracción de fibra del orujo (A) y raspón (B). Para cada tipo de muestra y polisacárido de la pared celular, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 165

**Figura 4.11.** Grado de metil-esterificación de las pectinas (DME) de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades..... 167

**Figura 4.12.** Propiedades funcionales de la fibra. Hinchamiento (Sw) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 168

**Figura 4.13.** Propiedades funcionales de la fibra. Capacidad de retención de agua (WRC) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 169

**Figura 4.14.** Propiedades funcionales de la fibra. Capacidad de retención de lípidos (FAC) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 171

**Figura 4.15.** Rendimientos de la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes del orujo. Para cada base de referencia (base seca y base húmeda), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 172

- Figura 4.16.** Rendimientos de la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes del raspón. Para cada base de referencia (base seca y base húmeda), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. .... 173
- Figura 4.17.** Diagramas de Pareto para la extracción de compuestos fenólicos (**A**), flavonoles (**B**) y capacidad antioxidante, según los métodos CUPRAC (**C**) y FRAP (**D**) en función de las variables del proceso. L, término lineal; C, término cuadrático. .... 207
- Figura 4.18.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de los compuestos fenólicos del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**). .... 208
- Figura 4.19.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de los flavonoles del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**). .... 211
- Figura 4.20.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de la capacidad antioxidante del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**). .... 213
- Figura 4.21.** Contenido de fenólicos totales de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US). .... 216
- Figura 4.22.** Capacidad antioxidante (método ABTS) de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US). .... 217
- Figura 4.23.** Capacidad antioxidante (método FRAP) de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US). .... 217

**Figura 4.24.** Representación del parámetro  $\beta$  en función de la temperatura (20 – 50 °C) y del tiempo, para el proceso de extracción acústica de compuestos fenólicos (A) y capacidad antioxidante, según los métodos ABTS (B) y FRAP (C), del orujo fermentado..... 227

**Figura 4.25.** Comparación entre los valores del contenido de fenólicos totales simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B)..... 229

**Figura 4.26.** Comparación entre los valores de capacidad antioxidante (método ABTS) simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B). ..... 230

**Figura 4.27.** Comparación entre los valores de capacidad antioxidante (método FRAP) simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B). ..... 231

**Figura 4.28.** Representación de los residuos frente a los valores calculados mediante el modelo de Weibull modificado en base normalizada. Distribución de los residuos de la extracción de fenólicos totales y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas y en ausencia/presencia de US. .... 233

## ÍNDICE DE TABLAS

### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.1.</b> Datos de superficie, producción de uva y elaboración de vino de las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares en el año 2012.....	35
<b>Tabla 1.2.</b> Variedades de uva autorizadas y municipios de producción de las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares.....	37
<b>Tabla 1.3.</b> Revisión bibliográfica de la incorporación de extractos de subproductos de vinificación en alimentos.....	43
<b>Tabla 1.4.</b> Efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de fibra dietética.....	51
<b>Tabla 1.5.</b> Efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de compuestos fenólicos de la uva.....	62
<b>Tabla 1.6.</b> Modelos empíricos y semiempíricos más utilizados en la bibliografía para las cinéticas de extracción de compuestos bioactivos de origen vegetal.....	72
<b>Tabla 1.7.</b> Ejemplos de uso del modelo de Weibull en tecnología de alimentos.....	73

### 3. MATERIALES y MÉTODOS

<b>Tabla 1.8.</b> Diseños experimentales de RSM más utilizados en la bibliografía relacionada con procesos de extracción de compuestos bioactivos en la industria alimentaria.....	75
<b>Tabla 3.1.</b> Muestras de uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	84
<b>Tabla 3.2.</b> Muestras de orujo.....	84
<b>Tabla 3.3.</b> Muestras de raspón.....	84
<b>Tabla 3.4.</b> Muestras de suelo.....	85
<b>Tabla 3.5.</b> Preparación de las soluciones-muestra para la evaluación del contenido de fenólicos totales.....	95
<b>Tabla 3.6.</b> Gradiente de elución para la identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos.....	96
<b>Tabla 3.7.</b> Gradiente de elución para la determinación del grado medio de polimerización de los taninos condensados.....	97

**Tabla 3.8.** Productos de reacción de la fluoroglucinólisis: coeficientes de extinción molar y masas moleculares de ionización..... 99

**Tabla 3.9.** Preparación de las soluciones-muestra para la evaluación de la capacidad antioxidante. .... 100

**Tabla 3.10.** Número de viñedos de las *IGPs* de las Islas Baleares considerados en el estudio..... 109

**Tabla 3.11.** Número de viñedos de las *DOs* de las Islas Baleares considerados en el estudio..... 111

**Tabla 3.12.** Valores experimentales y codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño Box-Behnken..... 115

**Tabla 3.13.** Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken. .... 116

**4. RESULTADOS y DISCUSIÓN**

**Tabla 4.1.** Caracterización de los viñedos de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de las indicaciones geográficas protegidas (*IGPs*) de las Islas Baleares: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje. .... 126

**Tabla 4.2.** Análisis de componentes principales de los viñedos-muestra de *Merlot*. Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales..... 129

**Tabla 4.3.** Análisis de componentes principales de los viñedos-muestra de *Cabernet Sauvignon*. Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales..... 132

**Tabla 4.4.** Caracterización de los viñedos-muestra de la *DO Binissalem*: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje. .... 137

**Tabla 4.5.** Caracterización de los viñedos-muestra de la *DO Pla i Llevant*: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje. .... 138

**Tabla 4.6.** Análisis de clusters. Porcentaje de asignación natural en función de la añada y del origen de producción para las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*..... 139

**Tabla 4.7.** Análisis de clusters. Porcentaje de asignación natural en función de la variedad y del origen de producción para las añadas 2009 y 2010..... 140

**Tabla 4.8.** Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Contribución de las variables a las tres primeras funciones discriminantes. .... 141

---

<b>Tabla 4.9.</b> Análisis discriminante. Predicción de grupo de pertenencia en función de la añada y del origen de producción para las variedades <i>Merlot</i> y <i>Cabernet Sauvignon</i> . .....	145
<b>Tabla 4.10.</b> Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Contribución de las variables a las tres primeras funciones discriminantes. ....	146
<b>Tabla 4.11.</b> Análisis discriminante. Predicción de grupo de pertenencia en función de la variedad de uva y del origen de producción para las añadas 2009 y 2010. ....	148
<b>Tabla 4.12.</b> Revisión bibliográfica del efecto de la añada, origen de producción y/o variedad de uva como criterios de diferenciación de la calidad. Estudios realizados mediante el uso de análisis discriminante.....	150
<b>Tabla 4.13.</b> Composición química general <sup>a</sup> de la uva ( <i>Vitis vinifera</i> ) y de los residuos de vinificación. ....	157
<b>Tabla 4.14.</b> Contenido de fibra dietética de los subproductos de vinificación. Revisión bibliográfica.....	159
<b>Tabla 4.15.</b> Composición de los polisacáridos de la pared celular de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. ....	161
<b>Tabla 4.16.</b> Ratios de fibra insoluble/fibra soluble (FI/FS) para la uva y sus subproductos, orujo y raspón. ....	166
<b>Tabla 4.17.</b> Propiedades funcionales de la fibra procedente de diferentes subproductos agrícolas. Revisión bibliográfica. ....	170
<b>Tabla 4.18.</b> Fenólicos totales del orujo y raspón. ....	174
<b>Tabla 4.19.</b> Contenido de fenólicos totales del orujo. Revisión bibliográfica.....	175
<b>Tabla 4.20.</b> Contenido de fenólicos totales del raspón. Revisión bibliográfica. ....	177
<b>Tabla 4.21.</b> Taninos totales del orujo y raspón.....	178
<b>Tabla 4.22.</b> Contenido de taninos totales de los subproductos de vinificación. Revisión bibliográfica.....	179
<b>Tabla 4.23.</b> Perfil flavan-3-olico del orujo y raspón. ....	180
<b>Tabla 4.24.</b> Contenido de flavan-3-oles del orujo. Revisión bibliográfica.....	182
<b>Tabla 4.25.</b> Contenido de flavan-3-oles del raspón. Revisión bibliográfica. ....	184
<b>Tabla 4.26.</b> Grado medio de polimerización (mDP) y composición estructural de las proantocianidinas del orujo y raspón. ....	185

<b>Tabla 4.27.</b> Grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados de orujo, piel y pepitas de uva. Revisión bibliográfica.....	188
<b>Tabla 4.28.</b> Grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados de raspón. Revisión bibliográfica.....	190
<b>Tabla 4.29.</b> Capacidad antioxidante <sup>a</sup> del orujo y raspón.....	192
<b>Tabla 4.30.</b> Capacidad antioxidante del orujo. Revisión bibliográfica.....	194
<b>Tabla 4.31.</b> Capacidad antioxidante del raspón. Revisión bibliográfica.....	197
<b>Tabla 4.32.</b> Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de fenólicos totales. Revisión bibliográfica.....	199
<b>Tabla 4.33.</b> Valores experimentales y calculados del contenido de fenólicos y flavonoles totales, y de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la extracción acuosa de orujo asistida por ultrasonidos de potencia.....	202
<b>Tabla 4.34.</b> Coeficientes de regresión y parámetros estadísticos de los modelos matemáticos obtenidos por RSM correspondientes a la extracción de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante del orujo con aplicación de ultrasonidos de potencia.....	204
<b>Tabla 4.35.</b> Extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas en ausencia/presencia de US. Parámetros identificados del modelo de Weibull modificado, intervalos de confianza (IC) y error estándar asociado a cada parámetro (ES).....	223
<b>Tabla 4.36.</b> Evidencia bibliográfica del orden de magnitud de la energía de activación ( $E_a$ ) de procesos de extracción de compuestos bioactivos de productos de origen vegetal.....	225
<b>Tabla 4.37.</b> Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR). Comparación entre los valores experimentales y simulados mediante el modelo de Weibull modificado. Extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas en ausencia/presencia de US. ....	232





## RESUMEN

En las últimas décadas, la industria vitivinícola está encarando la potencial revalorización de sus residuos para hacer frente a la creciente presión legislativa sobre la mitigación del impacto ambiental derivado de la elaboración del vino.

Los subproductos de vinificación constituyen potenciales fuentes de compuestos bioactivos de gran interés para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Actualmente, en el campo de la alimentación, su uso para la obtención de diferentes ingredientes funcionales es objeto de numerosos estudios.

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar el uso de los subproductos de vinificación, orujo y raspón, como fuentes de fibra dietética y compuestos fenólicos. Para ello se plantearon tres líneas de investigación, la primera de las cuales se centra en el estudio de las indicaciones vitivinícolas de las Islas Baleares en vistas a determinar sus características diferenciales consecuencia del entorno geográfico. Una vez reconocida dicha diferenciación y, consecuentemente, la diferenciación entre sus subproductos, se procedió a la caracterización de los residuos de vinificación de diferentes variedades de uva (*Vitis vinifera* L.). Esta segunda línea de trabajo se propuso para evidenciar aquellas variedades cuyo orujo y raspón manifiestan un mayor potencial de revalorización en función del contenido y de la composición que presentan tanto de fibra dietética como de compuestos fenólicos. Por su parte, la tercera línea de trabajo evaluó la aplicación de los ultrasonidos de potencia como tecnología para favorecer la extracción de los compuestos fenólicos del orujo utilizando agua como disolvente, potenciando así su posible uso alimentario como ingrediente funcional.

En la primera línea de investigación, relacionada con la diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen geográfico, se consideró un número representativo de viñedos de las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* pertenecientes a cada una de las indicaciones vitivinícolas existentes en las Islas Baleares (4 *IGPs* y 2 *DOs*). En cada uno de ellos, se tomaron muestras de uva y suelo, y se registraron las condiciones climáticas y de paisaje, aplicando el análisis multivariable a la base de datos.

Como resultado se ha propuesto una metodología capaz de diferenciar entre indicaciones vitivinícolas, en base a las características de la uva y de los atributos agroclimáticos del *terroir*, sin incluir el factor humano, que corrobora la existencia histórica de las indicaciones vitivinícolas de las Islas Baleares.

En el caso de las indicaciones geográficas protegidas (*IGPs*), los viñedos-muestra de las cuatro *IGPs* de las Islas Baleares se distribuyeron en cuatro grupos diferenciados como resultado de la aplicación del análisis de componentes principales sobre las características físico-químicas de la uva, la textura y fertilidad del suelo, y las condiciones climáticas y de paisaje. Los tres primeros componentes principales, dos representativos de los descriptores agroclimáticos y uno específico de los atributos de la uva, identificaron el patrón de comportamiento de los viñedos-muestra en base a su origen geográfico explicando el 68% y el 70% de la varianza total de la base de datos correspondiente a las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Merlot*, respectivamente.

En el caso de las denominaciones de origen (*DOs*), se evaluó el efecto de la añada, del origen de producción y de la variedad de uva, observándose una decreciente capacidad de discriminación entre los viñedos-muestra en ese orden. De acuerdo con los resultados del análisis discriminante, al fijar la variedad, el 100% de los viñedos-muestra se clasificaron correctamente en función de la añada; y al fijar la añada, la aplicación del análisis discriminante también permitió la correcta clasificación del 100% de los viñedos-muestra de acuerdo con la *DO* a la que pertenecen.

Asimismo, con este estudio se ha proporcionado a los correspondientes consejos reguladores el aval científico necesario para justificar, frente al Reglamento Europeo (CE) nº 479/2008, la vinculación geográfica de dichas indicaciones vitivinícolas de calidad a su zona de producción. Y se ha justificado la importancia/necesidad de conocer el origen geográfico de un vino como producto final y/o de los residuos de vinificación como subproductos del proceso, como punto de partida para su caracterización físico-química.

En la segunda línea de investigación, la caracterización físico-química de la fracción de fibra dietética y de la fracción fenólica de los principales residuos de vinificación, orujo y raspón, de diferentes variedades de uva (*V. vinifera* L.), ha generado una completa base de datos que permite a la industria alimentaria seleccionar el subproducto y/o variedad más adecuados en función de las características requeridas para la posible formulación de ingredientes funcionales.

Se ha observado que el orujo y el raspón constituyen fuentes potenciales de fibra dietética de calidad y compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante, destacándose una importante variabilidad cualitativa y cuantitativa no sólo con el tipo de subproducto sino también con la variedad de uva considerada.

En lo que respecta a la fracción de fibra dietética, ambos subproductos presentaron un elevado contenido (53 – 94%, base seca), con adecuadas propiedades funcionales (capacidad de retención de agua: 3.8 – 10.7 g agua/ g concentrado de fibra; capacidad de retención de lípidos: 3.8 – 6.6 g aceite/g concentrado de fibra) y un ratio fibra insoluble/fibra soluble comprendido entre 1.0 y 2.3, lo cual permitiría beneficiarse de los efectos fisiológicos, nutricionales y tecnológicos asociados a ambas fracciones de la fibra, soluble e insoluble.

En el caso del orujo, las pectinas fueron el principal polisacárido de la pared celular (33 – 54% de los polisacáridos de la pared celular, CWP), mientras que en el raspón el componente mayoritario fue la celulosa (40 – 49% CWP), si bien cabe indicar que este subproducto también constituye una importante fuente de pectinas (27 – 41% CWP).

En cuanto a la fracción fenólica, pese a que ambos subproductos de vinificación mostraron un alto contenido en fenólicos totales, el del raspón fue entre 1.5 y 2.5 veces mayor que el correspondiente al orujo de la misma variedad, observándose el mismo comportamiento para la capacidad antioxidante, independientemente de la técnica analítica utilizada (ABTS, CUPRAC, FRAP, ORAC). Concretamente, para las variedades *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* y *Premsal Blanc*, la capacidad antioxidante del raspón fue entre 1.3 y 2.5 veces mayor que la de sus orujos.

Se ha realizado una comparación y descripción detallada de la composición flavan-3-olica de ambos residuos para diferentes variedades de uva (*V. vinifera* L.), observándose un perfil propio y característico en cada caso. En general, los orujos presentaron un mayor contenido de monómeros (43 – 71% del total de flavan-3-oles) y trímeros (5 – 9% del total de flavan-3-oles), pero menor cantidad de dímeros (23 – 48% del total de flavan-3-oles), que los correspondientes raspones (monómeros: 30 – 50%, y dímeros: 50 – 70% del total de flavan-3-oles).

En general, los valores del grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados o proantocianidinas fueron mayores para los orujos ( $mDP_{\text{orujo}} = 4.5 - 10.1$ ) que para el correspondiente raspón de la misma variedad ( $mDP_{\text{raspón}} = 4.6 - 8.5$ ).

El raspón de las variedades autóctonas (*Callet*, *Manto Negro*, *Parellada*, *Premsal Blanc*) destacó, de entre las 10 variedades en estudio, por su mayor contenido

en fenólicos totales (TP) y mayor capacidad antioxidante, especialmente en el caso de la variedad *Callet* (TP = 11525 ± 886 mg GA/100 g bs).

Finalmente, en la tercera línea de investigación de la presente tesis doctoral, se evaluó el proceso de extracción acuosa de la fracción fenólica del orujo asistida mediante dos equipos de ultrasonidos de potencia. Se observó que la aplicación de ultrasonidos mejora el rendimiento y/o eficacia del proceso con respecto a la extracción convencional (con agitación mecánica).

En los experimentos con un plato transductor de ultrasonidos, se concluyó que la frecuencia y potencia acústicas condicionan significativamente el proceso de extracción, siendo necesaria su optimización para incrementar el rendimiento del proceso. Los datos experimentales de la extracción de compuestos fenólicos y flavonoles asistida acústicamente, y de la capacidad antioxidante de los extractos, determinada mediante las técnicas CUPRAC y FRAP, se ajustaron de forma significativa a un modelo cuadrático ( $p < 0.05$ ), capaz de explicar satisfactoriamente el comportamiento del sistema y de predecir por interpolación las respuestas en el dominio experimental considerado.

Mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta, se estimaron las condiciones óptimas para la máxima extracción acústica de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante del orujo, utilizando agua como disolvente. Los valores óptimos obtenidos fueron 40 kHz de frecuencia, 150 W/L de potencia y un tratamiento de 25 min.

En los experimentos con una sonda de ultrasonidos, se estudiaron las cinéticas del proceso de extracción convencional y acústica, así como el efecto de la temperatura sobre las mismas. Se observó un aumento progresivo y significativo del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante de los extractos a medida que aumentaba la temperatura, alcanzando los valores más altos en el caso de la extracción asistida acústicamente.

La aplicación de ultrasonidos de potencia mejoró el proceso de extracción. Así, según los resultados experimentales obtenidos, las extracciones convencionales de fenólicos totales a 35 y 50 °C no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con las asistidas por ultrasonidos a 20 y 35 °C, respectivamente. En cuanto al tiempo de extracción, la extracción acústica necesitó del orden de 3, 4 y 8 veces menos tiempo, a

20, 35 y 50 °C, que la extracción control para obtener extractos con las mismas características.

Las curvas de extracción obtenidas para el contenido de fenólicos totales y capacidad antioxidante, según los métodos ABTS y FRAP, del orujo fueron representadas adecuadamente mediante el modelo de Weibull modificado (valores medios de la varianza explicada  $\geq 97.9\%$ , y del error relativo medio,  $\leq 7.0\%$ ), tanto para procesos de extracción control como de extracción acústica, dentro del rango de temperaturas 20 – 50 °C. Se observó una elevada correlación ( $r^2 \geq 0.992$ ) entre los valores experimentales y los calculados para todos los atributos en estudio.

Globalmente, el trabajo experimental realizado ha contribuido a la caracterización de los residuos vitivinícolas, orujo y raspón, como materia prima, así como del proceso de extracción acuosa asistida mediante ultrasonidos de potencia como metodología, para la obtención de ingredientes funcionales ricos en fibra y compuestos fenólicos que pueden ser de gran interés en el campo de la industria alimentaria.



## RESUM

En les darreres dècades, la indústria vitivinícola s'encara amb la potencial revalorització dels seus residus per fer front a la creixent pressió legislativa sobre la mitigació de l'impacte ambiental derivat de l'elaboració del vi.

Els subproductes de vinificació constitueixen fonts potencials de composts bioactius de gran interès per a les indústries alimentària, cosmètica i farmacèutica. Actualment, en el camp de l'alimentació, el seu ús per a l'obtenció de diferents ingredients funcionals és objecte de nombrosos estudis.

El present treball té com a objectiu general avaluar la utilització dels subproductes de vinificació, pasta premsada i rapa, com a fonts de fibra dietètica i composts fenòlics. En aquest context, es varen plantejar tres línies d'investigació, la primera de les quals està centrada en l'estudi de les indicacions vitivinícoles de les Illes Balears per tal de determinar-ne les característiques diferencials conseqüència de l'entorn geogràfic. Un cop reconeguda aquesta diferenciació i, conseqüentment, la diferenciació entre els subproductes, es va procedir a caracteritzar els residus de vinificació de diferents varietats de raïm (*Vitis vinifera* L.). Aquesta segona línia de treball es va proposar per evidenciar les varietats la pasta premsada i la rapa de les quals manifesten més potencial de revalorització en funció del contingut i de la composició que presenten, tant de fibra dietètica com de composts fenòlics. Finalment, en la tercera línia de recerca es va avaluar l'aplicació dels ultrasons de potència com a tecnologia per afavorir l'extracció dels composts fenòlics de la pasta premsada, utilitzant aigua com a dissolvent, potenciant així el seu possible ús alimentari com a ingredient funcional.

Dins la primera línia d'investigació, relacionada amb la diferenciació de la qualitat vitivinícola lligada a l'origen geogràfic, es va considerar un nombre representatiu de vinyes, de les varietats *Merlot* i *Cabernet Sauvignon*, de cadascuna de les indicacions vitivinícoles existents a les Illes Balears (4 IGPs i 2 DOs). En cada vinya es varen agafar mostres de raïm i de sòl, i es varen registrar les condicions climàtiques i de paisatge, aplicant l'anàlisi multivariable sobre la base de dades.

Com a resultat s'ha proposat una metodologia capaç de diferenciar entre indicacions vitivinícoles basant-se en les característiques del raïm i en els atributs agroclimàtics del *terroir*, sense incloure el factor humà, que corrobora l'existència històrica de les indicacions vitivinícoles de les Illes Balears.

En el cas de les indicacions geogràfiques protegides (*IGPs*), les vinyes-mostra de les quatre *IGPs* de les Illes Balears es varen distribuir en quatre grups diferenciats com a resultat de l'aplicació de l'anàlisi de components principals sobre les característiques fisicoquímiques del raïm, la textura i fertilitat del sòl i les condicions climàtiques i de paisatge. Els tres primers components principals, dos de representatius dels descriptors agroclimàtics i un d'específic dels atributs del raïm, varen identificar el patró de comportament de les vinyes-mostra sobre la base del seu origen geogràfic, explicant el 68% i el 70% de la variància total de la base de dades corresponent a les varietats *Cabernet Sauvignon* i *Merlot*, respectivament.

En el cas de les denominacions d'origen (*DOs*), es va avaluar l'efecte de l'anyada, de l'origen de producció i de la varietat de raïm, i s'observà una decreixent capacitat de discriminació entre les vinyes-mostra en aquest ordre. D'acord amb els resultats de l'anàlisi discriminant, en fixar la varietat, el 100% de les vinyes-mostra es varen classificar correctament segons l'anyada; i en fixar l'anyada, l'aplicació de l'anàlisi discriminant també va permetre la correcta classificació del 100% de les vinyes-mostra segons la *DO* a la qual pertanyien.

Així mateix, aquest estudi ha proporcionat als corresponents consells reguladors l'aval científic necessari per justificar, davant del Reglament Europeu (CE) núm. 479/2008, la vinculació geogràfica de les esmentades indicacions vitivinícoles a la seva zona de producció. I s'ha justificat la importància/necessitat de conèixer l'origen geogràfic d'un vi com a producte final i/o dels residus de vinificació com a subproductes del procés, com a punt de partida per fer-ne la caracterització fisicoquímica.

Dins la segona línia d'investigació, la caracterització fisicoquímica de la fracció de fibra dietètica i de la fracció fenòlica dels principals residus de vinificació, pasta premsada i rapa, de diferents varietats de raïm (*V. vinifera* L.), ha generat una completa base de dades que permet a la indústria alimentària seleccionar el subproducte i/o varietat més adequats en funció de les característiques requerides per a la possible formulació d'ingredients funcionals.

S'ha observat que tant la pasta premsada com la rapa constitueixen fonts potencials de fibra dietètica de qualitat i composts fenòlics amb elevada capacitat antioxidant, i es manifesta una important variabilitat qualitativa i quantitativa no només en funció del tipus de subproducte sinó també de la varietat de raïm considerada.

Pel que fa a la fracció de fibra dietètica, ambdós subproductes en varen presentar un elevat contingut (53 – 94%, base seca) amb adequades propietats funcionals (capacitat de retenció d'aigua: 3.8 – 10.7 g aigua/g concentrat de fibra; capacitat de retenció de lípids: 3.8 – 6.6 g oli/g concentrat de fibra) i una ràtio fibra insoluble / fibra soluble compresa entre 1.0 i 2.3, cosa que permetria beneficiar-se dels efectes fisiològics, nutricionals i tecnològics associats a ambdues fraccions de la fibra, soluble i insoluble.

En el cas de la pasta premsada, les pectines resultaren el principal polisacàrid de la paret cel·lular (33 – 54% dels polisacàrids de la paret cel·lular, CWP), mentre que a la rapa el component majoritari era la cel·lulosa (40 – 49% CWP), si bé cal destacar que aquest subproducte també constitueix una font important de pectines (27 – 41% CWP).

Respecte a la fracció fenòlica, malgrat que ambdós subproductes de vinificació varen mostrar un alt contingut de fenòlics totals, el de la rapa va ser entre 1.5 i 2.5 vegades més alt que el corresponent a la pasta premsada de la mateixa varietat, i s'observà el mateix comportament per a la capacitat antioxidant, independentment de la tècnica analítica emprada (ABTS, CUPRAC, FRAP, ORAC). Concretament, per a les varietats *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* i *Premsal Blanc*, la capacitat antioxidant de la rapa va ser entre 1.3 i 2.5 vegades superior a la de les corresponents pastes premsades.

S'ha realitzat una comparació i descripció detallada de la composició de flavan-3-ols d'ambdós residus per a diferents varietats de raïm (*V. vinifera* L.), i s'observà un perfil propi i característic en cada cas. En general, les pastes premsades presentaven un contingut més alt de monòmers (43 – 71% del total de flavan-3-ols) i trímers (5 – 9% del total de flavan-3-ols), però una quantitat més petita de dímers (23 – 48% del total de flavan-3-ols), que les corresponents rapes (monòmers: 30 – 50%, i dímers: 50 – 70% del total de flavan-3-ols).

En general, els valors del grau mitjà de polimerització (mDP) dels tanins condensats o proantocianidines varen ser més alts per la pasta premsada ( $mDP_{\text{pasta premsada}} = 4.5\text{--}10.1$ ) que per la rapa de la mateixa varietat ( $mDP_{\text{rapa}} = 4.6\text{--}8.5$ ).

La rapa de les varietats autòctones (*Callet*, *Manto Negre*, *Parellada*, *Premsal Blanc*) destacà d'entre les 10 varietats en estudi, pel seu més alt contingut en fenòlics totals (TP) i més gran capacitat antioxidant, especialment en el cas de la varietat *Callet* (TP =  $11525 \pm 886$  mg GA/100 g bs).

Finalment, dins la tercera línia de recerca de la present tesi doctoral, s'ha avaluat el procés d'extracció aquosa de la fracció fenòlica de la pasta premsada assistida mitjançant dos equips d'ultrasons de potència. S'observà que l'aplicació d'ultrasons millora el rendiment i/o eficàcia del procés respecte de l'extracció convencional (amb agitació mecànica).

En els experiments amb un plat transductor d'ultrasons, es va concloure que la freqüència i potència acústiques condicionen significativament el procés d'extracció, essent necessària la seva optimització per incrementar el rendiment del procés. Les dades experimentals de l'extracció de composts fenòlics i flavonols assistida acústicament, i de la capacitat antioxidant dels extractes, determinada mitjançant les tècniques CUPRAC i FRAP, es varen ajustar de forma significativa a un model quadràtic ( $p < 0.05$ ), capaç d'explicar satisfactòriament el comportament del sistema i de predir per interpolació les respostes en el domini experimental considerat.

Mitjançant l'aplicació de la metodologia de superfície de resposta, es varen estimar les condicions òptimes per a la màxima extracció acústica de composts fenòlics, flavonols i capacitat antioxidant de la pasta premsada, utilitzant aigua com a dissolvent. Els valors òptims obtinguts són 40 kHz de freqüència, 150 W/L de potència i un tractament de 25 min.

En els experiments amb una sonda d'ultrasons, es varen estudiar les cinètiques del procés d'extracció convencional i acústica, així com l'efecte de la temperatura sobre aquestes. S'observà un augment progressiu i significatiu del contingut de fenòlics totals i de la capacitat antioxidant dels extractes a mesura que augmentava la temperatura: els valors més elevats s'assoliren en el cas de l'extracció assistida acústicament.

L'aplicació d'ultrasons de potència va millorar el procés d'extracció. Així, segons els resultats experimentals obtinguts, les extraccions convencionals de fenòlics totals a 35 y 50 °C no presentaren diferències significatives ( $p > 0.05$ ) amb les assistides per ultrasons a 20 y 35 °C, respectivament. Respecte al temps d'operació, l'extracció acústica necessita de l'ordre de 3, 4 i 8 veges menys temps, a 20, 35 y 50 °C, que l'extracció control per a obtenir extractes amb les mateixes característiques.

Les corbes d'extracció obtingudes pel contingut de fenòlics totals i capacitat antioxidant, segons els mètodes ABTS i FRAP, de la pasta premsada s'han representat adequadament mitjançant el model de Weibull modificat (valors mitjans de la variància

explicada  $\geq 97.9\%$ , i de l'error relatiu mitjà,  $\leq 7.0\%$ ), tant per als processos d'extracció control com d'extracció acústica, dins el rang de temperatures 20 – 50 °C. Es va observar una elevada correlació ( $r^2 \geq 0.992$ ) entre els valors experimentals i els calculats per a tots els atributs en estudi.

Globalment, el treball experimental realitzat ha contribuït a la caracterització dels residus vitivinícoles, pasta premsada i rapa, com a matèria primera, així com del procés d'extracció aquosa assistida amb ultrasons de potència com a metodologia, per a l'obtenció d'ingredients funcionals rics en fibra i composts fenòlics que poden ser de gran interès en el camp de la indústria alimentària.



## RÉSUMÉ

Au cours des dernières décennies, l'industrie vitivinicole s'est intéressée à la revalorisation de ses résidus afin de répondre à la pression croissante du législateur sur sujet de l'atténuation des impacts environnementaux liés à la production du vin.

Les sous-produits de vinification constituent des sources potentielles de composés bioactifs d'intérêt majeur pour les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. A l'heure actuelle, dans le domaine de l'alimentation, leur utilisation dans une perspective d'obtention d'ingrédients fonctionnels est l'objet de nombreuses études.

Les travaux présentés à suivre ont pour objectif général d'évaluer l'utilisation de sous-produits issus de la vinification, marc et rafles, en tant que sources de fibre diététique et de composés phénoliques. Dans ce but, trois axes de recherche ont été privilégiés. Le premier s'est focalisé sur l'étude des indications vitivinicoles des Iles Baléares en vue de déterminer leurs caractéristiques différentielles sur la base de leur environnement géographique. Une fois ces différences reconnues et, par conséquent, une fois la différenciation entre résidus mise en évidence, une caractérisation de ces sous-produits de vinification issus de différentes variétés de raisin (*Vitis vinifera* L.) a été mise en œuvre. Ce deuxième axe de recherche avait pour objectif de mettre en évidence les variétés dont le marc et les rafles possèdent un meilleur potentiel de revalorisation du à leur composition tant en fibre diététique qu'en composés phénoliques. De son côté, le troisième axe de recherche a permis d'évaluer l'application des ultrasons de puissance en tant que technologie permettant de favoriser l'extraction des composés phénoliques du marc en utilisant l'eau comme dissolvant, maximisant ainsi son utilisation possible comme ingrédient fonctionnel.

Dans le premier axe de recherche, portant sur la différenciation de la qualité vitivinicole liée à l'origine géographique, un nombre représentatif de vignobles constitué des variétés *Merlot* et *Cabernet Sauvignon* appartenant à chacune des indications vitivinicoles existant au sein des Iles Baléares (4 IGP's et 2 AOs) a été considéré. Un échantillonnage de sol et de raisin, ainsi qu'un relevé des conditions climatiques et paysagères a été conduit dans chacun des vignobles; une approche statistique multivariée a ensuite été appliquée à la base de données.

A la lumière de ces premiers travaux, une méthodologie capable de différencier les indications vitivinicoles sur la base des caractéristiques du raisin ainsi que des caractéristiques agroclimatiques du *terroir*, sans inclure le facteur humain, a été proposée, qui corrobore l'existence historique des indications vitivinicoles des Iles Baléares.

Dans les cas des indications géographiques protégées (*IGPs*), les vignobles échantillonnés des quatre *IGPs* des Iles Baléares se sont distribués en quatre groupes différenciés dans le cadre d'une analyse en composantes principales basée sur les caractéristiques physico-chimiques du raisin, de la texture et de la fertilité de sols ainsi que sur les caractéristiques climatiques et paysagères du site. Les trois premiers composantes principales, deux représentatives des descripteurs agro-climatiques et une spécifique des caractéristiques du raisin, ont permis de discriminer les vignobles échantillonnés sur la base de leur origine géographique en expliquant respectivement 68% et 70% de la variance totale de la base de données correspondante aux variétés *Cabernet Sauvignon* et *Merlot*.

Dans le cas des appellations d'origine (*AOs*), l'effet de l'année, de l'origine de production et de la variété de raisin ont été évalués, avec un pouvoir discriminant décroissant des vignobles échantillonnés dans cet ordre. Une analyse discriminante complémentaire a permis, en fixant le facteur « variété », de correctement classer 100% des vignobles échantillonnés en fonction de l'année; en fixant le facteur « année », l'application de l'analyse discriminante a aussi permis une classification correcte de 100% des vignobles échantillonnés en accord avec leur *AO* d'origine.

Ainsi, dans le cadre de ces travaux un aval scientifique a pu être apporté aux gestionnaires pour justifier, face au règlement européen (CE) n° 479/2008, le lien géographique entre ces indications vitivinicoles de qualité et leur zone de production. De plus, l'accent a été mis au travers de cette étude sur l'importance/la nécessité de connaître l'origine géographique d'un vin en tant que produit final et/ou des résidus de vinification en tant que sous-produits du processus, comme point de départ de leur caractérisation physico-chimique.

Dans le second axe de recherche, la caractérisation physico-chimique de la fraction de fibre diététique et de la fraction phénolique des principaux résidus de vinification, le marc et les rafles, pour différentes variétés de raisin (*V. vinifera* L.), a généré une base de données complète permettant à l'industrie alimentaire de

sélectionner le sous-produit et/ou la variété la plus adéquate en fonction des caractéristiques requises pour la possible formulation d'ingrédients fonctionnels.

Cette étude a permis de démontrer que le marc et les rafles constituent des sources potentielles de fibre diététique et de composés phénoliques à capacité antioxydante élevée, avec une variabilité qualitative et quantitative importante, non seulement en fonction du sous-produit mais également en fonction de la variété de raisin considérée.

Les deux sous-produits ont présenté un taux élevé de fibre diététique (53-94%, matière sèche) avec des propriétés fonctionnelles adéquates (capacité de rétention de l'eau: 3.8-10.7 g eau/g concentré de fibre; capacité de rétention des lipides: 3.8-6.6 g huile/g de concentré de fibre) et un ratio fibre insoluble/fibre soluble compris entre 1.0 et 2.3. Ceci permettrait de bénéficier des effets physiologiques, nutritionnels et technologiques associés aux deux fractions de la fibre, soluble et insoluble.

Dans le cas du marc, les pectines ont représenté le principal polysaccharide de la paroi cellulaire (33 – 54% des polysaccharides de la paroi cellulaire, CWP), tandis que dans les rafles le composé majoritaire était la cellulose (40 – 49% CWP), même si ce sous-produit est également une source importante de pectines (27 – 41% CWP).

En ce qui concerne la fraction phénolique, bien que les deux sous-produits de vinification ont présenté un taux élevé en phénoliques totaux, celui des rafles était 1.5 à 2.5 fois plus important que celui des marcs pour la même variété. La même tendance a été relevée pour la capacité antioxydante, indépendamment de la technique analytique utilisée (ABTS, CUPRAC, FRAP, ORAC). Concrètement, pour les variétés *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* et *Premsal Blanc*, la capacité antioxydante des rafles était 1.3 à 2.5 fois plus importante que celle des marcs.

Une comparaison et une description détaillée de la composition en flavan-3-ols des deux résidus a été réalisée pour les différentes variétés de raisin (*V. vinifera* L.), qui a permis d'observer un profil propre et caractéristique pour chaque cas. En général, les marcs ont présenté un taux plus élevé de monomères (43 – 71% du total de flavan-3-ols) et de trimères (5 – 9% du total de flavan-3-ols), mais un taux plus faible en dimères (23 – 48% du total de flavan-3-ols), que les rafles correspondantes (monomères: 30 – 50% et dimères: 50 – 70% du total de flavan-3-ols).

En règle générale, les valeurs du degré de polymérisation (mDP) des tanins condensés ou proanthocyanidines ont été plus élevés pour les marcs ( $mDP_{\text{marc}} = 4.5 - 10.1$ ) que pour les rafles correspondantes de la même variété ( $mDP_{\text{rafles}} = 4.6 - 8.5$ ).

Les rafles des variétés autochtones (*Callet*, *Manto Negro*, *Parellada*, *Premsal Blanc*) se sont détachées, parmi les 10 variétés de l'étude, de par leur teneur plus élevée en phénoliques totaux (TP) ainsi que par leur plus grande capacité antioxydante, plus particulièrement dans le cas de la variété *Callet* ( $TP = 11525 \pm 886$  mg GA/100 g bs).

Enfin, dans le cadre du troisième axe de recherche de cette thèse, le processus d'extraction en phase aqueuse de la fraction phénolique du marc assistée par ultrasons de puissance a été évalué. Ces travaux ont permis d'observer que l'application d'ultrasons améliore le rendement et/ou l'efficacité par rapport à l'extraction conventionnelle (sous agitation mécanique).

Dans les expériences menées avec une plaque de transduction des ultrasons, il a été observé que la fréquence et la puissance acoustiques conditionnent de manière significative le processus d'extraction, l'optimisation de ce procédé étant cependant nécessaire pour augmenter encore le rendement du processus. Les données expérimentales de l'extraction de composés phénoliques et de flavonols assistée acoustiquement, et de la capacité antioxydante des extraits – déterminée via les techniques CUPRAC et FRAP, se sont ajustées de manière significative à un modèle quadratique ( $p < 0.05$ ), capable d'expliquer de manière satisfaisante le comportement du système et de prédire par interpolation les réponses dans le domaine expérimental considéré.

Les conditions optimales pour l'extraction acoustique de composés phénoliques, flavonols et de la capacité antioxydante du marc, en utilisant l'eau comme dissolvant ont été évaluées à l'aide de l'application de la méthodologie de surface de réponse. Les valeurs optimales obtenues ont été 40 KHz de fréquence, 150 W/L de puissance et une durée de traitement de 25 min.

Les cinétiques du processus d'extraction conventionnel et acoustique ainsi que l'effet de la température sur celles-ci ont été évalués dans le cadre d'expériences menées à l'aide d'une sonde à ultrasons. Une augmentation progressive et significative du contenu en phénoliques totaux et de la capacité antioxydante des extraits à mesure que

la température augmentait a été observé, pour atteindre les valeurs les plus élevées dans le cas de l'extraction assistée acoustiquement.

L'application d'ultrasons de puissance a permis d'améliorer le processus d'extraction. Ainsi, au vu des résultats expérimentaux obtenus, les extractions conventionnelles des phénoliques totaux à 35 et 50 °C n'ont pas présenté de différences significatives ( $p > 0.05$ ) par rapport à celles assistées par ultrasons à respectivement 20 et 35 °C. En ce qui concerne le temps d'extraction, l'extraction acoustique a nécessité de l'ordre de 3, 4 et 8 fois moins de temps, à 20, 35 et 50 °C, que l'extraction control pour obtenir des extraits avec les mêmes caractéristiques.

Les courbes d'extraction (extraction control et extraction acoustique) obtenues pour le contenu de phénoliques totaux et la capacité antioxydante, selon les méthodes ABTS et FRAP pour les marcs, ont été représentées à l'aide du modèle de Weibull modifié (valeurs moyennes de la variance expliquée  $\geq 97.9\%$ , erreur relative moyenne,  $\leq 7\%$ ), dans la gamme de température 20 – 50 °C. Une corrélation élevée ( $r^2 \geq 0.992$ ) a été observée entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour tous les attributs des extraits considérés dans cette étude.

Globalement, le travail expérimental réalisé a contribué à la caractérisation des résidus vitivinicoles, marc et rafles, en tant que matière première, ainsi qu'à celle du processus d'extraction en phase aqueuse assistée par ultrasons de puissance en tant que méthodologie, ceci pour l'obtention d'ingrédients fonctionnels riches en fibre et en composés phénoliques d'intérêt majeur dans le secteur de l'industrie alimentaire.



**ABSTRACT**

For the last decades, the wine industry is facing the potential exploitation of its residues in order to respond to the increasing legislative pressure about minimizing the environmental impact caused by winemaking.

Winery by-products are potential sources of bioactive compounds with interesting properties for the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Nowadays, their use to obtain functional ingredients is the subject of many studies in the food field.

The general aim of the present study is focused on the evaluation of the main winery by-products, grape pomace and stems, as sources of dietary fibre (DF) and phenolic compounds. In this context, three research lines were proposed. The first one was based on the study of the viticultural appellations from the Balearic Islands in order to evaluate their differentiation according to the geographical environment. Once this differentiation was recognized and, as a result, the differentiation among their residues, the physicochemical characterization of winery by-products from different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) was performed. Thus, this second research line was proposed to show those grape varieties whose pomace and stems exhibit the greatest potential for exploitation based on the content and composition of the DF and phenolic fractions. Finally, the third research line evaluated the application of power ultrasounds technology to assist phenolic extraction from grape pomace by using water as solvent, promoting and enhancing its food use as functional ingredient.

For the first research line, related to the viticultural quality differentiation according to the geographical origin, a representative number of both *Merlot* and *Cabernet Sauvignon* vineyards was selected from each vine-growing appellation of the Balearic Islands (4 *PGIs* and 2 *AOs*). Grapes and soil were sampled over the whole surface of each vineyard; climatic and landscape conditions were also recorded at each site, and multivariable statistical analysis was applied to the datasets.

This work provided a methodology for evaluating the appropriateness of the viticultural appellations recognition and differentiation, based on both the grape characteristics and the agroclimatic attributes of *terroir*, without considering the human factor. This methodology corroborated the historical existence of the viticultural appellations from the Balearic Islands.

In the case of the protected geographical indications (*PGIs*), vineyards-sample from the four *PGIs* of the Balearic Islands were distributed in four different clusters as a result of the application of principal component analysis (PCA) to physicochemical characteristics of grapes, soil texture and fertility, climate features and landscape conditions of the vineyards. The first three principal components, two related to agroclimatic features and a third one, to grape attributes, identified the behavior patterns of the vineyards-sample depending on their geographical origin. PCA results revealed that 68% of the total variance of the dataset in *Cabernet Sauvignon* and 70% in *Merlot* could be explained by the first three principal components.

In the case of the appellations of origin (*AOs*), the effect of vintage, winemaking area and grape variety on vineyards-sample differentiation was evaluated, by showing a decreasing capacity of separation in the same order. According to the discriminant analysis results, the 100% of the vineyards-sample were appropriately classified according to the vintage when setting the grape variety. In addition, by setting the vintage, the application of discriminant analysis also led to a 100% correct classification of the vineyards-sample according to the *AO*.

Furthermore, this study has provided to the regulatory boards the scientific evidence required in order to demonstrate the geographical entail of all these viticultural appellations to their winemaking area as specified by the Council Regulation (EC) no. 479/2008. Further, it has also been justified the need/importance to know the geographical origin either of a particular wine or also, of the winery by-products produced, as the starting point of their physicochemical characterization

In the second research line, the physicochemical characterization of both DF and phenolic fractions of the main winery residues, grape pomace and stems, from different grape varieties (*V. vinifera* L.), produced a complete database which might help to the food industry to select the most suitable by-product and/or grape variety, depending on the required properties, for functional ingredient formulation.

According to the results, grape pomace and stems are potential sources of high quality DF and phenolic compounds exhibiting high antioxidant capacity. Moreover, an important qualitative and quantitative variability was observed depending not only on the type of by-product but also on the grape variety considered.

With regard to the DF fraction, both winery by-products presented high amounts of fibre (53 – 94%, dry matter), with appropriate functional properties (water retention capacity: 3.8 – 10.7 g water/g fibre extract; fat adsorption capacity: 3.8 – 6.6 g oil/g fibre extract). In general, the ratio insoluble-soluble fibre was comprised between 1.0 and 2.3, indicating the potential benefits related to both fibre fractions, soluble and insoluble, which could be obtained from physiological, nutritional and technological points of views.

In the case of grape pomace, pectic polysaccharides were the main constituent of the cell walls (33 – 54% of cell wall polysaccharides, CWP), whereas cellulose was the predominant cell wall component identified for stem by-products (40 – 49% CWP). Nevertheless, this by-product could also be considered as an important source of pectic substances (27 – 41% CWP).

Regarding the phenolic fraction, despite both winery by-products showed a high total phenolic content, for the same grape variety stem phenolics were from 1.5 to 2.5 times higher than those found in grape pomace. A similar behavior was observed for the antioxidant capacity, regardless of the analytical technique used (ABTS, CUPRAC, FRAP, ORAC). In particular, the antioxidant capacity of stems from *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* and *Premisal Blanc* varieties, was between 1.3 and 2.5 times higher than the values determined for the corresponding grape pomace.

A detailed description of flavan-3-ol composition of both winery by-products was performed for the different grape varieties (*V. vinifera* L.) in study. A particular profile was observed in each case. In general, grape pomace presented higher monomer (43 – 71% from total of flavan-3-ols) and trimer (5 – 9% from total of flavan-3-ols) amounts, but a lower dimeric content (23 – 48% from total of flavan-3-ols), than the corresponding stems (monomers: 30 – 50%; and dimers: 50 – 70% from total of flavan-3-ols).

In general, a higher mean degree of polymerization (mDP) values of condensed tannins or proanthocyanidins were observed for grape pomace ( $\text{mDP}_{\text{pomace}} = 4.5 - 10.1$ ) than for stems of the same grape variety ( $\text{mDP}_{\text{stems}} = 4.6 - 8.5$ ).

It is noteworthy that stems from autochthonous varieties (*Callet*, *Manto Negro*, *Parellada*, *Premisal Blanc*) stand out clearly from the 10 grape varieties considered,

exhibiting the highest total phenolic contents (TP) and antioxidant capacities, especially for the *Callet* variety (TP = 11525 ± 886 mg GA/100 g dry matter).

Finally, the third research line focused on the evaluation of the aqueous extraction of the phenolic fraction from grape pomace acoustically assisted by using two different power ultrasound equipments. It was observed that the application of ultrasound energy improved the yield and/or the efficiency of the process when compared to the control extraction performed with mechanical stirring.

For the experiences using an ultrasonic transducer plate, it was concluded that variables such as the acoustic frequency and the power highly influenced the extraction process. Experimental data about the acoustic extraction of phenolic compounds and flavonols, and related to the antioxidant capacity of the obtained extracts, fitted significantly to a quadratic model ( $p < 0.05$ ), which was able to explain satisfactorily the behavior of the system and, also, to adequately predict the responses in the experimental domain.

The optimal conditions for the maximum acoustic extraction of phenolics, flavonols and antioxidant capacity from grape pomace, by using water as solvent, were estimated by application of response surface methodology. The optimum values were obtained using 40 kHz of frequency, 150 W/L of power and 25 min of working time.

For the experiences using an ultrasonic probe, the kinetic curves of the conventional extraction process (with magnetic stirring) were compared with those obtained from the extraction assisted with power ultrasounds. The effect of the temperature as also analyzed. A gradual and significant increase of total phenolic content and antioxidant capacity of the extracts was observed as the temperature increased, the highest values obtained in the case of the extraction assisted acoustically.

The application of power ultrasounds improved the extraction process. Thus, according to the experimental results, conventional extraction of phenolics at 35 and 50 °C did not differ significantly from extractions assisted with power ultrasounds at 20 and 35 °C, respectively. With regard to the extraction time, the acoustic process required about 3, 4 and 8 times less time, at 20, 35 and 50 °C, than the conventional extraction to obtain extracts with similar characteristics.

The extraction curves obtained for phenolic content and antioxidant capacity, measured by the ABTS and FRAP methods, were properly represented by the modified

Weibull model (average explained variance  $\geq 97.9\%$ , and average mean relative error  $\leq 7.0\%$ ) for both conventional and acoustic extractions within the temperature range 20 – 50 °C. A high correlation ( $r^2 \geq 0.992$ ) was observed between the experimental and simulated values for all the properties studied.

Overall, this experimental work has contributed, on the one hand, to the physico-chemical characterization of the main winery residues, grape pomace and stems, as raw materials for the production of DF and antioxidant rich extracts, and, on the other hand, the study has also established the main parameters related to the aqueous extraction assisted with power ultrasounds, as an appropriate methodology to obtain functional ingredients rich in DF and phenolic compounds, which may be of a great interest for the food industry.



## **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

### 1.1.1. El concepto de *terroir*

El término *terroir* nació con el propósito de explicar la correlación que parece existir entre los atributos sensoriales del vino y el ecosistema de la viña que ha proporcionado la uva como materia prima (Morlat and Bodin, 2006; Formica, 2007). Debido a la falta de un consenso global sobre su significado en el mundo vitivinícola, se han establecido numerosas definiciones que pueden descomponerse en cuatro nociones básicas (agrocultural, territorial, de identidad y publicitaria), todas ellas marcadas por los conceptos clave de origen, tipicidad, especificidad y calidad (**Figura 1.1**) (Vaudour, 2003).



**Figura 1.1.** Nociones básicas del concepto de *terroir*.

En base a ello, para establecer un marco de referencia, cabe apuntar a las siguientes definiciones propuestas en la bibliografía:

*“El terroir es un agro-ecosistema particular, dotado de la capacidad de ofrecer productos a los que confiere una originalidad y carácter propios. Se basa en un sistema de interacciones complejas entre las técnicas vitícolas y enológicas, la producción agrícola y el entorno físico en el que se desarrolla”* (Salette et al., 1998)

“*El terroir puede definirse como una entidad espacial y temporal caracterizada por atributos homogéneos del suelo, paisaje, clima y topografía a una escala determinada, así como por factores biológicos (especie, variedad) y humanos (aspectos sociales y técnicos, patrimonio cultural, experiencia e historia enológica)*” (Vaudour and Shaw, 2005)

Ambas definiciones mantienen una visión del *terroir* fundamentada en la proyección simultánea de múltiples y complejas interacciones entre el clima, el suelo, el paisaje y la viña, en un territorio concreto marcado por una técnica, experiencia y/o tradición vitícola y enológica determinadas. Así pues, el concepto de *terroir* puede explicar la identidad propia de la uva (o de los subproductos derivados) y/o el carácter y originalidad de un vino en función de su origen geográfico.

La expresión del *terroir* es tan compleja que, en los últimos años, numerosos estudios han tratado de determinar el grado de interacción entre la uva, mosto o vino y el ecosistema natural, de acuerdo con uno de los tres principales generadores de tipicidad en la viña –clima, suelo y paisaje– (Mouton, 2006).

#### **1.1.1.1. Clima**

La temperatura, la pluviometría y la exposición solar son las variables climáticas que ejercen una mayor influencia sobre los cultivos agrícolas (Hidalgo, 2002). Actualmente, son diversos los estudios que analizan sus efectos en diferentes cultivos, tales como la quinoa (Bois *et al.*, 2006), el trigo (Li *et al.*, 2010) o el arroz (Mohammed and Tarpley, 2010).

En el campo de la viticultura, Bergqvist *et al.* (2001) examinaron el efecto de la exposición solar sobre la intensidad de color, la acumulación de antocianos y el contenido total de compuestos fenólicos en uvas de las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Garnacha*. Se observó un incremento de los tres parámetros directamente proporcional a la exposición solar indirecta, sugiriendo que el efecto de la radiación en la composición de la uva depende de la temperatura adquirida durante la exposición. Spayd *et al.* (2002) llegaron a conclusiones muy similares en uva de la variedad *Merlot*, señalando además el efecto negativo de una exposición solar directa. Sin embargo, Price *et al.* (1995) indicaron que la concentración de flavonoles, antocianos y quercetina en uvas de *Pinot Noir* se veía notablemente favorecida por una exposición solar moderada-alta.

Estas conclusiones contradictorias se generan en base a que la temperatura y la radiación ligadas a la exposición solar no presentan efectos independientes. No obstante, puede concluirse que, en términos generales, temperaturas diurnas y nocturnas moderadas (15 – 25 °C) favorecen la biosíntesis y acumulación de polifenoles en la uva, mientras que temperaturas elevadas (> 35 °C) pueden afectar negativamente a través de su degradación y/o de la inhibición de su ruta biosintética (Yasui *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2005).

#### **1.1.1.2. Suelo**

El efecto ejercido por el suelo también ha sido evaluado en la bibliografía, ya que éste proporciona a la planta los nutrientes, agua, oxígeno y soporte mecánico necesarios para su desarrollo (Wang *et al.*, 2003). Algunos trabajos analizan el efecto del régimen de agua del viñedo sobre el contenido en polifenoles de la uva o el perfil aromático del vino (Kennedy *et al.*, 2002; Ojeda *et al.*, 2002; Koundouras *et al.*, 2006). En ellos, se han observado dos respuestas al déficit de agua en la viña: i) una influencia indirecta y siempre positiva sobre la concentración fenólica debido a la reducción del tamaño de las bayas; y ii) un efecto directo sobre las rutas biosintéticas, que puede ser positivo o negativo dependiendo del tipo de compuesto fenólico, el momento del ciclo vegetativo de la viña y la gravedad del déficit de agua.

En la última década, se ha examinado más detenidamente el efecto de la textura y fertilidad de los suelos. En esta línea de investigación, cabe destacar el trabajo de Choné *et al.* (2001) en el que se estudió la influencia del suelo, en términos de materia orgánica y textura, sobre la composición y calidad de la uva, mosto y vino de *Cabernet Sauvignon* en el área del Médoc (Francia). Los autores apuntaron que el déficit de nitrógeno en el suelo tenía un efecto positivo sobre la concentración de antocianos y taninos del vino, a pesar de la pérdida de vigor de la planta y del bajo rendimiento en la producción. Por su parte, Andrés de Prado *et al.* (2007) llegaron a la conclusión de que en suelos más fértiles y con mayor capacidad de retención de agua se obtenían vinos con menor contenido en polifenoles, menor intensidad de color y menor calidad aromática.

Gómez-Míguez *et al.* (2007) realizaron análisis del color y perfil aromático de vinos blancos de la *DO Condado de Huelva* (España), con la finalidad de evaluar el efecto que ejerce sobre ellos la composición en arcilla-arena de los suelos. De acuerdo

con los estudios anteriores, se confirmó nuevamente que las características del suelo pueden influir de forma directa en el color y aroma del vino.

#### **1.1.1.3. Paisaje**

Por su parte, la influencia del paisaje, entendido como una combinación de características geológicas y topográficas, sobre las características de la uva y/o del vino, no ha sido estudiada tan extensamente. En el trabajo realizado por Mateus *et al.* (2001), se estudió el efecto de la altura del viñedo en la composición fenólica de las variedades de uva *Touriga Nacional* y *Touriga Francesa*, observándose que una menor altitud favorece la biosíntesis de catequinas, oligómeros de bajo peso molecular y proantocianidinas. No obstante, los mismos autores (Mateus *et al.*, 2002) concluyeron que la biosíntesis de antocianos, en las mismas variedades de uva, mostraba un efecto inverso, observándose mayores concentraciones a mayor altura del cultivo.

#### **1.1.1.4. Conjunción de factores**

Resulta difícil estudiar el efecto de todos los parámetros que definen el *terroir* en un solo experimento, pero desligar cada uno de ellos del resto para evaluar su efecto individual, no evidencia realmente el funcionamiento del *terroir* (Van Leeuwen *et al.*, 2004). Tal y como se ha podido observar, son numerosos los autores que han estudiado el impacto de un único factor, ya sea del suelo, climático o paisajístico, sobre la calidad de la uva, mosto o vino. Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se ha evaluado el efecto combinado de varios componentes del *terroir*, para obtener una visión más real de cómo las complejas interacciones que definen el origen geográfico determinan el comportamiento de la viña.

En el estudio de Tesic *et al.* (2002a) se evaluaron algunos factores del clima y del suelo determinantes en las etapas fenológicas del viñedo, con el objeto de relacionar la precocidad en la floración y el envero con la composición de la uva y los atributos del vino. Estos mismos autores desarrollaron el “*índice de emplazamiento*”, como una combinación de dichos atributos del clima y del suelo, y lo correlacionaron con diferentes variables vitícolas (Tesic *et al.*, 2002b). Por su parte, Van Leeuwen *et al.* (2004) estudiaron el efecto de algunos factores del clima y del suelo sobre el crecimiento y desarrollo de la viña, indicando el porcentaje de varianza atribuible a cada parámetro analizado. Sin embargo, ninguno de estos trabajos estudió las relaciones existentes entre dichos factores ni su efecto conjunto sobre la composición de la uva.

Para estudiar la combinación de efectos que definen el *terroir* y reconocer los patrones geográficos que derivan de ello, se pueden aplicar diferentes técnicas estadísticas de análisis multivariable, de entre las cuales el análisis de componentes principales (ACP), el análisis discriminante (AD) y el análisis de clusters (AC) son las utilizadas con mayor frecuencia (Gonzálvez *et al.*, 2009).

La aplicación del ACP permite explicar la relación existente entre las diferentes variables consideradas, así como visualizar la agrupación natural de las muestras en estudio en base a la mejor combinación lineal de dichas variables. En la literatura, diferentes autores utilizan esta técnica estadística multivariable para explicar los patrones aromáticos de vinos procedentes de diferentes regiones vitivinícolas (Douglas *et al.*, 2001; Kallithraka *et al.*, 2001; Goldner and Zamora, 2007; Vilanova *et al.*, 2007; Rezaei and Reynolds, 2010).

Cuando las regiones geográficas están próximas entre sí, la discriminación resulta algo más complicada, dado que las diferencias en el clima, suelo y paisaje pueden ser más reducidas. En estos casos puede hacerse uso del AD, que permite la diferenciación de las muestras en base a una combinación lineal de las variables que maximiza la varianza inter-categorías y la minimiza dentro de una misma categoría. Asimismo puede utilizarse el AC, que pone de manifiesto la asociación natural de las muestras en estudio en función de sus similitudes o diferencias de acuerdo con las variables consideradas (Mulet *et al.*, 1992; Gonzálvez *et al.*, 2009).

Se han publicado diferentes estudios que muestran la utilidad de estos tratamientos estadísticos multivariados en la identificación y discriminación de mostos y/o vinos en base a parámetros enológicos clásicos (Mulet *et al.*, 1992; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1993), composición fenólica (Pérez-Magariño and González-San José, 2001; Rodríguez-Delgado *et al.*, 2002; De Villiers *et al.*, 2005; González-Neves *et al.*, 2007), perfil aromático (Forcén *et al.*, 1993; Câmara *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010), composición en elementos químicos o sus isótopos (Gremaud *et al.*, 2004; Thiel *et al.*, 2004; Coetzee *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2007; Gonzálvez *et al.*, 2009; Paneque *et al.*, 2009; Fabani *et al.*, 2010; Paneque *et al.*, 2010), y atributos sensoriales (Rezaei and Reynolds, 2010), entre otros. Dichas investigaciones atribuyen las diferencias entre los mostos y/o vinos en estudio a su diferente origen geográfico. Sin embargo, no sólo ninguna variable del entorno agroclimático se incluye en el análisis,

sino que además, al estar tratando con mostos y/o vinos, todos estos estudios tienen en cuenta el factor humano de forma inherente.

Dado que toda región vitivinícola posee una tradición e historia propias, en la elaboración del vino el factor humano puede jugar un papel muy significativo en la diferenciación del producto final de una zona vitivinícola con respecto a otra. De modo que podría plantearse la pregunta de si dicha diferenciación está propiciada por los enólogos o si éstos simplemente amplifican las diferencias ya existentes previamente en la materia prima como consecuencia del entorno agroclimático de la viña.

Sin embargo, no se han encontrado en la bibliografía estudios que, en base a un concepto global de *terroir*, evalúen cómo los factores naturales, considerados como una combinación de las características de la uva, el clima, el suelo y el paisaje, influyen en la diferenciación de las regiones vitivinícolas o indicaciones vitivinícolas de calidad.

### **1.1.2. Indicaciones de calidad para el vino**

Desde la década de los '80, los consumidores europeos han orientado sus preferencias alimentarias hacia productos de mayor calidad y con características que los diferencien del resto. Para evitar imitaciones y no poner en peligro la reputación de los productos, las administraciones públicas (a nivel europeo, estatal y regional) han optado en los últimos años por regular el uso del término 'calidad', así como de otras expresiones que puedan sugerir una distinción o excelencia frente al resto de productos similares, y han desarrollado diferentes sistemas de certificación para garantizar su autenticidad al consumidor. En general, se trata de productos con identidad territorial (Vera *et al.*, 2011).

Los vinos, al igual que otros alimentos, pueden acogerse a figuras legales de protección de la calidad. Ello resulta de gran interés para los elaboradores debido a que despunta la identidad y personalidad propia del producto ante un mercado en creciente globalización, al mismo tiempo que proporciona criterios decisivos de aceptabilidad para el consumidor en términos de garantía de calidad (Galgano *et al.*, 2008; Tonietto, 2008).

La producción de vinos europeos se fundamenta en un sistema de distribución territorial basado en la existencia de figuras legales de protección de la calidad, concretamente, las Denominaciones de Origen (*DOs*) y las Indicaciones Geográficas

Protegidas (*IGPs*), en cuya regulación y delimitación geográfica el *terroir* juega un papel muy importante (Douglas *et al.*, 2001).

A efectos del artículo 34 del Reglamento Europeo (CE) nº 479/2008 del Consejo de 29 de abril de 2008 por el que se establece la nueva organización común del mercado vitivinícola (2008), se entiende por:

- ‘*Denominación de Origen*’: el nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto vitivinícola que cumple los requisitos siguientes:
  - su calidad y sus características se deben básica o exclusivamente a un entorno geográfico particular, con los factores naturales y/o humanos inherentes a él;
  - las uvas utilizadas en su elaboración proceden exclusivamente de esa zona geográfica;
  - la elaboración tiene lugar en dicha zona geográfica;
  - y se obtiene de variedades de vid de la especie *Vitis vinifera*.
- ‘*Indicación Geográfica Protegida*’: el nombre que se refiere a una región, a un lugar determinado o, en casos excepcionales, a un país, que sirve para designar un producto vitivinícola que cumple los requisitos siguientes:
  - posee una calidad, una reputación u otras características específicas atribuibles a su origen geográfico;
  - al menos el 85% de la uva utilizada en su elaboración procede exclusivamente de esa zona geográfica;
  - la elaboración tiene lugar en dicha zona geográfica;
  - se obtiene de variedades de vid de la especie *Vitis vinifera* o de un cruce entre esta especie y otras especies del género *Vitis*.

Tal y como se deriva de dichas definiciones, en ambos casos, el concepto comunitario de vino de calidad se basa en la atribución de sus características propias al entorno geográfico involucrado en su elaboración.

Según el artículo 35 del Reglamento Europeo (CE) nº 479/2008 sobre el contenido de la solicitud de protección de la calidad, todo expediente debe incluir una explicación detallada que confirme el vínculo entre el producto vitivinícola a proteger y el origen geográfico del mismo. Igualmente, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 51 de la misma directiva, aquéllas indicaciones de calidad que ya dispongan de

la protección que brinda el antiguo Reglamento (CE) nº 1493/1999 quedan automáticamente protegidas por el presente. No obstante, la Comisión Europea tiene la posibilidad de decidir la cancelación de las mismas hasta el 31 de diciembre de 2014, en el caso de que no se demuestre que cumplen con los requisitos establecidos en su definición como indicaciones de calidad (artículo 34).

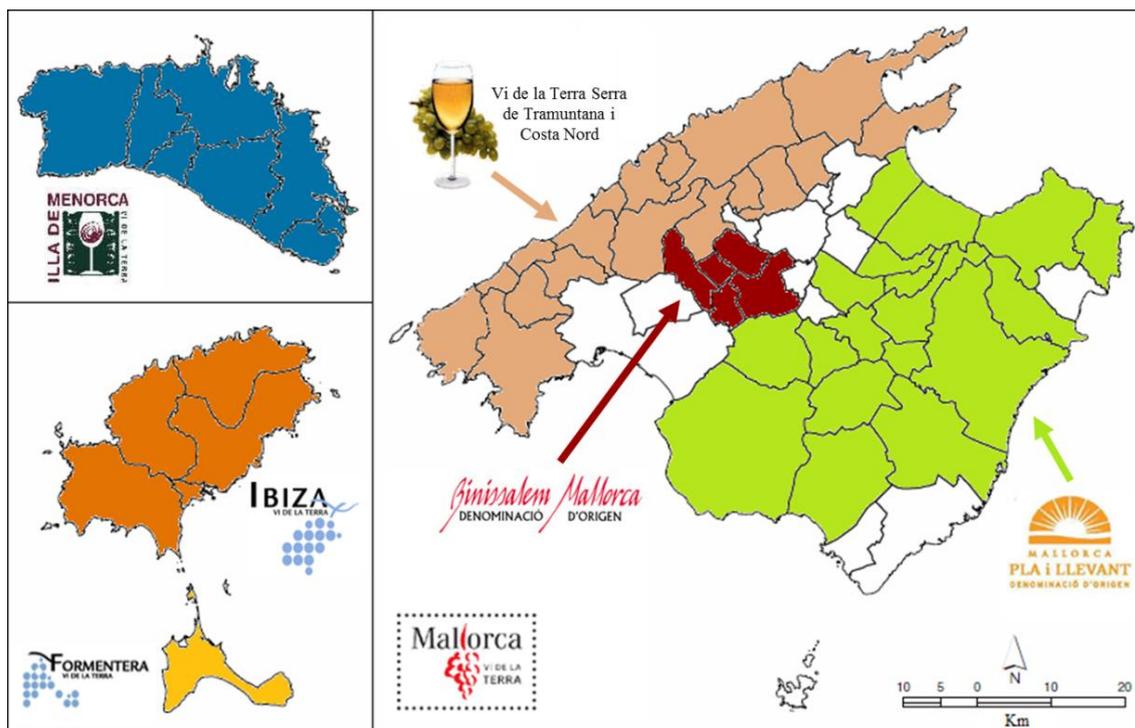
Así pues, ante el posible riesgo de que la protección se vea afectada, resulta de gran importancia establecer la diferenciación de la calidad ligada al origen, es decir, justificar que las características diferenciales de cada indicación de calidad son consecuencia de la huella que el territorio imprime sobre la uva como materia prima utilizada, manifestándose ésta en el vino derivado de la misma.

En la actualidad, España dispone de un total de 69 *DOs* y 41 *IGPs* vitivinícolas (ICEX España Exportación e Inversiones, 2013).

En el caso concreto de las Islas Baleares, los sectores de la agricultura, ganadería y pesca han luchado en las últimas décadas por mantener los productos tradicionales de la tierra, adaptándose progresivamente a las continuas exigencias del consumidor. Dicho esfuerzo ha sido siempre respaldado por la administración pública, quien se ha encargado de establecer diferentes indicaciones de calidad en los diversos sectores agroalimentarios.

La región vitivinícola de las Islas Baleares (España) dispone de un total de siete indicaciones de calidad, concretamente, dos Denominaciones de Origen (*DOs*) y cinco Indicaciones Geográficas Protegidas (*IGPs*) (**Figura 1.2**). En la isla de Mallorca coexisten de forma limítrofe la *DO Binissalem* y la *DO Pla i Llevant*, aprobadas en 1989 y 1999, respectivamente. Éstas comparten el territorio insular mallorquín con dos de las *IGPs*: *Vi de la Terra Serra de Tramuntana i Costa Nord*, que ampara los vinos producidos en el noreste de la isla (zona de la Serra de Tramuntana), y *Vi de la Terra Mallorca*, mención utilizada para los vinos elaborados en cualquier municipio de la misma. Las otras tres *IGPs* se localizan en cada una de las islas restantes: *Vi de la Terra Illa de Menorca*, *Vi de la Terra Ibiza* y *Vi de la Terra Formentera* (Rosselló *et al.*, 2003).

En 2012, el conjunto de las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares contaron con casi 1300 ha de superficie inscrita de viñedo (**Tabla 1.1**), destinando aproximadamente el 52% del mismo para la producción de vinos con *DO* y el 48% restante para la elaboración de *Vins de la Terra* (*IGPs*).



**Figura 1.2.** Indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares.

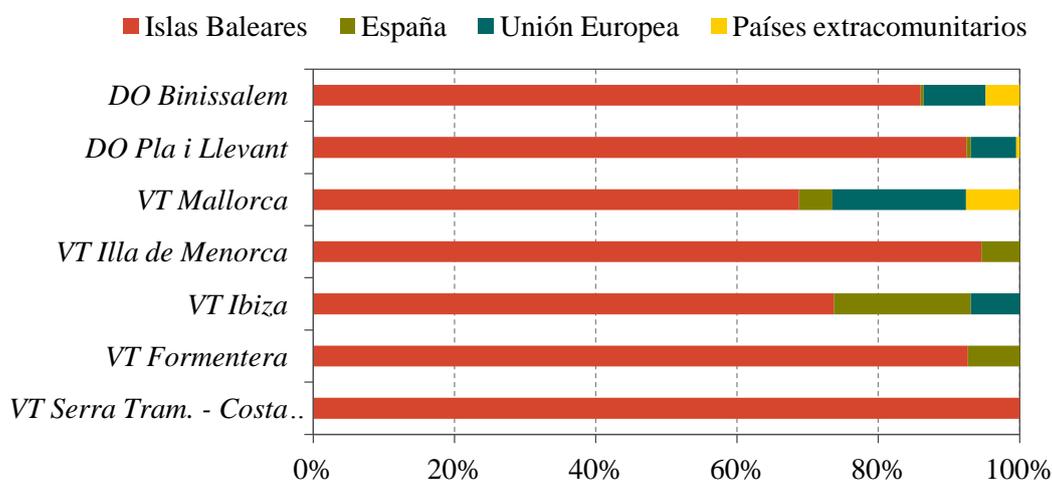
Se trata de una región vitivinícola relativamente pequeña comparada con otras del territorio español y/o europeo. Sin embargo, desde la aparición de la primera *DO* en 1989, ha sufrido un crecimiento importante en cuanto a la producción de uva (desde las 1166 Ton en 1995 hasta las 7494 Ton en 2012), la elaboración de vino (de 7966 hL en 1995 a 48682 hL en 2012) y la comercialización en el mercado exterior (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1.** Datos de superficie, producción de uva y elaboración de vino de las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares en el año 2012.

Indicación de calidad	Nº de bodegas adscritas	Superficie de viña (ha)	Producción de uva (Ton)	Elaboración de vino (hL)
<i>DO Binissalem</i>	13	424	2606	17040
<i>DO Pla i Llevant</i>	14	240	1661	11096
<b>Total DOs</b>	<b>27</b>	<b>664</b>	<b>4267</b>	<b>28136</b>
<i>VT Mallorca</i>	29	506	2761	17528
<i>VT Illa de Menorca</i>	7	27	125	824
<i>VT Ibiza</i>	5	50	273	1822
<i>VT Formentera</i>	2	16	34	193
<i>VT Serra Tramuntana i Costa Nord</i>	4	9	34	179
<b>Total IGPs</b>	<b>47</b>	<b>611</b>	<b>3227</b>	<b>20546</b>

El principal mercado de comercialización de los vinos con indicación de calidad de las Islas Baleares es la propia comunidad autónoma (**Figura 1.3**). En 2010, las ventas locales representaron entre el 69 y 95% del total, según la indicación de calidad considerada, exceptuando el *VT Serra de Tramuntana i Costa Nord*, cuyos vinos se venden íntegramente en las Islas Baleares. En general, el resto de España constituye el segundo destino principal de las ventas. En 2010, representó porcentajes pequeños en el caso de las *DOs* (< 1%), pero relativamente importantes en el caso de las *IGPs*, variando entre el 5% para *VT Mallorca* y el 19% para *VT Ibiza*. Cabe indicar que *VT Illa de Menorca* y *VT Formentera*, limitan la venta de sus vinos al mercado nacional.

En cuanto a las exportaciones, éstas han sufrido un crecimiento importante en los últimos años. A nivel de la Unión Europea, el principal destino es Alemania, seguida de países como Bélgica, Francia, Austria, Holanda, Finlandia, Dinamarca y/o Reino Unido. En cuanto a las ventas extracomunitarias, Suiza adquiere la mayor parte de las exportaciones, aunque también destacan destinos como EE.UU., China, México o Japón, entre otros (Vera *et al.*, 2011).



**Figura 1.3.** Mercados de comercialización de los vinos con indicación de calidad de las Islas Baleares en 2010.

En general, todas las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares atienden a un cultivo tradicional de la viña, así como a una elaboración propia basada en el patrimonio cultural e histórico y la tradición enológica de la región. Los vinos amparados bajo la protección de cada una de las siete indicaciones de calidad mencionadas se rige por un reglamento propio que define desde las variedades de uva autorizadas hasta las zonas de producción y elaboración del vino (**Tabla 1.2**).

**Tabla 1.2.** Variedades de uva autorizadas y municipios de producción de las indicaciones vitivinícolas de calidad de las Islas Baleares.

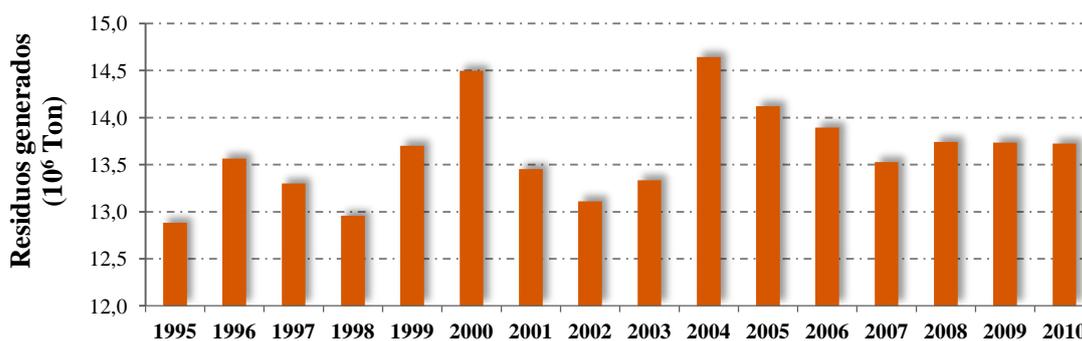
	<b>Año de creación</b>	<b>Variedades de uva autorizadas</b>	<b>Municipios de producción</b>
<b>DO Binissalem</b> 	1989	Chardonnay, Macabeu, Prensal Blanc <sup>a</sup> , Moscatel, Parellada	Cabernet Sauvignon, Callet <sup>a</sup> , Manto Negro <sup>a</sup> , Merlot, Monastrell, Syrah, Tempranillo Binissalem, Consell, Santa Maria del Camí, Santa Eugènia y Sencelles Reglamento: BOIB nº 177 de 24/11/2005
<b>DO Pla i Llevant</b> 	1999	Chardonnay, Macabeu, Prensal Blanc, Moscatel, Parellada, Riesling	Cabernet Sauvignon, Callet, Merlot, Fogoneu, Manto Negro, Monastrell, Pinot Noir, Syrah, Tempranillo Algaida, Ariany, Artà, Campos, Capdepera, Felanitx, Lluçmajor, Manacor, Maria de la Salut, Montuïri, Muro, Petra, Porreres, Sant Joan, Sant Llorenç des Cardassar, Santa Margalida, Sineu y Vilafranca de Bonany Reglamento: BOIB nº 55 de 1/04/2005
<b>VT Serra de Tramuntana i Costa Nord</b> 	2002	Chardonnay, Macabeu, Malvasia, Prensal Blanc, Moscatel, Parellada, Sauvignon Blanc	Cabernet Sauvignon, Callet, Manto Negro, Merlot, Monastrell, Syrah, Tempranillo Alaró, Alcúdia, Andratx, Banyalbufar, Bunyola, Calvià, Campanet, Deià, Escorca, Estellencs, Esporles, Fornalutx, Mancor de la Vall, Pollença, Puigpunyent, Selva, Sóller y Valldemossa Reglamento: BOIB nº 185 de 8/12/2005
<b>VT Illa de Menorca</b> 	2002	Chardonnay, Macabeu, Malvasia, Prensal Blanc, Moscatel, Parellada	Cabernet Sauvignon, Merlot, Monastrell, Syrah, Tempranillo Todos los municipios de la Isla de Menorca Reglamento: BOIB nº 181 de 1/12/2005
<b>VT Ibiza</b> 	2003	Chardonnay, Macabeu, Malvasia, Moscatel, Parellada	Cabernet Sauvignon, Merlot, Monastrell, Syrah, Tempranillo Todos los municipios de la Isla de Ibiza Reglamento: BOIB nº 79 de 5/06/2003
<b>VT Formentera</b> 	2004	Chardonnay, Malvasia, Prensal Blanc	Cabernet Sauvignon, Fogoneu, Merlot, Monastrell, Tempranillo Isla de Formentera Reglamento: BOIB nº 110 de 10/08/2004
<b>VT Mallorca</b> 	2007	Chardonnay, Macabeu, Malvasia, Prensal Blanc, Moscatel de Alejandría, Parellada, Riesling, Sauvignon Blanc	Cabernet Sauvignon, Callet, Merlot, Fogoneu, Manto Negro, Monastrell, Pinot Noir, Syrah, Tempranillo Todos los municipios de la Isla de Mallorca Reglamento: BOIB nº 57 de 17/04/2007

<sup>a</sup> Variedades autóctonas de las Islas Baleares.

A pesar de que el reconocimiento legal de las siete indicaciones vitivinícolas de calidad de la región balear data de los últimos 20 años, la diferenciación entre sus vinos siempre ha sido social e históricamente reconocida. Según los viticultores de las Islas, la existencia de dichas indicaciones de calidad queda justificada a partir de las características geoclimáticas de la región, siendo ellas las que permiten la obtención de vinos con una personalidad propia, notablemente reforzada por la presencia de variedades autóctonas. No obstante, su existencia no ha sido aún demostrada en base a los factores naturales del entorno geográfico, de acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento Europeo N° 479/2008 (2008).

### 1.1.3. Subproductos de vinificación

De acuerdo con la 10ª Asamblea Internacional de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, Izmir, 2012), con una producción global de 68 millones de toneladas en 2010, la uva es considerada la principal cosecha frutal a nivel mundial. Teniendo en cuenta que ~ 80% de la producción se destina a la elaboración de vino, y que dicho proceso genera grandes cantidades de residuos sólidos que pueden representar hasta el 30% de la uva utilizada (Makris *et al.*, 2007a), los subproductos derivados de la industria vitivinícola superaron los 13.5 millones de toneladas en 2010 (**Figura 1.4**). Dado que los principales países productores y exportadores de vino son Francia, Italia y España, en el continente europeo se genera entre el 56% y 67% de los mismos. Por su parte, el estado español aporta del 7 al 16% de los residuos producidos a nivel mundial.

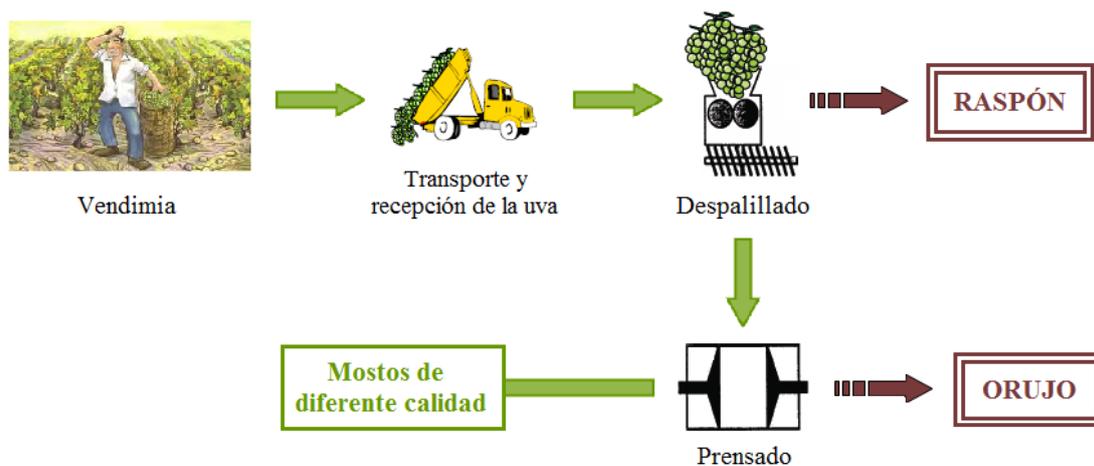


**Figura 1.4.** Generación anual de residuos vitivinícolas a nivel mundial en el período 1995 – 2010.

Debido al carácter estacional de la elaboración del vino y a la gran demanda química y biológica de oxígeno que presentan los residuos vitivinícolas, el almacenamiento, transformación y/o eliminación de tal cantidad de subproductos

constituye un serio problema en términos ecológicos y económicos (Negro *et al.*, 2003; González-Paramás *et al.*, 2004). Por ello, en las últimas décadas, la industria vitivinícola está encarando la potencial revalorización de sus residuos, promoviendo así una agricultura sostenible al mismo tiempo que haciendo frente a la creciente presión legislativa sobre la mitigación del impacto medioambiental de sus actividades (CCE, 2006).

La cantidad y composición de los residuos derivados del proceso de vinificación dependen de la variedad de uva considerada y de las prácticas enológicas aplicadas (Schieber *et al.*, 2001). Los principales subproductos sólidos, raspón y orujo, se generan, respectivamente, en las etapas de despalillado y prensado (**Figura 1.5** y **Figura 1.6**) (Ruberto *et al.*, 2007). De forma adicional, tanto en la elaboración de vinos blancos, rosados como tintos, se obtiene toda una serie de lías y/o fangos ligados a las operaciones de trasiego, fermentación y clarificación; así como un volumen importante de aguas residuales a raíz de la limpieza y desinfección de los equipos (Torrijos and Moletta, 2000).

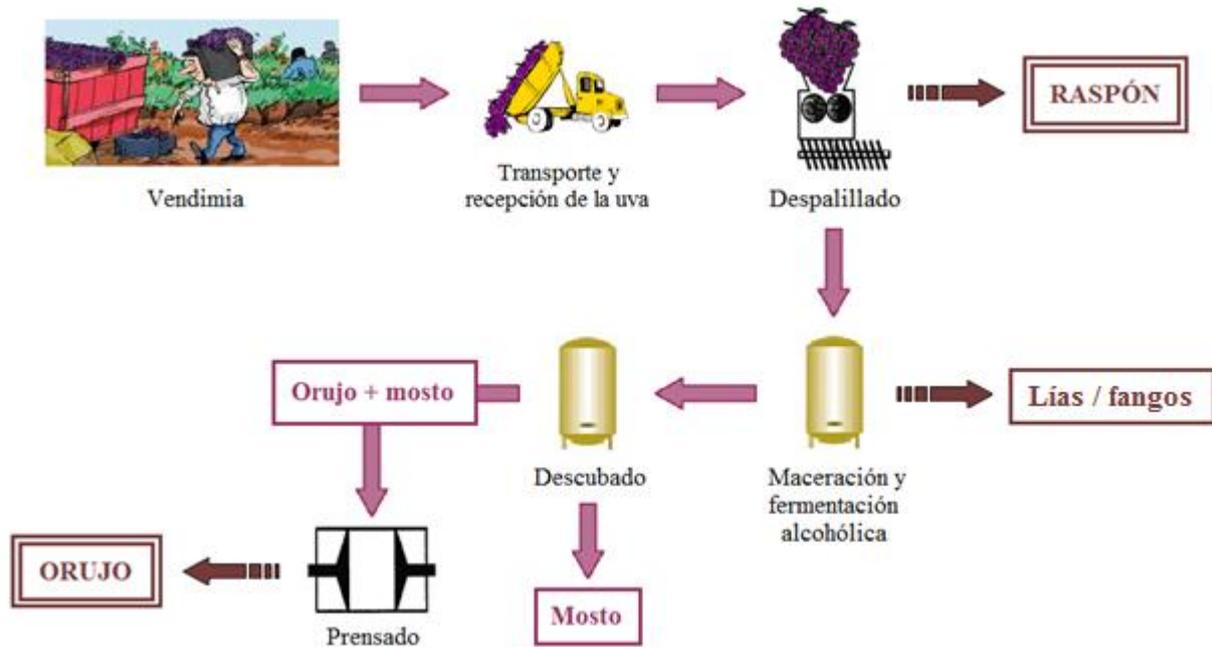


**Figura 1.5.** Elaboración de vinos blancos. Etapas del proceso donde se generan los principales residuos vitivinícolas.

El orujo está constituido por piel, pepitas y restos de pulpa de uva. Puede tratarse de orujo fresco, cuya obtención tiene lugar el mismo día de la vendimia (caso de las variedades blancas y de las tintas sólo para la producción de vino rosado), o de orujo fermentado, que se obtiene tras 2 – 3 semanas de maceración (caso de las variedades tintas para la producción de vino tinto). El orujo representa entre el 10 y 20%, en unidades de peso fresco, de la uva procesada en la elaboración del vino, oscilando su

contenido en pepitas entre un 20 – 30% en función de la variedad (García-Marino *et al.*, 2006).

Por su parte, el raspón o escobajo es el elemento leñoso del racimo de uva que sirve de soporte para las bayas. En unidades de peso fresco, este subproducto representa entre el 2 y el 8% del racimo (Panouillé *et al.*, 2007).



**Figura 1.6.** Elaboración de vinos tintos. Etapas del proceso donde se generan los principales residuos vitivinícolas.

Ambos residuos vitivinícolas son muy heterogéneos, presentando cada uno de ellos una composición propia que, a su vez, depende de la variedad de uva considerada (Cruz *et al.*, 2004). No obstante, tanto el orujo como el raspón constituyen fuentes naturales particularmente ricas en fibra alimentaria y en una amplia gama de compuestos fenólicos (Guendez *et al.*, 2005; Llobera and Cañellas, 2007). Ello se debe, por una parte, a que la fracción de fibra de ambos subproductos vitivinícolas (orujo fresco y raspón) no sufre mayores modificaciones durante el proceso de vinificación. Por otra parte, el perfil y contenido polifenólico original del raspón se preservan prácticamente intactos debido a que dicho subproducto se descarta directamente (Makris *et al.*, 2008). Y en cuanto al contenido polifenólico de pieles y pepitas, que puede representar hasta el 75% del total presente en las uvas (Ghafoor *et al.*, 2011), éste se transfiere al mosto durante las etapas de estrujado y/o fermentación. Sin embargo, se trata de una extracción parcial e incompleta (sólo el 30 – 40% del total en pieles y

pepitas), razón por la que grandes cantidades de compuestos fenólicos persisten aún en el orujo tras el prensado (Saura-Calixto, 1998; Alonso *et al.*, 2002; Rockenbach *et al.*, 2011).

Durante décadas los residuos vitivinícolas han sido utilizados como alimento animal o como abono orgánico para suelos (Hidalgo Togores, 2003). No obstante, numerosos estudios han indicado que algunos animales, especialmente los rumiantes, pueden manifestar intolerancia a ciertos componentes de dichos subproductos, como por ejemplo a los taninos, que afectan a la digestión (Baumgaertel *et al.*, 2007). Recientemente, también se ha demostrado el efecto fitotóxico y antimicrobiano de algunos polifenoles durante el proceso de compostaje (inhibición de la germinación) (Bustamante *et al.*, 2010). Así pues, de forma previa a su uso como alimento animal o fertilizante, sería necesario realizar un pre-tratamiento de los residuos vitivinícolas, con el correspondiente coste que ello supone para las bodegas (Ruberto *et al.*, 2007).

En la actualidad, son varias las alternativas propuestas para la revalorización de los subproductos de vinificación. Aunque aún en fase preliminar, una de las más novedosas es su posible uso como materia prima en la obtención de combustibles renovables, tales como el bioetanol, el biodiesel o el biogás, gracias al alto contenido en celulosa, hemicelulosas y lignina (fracción de fibra) que presentan el orujo y raspón (Ping *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012).

Comúnmente, el orujo es también una fuente importante para la obtención de alcohol (Silva *et al.*, 2000; Lukic *et al.*, 2011; Iacumin *et al.*, 2012), ácido tartárico y/o derivados (Versari *et al.*, 2001; Palma and Barroso, 2002; Yalcin *et al.*, 2008) y aceite de pepitas de uva (Sabir *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013).

Sin embargo, una de las opciones más apreciadas para la revalorización de los subproductos de vinificación es la recuperación de compuestos bioactivos de interés para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Makris *et al.*, 2007b). Entre estos biocompuestos destacan la fibra dietética y los compuestos fenólicos (Alonso *et al.*, 2002; González-Centeno *et al.*, 2010), dos de los ingredientes funcionales más ampliamente estudiados en el campo de la alimentación por sus demostrados efectos fisiológicos saludables.

Saura-Calixto (1998) acuñó el concepto de *fibra antioxidante*, refiriéndose a aquellas materias primas de origen vegetal con un elevado porcentaje de fibra dietética

(> 50%, bs), en cuya matriz se encuentra asociada una gran cantidad de antioxidantes naturales. Desde un punto de vista fisiológico, la *fibra antioxidante* combina en un mismo material los efectos beneficiosos de la fibra y de los compuestos fenólicos. Por su parte, a nivel nutricional, su uso como ingrediente funcional constituye una buena alternativa a la adición por separado de fibra y antioxidantes previamente aislados, debido a la posible pérdida de actividad biológica y de efectos sinérgicos.

En los últimos años, se ha incrementado el uso de subproductos agrícolas procedentes de frutas y verduras, entre ellos los derivados de la elaboración del vino, como fuente natural para la obtención de *fibra antioxidante* de elevada calidad (Fuentes-Alventosa *et al.*, 2009). Ello se fundamenta en el fácil y barato acceso a grandes cantidades de materia prima, en la necesidad de minimizar el impacto ambiental que producen y en la voluntad de favorecer una agricultura sostenible (González-Centeno *et al.*, 2010; Babbar *et al.*, 2011).

Consecuentemente, los subproductos de vinificación se utilizan cada vez más en la obtención de ingredientes funcionales, dado que su alto contenido en fibra y compuestos fenólicos los caracteriza como fuentes potenciales de *fibra antioxidante* (Llobera and Cañellas, 2007; Pérez-Jiménez and Sáyago-Ayerdi, 2009). Concretamente, las pepitas de uva ya se usan como suplementos dietéticos y aditivos alimentarios naturales en EE.UU., Australia, Japón, Korea y algunos países europeos (Bakkalbasi *et al.*, 2005).

En la última década, diferentes estudios han evaluado la estabilidad del alimento y/o la aceptabilidad sensorial del mismo, tras la incorporación de extractos funcionales procedentes de subproductos de vinificación, especialmente pepitas de uva y orujo de variedades tintas. En la **Tabla 1.3** se recogen algunos de los trabajos realizados en la última década. Dicha revisión bibliográfica evidencia el potencial de los subproductos de vinificación en su uso como ingredientes funcionales para mejorar no sólo el valor nutricional y saludable del alimento, sino también sus propiedades tecnológicas (pH, color, sabor, olor, textura) y su conservación durante el almacenamiento. Independientemente del alimento considerado, se observa que cuanto mayor es la cantidad incorporada de ingrediente vitivinícola, más se inhibe la oxidación del mismo y más se prolonga su vida útil. No obstante, también se observa que para elaborar un alimento funcional organolépticamente aceptable, garantizando al mismo tiempo su calidad nutricional e higiénico-sanitaria, dicha concentración viene determinada tanto

por la matriz del alimento como por las características del subproducto de vinificación (tipo, variedad y/o composición).

**Tabla 1.3.** Revisión bibliográfica de la incorporación de extractos de subproductos de vinificación en alimentos.

Alimento	Ingrediente funcional	Referencia bibliográfica
Aliños (vinagretas)	orujo de uva tinta al 0.5%, 1% y 2% (w/w, base aliño)	Tseng <i>et al.</i> (2013)
Barritas de cereales	pepitas de uva de Me al 5% (w/w, base harina), 2 recetas	
Tortitas (pancakes)	pepitas de uva de CS (25%, 30%) y Me (30%)	Soto <i>et al.</i> (2012)
Noodles	pepitas de uva de CS (20%) y Me (30%)	
Carne pechuga de pavo	extractos de pepitas de uva (comercial) al 0.04%, 0.08% y 0.16% (w/w, base carne)	Mielnik <i>et al.</i> (2006)
Carne de cerdo	pepitas de uva a 50, 100, 200, 300, 400 y 1000 ppm (w/w, base carne)	Carpenter <i>et al.</i> (2007)
Hamburguesas de pollo	orujo de uva tinta al 0.5%, 1%, 1.5% y 2% (w/w, base carne)	Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> (2009)
Hamburguesas de cerdo	extractos fenólicos de piel de uva tinta al 0.06% (w/w, base carne)	Garrido <i>et al.</i> (2011)
Salchichas	pepitas de uva tinta al 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% y 5% (w/w, base carne)	Özvural <i>et al.</i> (2011)
Hamburguesas de carne vacuna	extractos fenólicos de orujo de 5 variedades de uva al 1%, 2%, 5% y 10% (w/w, base carne)	Sagdic <i>et al.</i> (2011)
Galletas	orujo de uva blanca al 10%, 20% y 30% (w/w, base harina)	Mildner-Szkudlarz <i>et al.</i> (2013)
Maíces (corn chips)	pepitas de uva a 200, 400 y 800 ppm (w/w)	Rababah <i>et al.</i> (2011)
Pan	pepitas de uva al 0.06%, 0.12% y 0.2% (w/w, base harina)	Peng <i>et al.</i> (2010)
Pan	orujo de uva tinta al 2.5%, 5%, 7.5% y 10% (w/w, base harina)	Hoye <i>et al.</i> (2011)
Pan	orujo de uva tinta al 4%, 6%, 8% y 10% (w/w, base harina)	Mildner-Szkudlarz <i>et al.</i> (2011)
Pan	orujo de uva blanca al 2%, 5% y 10% (w/w, base harina)	Hayta <i>et al.</i> (2013)
Pescado (caballa)	extractos fenólicos de orujo de uva blanca al 0.01% (w/w, base pescado)	Pazos <i>et al.</i> (2005)
Pescado (jurel)	procianidinas de orujo a 50 y 100 ppm (w/w, base pescado)	Medina <i>et al.</i> (2006)
Pescado (jurel)	orujo de uva blanca al 2% y 4% (w/w, base pescado)	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2007a)
Pescado (bacalao)	orujo de uva blanca al 2% y 4% (w/w, base pescado)	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2007b)
Pescado (jurel)	orujo de uva tinta al 2% y 4% (w/w, base pescado)	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008a)
Pescado	extractos de pepitas de uva (comercial) y polifenoles individuales	Maestre <i>et al.</i> (2010)
Pescado (estomino)	extracto fenólico de pepitas de uva al 2% (w/w, base pescado)	Özen <i>et al.</i> (2011)
Yogurt	extractos fenólicos de pieles de uva de CS, Ch, Me, Sy	Karaaslan <i>et al.</i> (2011)
Yogurt	orujo de uva tinta al 1%, 2% y 3% (w/w, base yogurt)	Tseng <i>et al.</i> (2013)

Como ya se ha indicado previamente, los residuos derivados de la industria vitivinícola son muy heterogéneos y cada uno de ellos presenta una composición propia (Cruz *et al.*, 2004). A su vez, existe una gran diversidad de variedades de *Vitis*, cada una de ellas caracterizada por una fracción de fibra y un contenido-perfil polifenólico, cuya capacidad antioxidante y propiedades beneficiosas para la salud pueden diferir notablemente de una a otra (González-Centeno *et al.*, 2012). Toda esta variabilidad puede influir significativamente en el grado de aceptabilidad y preferencia organoléptica del alimento funcional por parte del consumidor, además de en el beneficio fisiológico que le procure (Pazos *et al.*, 2005; Karaaslan *et al.*, 2011). Así pues, para la industria alimentaria, sería de gran interés disponer de una caracterización exhaustiva de los subproductos de vinificación en cuanto a su composición fenólica y de fibra, para poder elegir el subproducto y/o variedad más adecuados en función de las características requeridas en el diseño y formulación de futuros alimentos funcionales.

## 1.2. LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE INTERÉS EN LA VIÑA

### 1.2.1. La fibra alimentaria o dietética

El concepto de fibra dietética ha sido objeto de controvertida polémica internacional desde la primera definición propuesta por Hipsley (1953), en la que se describía como la cantidad total de celulosa, hemicelulosas y lignina consumida a través de la dieta. No fue hasta dos décadas más tarde que Trowell (1972) acuñó una definición más consistente con las aceptadas en la actualidad. Según la AOAC, se entiende por fibra dietética al conjunto formado por los polisacáridos libres de almidón, la lignina y sustancias químicas asociadas, presentes en la pared celular de las plantas y resistentes a la hidrólisis enzimática a nivel gastrointestinal (DeVries, 2004). Por su parte, según el *Codex Alimentarius*, el concepto de fibra dietética únicamente incluye los carbohidratos poliméricos libres de almidón propios de la pared celular de las plantas, principalmente celulosa, hemicelulosas y pectinas (Cummings *et al.*, 2009).

La fibra dietética presenta un origen exclusivamente vegetal (Ramulu and Rao, 2003), siendo los cereales (trigo, cebada, maíz, arroz, avena), frutas (cítricos, uva, manzana), legumbres (soja, guisantes) y hortalizas, las fuentes naturales principales para la incorporación de fibra en nuestra alimentación (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008). Cabe indicar, no obstante, que la concentración y naturaleza de la fibra dietética difiere notablemente de un alimento a otro: mientras que los cereales son la fuente principal de celulosa y hemicelulosas, las frutas y hortalizas lo son mayormente de pectinas (Elleuch *et al.*, 2011).

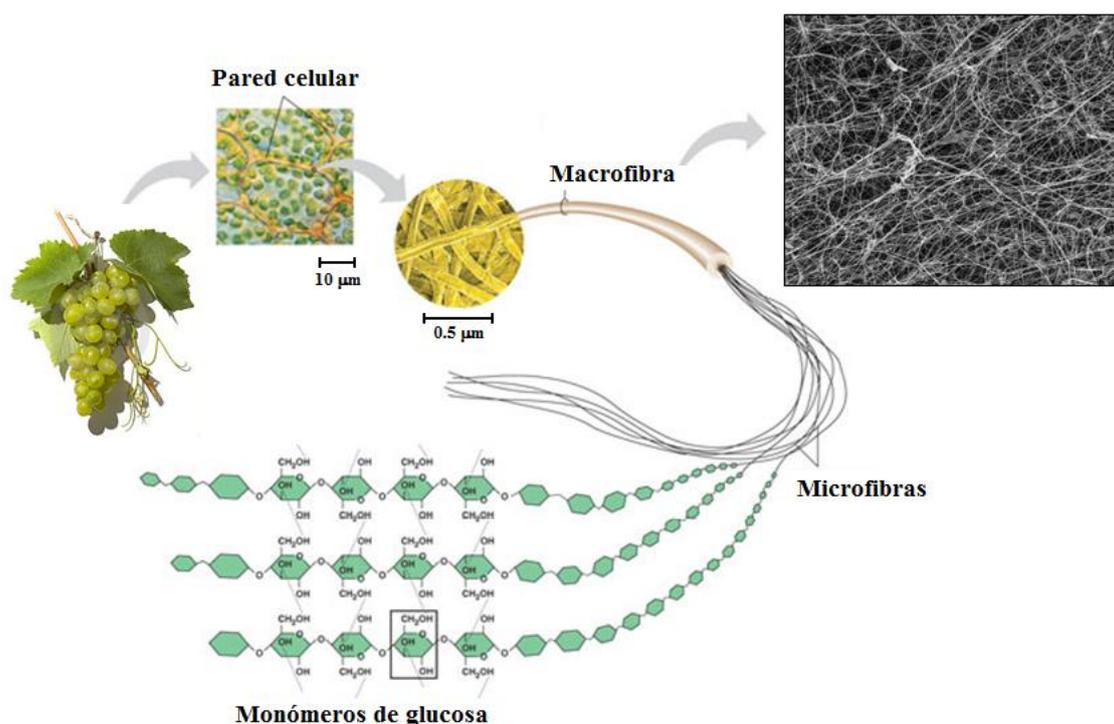
En general, la fibra dietética procedente de frutas y hortalizas presenta una mejor calidad nutricional que la de los cereales (Yi *et al.*, 2009). Ello se debe no sólo a la mayor proporción de fibra soluble y, consecuentemente, un mejor y más equilibrado ratio fibra insoluble/fibra soluble (FI/FS), sino también a un mayor contenido de fibra total sobre extracto seco, mejores propiedades funcionales de la fibra (mayor capacidad de retención de agua y lípidos, mayor poder de gelificación, mayor viscosidad), menor consumo de energía metabólica y presencia de gran cantidad de compuestos bioactivos asociados que pueden promover efectos saludables adicionales (Figuerola *et al.*, 2005; Marín *et al.*, 2007; Vergara-Valencia *et al.*, 2007; Sánchez-Alonso and Borderías, 2008a).

### 1.2.1.1. Polisacáridos de la pared celular

La pared celular se define como la estructura rígida localizada en la zona más externa de las células de origen vegetal. Su composición química, así como el tipo de polisacáridos que la componen, varía considerablemente en función de la planta y el tipo de tejido. Los polisacáridos son los principales componentes de la pared celular primaria de frutas y hortalizas, concretamente, la celulosa, hemicelulosas y pectinas. Por su parte, la lignina se encuentra mayoritariamente en las células que han desarrollado paredes celulares secundarias (Aboughe-Angone *et al.*, 2008).

#### Celulosa

La celulosa es un homopolímero de la pared celular que resulta de la unión lineal de monómeros de glucosa, mediante enlaces glucosídicos tipo  $\beta$ -1,4, formando cadenas de más de 15000 unidades. Este polisacárido se organiza en microfibrillas unidas mediante puentes de hidrógeno, que a su vez interactúan entre sí formando macrofibras de celulosa visibles mediante microscopía electrónica (**Figura 1.7**). La celulosa se caracteriza por ser muy insoluble en agua, como consecuencia de los puentes de hidrógeno tanto intra como intermoleculares, entre el oxígeno del anillo de un residuo de glucosa y el hidrógeno del grupo hidroxilo del C<sub>3</sub> de otro residuo vecino (Brett and Waldron, 1990).

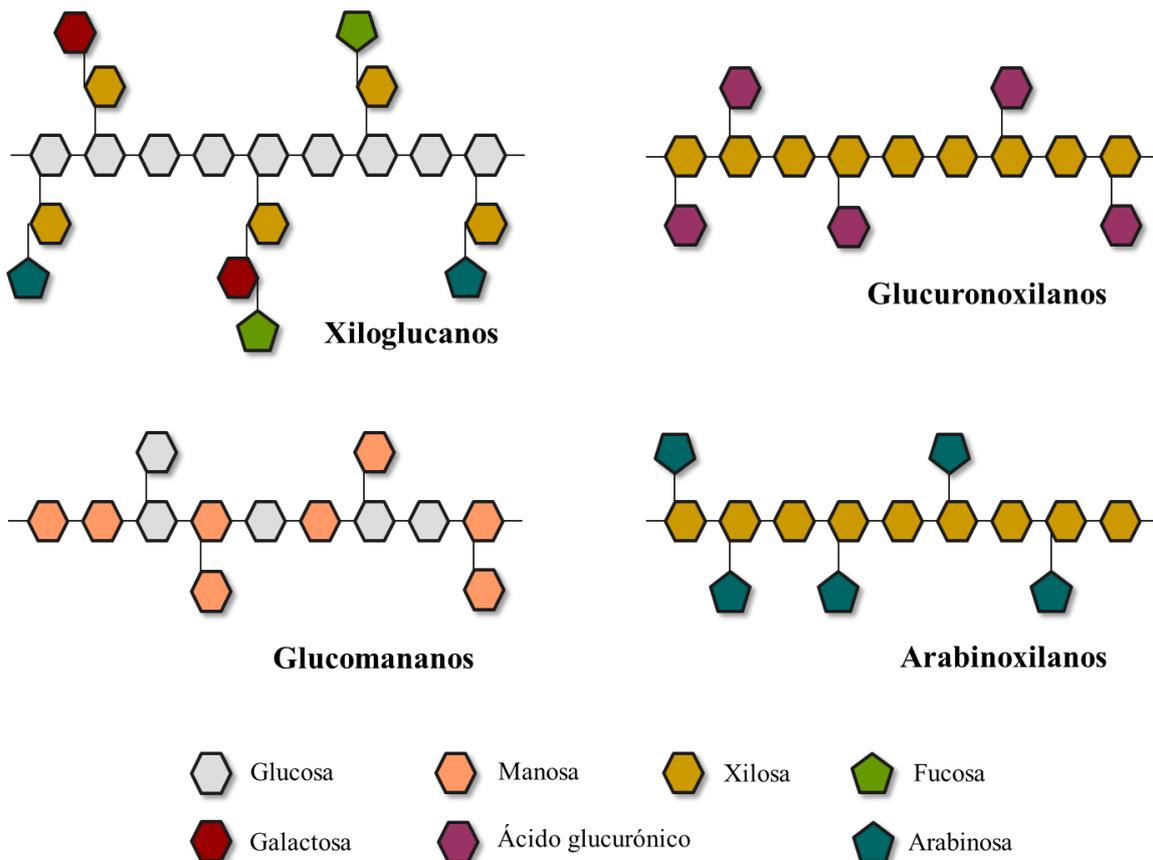


**Figura 1.7.** Estructura de la celulosa.

### Hemicelulosas

A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas están constituidas por más de un tipo de monosacárido, lo que da lugar a diferentes heteropolímeros (**Figura 1.8**). De entre ellos, los xiloglucanos, destacan por su presencia mayoritaria en frutas y hortalizas (Derriche and Berrahmoune, 2007). Están formados por una cadena principal de glucosa con ramificaciones  $\alpha$ -1,6 de xilosa, que a su vez pueden presentar sustituciones  $\beta$ -1,2 con unidades de galactosa, fucosa y/o arabinosa (Buckeridge, 2010).

Un segundo tipo de polisacáridos perteneciente al grupo de hemicelulosas es el de los xilanos ácidos o glucuronoxilanos, constituidos por una cadena principal de xilosa y ramificaciones de ácido glucurónico. También destacan los glucomananos, a menudo acetilados, formados únicamente por unidades de manosa y glucosa; y los arabinoxilanos que, con ramificaciones de arabinosa sobre una cadena principal de xilosa, son las principales hemicelulosas presentes en las paredes celulares de los cereales (Scheller and Ulvskov, 2010).

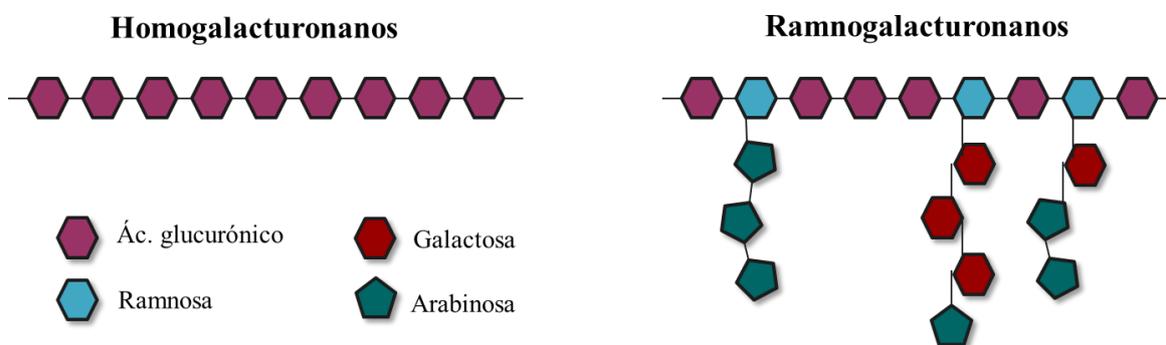


**Figura 1.8.** Representación esquemática de los principales tipos de hemicelulosas.

En general, las hemicelulosas presentan enlaces  $\beta$ -1,4 entre los residuos monosacáridos de la cadena principal y, en la pared celular, se encuentran ligadas a las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno, razón por la que son necesarias soluciones alcalinas concentradas para su extracción (Brett and Waldron, 1990).

### Pectinas

Las pectinas constituyen el grupo de polisacáridos más complejo de la pared celular. Las dos estructuras principales se conocen bajo el nombre de homogalacturonanos y ramnogalacturonanos (Brett and Waldron, 1990) (**Figura 1.9**). Los homogalacturonanos consisten en largas cadenas lineales de residuos de ácido glucurónico unidos mediante enlaces  $\alpha$ -1,4, que pueden estar parcialmente metil-esterificados o acetilados (Hilz *et al.*, 2005). Por su parte, los ramnogalacturonanos se caracterizan por la presencia de unidades de ramnosa intercaladas en la cadena principal de ácido galacturónico (enlaces  $\alpha$ -1,2). Las cadenas laterales, unidas a la posición C<sub>4</sub> de la ramnosa, están principalmente constituidas por arabinosa y galactosa (Arnous and Meyer, 2009).



**Figura 1.9.** Representación esquemática de los principales tipos de pectinas.

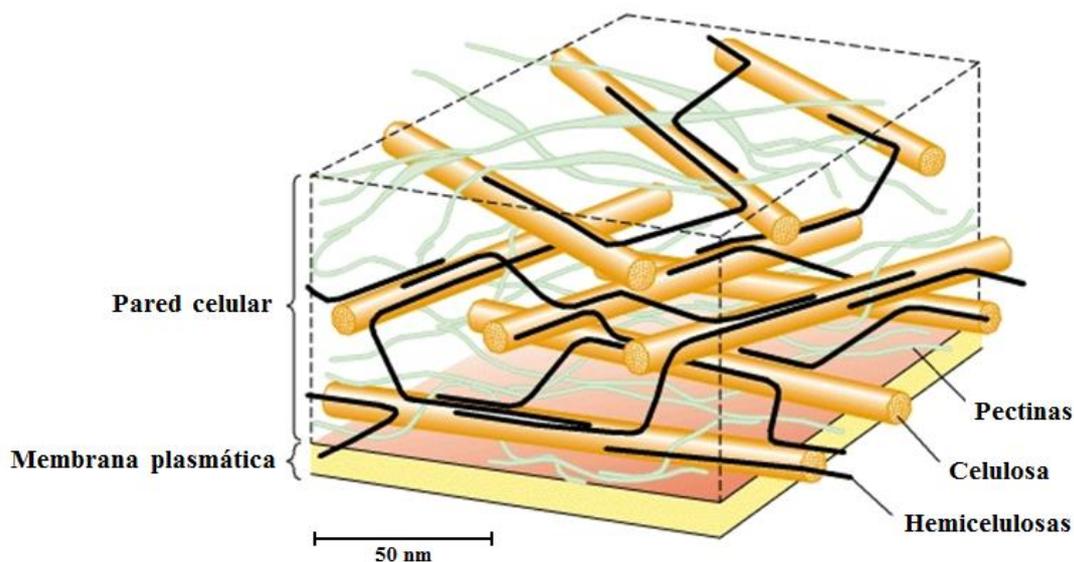
La funcionalidad de las pectinas como agentes gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria está íntimamente relacionada con su estructura química, concretamente con el tamaño de la molécula, y el número y distribución de los ésteres metílicos. En función del grado de metilesterificación (DME) de los residuos de ácido glucurónico, las pectinas pueden clasificarse como pectinas de alto grado de metilesterificación (DME > 50%) o de bajo grado de metilesterificación (DME < 50%) (Guillotin *et al.*, 2007).

Las pectinas son el componente de la pared celular más susceptible a sufrir degradación, ya sea por activación enzimática o por  $\beta$ -eliminación (Fraeye *et al.*, 2007).

En ambos casos, los cambios químicos que tienen lugar pueden traducirse en una reducción del contenido total de pectinas en el alimento, lo que puede quedar reflejado en las propiedades de la fibra alimentaria, tales como su solubilidad o su capacidad para absorber y/o retener agua y lípidos.

*Polisacáridos de la pared celular y fibra dietética*

Se han planteado diversas hipótesis con el fin de explicar la disposición espacial macromolecular de los diferentes componentes de la pared celular. En la **Figura 1.10** se representa uno de los modelos más aceptados para explicar la estructura de la pared celular primaria de la mayoría de plantas. Este modelo propone una red macromolecular constituida por macrofibras de celulosa a las cuales se unen de forma directa las hemicelulosas, actuando estas últimas conjuntamente con las pectinas como matriz del sistema (Carpita and Gibeaut, 1993).



**Figura 1.10.** Esquema representativo de la estructura de la fibra alimentaria.

Según el grado de solubilidad en agua de los polisacáridos de la pared celular, la fibra dietética puede subdividirse en dos fracciones. La fracción denominada fibra soluble (FS) está mayoritariamente constituida por pectinas, mientras que la celulosa, hemicelulosas y lignina conforman principalmente la fracción de fibra insoluble (FI) (McKee and Latner, 2000). Cabe indicar que ambas fracciones de la fibra comparten su capacidad para retener grandes cantidades de agua y cationes minerales en su estructura macromolecular (Jiménez-Escrig and Sánchez-Muniz, 2000). No obstante, la fibra soluble se caracteriza adicionalmente por una elevada capacidad de gelificación y retención de lípidos, así como de incrementar la viscosidad de la matriz donde se

encuentra (Vergara-Valencia *et al.*, 2007); y la fracción insoluble, por una elevada porosidad y baja densidad (Yu and Ahmedna, 2013). Estas propiedades particulares asociadas a cada una de las fracciones de la fibra justifican tanto su funcionalidad tecnológica como sus efectos fisiológicos y/o nutricionales en el cuerpo humano. Concretamente, de acuerdo con varios autores, para beneficiarse de los efectos y propiedades asociados a las fracciones soluble e insoluble de la fibra dietética, el balance entre ambas debe estar equilibrado, lo que se traduce en un ratio de variación FI/FS comprendido entre 1.0 y 2.3 (Spiller, 1986; Grigelmo-Miguel and Martín-Belloso, 1999b).

#### ***1.2.1.2. Interés de la fibra alimentaria a nivel industrial***

La fibra dietética es apreciada no sólo por su indiscutible valor nutricional y por sus efectos fisiológicos beneficiosos para la salud (Kendall *et al.*, 2010), sino también por sus importantes propiedades funcionales y tecnológicas en el campo de la industria alimentaria (Thebaudin *et al.*, 1997).

Ambas fracciones de la fibra dietética, soluble e insoluble, desempeñan funciones fisiológicas propias y aportan beneficios nutricionales característicos que, en última instancia, dependen de forma directa de las propiedades funcionales de cada una de las fracciones (Tosh and Yada, 2010). La fibra soluble obstaculiza la absorción de macronutrientes, tales como el colesterol y/o la glucosa (Isken *et al.*, 2010), gracias a su viscosidad y a su capacidad para unirse a biomoléculas orgánicas, con lo que participa activamente en la reducción del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes (**Tabla 1.4**). Contrariamente al resto de nutrientes y tal y como especifica su definición, la fibra no es hidrolizada enzimáticamente ni en el estómago ni en el intestino delgado. Sin embargo, al alcanzar el intestino grueso, la fracción soluble actúa como sustrato fermentable, ayudando a mantener la microflora bacteriana (Jiménez-Escrig and Sánchez-Muniz, 2000) y generando ácidos grasos de cadena corta que intervienen positivamente en la regulación de otros procesos fisiológicos (Yu and Ahmedna, 2013).

Por su parte, la fibra insoluble está implicada en la aceleración del tránsito gastrointestinal (Redondo-Cuenca *et al.*, 2007). Su elevada capacidad de retención de agua, su baja densidad y viscosidad, y su escasa fermentación a nivel del intestino grueso, le permite aumentar la motilidad del bolo alimenticio a través del sistema

digestivo, incrementar el volumen de masa fecal y estimular su evacuación (Esposito *et al.*, 2005; Vergara-Valencia *et al.*, 2007; Tosh and Yada, 2010).

**Tabla 1.4.** Efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de fibra dietética.

Efecto para la salud	Referencias bibliográficas
Protección frente al cáncer a nivel del sistema gastrointestinal	Levi <i>et al.</i> (2001), Bingham <i>et al.</i> (2003), Pelucchi <i>et al.</i> (2003), Scheppach <i>et al.</i> (2004), Wong <i>et al.</i> (2006), Bravi <i>et al.</i> (2009), Murphy <i>et al.</i> (2012),
Regulación del tránsito intestinal	Bosaeus <i>et al.</i> (2004), Loening-Baucke <i>et al.</i> (2004), Arya <i>et al.</i> (2005), Sturtzel <i>et al.</i> (2009), Yang <i>et al.</i> (2012)
Prevención de la obesidad	Slavin <i>et al.</i> (2005), Wang <i>et al.</i> (2007), van de Vijver <i>et al.</i> (2009), Isken <i>et al.</i> (2010), Brauchla <i>et al.</i> (2012)
Reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares	Pereira <i>et al.</i> (2004), Pérez-Jiménez <i>et al.</i> (2008), Streppel <i>et al.</i> (2008), Estruch <i>et al.</i> (2009), Eshak <i>et al.</i> (2010), Crowe <i>et al.</i> (2012)
Control / prevención de la diabetes	Chandalia <i>et al.</i> (2000), Meyer <i>et al.</i> (2000), Lindström <i>et al.</i> (2006), Zhang <i>et al.</i> (2006), Anderson <i>et al.</i> (2008), Wannamethee <i>et al.</i> (2009), Post <i>et al.</i> (2012)

Para poder beneficiarse de los efectos fisiológicos saludables de la fibra, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja un consumo mínimo diario de 27 – 40 g/persona, recomendación que varía según el país en base a la dieta y estilo de vida propios (Boyle and Long, 2007; Lunn and Buttriss, 2007). Sin embargo, los malos hábitos y preferencias alimentarias individuales provocan que el consumo diario de fibra esté muy por debajo de las recomendaciones dietéticas, siendo necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para su inclusión en la dieta. Una posible solución para cubrir el déficit existente y asegurar una alimentación sana, completa y equilibrada, que apenas requiere cambios en nuestras costumbres alimentarias, es la incorporación de suplementos de fibra en los alimentos de consumo habitual (Redondo-Cuenca *et al.*, 2008), formulándose así los conocidos como alimentos funcionales enriquecidos en fibra.

La incorporación de fibra a determinados alimentos, tales como productos de panadería, confitería, bebidas, sopas, productos lácteos, pasta, pescados y/o productos cárnicos, denota diversas funciones. Por una parte, mejora nutricionalmente alimentos que de forma natural carecen de fibra en su composición o presentan una baja proporción de la misma. Pero además, la industria alimentaria aprovecha la funcionalidad tecnológica derivada de las propiedades físico-químicas de la fibra para mejorar la viscosidad, textura, características sensoriales y vida útil de sus productos

(Elleuch *et al.*, 2011). De ahí que, en el campo de la alimentación, la fibra dietética se utilice como agente gelificante, emulsificante, espesante, quelante y/o estabilizante (Abdul-Hamid and Luan, 2000; Reyes-Caudillo *et al.*, 2008). Asimismo, a nivel industrial, las propiedades de hidratación de la fibra (hinchamiento y capacidad de retención de agua), así como su capacidad de retención de lípidos, juegan un papel importante en la modulación de la textura y sabor de los alimentos, especialmente tras su cocción (Elleuch *et al.*, 2011).

También resulta importante mencionar la participación de la fibra dietética en la prevención del deterioro oxidativo de los alimentos a los que se adiciona, gracias a su capacidad de captación de especies prooxidantes en su matriz macromolecular (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007c).

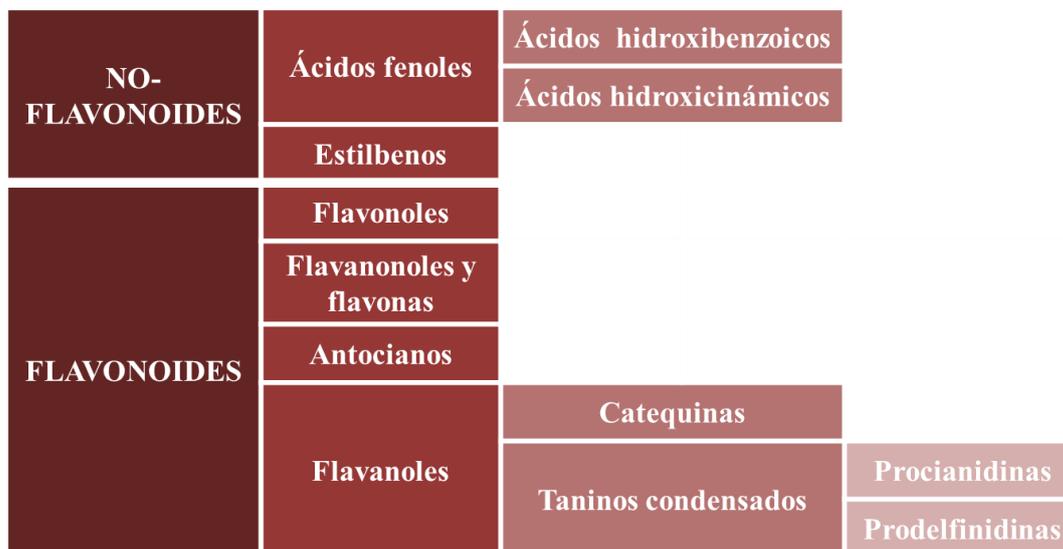
### **1.2.2. Metabolismo secundario de la viña: los compuestos fenólicos**

En el reino vegetal, los compuestos fenólicos constituyen el segundo grupo de sustancias químicas en abundancia tras el de los carbohidratos (Pridham, 1965). Su biosíntesis tiene lugar a través del metabolismo secundario de las plantas, que lejos de ocuparse del crecimiento y desarrollo de las mismas como individuos (metabolismo primario – ciclo vegetativo), asegura la adaptación, evolución y perpetuidad de las distintas especies (ciclo reproductor) (Beckman, 2000; Naczk and Shahidi, 2004).

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

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en función del número y distribución de los átomos de carbono que lo componen o la longitud de la cadena alifática unida al núcleo aromático (Cheynier *et al.*, 1997). No obstante, el criterio de clasificación más utilizado para describir la fracción fenólica es el basado en la naturaleza y estructura de su esqueleto carbonado, dividiendo los polifenoles en compuestos no-flavonoides y flavonoides (**Figura 1.11**). Ambos grupos se dividen a su vez en diferentes subfamilias químicas, cuyas características estructurales determinan su función fisiológica en el metabolismo secundario de la vid, así como su papel en la posterior configuración de la calidad organoléptica del vino (Cheynier *et al.*, 2000). Los compuestos flavonoides se sitúan en pieles, pepitas y raspones, mientras que

los no-flavonoides están principalmente localizados en la pulpa de la uva (Monagas *et al.*, 2005).



**Figura 1.11.** Clasificación de los compuestos fenólicos (extraído de Zamora (2003)).

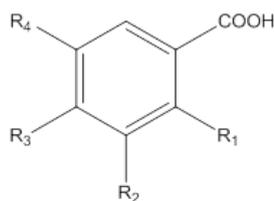
La composición fenólica de la uva y de sus subproductos, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, depende de un gran número de factores que incluyen desde el entorno agroclimático involucrado en su desarrollo hasta la variedad en estudio, el tejido considerado (piel, pepitas, orujo o raspón) y las prácticas vitivinícolas efectuadas (Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006; Makris *et al.*, 2007a; Tounsi *et al.*, 2009).

#### ***1.2.2.1. Compuestos fenólicos no-flavonoides***

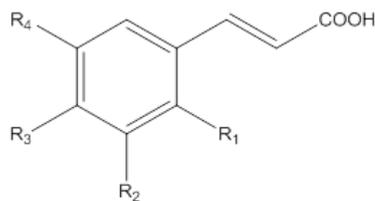
Esta denominación abarca los ácidos fenoles y los estilbenos.

##### Ácidos fenoles

Estos compuestos fenólicos se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (**Figura 1.12**). Los primeros presentan un esqueleto carbonado tipo  $C_6-C_1$ , y su principal representante en la uva es el ácido gálico, esencialmente bajo la forma de éster de flavanoles (Cheynier *et al.*, 2000). Por su parte, los ácidos hidroxicinámicos denotan una estructura tipo  $C_6-C_3$  y, en general, se encuentran esterificados con ácido tartárico (Ribéreau-Gayon, 1963). Aunque localizados principalmente en la piel y pulpa de la uva, también se han detectado en raspón (Alonso *et al.*, 2002).



Ácidos hidroxibenzoicos



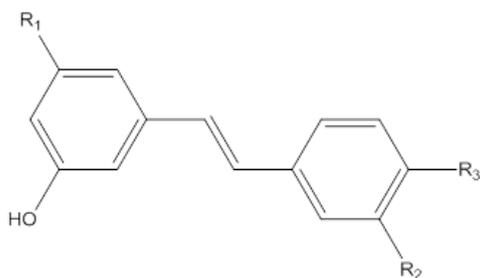
Ácidos hidroxicinámicos

Ácidos hidroxibenzoicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Ácidos hidroxicinámicos
<i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H	<i>p</i> -cumárico
Protocatéquico	H	OH	OH	H	Cafeico
Vanílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ferúlico
Siríngico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Sinápico
Gálico	H	OH	OH	OH	
Salicílico	OH	H	H	H	
Gentísico	OH	H	H	OH	

**Figura 1.12.** Estructura química de los principales ácidos fenoles de la uva.

### Estilbenos

Se biosintetizan principalmente en la piel de la uva, aunque también han sido detectados en hojas, raspones y raíces de la vid, como respuesta al estrés abiótico producido por ataques fúngicos, bacterianos o virales, y/o exposición excesiva a radiación UV (Kostadinovic *et al.*, 2012). Los estilbenos presentan una estructura molecular tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, correspondiente a dos núcleos aromáticos unidos por un puente etileno (Chira *et al.*, 2008). A partir de dicha estructura básica, se deriva una amplia gama de compuestos fenólicos cuya naturaleza varía en función del número y posición de los grupos hidroxilos, de la sustitución de los mismos por azúcares o grupos metoxi y de la conformación estérica de la molécula (*cis* o *trans*) (**Figura 1.13**). En la uva, los estilbenos por excelencia son el *trans*-resveratrol y su derivado glucosilado (*trans*-piceida) (Ribeiro de Lima *et al.*, 1999).



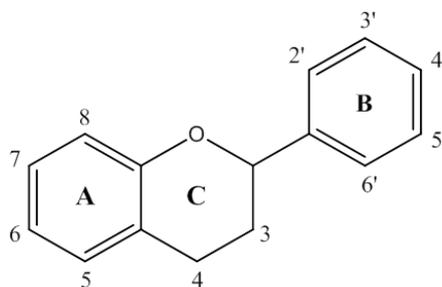
Principales estilbenos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Resveratrol	OH	H	OH
Piceida	OGlc	H	OH
Astringina	OGlc	OH	OH

**Figura 1.13.** Estructura química de los principales estilbenos de la uva.

Cabe indicar que las uvas, así como sus productos y subproductos derivados, se consideran las fuentes dietéticas de estilbenos más importantes, siendo objeto de numerosos estudios en la última década debido a las propiedades beneficiosas para la salud que muestran este tipo de compuestos fenólicos (Zamora-Ros *et al.*, 2008).

### 1.2.2.2. Compuestos fenólicos flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más abundante en la uva (Rockenbach *et al.*, 2011). Según Ribéreau-Gayon (1968), se trata de una gran familia de compuestos fenólicos que poseen una estructura molecular común tipo  $C_6-C_3-C_6$  (**Figura 1.14**), constituida por dos ciclos bencénicos polihidroxilados (A y B) unidos mediante un heterociclo central tipo pirano (C), cuyo grado de insaturación determina la subfamilia de flavonoide. Se distinguen un total de cinco subfamilias: los flavonoles, antocianos y flavanoles como mayoritarias, y los flavanonoles y flavonas en menor proporción (Cheynier *et al.*, 2000). Dentro de cada subfamilia, los compuestos fenólicos se diferencian entre sí en función del número y localización de los grupos hidroxilo y/o metoxilo del anillo B. Todos los flavonoides pueden presentarse bajo su forma *O*-glucosilada en la posición  $C_3$  del anillo C, y a su vez estos glucósidos pueden encontrarse acilados o no.



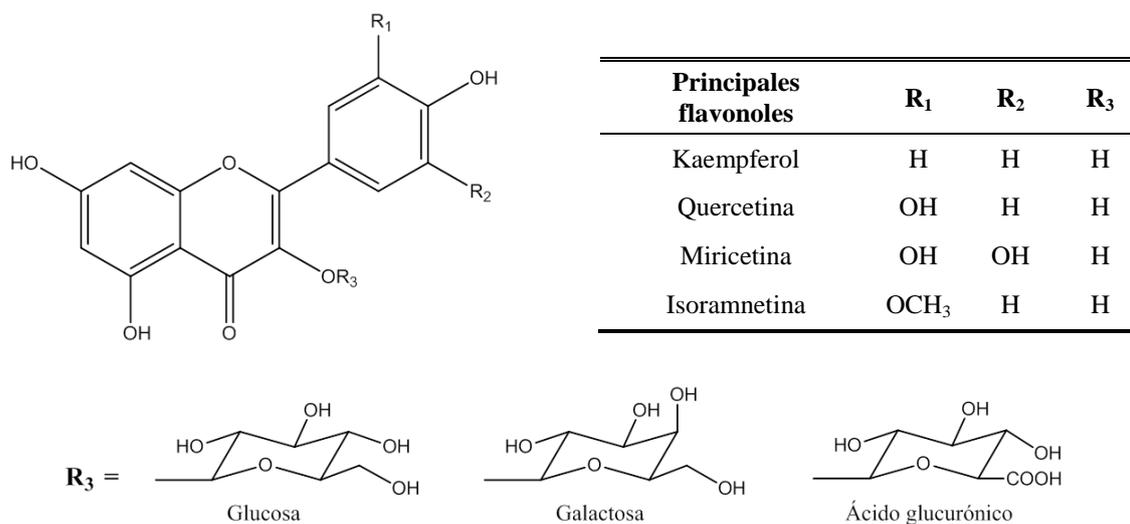
**Figura 1.14.** Estructura química general de los compuestos fenólicos flavonoides.

#### Flavonoles

Los flavonoles son compuestos fenólicos que participan en la coloración amarilla de la piel de la uva blanca (Zamora, 2003). No obstante, su localización no se limita a los hollejos, sino que se ha descrito su presencia en raspón (Souquet *et al.*, 2000; Makris *et al.*, 2008; Anastasiadi *et al.*, 2012) y en hojas (Hmamouchi *et al.*, 1996).

En la **Figura 1.15** se indican los cuatro flavonoles principales de la uva. En general, éstos se presentan bajo la forma de heterósidos (principalmente glucósidos, galactósidos o glucurónidos) en el grupo hidroxilo de la posición  $C_3$ . Cabe indicar que

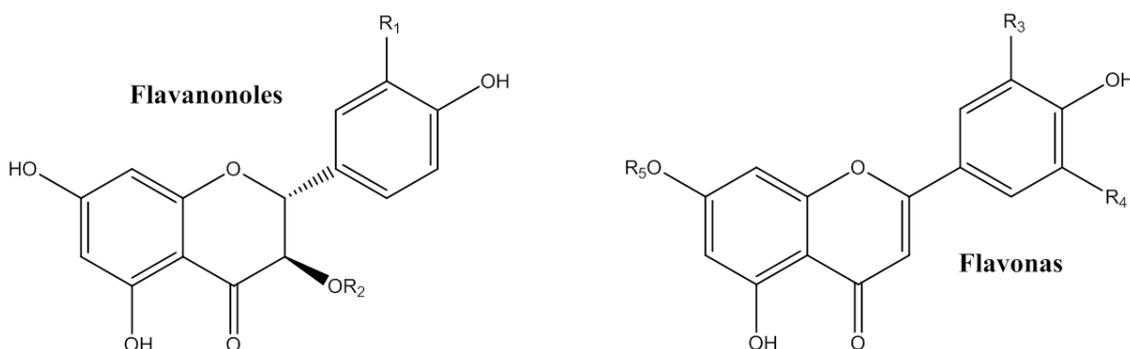
los flavonoles actúan principalmente como protectores de la vid frente a la radiación UV (Monagas *et al.*, 2005), por ello en la literatura se reportan mayores cantidades en aquellos racimos expuestos directamente al sol (Spayd *et al.*, 2002).



**Figura 1.15.** Estructura química de los principales flavonoles de la uva.

#### Flavanonoles y flavonas

Ambos compuestos fenólicos son estructuralmente muy similares a los flavonoles: mientras los flavanonoles o dihidroflavonoles se caracterizan por la ausencia del doble enlace C<sub>2</sub>–C<sub>3</sub> y por la presencia de un centro quiral en C<sub>2</sub>; las flavonas únicamente difieren de los flavonoles en la ausencia del grupo hidroxilo del C<sub>3</sub> (Chira *et al.*, 2008) (**Figura 1.16**). Se trata de compuestos fenólicos minoritarios en la uva. No obstante, bajo sus correspondientes formas glucósido (en R<sub>2</sub> y R<sub>5</sub>, respectivamente), los flavanonoles han sido detectados en raspón y pieles de variedades blancas (Souquet *et al.*, 2000; Makris *et al.*, 2008), y las flavonas, en hojas de *Vitis vinifera* (Hmamouchi *et al.*, 1996).



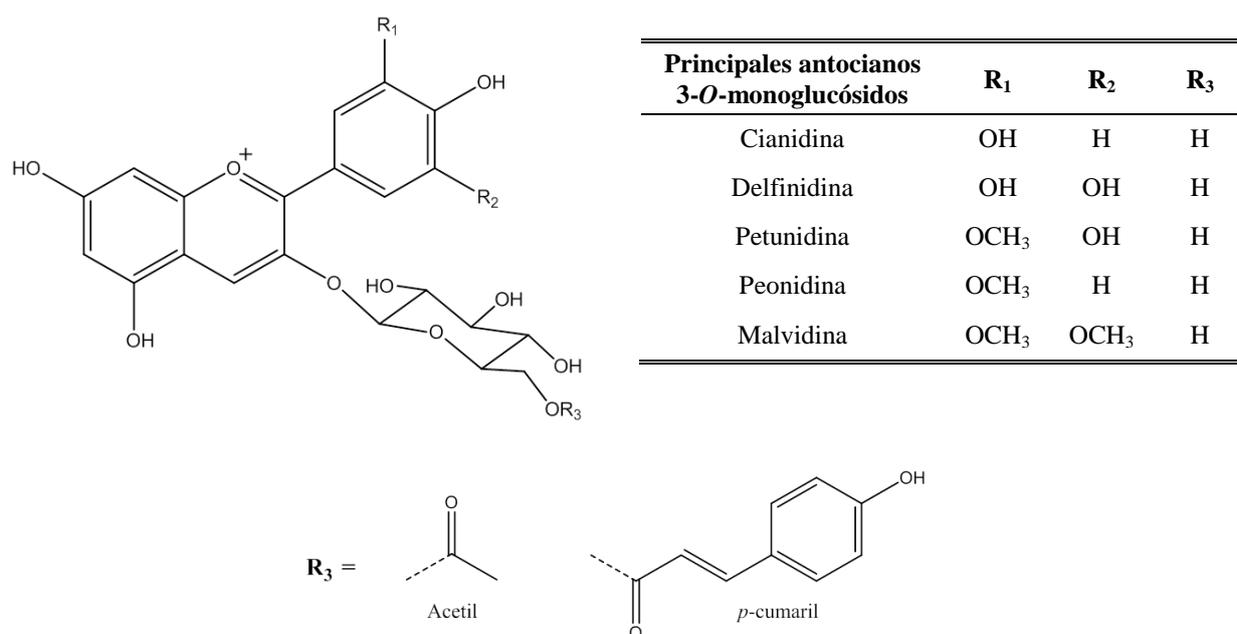
**Figura 1.16.** Estructura química general de los flavanonoles y las flavonas.

### Antocianos

Los antocianos o antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, responsables de las tonalidades rojas, azules y violetas (en función del pH del medio) que presenta la piel de uva tinta (Chira *et al.*, 2008). No obstante, estos compuestos fenólicos también se han identificado en la pulpa de algunas variedades tintoreras y en hojas de *Vitis vinifera* (Nabli *et al.*, 2012). A nivel estructural, los antocianos presentan una carga positiva sobre el átomo de oxígeno del heterociclo central (catión *flavilium*), cuya deslocalización por toda la molécula es responsable de la interacción con la luz y, consecuentemente, de su color (Zamora, 2003).

Los antocianos identificados en *Vitis vinifera* corresponden principalmente a los 3-*O*-monoglucósidos y 3-*O*-monoglucósidos acilados de las antocianidinas cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina y malvidina, que difieren entre sí en el número, tipo y posición de los sustituyentes del anillo B (**Figura 1.17**). La acilación de la molécula tiene lugar en el C<sub>6</sub> de la glucosa mediante esterificación con ácido acético (antocianos acetílicos) o *p*-cumárico (antocianos *p*-cumarílicos) (Monagas *et al.*, 2005).

Cabe indicar que pese a que la distribución y concentración de los antocianos varía sustancialmente en función de la variedad y madurez de la uva, las condiciones climáticas y/o la zona de producción, entre otros, la malvidina es generalmente la antocianidina mayoritaria (Monagas and Bartolomé, 2009).

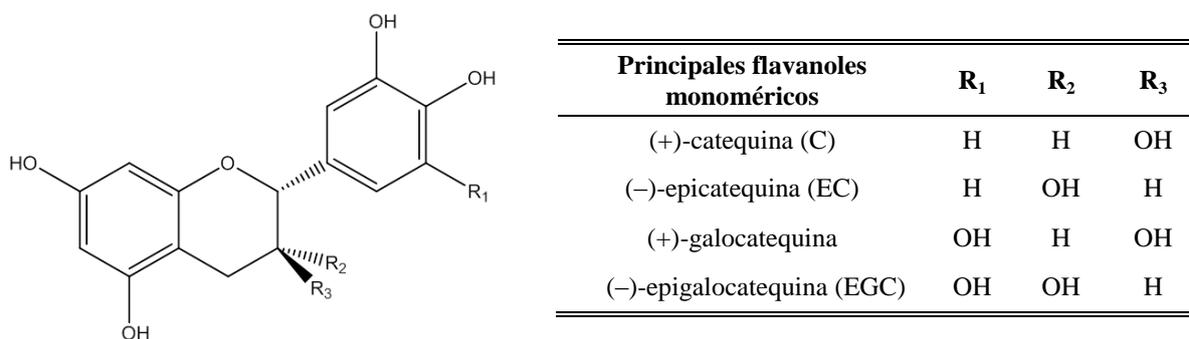


**Figura 1.17.** Estructura química de los principales antocianos de la uva.

### Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles se sitúan principalmente en el raspón piel y pepitas (Llaudy *et al.*, 2008). Estos compuestos fenólicos representan la subfamilia más compleja de flavonoides presente en *Vitis vinifera*, dado que pueden encontrarse como unidades monoméricas simples llamadas catequinas, o formando oligómeros y/o polímeros conocidos como taninos condensados o proantocianidinas (Terrier *et al.*, 2009).

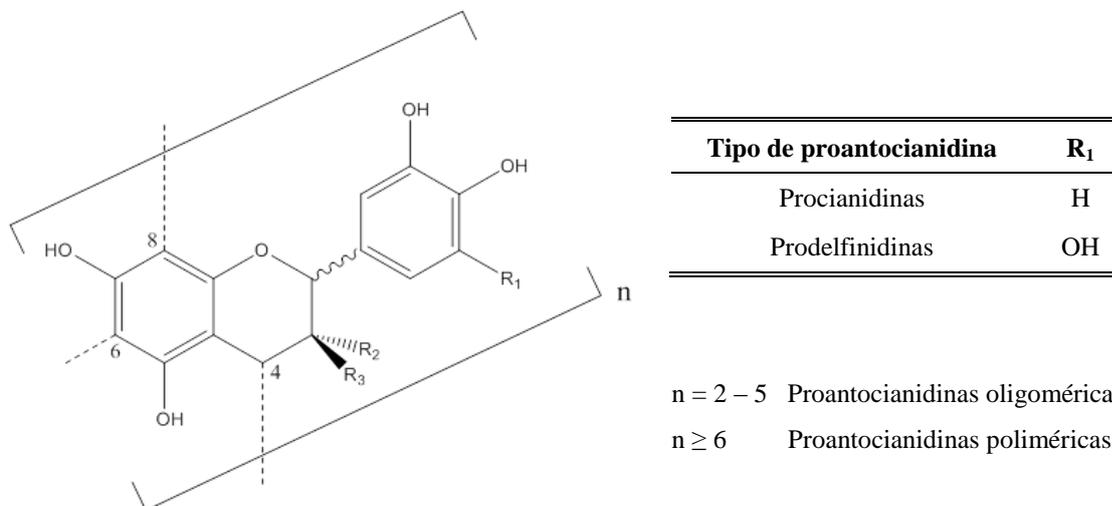
La estructura básica del grupo de las catequinas presenta dos carbonos quirales, lo que proporciona cuatro formas isoméricas ortohidroxiadas en las posiciones C<sub>3'</sub> y C<sub>4'</sub> del anillo B: la (+) / (-)-catequina y la (+) / (-)-epicatequina. La presencia de un tercer grupo hidroxilo en el C<sub>5'</sub> origina los flavanoles (+) / (-)-galocatequina y (+) / (-)-epigalocatequina (**Figura 1.18**). Adicionalmente, estos monómeros pueden presentarse esterificados con ácido gálico en la posición C<sub>3</sub>, dando lugar a los correspondientes 3-galatos. En general, los flavan-3-oles monoméricos mayoritarios de la uva son la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato (Cheynier *et al.*, 2000).



**Figura 1.18.** Estructura química de los principales flavanoles monoméricos de la uva.

Los taninos condensados se forman a partir del acoplamiento oxidativo de unidades flavanol entre las posiciones C<sub>4</sub> del heterociclo central (posición electrófila) y el C<sub>6</sub> y/o C<sub>8</sub> del monómero adyacente (posición nucleófila) (**Figura 1.19**) (Chira *et al.*, 2008). El término proantocianidina se refiere a la capacidad de los taninos condensados para transformarse en antocianidinas por calentamiento en medio ácido (reacción de Bate-Smith) a partir de la ruptura del enlace interflavánico (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1966). Según la naturaleza de la antocianidina liberada (cianidina o delphinidina), en la uva se distinguen dos tipos de proantocianidinas: las procianidinas,

formadas por (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las prodelfinidinas, constituidas por (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina.

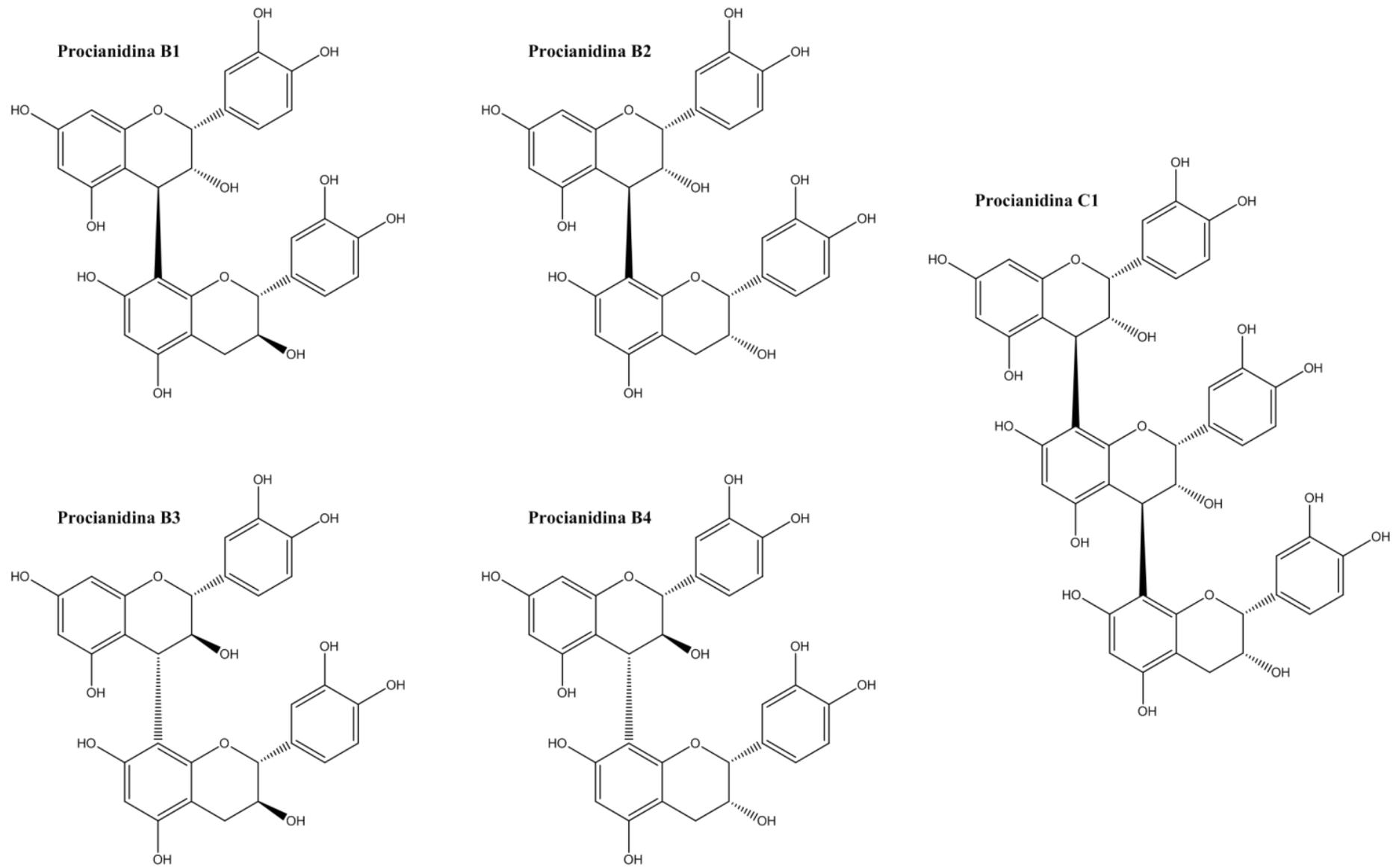


**Figura 1.19.** Estructura química general de los taninos condensados o proantocianidinas.

Las proantocianidinas también pueden diferenciarse en función de la longitud de sus cadenas. Definiéndose el número medio aproximado de unidades monoméricas que conforman la cadena como grado medio de polimerización (mDP), el término oligómero se refiere a las proantocianidinas con un mDP entre 2 y 5, y el término polímero, a aquellas con un  $mDP \geq 6$ . En la **Figura 1.20** se indican los principales flavan-3-oles oligoméricos presentes en la uva.

Cabe indicar que la estructura y tamaño de las proantocianidinas varía en función de su localización en la uva. A nivel estructural, en las pepitas sólo se ha identificado la presencia de procianidinas, mientras que en la piel y raspón también pueden encontrarse prodelfinidinas (Monagas *et al.*, 2005). En cualquier caso, las proantocianidinas de las pepitas presentan entre 2 y 6 veces mayor porcentaje de galoilación (esterificación con ácido gálico) que las localizadas en las otras fracciones de la uva (Souquet *et al.*, 2000). En lo que respecta a la longitud de las cadenas, las proantocianidinas de la piel son de mayor tamaño (mDP ~ 28) que las correspondientes a pepitas (mDP ~ 11) y raspón (mDP ~ 9) (Pinelo *et al.*, 2006a).

En la literatura pueden encontrarse estudios sobre el perfil flavan-3-olico y el grado de polimerización de las proantocianidinas de piel y pepitas por separado. Sin embargo, son escasas las referencias bibliográficas correspondientes al raspón y al orujo tratados como residuos de vinificación.



**Figura 1.20.** Estructura química de los principales flavanoles oligoméricos de la uva.

En general, cabe indicar que son numerosos los estudios que se han llevado a cabo en los últimos años sobre la caracterización del contenido y perfil de los constituyentes fenólicos en los subproductos vitivinícolas. No obstante, la mayoría de estos trabajos se centran en los orujos de uva tinta y, sobre todo, en las correspondientes pieles y/o pepitas de forma independiente. Por su parte, el raspón y el orujo de uva blanca han sido objeto de escasa investigación, pese a que también albergan un importante contenido y amplia gama de polifenoles (Makris *et al.*, 2007b). De ahí, que su evaluación merezca una mayor atención en futuros estudios.

### ***1.2.2.3. Interés de los compuestos fenólicos a nivel industrial***

Los procesos oxidativos están relacionados tanto con el deterioro de los alimentos, siendo responsables de la reducción de su valor nutricional y/o la pérdida de color, aroma, sabor o textura, como con el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas en el ser humano, tales como aterosclerosis, cáncer, cataratas, alzheimer, artritis o diabetes, entre otras (Babbar *et al.*, 2011). Todas estas patologías presentan un origen común a nivel biológico conocido con el nombre de estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio entre la generación de radicales libres (especies oxidantes) y la capacidad de los sistemas de defensa del organismo para hacer frente a la agresión y a los efectos adversos derivados (Mayne, 2003). Para reforzar las defensas naturales del organismo, éste necesita un aporte continuo de compuestos con elevada capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2008a), que, según numerosas organizaciones internacionales sobre la salud, se traduce en la incorporación de alimentos de origen vegetal en la dieta.

En las últimas décadas, son numerosos los estudios epidemiológicos que asocian los efectos beneficiosos derivados del consumo de productos de origen vegetal a la presencia, tipo y cantidad de compuestos fenólicos que incluyen en su composición (Shahidi and Naczki, 2004). Ello se debe a la elevada capacidad antioxidante que presentan dichos compuestos, ya que ésta les permite prevenir y/o inhibir los procesos oxidativos y bloquear la incidencia-ataque de radicales libres, tanto en los alimentos como en el cuerpo humano (Babbar *et al.*, 2011). Gracias a la prevención de la oxidación de biomoléculas del organismo, tales como lípidos, proteínas y/o ácidos nucleicos, la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos incluidos en nuestra dieta se traduce en toda una serie de efectos beneficiosos para la salud que se resumen en la **Tabla 1.5**.

Al igual que en el caso de la fibra dietética, el interés de los compuestos fenólicos a nivel de la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, no sólo viene determinado por los efectos fisiológicos saludables vinculados a su consumo, sino que también se relaciona con su influencia directa en las características organolépticas del producto.

**Tabla 1.5.** Efectos saludables sobre el organismo derivados de la ingesta de compuestos fenólicos de la uva.

<b>Efecto para la salud</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>
anticancerígeno	Bomser <i>et al.</i> (2000), Mantena <i>et al.</i> (2006), Hudson <i>et al.</i> (2007), Lazze <i>et al.</i> (2009), Zhou <i>et al.</i> (2012), Gollucke <i>et al.</i> (2013)
antiinflamatorio	Li <i>et al.</i> (2001), Castilla <i>et al.</i> (2006), Chacón <i>et al.</i> (2009), Terra <i>et al.</i> (2009), Overman <i>et al.</i> (2010)
antimutagénico	Stagos <i>et al.</i> (2006), Dani <i>et al.</i> (2009), Anter <i>et al.</i> (2011)
antiulceroso	Saito <i>et al.</i> (1998), Iwasaki <i>et al.</i> (2004), Li <i>et al.</i> (2008b), Wang <i>et al.</i> (2010b)
antimicrobiano (antiviral, antibacteriano, antifúngico)	Al-Habib <i>et al.</i> (2010), Cueva <i>et al.</i> (2012), Jung <i>et al.</i> (2005), Matías <i>et al.</i> (2010), Rhodes <i>et al.</i> (2006), Su <i>et al.</i> (2011)
cardioprotector	Clifton <i>et al.</i> (2004), Auger <i>et al.</i> (2004; 2005), Shanmuganayagam <i>et al.</i> (2007), Leifert <i>et al.</i> (2008), Pérez-Jiménez <i>et al.</i> (2008), Olas <i>et al.</i> (2012)
dermoprotector	Khanna <i>et al.</i> (2001; 2002), Perde-Schrepler <i>et al.</i> (2013)
hepatoprotector	Dulundu <i>et al.</i> (2007), Dani <i>et al.</i> (2008), Sehirli <i>et al.</i> (2008), Shin <i>et al.</i> (2010), Gupta <i>et al.</i> (2011),
neuroprotector	Balu <i>et al.</i> (2005; 2006), Krikorian <i>et al.</i> (2010), Wang <i>et al.</i> (2010a), Pasinetti <i>et al.</i> (2012)

En el campo de la alimentación, la incorporación de compuestos fenólicos como ingredientes funcionales contribuye al color, sabor, aroma y estabilidad oxidativa del producto (Naczk and Shahidi, 2004). Concretamente, los antocianos se utilizan como colorantes alimentarios naturales, dada su elevada solubilidad en agua y la amplia gama de colores que pueden proporcionar en función del pH del alimento (Ju and Howard, 2005; Lapornik *et al.*, 2005; Bordignon-Luiz *et al.*, 2007).

Por su parte, debido a la creciente preocupación de los consumidores sobre la posible toxicidad de los antioxidantes sintéticos incorporados a los alimentos para prevenir su oxidación durante el almacenamiento y/o procesado, son numerosos los estudios que promueven la substitución de los mismos por compuestos fenólicos de origen vegetal como antioxidantes naturales saludables (Tounsi *et al.*, 2009; Babbar *et al.*, 2011).

### 1.3. EXTRACCIÓN SÓLIDO – LÍQUIDO ASISTIDA POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA.

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y, entre otros fines, se aplica en la recuperación de ciertos compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales (Pinelo *et al.*, 2006b). En las últimas décadas, ha adquirido un papel determinante en el aislamiento de compuestos fenólicos de origen vegetal para su posterior utilización en la preparación de suplementos dietéticos o nutracéuticos, ingredientes funcionales y/o aditivos para productos alimentarios, farmacéuticos o cosméticos (Cacace and Mazza, 2003).

La extracción sólido-líquido es un proceso de transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo tiene lugar en dos etapas: una primera de lavado, en la que se produce una rápida transferencia del compuesto/-s objetivo desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa de transferencia desde el interior del sólido mediante difusión (Sturzoiu *et al.*, 2011). En la mayoría de sistemas de extracción de la industria alimentaria, se asume que la segunda etapa es el paso limitante del proceso (Cacace and Mazza, 2003; Hojnik *et al.*, 2008), debido a la resistencia natural que ofrece la fase sólida (a menudo tejidos de origen vegetal) a la transferencia de materia y/o penetración de líquidos (Cissé *et al.*, 2012). Como consecuencia el proceso es más lento, menos eficiente y requiere una mayor demanda energética y un mayor consumo de disolvente, haciendo ello menos interesante su uso a escala industrial (Viroit *et al.*, 2010; Shirsath *et al.*, 2012).

Además, el proceso de extracción sólido-líquido es una operación heterogénea y multicomponente, para la que no existe una metodología universal capaz de recuperar todos los compuestos bioactivos de interés (Naczk and Shahidi, 2004) y cuyo rendimiento es función de las condiciones experimentales y del material de partida (Pinelo *et al.*, 2005).

En las últimas décadas, como consecuencia de la investigación e innovación tecnológica en este campo, se han desarrollado toda una serie de técnicas, de carácter más ecológico que la extracción convencional, para mejorar la recuperación de compuestos bioactivos presentes en los tejidos de origen vegetal (Ghafoor *et al.*, 2009b). Entre estas técnicas cabe mencionar la extracción asistida por microondas o por

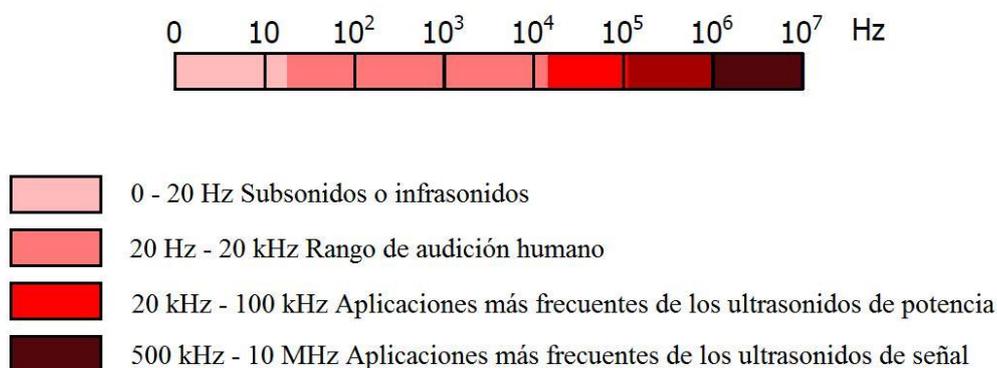
ultrasonidos de potencia, la extracción con fluidos supercríticos o la extracción acelerada con disolventes presurizados, entre otras. Todas estas metodologías se caracterizan por acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de disolvente y energía, incrementar el rendimiento del proceso y mejorar la calidad de los extractos (Wang and Weller, 2006).

De entre ellas, la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) es la técnica más ampliamente estudiada tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial, debido probablemente a que su equipo instrumental es relativamente barato y de fácil manejo (Cheung *et al.*, 2012). Además, los ultrasonidos pueden ser utilizados prácticamente con cualquier disolvente y permiten la extracción de compuestos termolábiles a bajas temperaturas (Wang and Weller, 2006).

### 1.3.1. Los ultrasonidos de potencia

La energía acústica es uno de los tipos fundamentales de energía que pueden encontrarse en la naturaleza. Las ondas que la componen son oscilaciones mecánicas en el tiempo y en el espacio que, a diferencia de las ondas electromagnéticas, necesitan de un medio material para su propagación (Cárcel, 2003).

Las ondas acústicas pueden clasificarse en función de su frecuencia (**Figura 1.21**), denominándose ondas subsónicas aquéllas que se encuentran por debajo de los 20 Hz; ondas sónicas, las que presentan frecuencias comprendidas entre 20 Hz y 20 kHz, rango que aproximadamente delimita el campo de audición humano; y ondas ultrasónicas o ultrasonidos, que son aquéllas que superan los 20 kHz de frecuencia (Mason, 1998).



**Figura 1.21.** Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia.

A su vez, los ultrasonidos pueden clasificarse según sus aplicaciones industriales, a partir de su frecuencia e intensidad. Por una parte, se distinguen los ultrasonidos de señal, de baja potencia o de baja intensidad. Éstos se caracterizan por presentar frecuencias comprendidas entre 500 kHz y 10 MHz, e intensidades inferiores a  $1 \text{ W/cm}^2$ . Dado que la energía transmitida al medio por este tipo de ultrasonidos es débil, su aplicación no induce cambios en el sistema. De ahí, su uso en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales. Ejemplos de ello serían la imagen médica, los sondeos submarinos o la monitorización de la composición y/o propiedades de los alimentos durante su procesado y/o almacenamiento (Cárcel, 2003). Estas aplicaciones diagnósticas se basan en el estudio de la variación de las propiedades de las ondas acústicas (velocidad, atenuación) a su paso por un medio físico concreto (Cárcel *et al.*, 2012).

Por otra parte, se definen los ultrasonidos de potencia (US), también conocidos como de alta intensidad, cuyas frecuencias oscilan entre los 20 y 100 kHz y su intensidad es superior a  $1 \text{ W/cm}^2$ . Este tipo de ultrasonidos tiene la capacidad de producir cambios en las propiedades físicas, mecánicas, químicas y/o bioquímicas del material o proceso en el que se aplican, derivando de ello una amplia gama de aplicaciones industriales (Awad *et al.*, 2012).

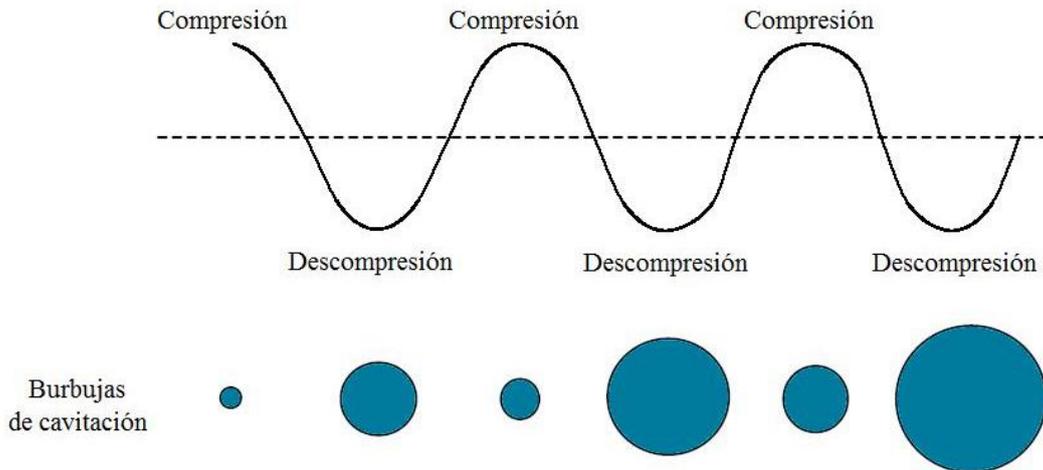
Al igual que cualquier tipo de onda, los ultrasonidos se caracterizan por una serie de parámetros, entre los que destacan principalmente la frecuencia, la intensidad y potencia acústicas, y la atenuación (García Pérez, 2007). La frecuencia (Hz) se define como el número de vibraciones o ciclos completados por la onda por unidad de tiempo. Por su parte, se entiende por intensidad de una onda acústica ( $\text{W/m}^2$ ), la energía media transmitida por unidad de tiempo a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda. La potencia acústica (W) es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo, y puede calcularse a partir de la intensidad acústica y el área de la superficie radiante. Por último, la atenuación se define como la disminución de la intensidad de la onda durante su propagación por un medio, al aumentar la distancia a la fuente que la produce. Este fenómeno puede ser consecuencia de la reflexión, dispersión y/o difracción de la onda, así como de la conversión de parte de la energía cinética en calor.

Los efectos atribuidos a los ultrasonidos de potencia pueden ser muy diferentes en función del medio físico sobre el que se apliquen (Cárcel *et al.*, 2012). En el caso de

medios líquidos, la mayoría de ellos están asociados al fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano/microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de las ondas ultrasónicas (Viot *et al.*, 2010; Shirsath *et al.*, 2012). Cuando los ultrasonidos se propagan a través de un fluido, las moléculas oscilan alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión. Durante los ciclos de compresión, los ultrasonidos ejercen una presión positiva sobre el líquido y las moléculas tienden a aproximarse. Mientras que durante los ciclos de descompresión, se produce el efecto contrario, generándose una presión negativa que tiende a separarlas. Alcanzado un cierto umbral de intensidad ultrasónica, la disminución de presión durante el ciclo de descompresión puede vencer las fuerzas de atracción entre moléculas vecinas, pudiendo aparecer cavidades en el seno del líquido a partir de núcleos de gas pre-existentes (Esclapez *et al.*, 2011).

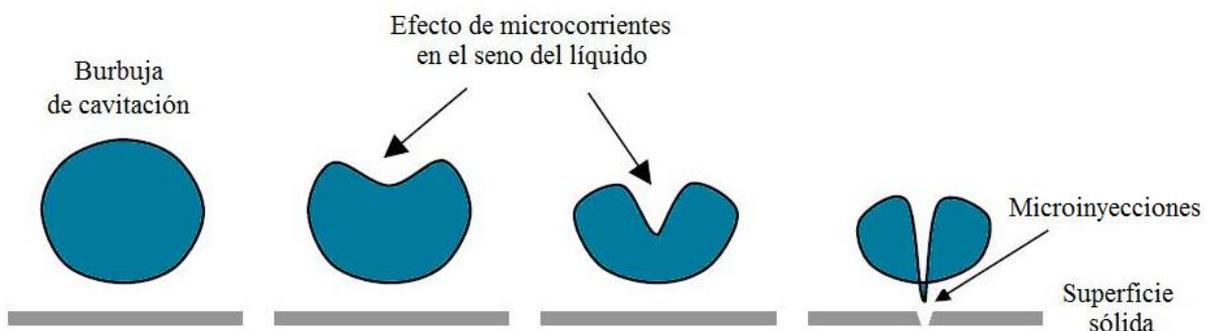
El intercambio de gas entre el líquido y las burbujas de cavitación es proporcional al área de transferencia. Durante los ciclos de descompresión o presión negativa, el flujo de gas se produce desde el líquido hacia la burbuja, haciendo que ésta se expanda. No obstante, durante el ciclo de compresión o presión positiva, el flujo de gas tiene lugar en dirección opuesta y la burbuja se contrae. Si el flujo de gas del sistema burbuja-líquido es similar en ambas direcciones, las oscilaciones de tamaño son regulares, apareciendo la denominada cavitación estable. Ésta suele darse cuando la intensidad ultrasónica no es muy elevada y/o cuando las ondas acústicas son de frecuencia alta.

No obstante, bajo condiciones de elevada intensidad y baja frecuencia ultrasónicas, la cantidad de gas que gana la burbuja en el ciclo de expansión es mayor que la perdida durante el ciclo de compresión, apareciendo la conocida como cavitación transitoria. En ella, la burbuja crece progresivamente en cada ciclo (**Figura 1.22**) hasta que alcanzado el tamaño crítico en resonancia con la frecuencia ultrasónica aplicada, la burbuja implosiona (Cárcel, 2003; Patist and Bates, 2008). Ello genera un punto localizado de elevada energía, donde se estima que las condiciones de presión y temperatura alcanzan valores de 1000 atm y 5000 K, respectivamente (Bhaskaracharya *et al.*, 2009).



**Figura 1.22.** Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido sobre el que se aplican ultrasonidos de potencia.

Además de dichas condiciones extremas, la implosión de las burbujas de cavitación provoca un gran número de efectos mecánicos en el sistema, tales como microcorrientes, turbulencia y colisiones intermoleculares a alta velocidad (Shirsath *et al.*, 2012). Adicionalmente, en el caso de sistemas sólido-líquido, tiene lugar la formación de microinyecciones (**Figura 1.23**) como consecuencia de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en posiciones cercanas a la interfase sólido-líquido. Las microinyecciones pueden alterar de forma significativa las características y estructura del sólido, pues pueden provocar el descamado y erosión de su superficie, así como la formación de microfracturas, con la consecuente dispersión de partículas, el descubierta de nuevas superficies activas y el incremento de transferencia de materia entre las dos fases (Vilkhu *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2011).



**Figura 1.23.** Formación de microinyecciones en una interfase sólido-líquido como consecuencia del fenómeno de cavitación producido por la aplicación de ultrasonidos de potencia.

La intensidad de la cavitación, así como sus efectos, depende de las características del medio y de las variables del proceso (frecuencia e intensidad ultrasónicas y temperatura) (Cárcel *et al.*, 2012).

El equipo necesario para la aplicación de ultrasonidos de potencia está constituido por tres elementos fundamentales: un generador, un transductor y un emisor (García Pérez, 2007). El generador transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor, que suele ser un cuerpo vibrante, es la fuente que genera los ultrasonidos a partir de la señal eléctrica de alta frecuencia que recibe del generador. El emisor, por su parte, es el elemento que transmite la energía acústica generada por el transductor al medio que se desea tratar (Patist and Bates, 2008).

De entre los equipos de aplicación de ultrasonidos en medios acuosos destacan principalmente los baños y los sistemas tipo sonda. Los baños de ultrasonidos son posiblemente los sistemas de aplicación de ultrasonidos de potencia más utilizados, debido a que se trata de equipos simples, compactos y económicos, con los transductores colocados en la base del recipiente y con el sistema de generación-emisión incluido en el mismo. Sus principales limitaciones son la poca potencia que, comparados con otros sistemas, suministran al medio; la dificultad en el control de temperatura; y la variación de la intensidad ultrasónica en función de la posición dentro del baño.

En los equipos tipo sonda, se utiliza una sonda metálica como emisor del sistema para aplicar al medio líquido la vibración generada por el transductor. El material utilizado para su fabricación debe tener una alta resistencia a la fatiga y erosión que provoca el fenómeno de cavitación.

Al propagarse los ultrasonidos por un medio, se transmite energía acústica que puede ser disipada en forma de calor debido a los rozamientos producidos entre moléculas y al trabajo realizado al desplazarlas en un medio sujeto a fuerzas de cohesión contrarias al desplazamiento de las mismas (García Pérez, 2007). La absorción de los ultrasonidos y, consecuentemente, el calentamiento del medio, depende de las características viscosas del mismo, así como de la frecuencia y potencia ultrasónicas aplicadas (Cárcel, 2003).

Otro aspecto importante, tanto en el uso de baños de ultrasonidos como de equipos tipo sonda, es la caracterización de la intensidad del campo acústico que

realmente actúa sobre el sistema, dado que la potencia nominal del equipo no se corresponde con su potencia real de trabajo. Los métodos calorimétricos, basados en la medida de la generación de calor que se produce en un medio al aplicar ultrasonidos, son los más utilizados.

### **1.3.2. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida acústicamente**

Como consecuencia de los efectos mecánicos derivados del fenómeno de cavitación, los ultrasonidos de potencia se caracterizan por una amplia y potencial aplicabilidad en la industria alimentaria. De entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos de emulsión, cristalización, congelación, descongelación, secado y/o filtración.

En los trabajos de revisión recientemente publicados en la bibliografía por Patist *et al.* (2008), Bhaskaracharya *et al.* (2009), Soria *et al.* (2010), Chemat *et al.* (2011), Awad *et al.* (2012) y Chandrapala *et al.* (2012), se incluyen ejemplos de diferentes estudios basados en la aplicación de los ultrasonidos de potencia en las operaciones de la industria alimentaria mencionadas, así como en procesos de ablandamiento de carne, corte de piezas, fermentación, desgasificación, despolimerización, limpieza, pasteurización y esterilización, entre otros. No obstante, una de las mayores y más importantes aplicaciones de los ultrasonidos de potencia en la industria alimentaria es la asistencia de procesos de extracción sólido-líquido para la obtención de componentes bioactivos de origen vegetal (Vilkhu *et al.*, 2008).

Tal y como se ha indicado anteriormente, la extracción convencional presenta ciertas limitaciones en cuanto al tiempo y temperatura de trabajo, el consumo de energía y el volumen de disolvente utilizado. Sin embargo, la asistencia con ultrasonidos permite mejorar el proceso, así como acelerarlo, gracias a los efectos derivados del fenómeno de cavitación (Esclapez *et al.*, 2011). Según Mason *et al.* (2011), son cuatro los mecanismos interconectados a través de los cuales los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción:

- *Rotura de las paredes celulares:* como consecuencia de la formación de microinyecciones a raíz de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en la zona próxima a la interfase sólido-líquido. Ello aumenta la permeabilidad del tejido vegetal, libera el material intracelular y reduce el

tamaño de partícula, incrementando progresivamente la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción;

- *Incremento de la solubilidad de los analitos:* provocada por el incremento localizado de la temperatura en la zona de implosión de las burbujas de cavitación;
- *Mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto:* como consecuencia del aumento localizado de presión, así como de la rotura y erosión de la superficie celular originadas por los microinyecciones;
- *Mejora de la difusión:* gracias a que los ultrasonidos provocan microcorrientes que favorecen la continua renovación de la capa de disolvente en contacto con la superficie del sólido.

La conjunción de todos estos mecanismos resulta en el incremento de la transferencia de materia desde la matriz del sólido vegetal hasta el seno del disolvente, al mismo tiempo que permite, con respecto a la extracción convencional, trabajar a temperaturas inferiores y reducir el tiempo de operación.

La influencia de variables tales como el tipo de disolvente, la temperatura de trabajo, el tamaño de partícula o el ratio sólido-líquido, han sido las variables más estudiadas en procesos de extracción asistidos por ultrasonidos de potencia. No obstante, cabe apuntar que son escasos los trabajos que evalúan cómo la frecuencia y potencia ultrasónicas afectan al proceso de extracción, pese a que la intensidad del efecto de cavitación depende directa y sustancialmente de estos parámetros (Esclapez *et al.*, 2011).

### **1.3.3. Modelización y simulación del proceso**

En ingeniería de alimentos, la modelización constituye una herramienta de gran utilidad para la simulación, optimización, control y diseño de procesos, gracias a su capacidad para describir y predecir el comportamiento del sistema bajo diferentes condiciones de operación. Al mismo tiempo, la modelización puede contribuir a un mejor aprovechamiento de la energía, tiempo, materia prima y disolvente invertidos en el proceso (Simal *et al.*, 2006; Bucic-Kojic *et al.*, 2013; Radha Krishnan *et al.*, 2013). En la modelización de un sistema pueden distinguirse dos fases fundamentales: una

primera, consistente en la formulación, resolución e identificación paramétrica; y, una segunda, de simulación y validación (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2007; Eim, 2012).

En el planteamiento matemático del modelo, una vez determinadas las variables que influyen en el proceso, deben establecerse las relaciones matemáticas existentes entre las mismas para definir las ecuaciones representativas. Estas relaciones matemáticas pueden ser de carácter fenomenológico o empírico. Los modelos fenomenológicos son aquéllos cuyo principio de formulación se basa en leyes físicas, siendo los derivados de la teoría de difusión, o segunda Ley de Fick, los más utilizados en procesos de extracción (Blasco *et al.*, 2006). Por su parte, los modelos empíricos o no paramétricos son aquéllos que se formulan a partir de datos experimentales, que, en el caso de la extracción, deben ser representativos de la transferencia de materia que tiene lugar en cada momento (Garau, 2008).

En general, los modelos empíricos no explican físicamente el proceso, dado que su único objetivo es determinar las variables relevantes y describir las relaciones existentes entre las mismas. Sin embargo, resultan de gran utilidad para ciertas aplicaciones industriales o para simplificar el estudio de sistemas complejos, difícilmente formulables y/o solucionables mediante modelos fenomenológicos (Blasco *et al.*, 2006). Tal es el caso de la extracción de compuestos bioactivos de materiales de origen natural, dada la heterogeneidad de las muestras y la complejidad del mecanismo de transferencia de materia debido al carácter multicomponente de las mismas. En la bibliografía también se dispone de los denominados modelos semi-empíricos, entendidos como aquéllos que utilizan estimaciones empíricas y leyes físicas simultáneamente, para dar un cierto significado físico a los parámetros cinéticos del sistema.

Desde de un punto de vista industrial, la determinación de los parámetros cinéticos de un proceso de extracción resulta de gran importancia para determinar el efecto de las diferentes variables de operación y asegurar una mayor eficiencia del mismo. Es por ello que existen en la literatura numerosos modelos empíricos y/o semiempíricos utilizados en la interpretación de las cinéticas de extracción (Quispe-Fuentes *et al.*, 2013). En la **Tabla 1.6** se destacan algunos de ellos, incluido el conocido como modelo de Weibull.

**Tabla 1.6.** Modelos empíricos y semiempíricos más utilizados en la bibliografía para las cinéticas de extracción de compuestos bioactivos de origen vegetal.

Modelo	Ecuación	Referencia bibliográfica
Difusión parabólica	[1.2]	Kitanovic <i>et al.</i> (2008) Teoh <i>et al.</i> (2012)
Elovich's	[1.3]	Kitanovic <i>et al.</i> (2008) Cheung <i>et al.</i> (2012) Lafka <i>et al.</i> (2013)
Page	[1.4]	Amendola <i>et al.</i> (2010) Jokic <i>et al.</i> (2010) Quispe-Fuentes <i>et al.</i> (2013)
Peleg	[1.5]	Amendola <i>et al.</i> (2010) Jokic <i>et al.</i> (2010) Lafka <i>et al.</i> (2013)
Power Law Model	[1.6]	Sturzoiu <i>et al.</i> (2011) Cheung <i>et al.</i> (2012) Lafka <i>et al.</i> (2013)
Weibull	[1.7]	Sturzoiu <i>et al.</i> (2011) Cheung <i>et al.</i> (2012)

*RE*, rendimiento de extracción, ( $C/C_0$ ).

### 1.3.3.1. Modelo de Weibull

El modelo empírico de Weibull está basado en una función probabilística utilizada para predecir el comportamiento de sistemas complejos variantes (Cunha *et al.*, 1998). Concretamente, en el campo de la tecnología de alimentos, el modelo de Weibull ha sido ampliamente utilizado para describir procesos degradativos, ya sea de inactivación enzimática, crecimiento y supervivencia de microorganismos y/o degradación química de los atributos de un producto. No obstante, también se ha aplicado satisfactoriamente a cinéticas de secado-rehidratación y, más recientemente, de extracción (**Tabla 1.7**).

El modelo de Weibull consiste en una ecuación exponencial (ecuación [1.7], **Tabla 1.6**), donde el parámetro  $\alpha$  está relacionado con la cinética del proceso, presentando una relación inversa con la constante de velocidad del mismo (Blasco *et al.*, 2006); y  $\beta$  es un parámetro de forma característico del material, que se asimila como un índice de su comportamiento durante el proceso (Sturzoiu *et al.*, 2011). La inclusión del parámetro de forma además del parámetro cinético  $\alpha$ , es lo que confiere al modelo de Weibull flexibilidad y potencial para describir un gran número de procesos.

**Tabla 1.7.** Ejemplos de uso del modelo de Weibull en tecnología de alimentos.

<b>Tipo de proceso</b>	<b>Producto</b>	<b>Variable objetivo</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Inactivación enzimática / crecimiento de microorganismos	Zumo de naranja y zanahoria	Pectinmetilesterasas / mohos y levaduras	Rodrigo <i>et al.</i> (2003)
Inactivación enzimática	Preparado enzimático comercial	Pectinesterasas	Giner <i>et al.</i> (2005)
Inactivación enzimática	Zumo de naranja	Peroxidasas	Elez-Martínez <i>et al.</i> (2006)
Inactivación enzimática	Leche desnatada	Lipasas	Soliva-Fortuny <i>et al.</i> (2006)
Crecimiento de microorganismos	Zumo de naranja y zanahoria	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Rodrigo <i>et al.</i> (2001)
Crecimiento de microorganismos	Leche	<i>Listeria monocytogenes</i>	Chen <i>et al.</i> (2004)
Crecimiento de microorganismos	Soluciones de sacarosa	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fernández <i>et al.</i> (2007a)
Crecimiento de microorganismos	Pechuga de pollo cruda	<i>Listeria innocua</i> y <i>Salmonella enterica</i>	Pradhan <i>et al.</i> (2012)
Degradación química	Zumo de tomate	Licopeno, vitamina C y capacidad antioxidante	Odriozola-Serrano <i>et al.</i> (2008)
Degradación química	Fresas	Antocianos, vitamina C y capacidad antioxidante	Odriozola-Serrano <i>et al.</i> (2009)
Degradación química	Sandía	Licopeno, vitamina C, fenólicos totales y capacidad antioxidante	Oms-Oliu <i>et al.</i> (2009)
Degradación química	Piña	Ácido L-ascórbico	Santos <i>et al.</i> (2009)
Degradación química	Peras	Ácido L-ascórbico	Mrad <i>et al.</i> (2012)
Degradación química	Zanahorias	Fenólicos totales y capacidad antioxidante	Eim <i>et al.</i> (2013)
Secado	Rizomas de cúrcuma	Humedad	Blasco <i>et al.</i> (2006)
Secado	Coroba	Humedad	Corzo <i>et al.</i> (2008)
Secado	Arándanos	Humedad	López <i>et al.</i> (2010)
Secado	Pepino	Humedad	Uribe <i>et al.</i> (2011)
Rehidratación	Zanahoria deshidratada	Humedad	Marabi <i>et al.</i> (2003)
Rehidratación	Algas marinas	Humedad	Cox <i>et al.</i> (2012)
Extracción	Escaramujo <sup>a</sup>	$\beta$ -caroteno	Sturzoiu <i>et al.</i> (2011)
Extracción	Hongos medicinales	Sólidos solubles	Cheung <i>et al.</i> (2012)
Extracción	Orujo de uva tinta	Antocianos	Sant'Anna <i>et al.</i> (2012b)
Extracción	Pepitas de quinoa	Saponinas	Quispe-Fuentes <i>et al.</i> (2013)

<sup>a</sup> Fruto del rosal silvestre.

### ***1.3.3.2. Metodología de superficie de respuesta***

En los últimos años, la metodología de superficie de respuesta (RSM) ha sido amplia y satisfactoriamente aplicada en el desarrollo y optimización de un gran número de procesos relacionados con la industria agroalimentaria (Karacabey and Mazza, 2010). La RSM comprende un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de los datos experimentales a modelos empíricos (Bezerra *et al.*, 2008).

Se trata de una herramienta estadística multivariable de modelización y optimización, que se aplica a aquellos procesos en los que una o varias respuestas están condicionadas por varios factores y sus interacciones (Bas and Boyaci, 2007). La RSM permite construir un modelo de tipo polinómico que describe el comportamiento de la base de datos, sin necesidad de realizar experimentalmente todas las combinaciones posibles de las variables en estudio. Los objetivos principales de la RSM radican en: i) estimar el efecto de las variables independientes del proceso y de sus interacciones sobre la/-s respuesta/-s; ii) determinar la combinación de factores que origina una respuesta óptima del sistema; y iii) proporcionar un modelo matemático multivariable para realizar previsiones estadísticas (Ku and Mun, 2008; Rodríguez-González *et al.*, 2012).

La aplicación de la RSM conlleva una serie de etapas (Bas and Boyaci, 2007; Bezerra *et al.*, 2008):

- Estudio preliminar en el que se determinan las variables independientes con mayor influencia en el sistema y se delimitan sus niveles experimentales de acuerdo con el objetivo del estudio;
- Selección y ejecución del diseño experimental;
- Modelización matemática de los datos experimentales de acuerdo con una función polinómica multivariable;
- Evaluación del ajuste del modelo;
- Representación de las superficies de respuesta y cálculo de las condiciones óptimas para alcanzar el mayor rendimiento del proceso.

La ecuación matemática a la que se ajustan los datos experimentales en la RSM consiste en una función polinómica de segundo orden:

$$[1.8]$$

Donde  $Y$  es la respuesta predicha;  $X_i$  y  $X_j$ , las variables independientes;  $\delta_0$ , la constante del modelo; y  $\delta_i$ ,  $\delta_{ii}$  y  $\delta_{ij}$ , los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción del modelo, respectivamente.

Para estimar los parámetros de la ecuación [1.8] y poder representar las correspondientes superficies de respuesta del sistema, los diseños experimentales más frecuentes son el Box-Behnken y el de composición central (**Tabla 1.8**), que difieren con respecto al número de niveles experimentales de cada variable independiente considerada y respecto al número de experimentos realizados. No obstante, ambos se caracterizan por requerir niveles experimentales equidistantes de las variables en estudio (Bezerra *et al.*, 2008).

**Tabla 1.8.** Diseños experimentales de RSM más utilizados en la bibliografía relacionada con procesos de extracción de compuestos bioactivos en la industria alimentaria.

Modelo	Compuestos bioactivos extraídos	Referencia bibliográfica
Box-Behnken	Flavonoides, polisacáridos, compuestos fenólicos, antocianos, carotenoides, cafeína, clorofilas	Yang <i>et al.</i> (2010), Chen <i>et al.</i> (2011), Singh <i>et al.</i> (2011), Strati <i>et al.</i> (2011), Zou <i>et al.</i> (2011), Park <i>et al.</i> (2012)
Composición Central	Compuestos fenólicos, resveratrol, antocianos, flavonoides	Ballard <i>et al.</i> (2009), Ghafoor <i>et al.</i> (2009a; 2009b; 2011), Gan <i>et al.</i> (2011), Saha <i>et al.</i> (2011), Tabaraki <i>et al.</i> (2011)



## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

La gran cantidad de residuos sólidos generados de forma estacional por el sector vitivinícola vendimia tras vendimia, provoca una importante problemática medioambiental. En las últimas décadas, para contribuir a la gestión de los mismos, se ha propuesto la revalorización de este tipo de subproductos agrícolas como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos para la producción de ingredientes funcionales.

El objetivo general del presente trabajo consistió en **evaluar el uso potencial de los subproductos de vinificación como fuente de fibra alimentaria y compuestos antioxidantes**. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- Determinar la importancia del origen geográfico y de la añada sobre las características físico-químicas de los residuos de vinificación;
- Caracterizar la fracción de fibra dietética y la composición y perfil fenólico de orujos y raspones de diferentes variedades de uva (*Vitis vinifera* L.);
- Estudiar el proceso de extracción acuosa de compuestos fenólicos asistida acústicamente a partir de residuos de vinificación, haciendo uso de dos equipos de ultrasonidos de potencia (plato transductor y sonda). Para ello se definieron dos sub-objetivos:
  - analizar el efecto de la frecuencia y potencia de ultrasonidos sobre el proceso;
  - y estudiar el efecto de la temperatura sobre las cinéticas de extracción.



## **MATERIALES y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES y MÉTODOS

A continuación se describen las materias primas objeto de este estudio, la metodología analítica y equipos utilizados, los diseños experimentales propuestos y el tratamiento estadístico aplicado durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

#### 3.1. MATERIA PRIMA

Para la consecución de los objetivos planteados, se utilizaron muestras de uva, suelo y residuos de vinificación de diferente procedencia y añada. En concreto, se ha trabajado con seis variedades de uva tinta (*Cabernet Sauvignon* [CS], *Callet* [Ca], *Manto Negro* [MN], *Merlot* [Me], *Syrah* [Sy], *Tempranillo* [Te]) y cuatro variedades de uva blanca (*Chardonnay* [Ch], *Macabeu* [Ma], *Parellada* [Pa], *Premsal Blanc* [PB]) (Figura 3.1).

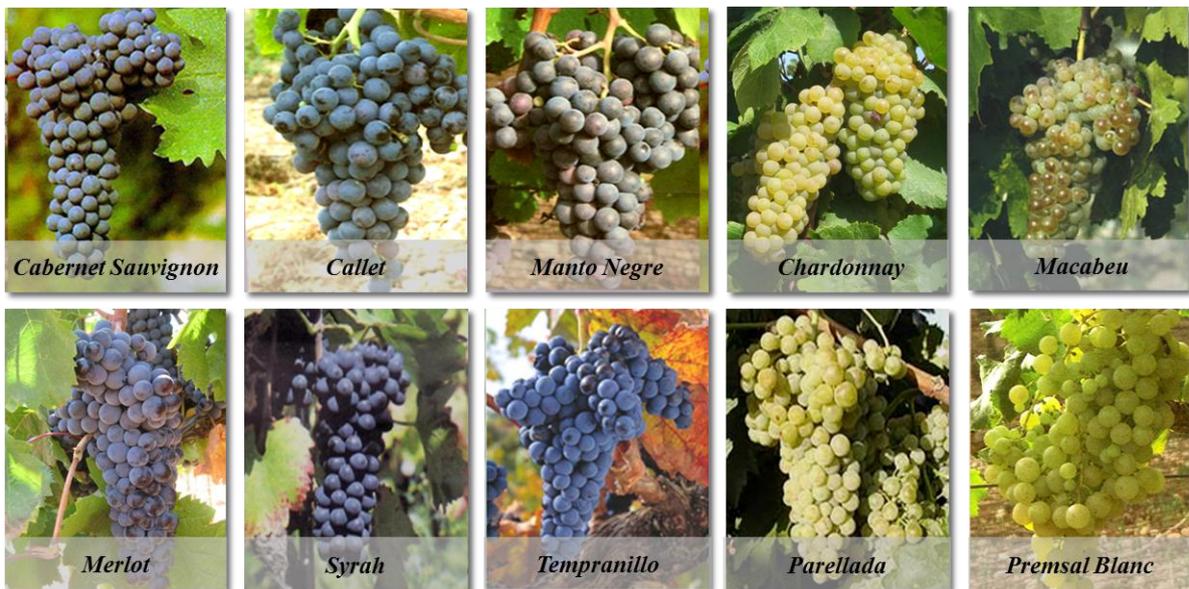


Figura 3.1. Variedades de uva (*Vitis vinifera* L.).

Los residuos o subproductos de vinificación analizados fueron el orujo y el raspón (Figura 3.2).



Figura 3.2. Subproductos de vinificación.

### 3.1.1. Uva

Las muestras de uva (*Vitis vinifera* L.) consideradas se detallan en la **Tabla 3.1**. Todas ellas se recolectaron manualmente en los correspondientes viñedos de las Islas Baleares (IB) y se conservaron un máximo de siete días a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

**Tabla 3.1.** Muestras de uva (*Vitis vinifera* L.).

Código de muestra	Variedad	Origen	Vendimia
U1	CS / Me	IGPs de las IB	2009
U2	CS / Me	DOs de las IB	2009 / 2010
U3	CS / Ca / MN / Me / Sy Te / Ch / Ma / Pa / PB	Bodega Pere Seda S.L. (Manacor, IB, España)	2009

### 3.1.2. Orujo

Las muestras de orujo consideradas se detallan en la **Tabla 3.2**. Todas ellas se recolectaron tras una etapa de prensado: concretamente, las correspondientes a orujo fresco se recogieron el mismo día de la vendimia, y las de orujo fermentado tras la maceración de la uva durante 2 – 3 semanas. Todas las muestras se conservaron al vacío a –80 °C hasta su análisis.

**Tabla 3.2.** Muestras de orujo.

Código de muestra	Tipo de orujo	Variedad	Origen	Vendimia
O1	Fresco	CS / Ca / MN / Me / Sy Te / Ch / Ma / Pa / PB	Bodega Pere Seda S.L. (Manacor, IB, España)	2009
O2	Fresco	Sy	Bodega Shadowfax (Werribee, VIC, Australia)	2011
O3	Fermentado	Sy	Bodega Ca'n Majoral (Algaida, IB, España)	2011

### 3.1.3. Raspón

Las muestras de raspón consideradas en este estudio se detallan en la **Tabla 3.3**. Todas ellas se recolectaron el mismo día de la vendimia tras la etapa de despallado y se conservaron bajo condiciones de vacío a –80 °C hasta su análisis.

**Tabla 3.3.** Muestras de raspón.

Código de muestra	Variedad	Origen	Vendimia
R1	CS / Ca / MN / Me / Sy Te / Ch / Ma / Pa / PB	Bodega Pere Seda S.L. (Manacor, IB, España)	2009

### 3.1.4. Suelo

Las muestras de suelo consistieron en fracciones superficiales representativas de cada viñedo, tomadas a una profundidad de 0 – 20 cm (**Tabla 3.4**).

**Tabla 3.4.** Muestras de suelo.

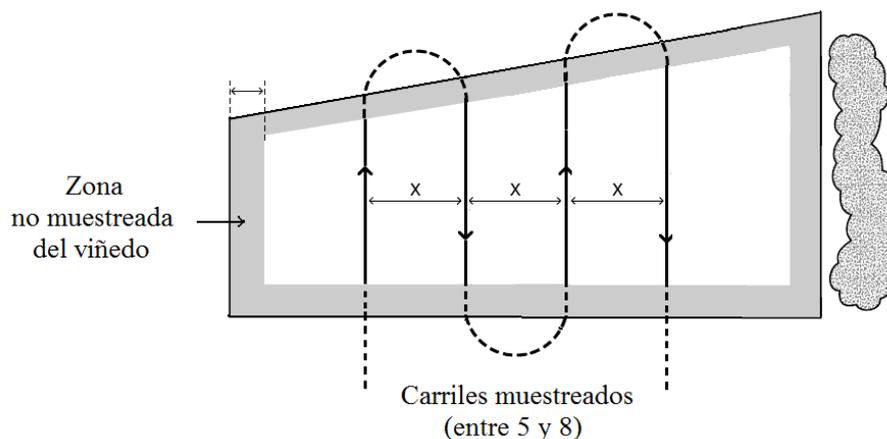
Código de muestra	Origen	Año
S1	IGPs de las IB	2009
S2	DOs de las IB	2009 / 2010

## 3.2. METODOLOGÍA

### 3.2.1. Sistemas de muestreo

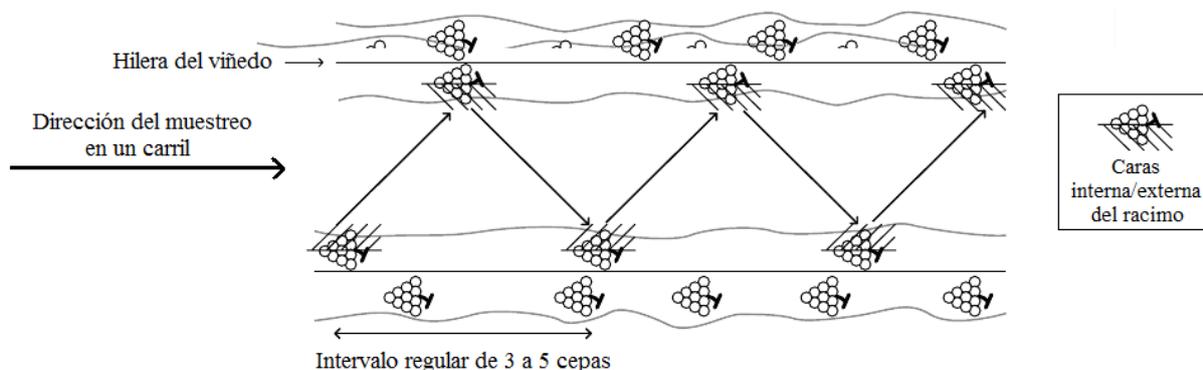
#### 3.2.1.1. Muestreo de uva

Para cada una de las variedades de uva objeto de estudio, se tomó una muestra representativa de cada viñedo. Para ello, el muestreo se realizó de manera uniforme en toda su superficie, descartando tanto las hileras colindantes de la parcela como las cepas ubicadas al principio de cada hilera, con el fin de evitar posibles desviaciones del comportamiento general de la viña (**Figura 3.3**). Delimitada la zona de muestreo, en un mismo carril del viñedo, se recogieron muestras de uva cada tres o cinco cepas, realizando un barrido del carril en forma de zig-zag (**Figura 3.4**). Dicha operación se repitió en un total de 5 a 8 carriles no consecutivos, en función de la superficie total del viñedo.



**Figura 3.3.** Diagrama de muestreo de uva en el viñedo (adaptado de Blouin and Peynaud (2004)).

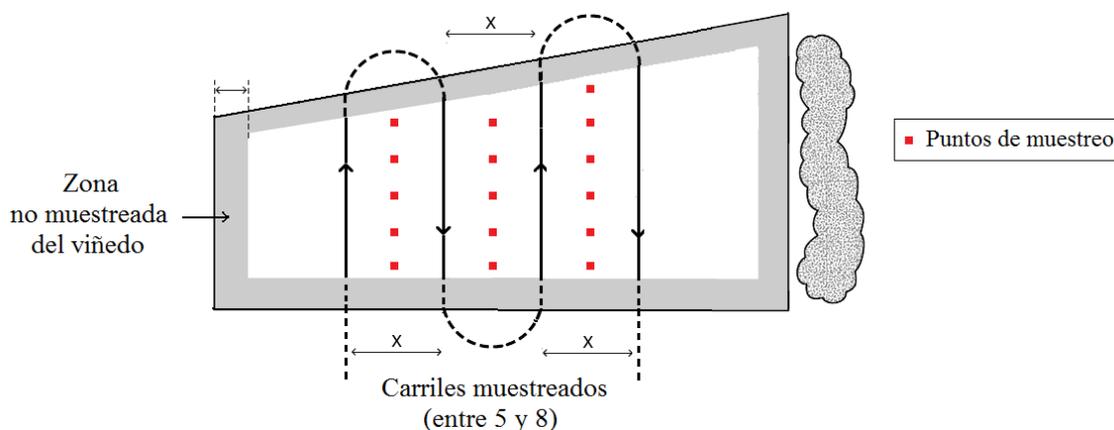
Para cada cepa muestreada, se consideraron racimos situados a diferente altura y bajo diferentes condiciones de incidencia solar. Y para evitar la heterogeneidad en cada racimo, se tomaron aleatoriamente uvas de la parte superior, central e inferior, de las caras externa e interna del racimo, y de diferente tamaño y grado de madurez. En total, se recogieron un mínimo de 3 kg de uva por viñedo.



**Figura 3.4.** Muestreo de uva a nivel de un carril del viñedo (adaptado de Hidalgo Togados (2006)).

### 3.2.1.2. Muestreo de suelo

En el caso de las muestras de suelo, para evitar interferencias con abonos y fertilizantes, se realizó un muestreo sistemático en el período de descanso biológico de la viña (marzo-abril). Al igual que para la uva, el muestreo del suelo se realizó descartando los carriles colindantes de la parcela. Para obtener una muestra de suelo representativa, se consideraron de 20 a 30 puntos de muestreo uniformemente distribuidos a lo largo de toda la superficie del viñedo (**Figura 3.5**). En dichos puntos, se tomaron, con ayuda de una barrena, muestras individuales superficiales (profundidad de 0 – 20 cm) hasta un peso total de 10 a 15 kg por viñedo.



**Figura 3.5.** Diagrama de muestreo de suelo en el viñedo (adaptado de Blouin and Peynaud (2004)).

### 3.2.2. Preparación de mosto y mosto macerado a partir de la uva

Para la preparación del mosto o zumo de uva se procedió al prensado manual de la misma (**Figura 3.6**) con la ayuda de un colador.

Por su parte, para la obtención del mosto macerado se trataron ~ 50 g de uva, ligeramente molturada con ayuda de una trituradora eléctrica, con 15 mL de EtOH 57%, durante 24 h a 24 °C y con agitación continua de vaivén (baño termostático Unitronic 320-OR, Selecta, España). Posteriormente y de forma previa a su análisis, el mosto macerado se separó de los restos sólidos de piel, pulpa y pepitas por decantación. El proceso de maceración se llevó a cabo por triplicado para cada muestra de uva en estudio.



**Figura 3.6.** Detalle del prensado manual de la uva para la obtención de su zumo o mosto.

### 3.2.3. Análisis químico general

Todas las determinaciones analíticas contempladas en el presente apartado se realizaron por triplicado.

#### 3.2.3.1. Humedad

El análisis del contenido de humedad se realizó siguiendo el procedimiento descrito por la AOAC n° 934.06 (AOAC, 1997). Se secaron 5 – 10 g de muestra (ligeramente triturada en el caso de la uva) en estufa de vacío (Vaciotem-T, Selecta, España) a  $70 \pm 2$  °C hasta peso constante (~ 24 h). El valor del contenido de humedad (%) se calculó en base a la variación de peso.

#### 3.2.3.2. Cenizas

La determinación de cenizas se llevó a cabo de acuerdo con el método AOAC n° 945.46 (AOAC, 1997). Se incineraron ~ 5 g de muestra en un horno de mufla (Select-Horn, Selecta, España) a 550 °C hasta la obtención de un residuo seco de color blanco. A partir de la variación de peso se calculó la cantidad de cenizas o residuo mineral (%).

### **3.2.3.3. Proteínas**

El contenido de proteínas se determinó según el método Kjeldahl de la AOAC nº 991.20 (AOAC, 1997) utilizando un equipo Tecator (Suecia) formado por un digestor (modelo 2020) y un sistema de destilación-valoración (Kjeltec 1035/38). La digestión de ~ 5 g de muestra se realizó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en presencia de un catalizador de Cu, lo que permitió la liberación del nitrógeno y su retención en forma de sal de amonio. La posterior destilación del último y su valoración con HCl 0.1 N, proporcionó la cantidad de nitrógeno total (N<sub>total</sub>) presente en la muestra. El contenido de proteínas se estimó como N<sub>total</sub> x 6.25 (Pearson, 1981).

### **3.2.3.4. Lípidos**

La determinación del contenido de lípidos se realizó por gravimetría (nº 991.36, AOAC, 1997) mediante extracción de la muestra con dietiléter utilizando un equipo Soxhlet (Soxtec, Tecator, Suecia).

### **3.2.3.5. Azúcares solubles**

La concentración de azúcares solubles de la muestra se determinó colorimétricamente según la metodología descrita por Femenia *et al.* (1995), usando antrona como reactivo y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

## **3.2.4. Parámetros enológicos**

### **3.2.4.1. pH**

El pH se midió por triplicado a 20 °C utilizando ~ 25 mL de mosto (pH-metro modelo PH 25 y electrodo 5051, Crison, España) de acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento (CEE) Nº 2676/90 (1990).

### **3.2.4.2. Acidez total**

La acidez total se analizó por triplicado mediante valoración de 10 mL de mosto sobre 25 mL de agua destilada utilizando NaOH 0.0667 M hasta pH 8.20 como punto final, según el método AOAC nº 962.12 (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron en g ácido tartárico/L.

### **3.2.4.3. Grado alcohólico probable**

El grado alcohólico probable del mosto se evaluó mediante refractometría de acuerdo con el Reglamento (CEE) Nº 2676/90 (1990). Previa centrifugación de la muestra, se midieron los grados Brix (° Brix) con ayuda de un refractómetro (Abbe 325,

Zuzi, China) a 20 °C y con una precisión de cuatro decimales. El grado alcohólico probable (% vol) se determinó a partir de la ecuación [3.1] (válida para el intervalo de temperaturas 15 – 25 °C) y con ayuda de tablas de corrección de temperatura en caso necesario.

[3.1]

#### **3.2.4.4. Características cromáticas**

Para definir las características cromáticas del mosto se evaluó la intensidad colorante (I), calculada a partir de la ecuación [3.2] como la suma de las absorbancias de la muestra a 420, 520 y 620 nm; y la tonalidad de color (TC), expresada como una relación entre las absorbancias a 420 y 520 nm (ecuación [3.3]), de acuerdo con lo dispuesto en el Reglamento (CEE) N° 2676/90 (1990). Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis (MultisKan Spectrum, Thermo Scientific, Finlandia) y se realizaron 32 réplicas por muestra.

[3.2]

[3.3] —

#### **3.2.5. Extracción de la fibra dietética. Residuo insoluble en alcohol**

Con el objeto de determinar el contenido, composición química y propiedades funcionales de la fibra dietética de la uva y de los residuos de vinificación, se procedió a la extracción de los polisacáridos de sus paredes celulares (CWP) mediante el método conocido como residuo insoluble en alcohol (AIR) (Femenia *et al.*, 2003), previa comprobación por tinción con una solución I<sub>2</sub>/KI, que todas las muestras estaban libres de almidón.

Para ello, ~ 50 g de muestra se trataron con una solución EtOH/H<sub>2</sub>O hasta conseguir una mezcla al 85% de EtOH, homogeneizándose el conjunto con ayuda de un Ultraturrax (DiAx 600, Heidolph, Alemania) y llevándose a ebullición para inactivarlo a nivel enzimático. La solución resultante se filtró al vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtro de microfibras de vidrio, libre de celulosa). Una vez descartado el filtrado, el residuo sólido se resuspendió en EtOH 85% y se sometió de nuevo a los pasos de homogeneización, ebullición y filtración. Esta operación se repitió con EtOH absoluto y acetona. Tras evaporarse los restos de disolvente a 23 ± 1 °C durante 24 h, se obtuvo el

AIR o concentrado de fibra. Los resultados se expresaron en unidades de g AIR/100 g sólido seco, como valor medio de tres determinaciones.

Previa trituración y tamizado de estos concentrados de fibra (0.5 mm), se realizó la determinación de la composición química (contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos, y grado de metil-esterificación de las pectinas) y de las propiedades funcionales (hinchamiento y capacidad de retención de agua y lípidos).

### **3.2.6. Caracterización de la fracción de fibra dietética**

#### ***3.2.6.1. Identificación y cuantificación de los azúcares neutros***

##### *Hidrólisis Saeman*

Los azúcares neutros o unidades básicas de los polisacáridos de las paredes celulares de la uva y de los residuos de vinificación fueron liberados mediante hidrólisis ácida (condiciones de la hidrólisis Saeman) (Brett and Waldron, 1990). Se mezclaron ~ 5 mg de AIR con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M y se incubó durante 3 h a 23 ± 1 °C, con el objeto de solubilizar la celulosa por rotura de los enlaces de hidrógeno que mantienen compacta su estructura. A continuación, se diluyó el medio a una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se incubó a 100 °C durante 2.5 h, permitiendo así la hidrólisis total de los polisacáridos de la pared celular.

Para determinar por diferencia el contenido en celulosa de las muestras, otra serie de las mismas se sometió únicamente a la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (100 °C, 2.5 h) (Garau *et al.*, 2007). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

##### *Determinación de los azúcares*

Una vez finalizada la hidrólisis, se adicionó una cantidad conocida de patrón interno 2-deoxyglucosa (2-dGlc, 200 µg) a todas las muestras, con el objeto de determinar de forma cuantitativa la presencia de los azúcares de referencia ramnosa (Rha), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xyl), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc).

Las soluciones resultantes fueron neutralizadas con NH<sub>3</sub> 25% y mezcladas con NH<sub>3</sub> 3 M, conteniendo éste 150 mg/mL de NaBH<sub>4</sub> como agente reductor, consiguiendo así la rotura de los ciclos que presentan los azúcares en su estructura, y su paso a alditoles por reducción del grupo aldehído a alcohol. Posteriormente las muestras se incubaron a 30 °C durante 1 h y tras enfriarse se les adicionó CH<sub>3</sub>COOH.

Una vez homogeneizadas, se hicieron reaccionar con anhídrido acético utilizando 1-metil-imidazol como catalizador e incubando de nuevo la mezcla a 30 °C durante 30 min. De este modo, se obtuvieron los correspondientes alditol-acetatos, compuestos que se detectaron mediante cromatografía de gases.

Una última etapa de extracción líquido-líquido de dichos compuestos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> consistió en separar la fase orgánica mediante centrifugación (2000 rpm, 1 min), eliminando la acuosa por aspiración y llevando las muestras a sequedad mediante una corriente de argón a 40 °C.

Los azúcares neutros, convertidos en sus correspondientes alditol-acetatos, se redisolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para su inyección y separación isotérmica a 220 °C mediante cromatografía de gases (GC) (Hewlett-Packard 5890A, Alemania). Se utilizó una columna capilar tipo OV225 con 3% Chromosorb WHP 100/120 y argón como gas portador con un caudal de 20 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector FID se fijaron a 230 y 240 °C, respectivamente. El contenido de azúcares individuales se expresó en % molar y el de azúcares totales en g/100 g muestra fresca (bh).

### **3.2.6.2. Identificación y cuantificación de los ácidos urónicos**

El contenido de ácidos urónicos se determinó de acuerdo con el método colorimétrico descrito por Blumenkrantz *et al.* (1973) con ciertas modificaciones. Se mezclaron ~ 5 mg AIR con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se incubó durante 1 h a 100 °C. Dichas soluciones hidrolizadas se adicionaron sobre NaBO<sub>2</sub> 25 mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (previamente congelado), calentando la mezcla a 100 °C durante 10 min. Trabajando en un baño de agua-hielo, se añadió una solución de m-fenilfenol 0.15% (w/v, en NaOH 0.5% (w/v) como disolvente), a excepción de en los blancos-control, apareciendo un color rosado. La diferencia de absorbancias se leyó a 524 nm y se utilizó ácido galacturónico (10 – 50 mg/L, disuelto en ácido benzoico saturado) como patrón para la recta de calibrado. El análisis se realizó por duplicado y con dos blancos-control por muestra.

De forma aproximada, la composición en celulosa, hemicelulosas y pectinas de los concentrados de fibra (AIRs) se calculó a partir de la concentración de azúcares neutros y de ácidos urónicos (ecuaciones [3.4], [3.5] y [3.6]). Por su parte, la estimación del ratio fibra insoluble/fibra soluble (FI/FS) se calculó a partir de la ecuación [3.7].

[3.4]

---

[3.5] \_\_\_\_\_

[3.6] \_\_\_\_\_

[3.7] \_\_\_\_\_

### **3.2.6.3. Determinación del grado de metil-esterificación de las pectinas**

El grado de metil-esterificación de las pectinas (DME) o porcentaje de ácidos urónicos esterificados se determinó según el protocolo descrito por Femenia *et al.* (2009). Brevemente, se prepararon por duplicado discos de KBr con ~ 2 mg de AIR y se analizaron por espectroscopía infrarroja (Tensor 27, Bruker Optik GmbH, Alemania). El DME se calculó según la ecuación [3.8] a partir de la intensidad de absorbancia ( $h$ , cm) de las bandas a 1630 y 1745  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración de tensión (*stretching*) del grupo carbonilo (C=O) del ácido galacturónico y de su éster metílico, respectivamente (Manrique and Lajolo, 2002).

[3.8] \_\_\_\_\_

### **3.2.6.4. Propiedades funcionales**

El hinchamiento, la capacidad de retención de agua y la capacidad de retención de lípidos fueron las propiedades funcionales analizadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado de acuerdo con la metodología descrita por Garau *et al.* (2007), utilizando para ello los concentrados de fibra (AIRs) pulverizados a un tamaño de partícula inferior a 0.180 mm.

#### Hinchamiento ( $Sw$ )

Se define como el volumen adquirido por un peso determinado de fibra al alcanzar el equilibrio con un exceso de disolvente en el que se encuentra suspendida (Raghavendra *et al.*, 2004). Se pesaron 100 mg de AIR y se hidrataron con 10 mL de agua destilada en una probeta. Tras alcanzar el equilibrio (16 – 24 h), se midió el volumen que adquirió la fibra una vez hidratada, expresando el resultado en mL agua/g AIR.

### Capacidad de retención de agua (WRC)

Se define como la cantidad de agua que la fibra es capaz de retener tras un proceso de centrifugación (Raghavendra *et al.*, 2006). Se mezclaron 200 mg de AIR con 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 24 h. Posteriormente, se sometió a centrifugación (2000 g, 25 min), descartándose el sobrenadante para pesar la fase sólida correspondiente a la fibra con el agua retenida. La capacidad de retención de agua de la muestra se expresó como g agua retenida/g AIR.

### Capacidad de retención de lípidos (FAC)

Se define como la capacidad que presenta la fibra para absorber lípidos tras un proceso de centrifugación (González-Centeno *et al.*, 2010). La capacidad de retención de lípidos se evaluó bajo las mismas condiciones que la WRC, utilizando aceite de girasol en lugar de agua. Los resultados se expresaron como g aceite retenido/g AIR.

## **3.2.7. Extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes**

La extracción de los compuestos fenólicos y antioxidantes de la uva y de los subproductos de vinificación, se realizó de forma diferente según la muestra en estudio.

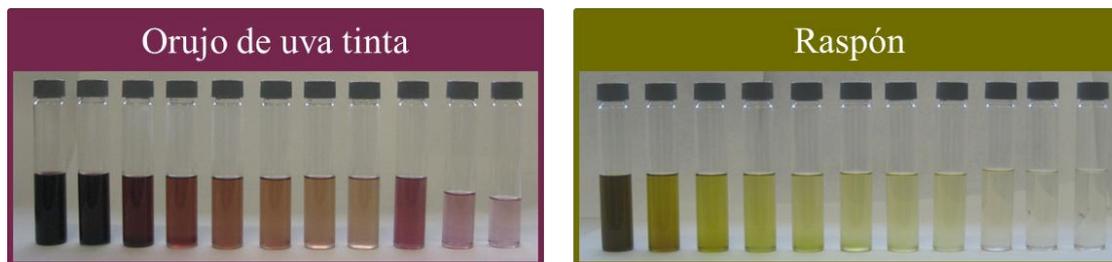
### **3.2.7.1. Muestras U1 y U2**

La extracción fenólica se llevó a cabo a partir de la maceración de las muestras de uva U1 y U2 (apartado 3.2.2). El mosto macerado obtenido se sometió a un análisis del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante.

### **3.2.7.2. Muestras O1 y R1**

De forma previa a la extracción de la fracción fenólica, las muestras O1 y R1 fueron liofilizadas (Telstar LyoQuest – 55, España) y molturadas manualmente con ayuda de un mortero de laboratorio. Se utilizó un sistema de extracción acelerada con disolventes presurizados ASE 350 (Dionex Corp., Thermo Scientific, EE.UU.), cuyas condiciones experimentales se fijaron en 4 min de *static time*, 1500 psi de presión y una temperatura de 40 °C con un pre-calentamiento del sistema de 5 min. Para evitar la oxidación durante el proceso de extracción, el equipo trabajó en atmósfera de N<sub>2</sub>. Para cada muestra, ~ 10 g se introdujeron en la célula de extracción y se sometieron a ocho extracciones sólido-líquido con acetona/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) seguidas de tres extracciones adicionales con MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) (**Figura 3.7**). Todos los extractos líquidos se recombinaron y rota-evaporaron hasta sequedad. El residuo sólido resultante se redisolvió en 30 mL de agua desionizada para su liofilización y posterior conservación

hasta su análisis como extracto polifenólico seco, bajo condiciones de refrigeración y oscuridad. La extracción se realizó por duplicado para todas las muestras.



**Figura 3.7.** Lote de extractos obtenidos para el orujo de uva tinta y el raspón con el extractor ASE 350.

A partir de estos extractos polifenólicos secos, se realizaron las determinaciones del contenido de fenólicos, taninos y flavonoles totales, así como la identificación y cuantificación de los taninos monoméricos y oligoméricos, el grado medio de polimerización de los taninos condensados, y la evaluación de la capacidad antioxidante.

### 3.2.7.3. Muestras O2 y O3

La extracción fenólica de las muestras O2 y O3 se llevó a cabo a partir de las condiciones experimentales contempladas en los diseños experimentales IV y V, respectivamente. Los extractos acuosos obtenidos se sometieron a un análisis del contenido de fenólicos y flavonoles totales, así como de la capacidad antioxidante.

## 3.2.8. Caracterización de la fracción fenólica

### 3.2.8.1. Fenólicos totales

El contenido total de compuestos fenólicos de las muestras se determinó en base al método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu descrito por Singleton and Rossi (1965), con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). En cada pozo de la microplaca (NUNC, Thermo Scientific, Dinamarca) se dispusieron 184  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 24  $\mu\text{L}$  de solución-muestra, seguidos de 12  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% (w/v). Para la incubación de la mezcla durante 1 h a 25  $^\circ\text{C}$  y la posterior lectura de su absorbancia a 765 nm, las microplacas se situaron en un espectrofotómetro UV/Vis (MultiSkán Spectrum, Thermo Scientific, Finlandia). El contenido de fenólicos totales se calculó a partir de una calibración con ácido gálico (GA, 0 – 24 ppm). Todos los resultados se calcularon como la media de seis determinaciones. Las soluciones-muestra para la

evaluación del contenido de fenólicos totales se prepararon bajo diferentes condiciones en función de la materia prima en estudio (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Preparación de las soluciones-muestra para la evaluación del contenido de fenólicos totales.

Muestra	Ratio de dilución o concentración	Disolvente	Unidades de los resultados
<b>Mosto macerado de uva (U1, U2)</b>	1:20 (v/v)	EtOH 57%	mg GA/L mosto macerado
<b>Extractos polifenólicos de residuos de vinificación (O1, R1)</b>	* 0.4 mg/mL para orujos de uva tinta y raspón * 1.0 mg/mL para orujos de uva blanca	EtOH/H <sub>2</sub> O 25:75 (v/v)	mg GA/100 g muestra liofilizada
<b>Extractos polifenólicos de residuos de vinificación (O2, O3)</b>	Sin dilución	---	mg GA/100 g muestra fresca

GA, ácido gálico.

### 3.2.8.2. Taninos totales

La determinación del contenido de taninos totales se estimó espectrofotométricamente mediante la reacción de Bate-Smith, basada en la transformación de las proantocianidinas (incolores) en antocianidinas (compuestos coloreados) por calentamiento a 100 °C bajo condiciones ácidas (Ribereau-Gayon and Stonestreet, 1966). En sendos tubos de ensayo, control e hidrólisis, se introdujeron 2 mL de la solución-muestra (0.5 mg extracto seco/mL en EtOH/H<sub>2</sub>O (10:90, v/v)), 1 mL de agua destilada y 3 mL de HCl 37%. Los tubos control se mantuvieron a 23 ± 1 °C en oscuridad, mientras que los tubos hidrólisis se taparon y calentaron a 100 °C durante 30 min. Con el objeto de parar la reacción, los tubos hidrólisis se enfriaron en un baño de agua-hielo durante 10 min. Finalmente, se les añadió a ambos 0.5 mL de EtOH 96%. La diferencia en absorbancia de los tubos control e hidrólisis a una longitud de onda de 550 nm se midió con un espectrofotómetro UV/Vis (Varian Cary 300 Bio, Australia), utilizando agua destilada como blanco. El análisis se llevó a cabo por triplicado y los resultados se expresaron en mg proantocianidinas/100 g muestra liofilizada.

### 3.2.8.3. Flavonoles totales

El contenido de flavonoles totales se determinó por lectura de la absorbancia de la muestra a 370 nm (Di Stefano and Cravero, 1991). El análisis se realizó a 25 °C con el espectrofotómetro UV/Vis Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Finlandia)

utilizando quercetina como estándar de calibración (QE, 0 – 100  $\mu\text{M}$ ). Los resultados, calculados como valor medio de seis réplicas, se expresaron en mg de QE/100 g de muestra fresca.

#### 3.2.8.4. Identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos

Se prepararon disoluciones metanólicas de los extractos polifenólicos a una concentración de 10 mg/mL, que se filtraron de forma previa a su inyección por duplicado. La identificación y cuantificación de los taninos monoméricos y oligoméricos se llevó a cabo en un sistema HPLC Thermo-Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, Francia) equipado con un detector UV/Vis (Surveyor PDA Plus), un detector de fluorescencia (Surveyor FL Plus Detector), un inyector automático de muestras (Surveyor Autosampler Plus) y una bomba cuaternaria (Surveyor MS Pump Plus). El tratamiento de datos de UV/Vis y de fluorescencia fue controlado, respectivamente, por los softwares Xcalibur y ChromQuest 4.2. Se utilizó una columna de fase inversa LiChrospher 100 RP18 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

Las fases móviles estaban formadas por HCOOH/H<sub>2</sub>O 1% (v/v, disolvente A) y HCOOH/CH<sub>3</sub>CN 1% (v/v, disolvente B) (Silva *et al.*, 2012). El sistema de elución binario utilizado se describe en la **Tabla 3.6** (González-Centeno *et al.*, 2012). El caudal se fijó a 1 mL/min, la longitud de onda de detección por UV/Vis a 280 nm, y la detección por fluorescencia a 280 y 320 nm, para las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente.

**Tabla 3.6.** Gradiente de elución para la identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos.

Tiempo (min)	0	21	22	24	25	31
% Disolvente A	92	82	0	0	82	82
% Disolvente B	8	18	100	100	8	8

La identificación y cuantificación de los picos principales se realizó a través de un calibrado con estándares externos: los monómeros (+)-catequina (C) y (–)-epicatequina (EC), los dímeros B1, B2, B3 y B4, y el trímero C1. Los resultados se expresaron en mg/100 g muestra liofilizada.

### 3.2.8.5. Determinación del grado medio de polimerización de los taninos condensados

El grado medio de polimerización (mDP) se evaluó a partir de la reacción de fluoroglucinólisis (Drinkine *et al.*, 2007), consistente en la despolimerización de los taninos condensados por ruptura de los enlaces interflavánicos en medio ácido y en presencia de un agente nucleófilo (fluoroglucinol). Dicha despolimerización permite recuperar las unidades terminales y bloquear las unidades de extensión bajo la forma de un aducto con el agente nucleófilo (**Figura 3.8**).

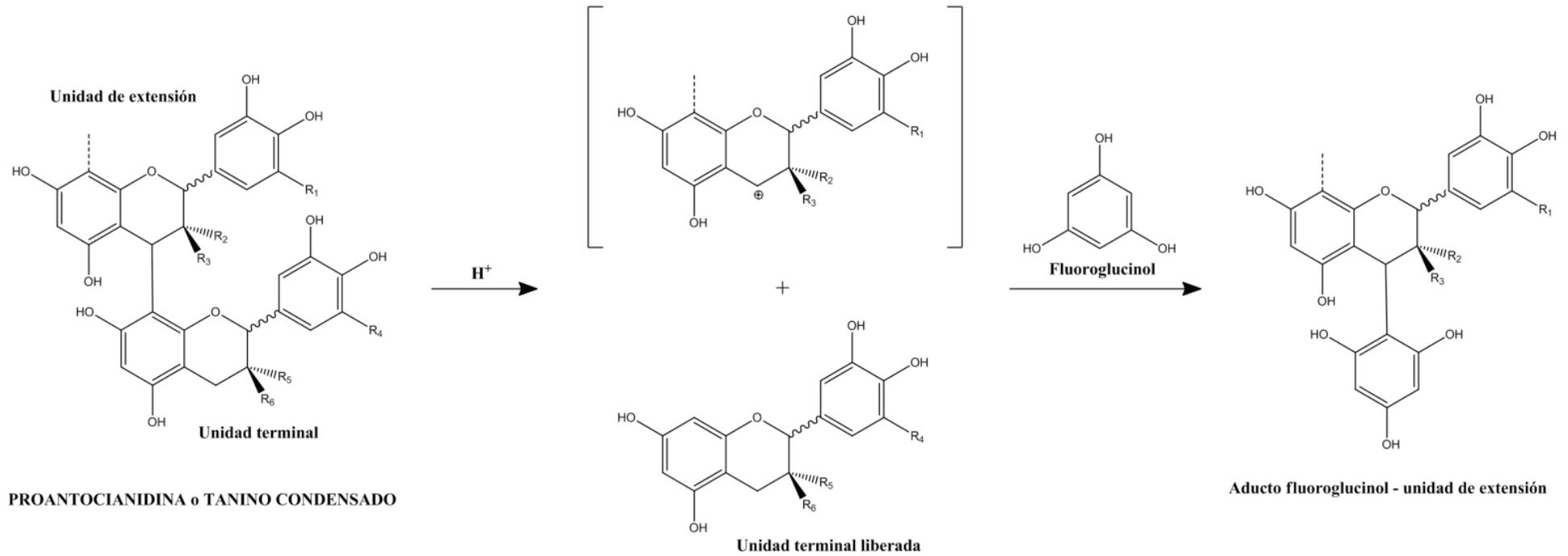
El procedimiento experimental consistió en hacer reaccionar 200  $\mu$ L de la solución-muestra (10 mg/mL en MeOH) con 200  $\mu$ L del reactivo fluoroglucinol (disolución de MeOH al HCl 0.1 N con 50 g/L de fluoroglucinol y 10 g/L de ácido ascórbico) a 50 °C durante 20 min. Posteriormente, para parar la reacción, se añadió 1 mL de disolución acuosa de CH<sub>3</sub>COONa 40 mM. Para la identificación y cuantificación se utilizó un sistema HPLC Thermo-Accela (Thermo Scientific, EE.UU.) con un caudal de 1 mL/min. La columna utilizada fue una Waters XTerra RP18 de fase inversa (100 mm x 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m) y los espectros de UV/Vis se registraron a 280 nm.

Las fases móviles consistieron en CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O 1% (v/v, disolvente A) y MeOH (disolvente B) (Lorrain *et al.*, 2011) y las condiciones de elución utilizadas se describen en la **Tabla 3.7** (González-Centeno *et al.*, 2012). Todas las determinaciones del mDP se realizaron por duplicado.

**Tabla 3.7.** Gradiente de elución para la determinación del grado medio de polimerización de los taninos condensados.

Tiempo (min)	0	25	45	60	62	67	68	70
% Disolvente A	95	95	80	68	0	0	95	95
% Disolvente B	5	5	20	32	100	100	5	5

Como resultado de la fluoroglucinólisis, las procianidinas de la muestra liberan (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC) y (-)-epicatequina-3-galato (ECG) como unidades terminales, mientras que las unidades de extensión corresponden a sus aductos con el fluoroglucinol: (+)-catequina-fluoroglucinol (C-P), (-)-epicatequina-fluoroglucinol (EC-P) y (-)-epicatequina-3-galato-fluoroglucinol (ECG-P). Por su parte, las prodelphinidinas liberan adicionalmente la (-)-epigallocatequina (EGC) y su aducto (-)-epigallocatequina-fluoroglucinol (EGC-P).



**Figura 3.8.** Principio de la reacción de fluoroglucínólisis (adaptado de Tarascou *et al.* (2010)).

La identificación de cada uno de estos productos de reacción se realizó a partir de su masa molecular de ionización y las concentraciones (mol/L) se calcularon como el cociente entre las áreas de pico en el cromatograma y sus coeficientes de extinción molar (**Tabla 3.8**).

**Tabla 3.8.** Productos de reacción de la fluoroglucinólisis: coeficientes de extinción molar y masas moleculares de ionización.

Compuesto	Coefficiente Extinción Molar (L/mmol)	[M-H]
(+)-catequina	57156	289
(-)-epicatequina	57156	289
(-)-epigallocatequina	19052	305
(-)-epicatequina-3-galato	197204	441
Aducto (+)-catequina-fluoroglucinol	60585	413
Aducto (-)-epicatequina-fluoroglucinol	60585	413
Aducto (-)-epigallocatequina-fluoroglucinol	19433	429
Aducto (-)-epicatequina-3-galato-fluoroglucinol	19433	565

La identificación y cuantificación de los productos de reacción de la fluoroglucinólisis permiten el cálculo del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de prodelphinidinas (% P) y el porcentaje de galoilación (% G, porcentaje de procianidinas esterificadas con ácido gálico) (ecuaciones [3.9], [3.10] y [3.11], respectivamente):

[3.9] \_\_\_\_\_

[3.10] \_\_\_\_\_

[3.11] \_\_\_\_\_

### 3.2.8.6. Capacidad antioxidante

A la fracción polifenólica de las plantas se le atribuye una importante capacidad antioxidante que incluye, desde un punto de vista químico, múltiples y muy diversos mecanismos de actuación. Debido a ello, ninguna metodología analítica es capaz por sí sola de cuantificarla, recomendándose siempre el uso de diferentes técnicas para

determinar la capacidad antioxidante de las muestras de una forma más global (Pellegrini *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se han considerado un total de cuatro técnicas: las espectrofotométricas ABTS, CUPRAC y FRAP, basadas en un mecanismo de transferencia de electrones, y la fluorimétrica ORAC, cuyo mecanismo consiste en la transferencia de hidrógeno. Para todas las determinaciones de capacidad antioxidante se utilizó un lector de microplacas: un Multiskan Spectrum UV/Vis (Thermo Scientific, Finlandia) en el caso de las medidas espectrofotométricas, y un FLUOstar Optima (BMG Labtech GmbH, Alemania) para las fluorimétricas. Todos los resultados se calcularon como valor medio de seis determinaciones.

Las soluciones-muestra se prepararon bajo condiciones diferentes en función de la materia prima en estudio y de la técnica analítica aplicada para evaluar la capacidad antioxidante (**Tabla 3.9**).

**Tabla 3.9.** Preparación de las soluciones-muestra para la evaluación de la capacidad antioxidante.

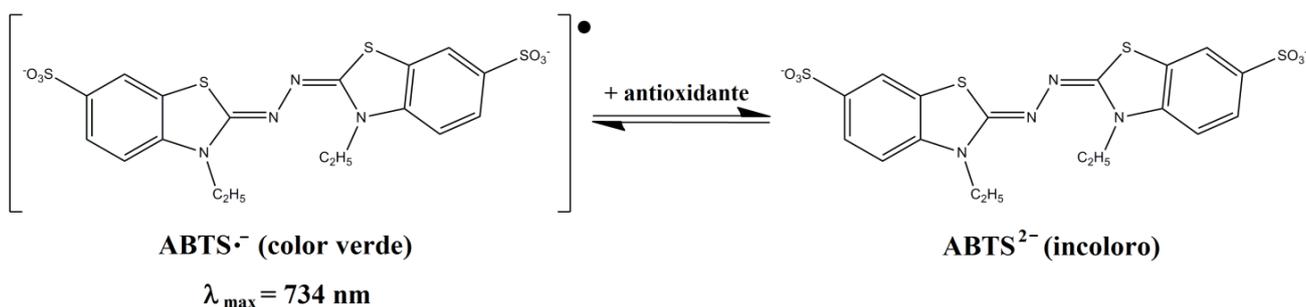
Muestra	Técnica aplicada	Ratio de dilución o concentración	Disolvente	Unidades de los resultados
Mosto macerado de uva (U1, U2)	ABTS	1:20 (v/v)	EtOH 57%	mg trolox/L mosto macerado
Extractos polifenólicos de residuos de vinificación (O1, R1)	ABTS CUPRAC FRAP	* 0.4 mg/mL para orujos de uva tinta y raspón * 1.0 mg/mL para orujos uva blanca	EtOH/H <sub>2</sub> O 25:75 (v/v)	mg trolox/g muestra liofilizada
Extractos polifenólicos de residuos de vinificación (O1, R1)	ORAC	20 mg/mL	Tampón fosfato 75 mM (pH 7.4)	mg trolox/g muestra liofilizada
Extractos polifenólicos de residuos de vinificación (O2, O3)	ABTS CUPRAC FRAP	Sin dilución	---	mg trolox/100 g muestra fresca

### ABTS

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS (*ácido 2,2'-Azinobis(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico)*) se basó en la metodología inicialmente descrita por Re *et al.* (1999), con ciertas modificaciones para adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). El radical ABTS<sup>•</sup> se preparó mezclando volúmenes equivalentes (1:1) de disoluciones acuosas de ABTS 7 mM y K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2.45 mM. Dicha solución madre se dejó reaccionar durante 12 – 16 h a

$23 \pm 1$  °C en oscuridad, para ser utilizada en las próximas 48 h, conservada bajo las mismas condiciones de temperatura y luminosidad. En el momento del análisis, 8 mL de la solución madre de ABTS se diluyeron con EtOH/H<sub>2</sub>O (25:75, v/v) hasta un volumen final de 100 mL para obtener un reactivo ABTS con absorbancia de  $1.00 \pm 0.02$  unidades a 734 nm.

Se incubaron las soluciones-muestra y el reactivo ABTS (190  $\mu$ L en cada pocillo) en microplacas de 96 pocillos, a 25 °C durante 20 min. Posteriormente, se realizó una lectura de absorbancia del blanco de reactivo a 734 nm ( $A_0$ ) y se procedió a iniciar la reacción (**Figura 3.9**) añadiendo 10  $\mu$ L de la solución-muestra a cada pocillo. La mezcla se incubó a la misma temperatura durante 30 min, tras los cuales la disminución de la absorbancia se midió a la misma longitud de onda ( $A_f$ ). Para el cálculo de la capacidad antioxidante, la diferencia entre las absorbancias  $A_0$  y  $A_f$  se correlacionó con un calibrado de trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), cuyas soluciones estándar se prepararon en el rango de concentración 0 – 0.8 mM ( $r^2 = 0.995$ ), utilizando EtOH/H<sub>2</sub>O (25:75, v/v) como disolvente.



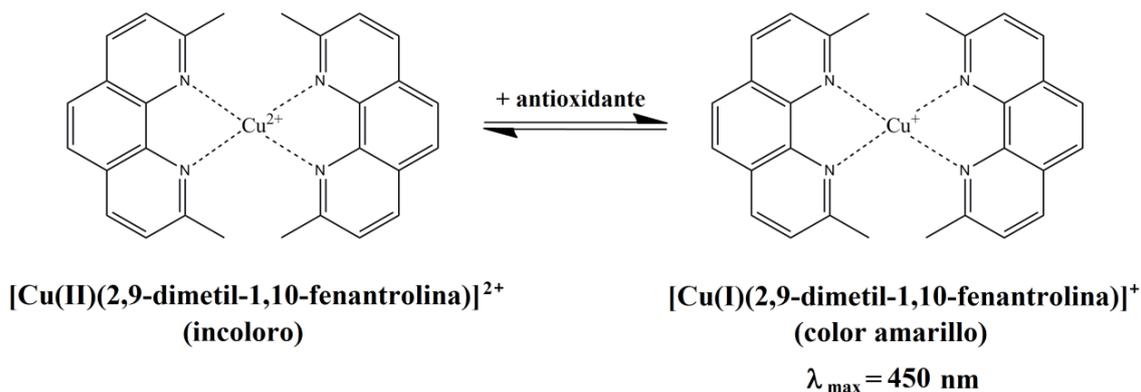
**Figura 3.9.** Principio químico del método ABTS (adaptado de Huang, Ou and Prior (2005)).

### CUPRAC

La medida de la capacidad antioxidante de las muestras a través del método CUPRAC (*CUPric Reducing Antioxidant Capacity*) se basó en una versión modificada del procedimiento experimental propuesto por Apak *et al.* (2004) para su evaluación en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). El reactivo CUPRAC se preparó el mismo día del análisis a partir de volúmenes equivalentes (1:1:1) de una disolución acuosa de Cu (II) 10 mM, de una solución de neocuproína 7.5 mM en EtOH 96% y de tampón acetato de amonio (1 M, pH 7).

El protocolo y condiciones experimentales, así como los cálculos para la evaluación de la capacidad antioxidante a través del método CUPRAC, fueron los

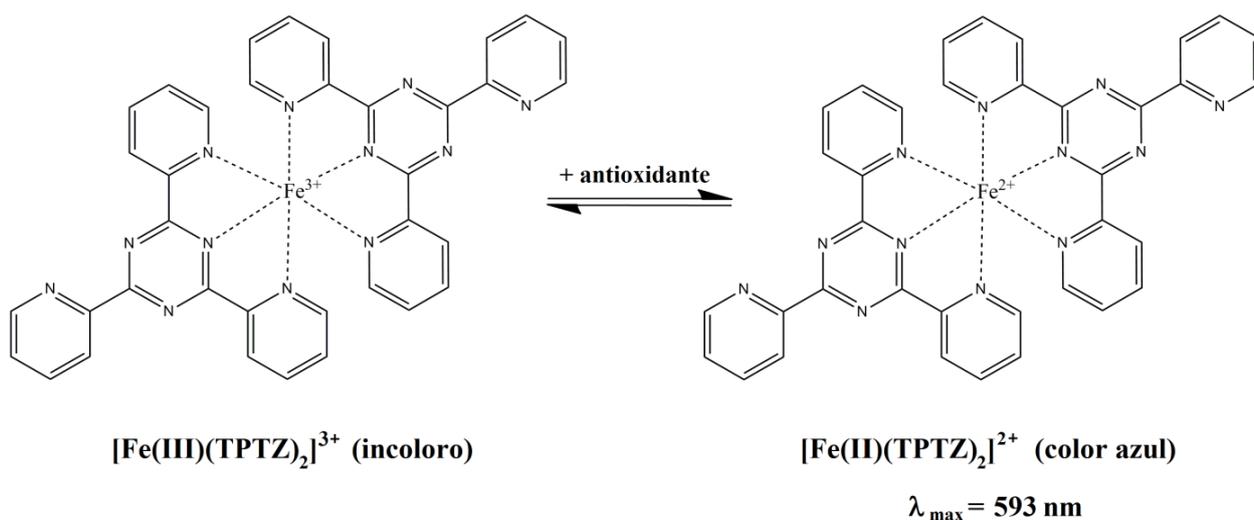
descritos para el caso del ABTS. No obstante, el incremento en la absorbancia se midió a 450 nm (**Figura 3.10**) y la calibración con trolox se preparó a concentraciones comprendidas entre 0 – 1.3 mM ( $r^2 = 0.996$ ).



**Figura 3.10.** Principio químico del método CUPRAC (adaptado de Huang *et al.* (2005)).

### FRAP

Se modificó la versión original del método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) para la determinación de la capacidad antioxidante (Benzie and Strain, 1996), con el objeto de adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). El reactivo FRAP (**Figura 3.11**), preparado el mismo día del análisis, se obtuvo a partir de la mezcla de una solución de TPTZ 0.01 M en HCl 0.04 M, una disolución acuosa de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 M y otra de tampón acetato (pH 3.6, preparado con 3.1 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  y 16 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial por 1 L de solución tampón) en un relación 1:1:10.

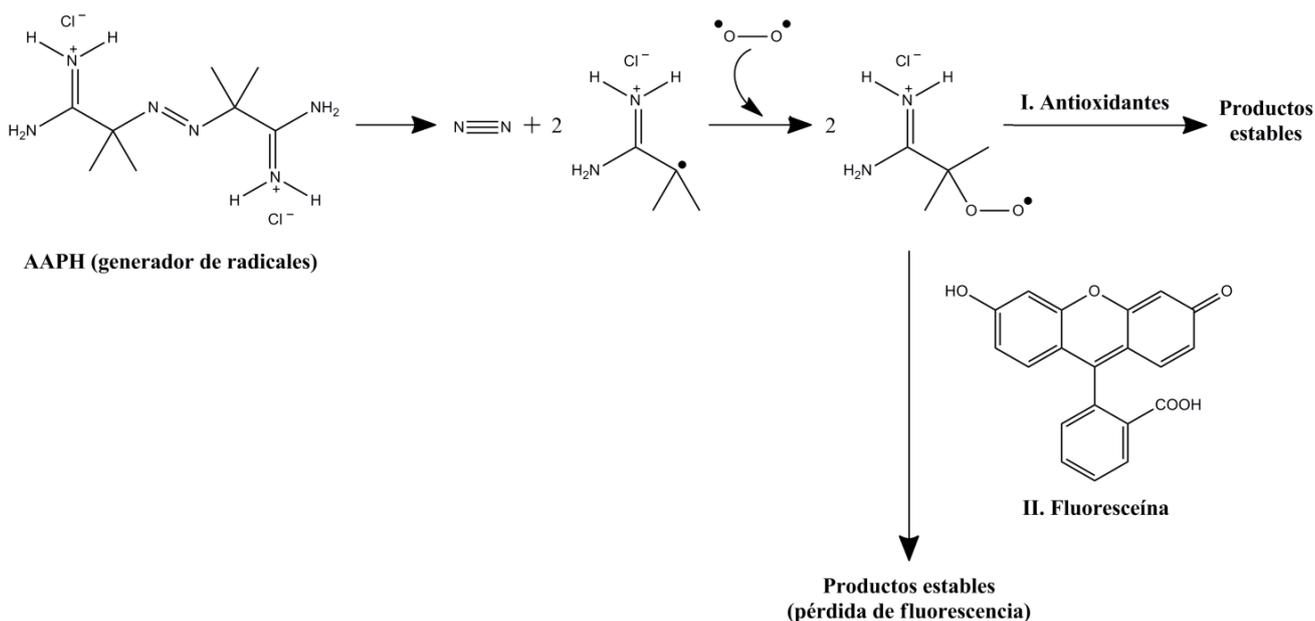


**Figura 3.11.** Principio químico del método FRAP (adaptado de Huang *et al.* (2005)).

El protocolo y condiciones experimentales, así como los cálculos para la evaluación de la capacidad antioxidante a través del método FRAP, fueron los mismos que para las técnicas ABTS y CUPRAC. Sin embargo, la longitud de onda utilizada para medir el incremento en la absorbancia fue de 593 nm y el calibrado de trolox se preparó en el rango de concentraciones comprendido entre 0 – 1.6 mM ( $r^2 = 0.996$ ).

### ORAC

Para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras según el método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) se procedió según el protocolo descrito por Dudonné *et al.* (2009) para su análisis en microplacas. Todas las disoluciones se prepararon en tampón fosfato (7.5 mM, pH 7.4). En microplacas tipo FluoroNUNC 96 (NUNC, Thermo Scientific, Dinamarca) se añadieron 30  $\mu$ L de solución-muestra, 180  $\mu$ L de fluoresceína 117 nM y 90  $\mu$ L de AAPH 40 mM a cada pocillo en este orden. La mezcla se dejó reaccionar durante 1.5 h a 37 °C (**Figura 3.12**), periodo en el que se registró la fluorescencia cada minuto a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente. Simultáneamente en la misma microplaca, se analizaron un blanco, en el que el tampón fosfato substituyó a la solución-muestra, y un calibrado de trolox con concentraciones entre 1 – 40  $\mu$ M ( $r^2 = 0.983$ ). Para el cálculo de la capacidad antioxidante según el método ORAC, se correlacionó la diferencia entre las áreas bajo la curva (AUC, calculadas por integración de las curvas de fluorescencia) con la recta de calibrado.



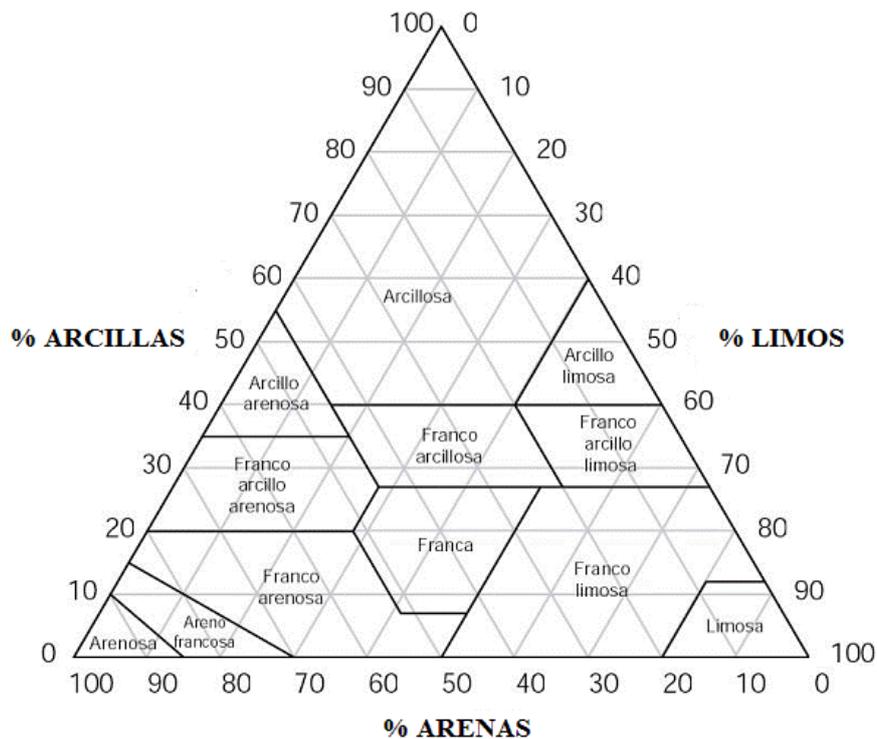
**Figura 3.12.** Principio químico del método ORAC (adaptado de Zulueta *et al.* (2009)).

### 3.2.9. Análisis de textura y fertilidad del suelo

Los análisis de textura y fertilidad del suelo se llevaron a cabo en el Instituto de Biología Animal de Baleares S.A. (IBABSA, Palma, Illes Balears, España) de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de Suelos y Aguas para Riego (MAPA, 1994). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 3.2.9.1. Textura

La textura del suelo viene definida por la proporción en que se encuentran distribuidas las partículas elementales que pueden constituir un sustrato, que según su tamaño o porosidad pueden clasificarse en tres grupos básicos: arenas ( $0.050 < x < 2.000$  mm), limos ( $0.002 < x < 0.050$  mm) y arcillas ( $x < 0.002$  mm) (USDA, 1999). En base a ello, se determinó el porcentaje de arenas, limos y arcillas de las muestras de suelo en estudio (**Figura 3.13**).



**Figura 3.13.** Textura del suelo. Clasificación USDA.

#### 3.2.9.2. Fertilidad

##### Humedad

La humedad del sustrato se determinó gravimétricamente por desecación a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (MAPA, 1994).

### pH

El pH de las muestras de suelo se midió a través del método potenciométrico con ayuda de un pH-metro (Crison, España) a partir de una relación suelo/H<sub>2</sub>O 1:2.5 (w/v) (MAPA, 1994).

### Conductividad

La determinación de la conductividad del suelo se llevó a cabo a 25 °C a partir de una relación suelo/H<sub>2</sub>O 1:5 (w/v), expresando los resultados en dS/m (MAPA, 1994).

### Materia orgánica oxidable

La materia orgánica oxidable del suelo se analizó mediante el método de Walkley-Black, consistente en una valoración de la muestra con sulfato ferroso (MAPA, 1994).

### Nitrógeno total

Al igual que en las determinaciones del contenido proteico de la uva y de los residuos de vinificación (apartado 3.2.3.3), se utilizó el método Kjeldahl para la cuantificación del nitrógeno total (N<sub>total</sub>) del suelo (MAPA, 1994).

### Carbonatos y caliza activa

Tanto el contenido de carbonatos como el de caliza activa se determinaron mediante el calcímetro de Bernard (MAPA, 1994). Los resultados de ambos parámetros se presentaron en unidades de porcentaje (%).

### Fósforo asimilable

El fósforo asimilable, íntimamente ligado a otros factores del suelo como el pH, la materia orgánica y la cal activa, se midió espectrofotométricamente de acuerdo con el método Olsen-Watanable (MAPA, 1994).

### Potasio intercambiable

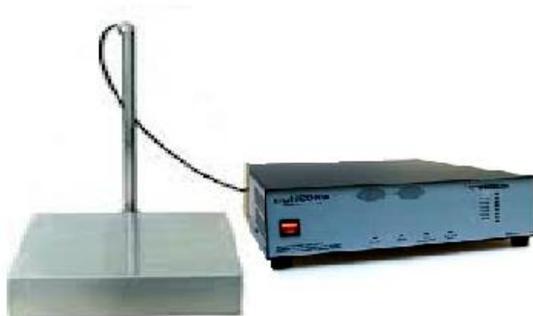
El potasio intercambiable se analizó por espectrometría de absorción atómica (MAPA, 1994).

## **3.3. EQUIPOS DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO**

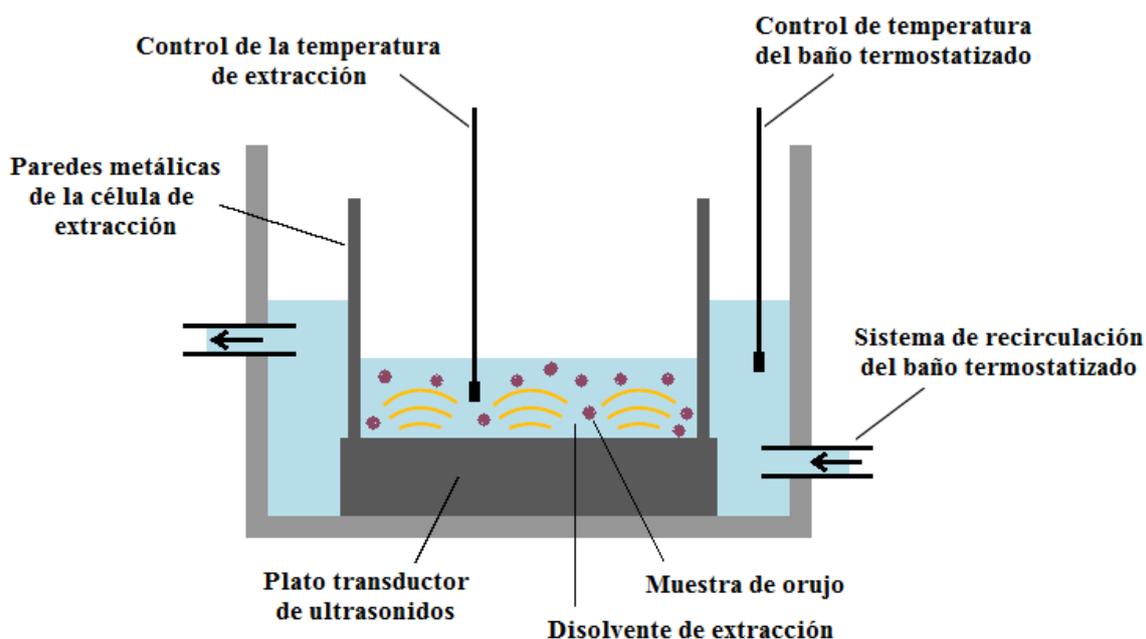
### **3.3.1. Equipo extractor I: plato transductor de ultrasonidos**

El equipo extractor I consistió en un generador de ultrasonidos multifrecuencia multiSONIK-2TM y un plato transductor de inmersión (dimensiones 23.6 x 21.8 cm) (Blackstone-Ney Ultrasonics, EE.UU.) (**Figura 3.14**). Para evitar pérdidas de energía

acústica y permitir una mayor penetración del disolvente en la matriz de la muestra, el plato transductor se utilizó directamente como contenedor del proceso de extracción, para lo que se equipó con paredes metálicas durante los experimentos (**Figura 3.15**).



**Figura 3.14.** Generador de ultrasonidos multifrecuencia y plato transductor de inmersión.



**Figura 3.15.** Equipo extractor I.

### 3.3.2. Equipo extractor II: sonda de ultrasonidos

El equipo extractor II consistió en un procesador de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) acoplado a una sonda de 22 mm de diámetro (**Figura 3.16**). Las condiciones experimentales establecidas, análogas para todas las experiencias de extracción acústica realizadas con este equipo, fueron:  $55 \pm 5$  Hz de frecuencia,  $87.2 \pm 0.1$  W de potencia (100% de amplitud),  $22.9 \pm 0.1$  A de intensidad y ciclos de 0.5 s.

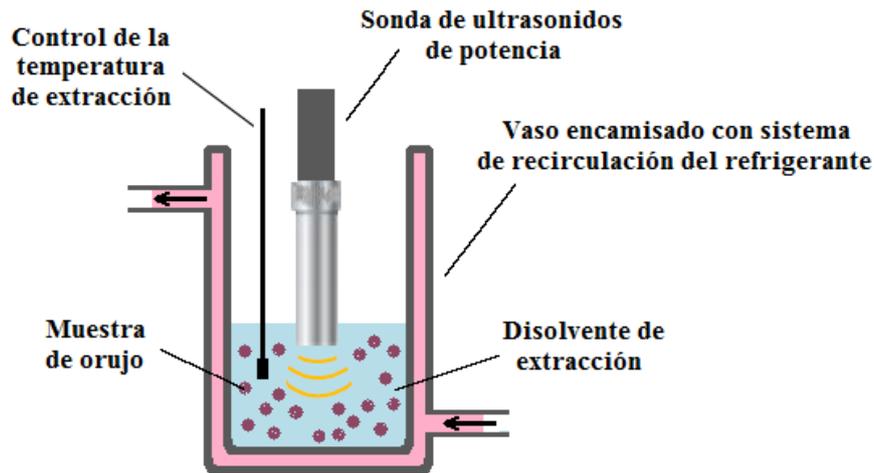


Figura 3.16. Equipo extractor II.

### 3.3.3. Equipo extractor III: agitador mecánico

El equipo extractor III consistió en un sistema de agitación (RZR 2021, Heidolph, Alemania) dotado con una hélice de cuatro álabes que describían un círculo de 50 mm de diámetro a una velocidad de giro de 200 rpm (Figura 3.17). Se comprobó que un aumento en la agitación no provocaba un incremento de la transferencia de materia.

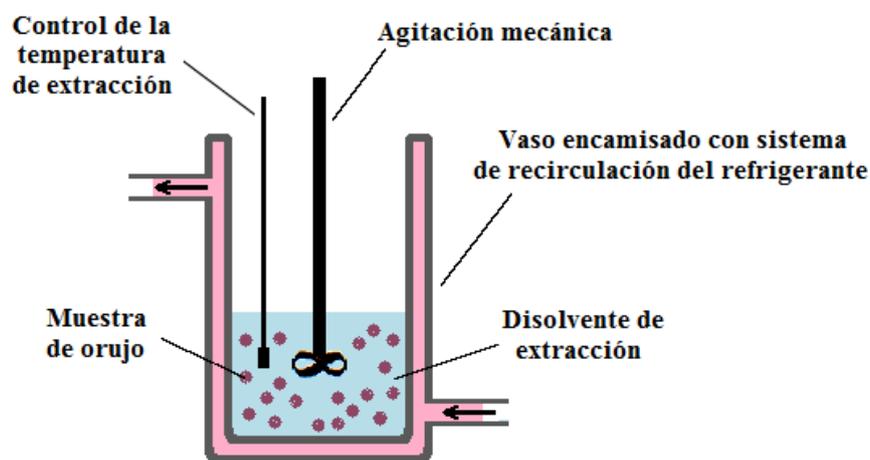


Figura 3.17. Equipo extractor III.

## 3.4. SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA

Se entiende por Sistema de Información Geográfica (SIG) al conjunto integrado de hardware, software y datos geográficos, diseñado para capturar, almacenar, gestionar, manipular, transformar y analizar información geográfica referenciada. En el marco de la presente tesis doctoral, se hizo uso del soporte informático ArcGis 9.3.1

(Environmental Systems Research Institute Inc., EE.UU.) para la obtención de información geolocalizada de clima y paisaje de los viñedos de las Islas Baleares en estudio.

Los datos climáticos de pluviometría, y temperaturas máximas y mínimas de los años comprendidos en el periodo 2004 – 2010, ambos inclusive, fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Meteorología – Centro Meteorológico Territorial de las Islas Baleares. Por su parte, los datos de paisaje, correspondientes a la elevación del terreno, los suministró el Servicio de Sistemas de Información Geográfica y Teledetección de la Universidad de las Islas Baleares (SSIGT-UIB).

### **3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En la presente tesis doctoral se plantearon tres líneas de investigación. La primera de ellas se centra en el estudio de las indicaciones de calidad del sector vitivinícola de las Islas Baleares, en vistas a determinar sus características diferenciales consecuencia del *terroir* y justificar su existencia histórica en términos agroclimáticos. Una vez reconocida dicha diferenciación y, consecuentemente, la diferenciación entre sus materias primas, productos y/o subproductos, se procedió a la caracterización de los residuos de vinificación de diferentes variedades de uva. Esta segunda línea de trabajo se propuso con el objetivo de evidenciar las variedades de uva con mayor potencial de revalorización como fuentes de compuestos bioactivos de interés –fibra dietética y compuestos fenólicos– para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Por último, la tercera línea de trabajo evaluó la aplicación de los ultrasonidos de potencia (US), como tecnología emergente para mejorar el proceso de extracción de dichos componentes bioactivos a partir de los residuos de vinificación.

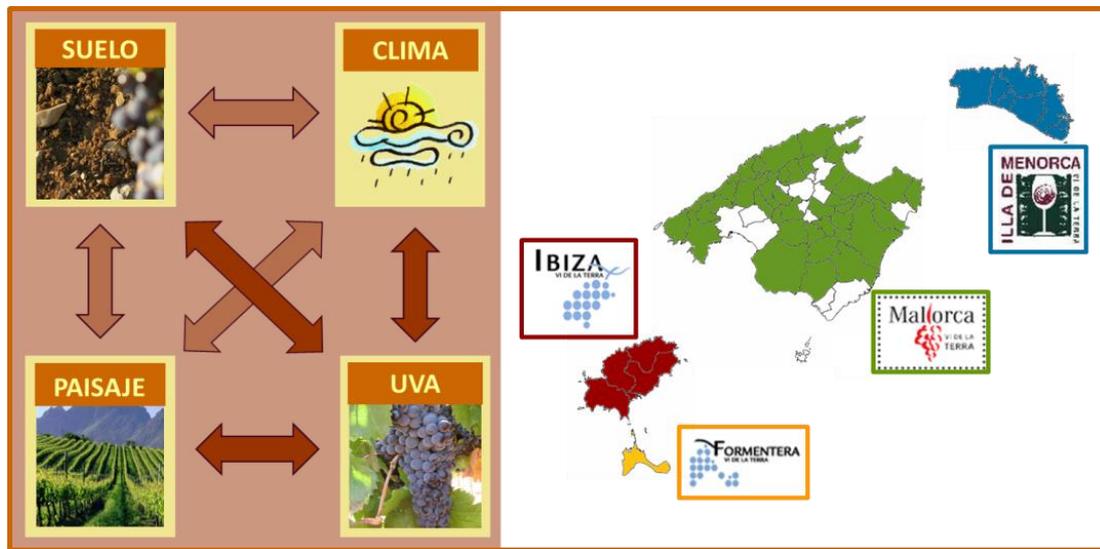
Así pues, con el objeto principal de evaluar el uso potencial de los subproductos de vinificación como fuente de fibra antioxidante, se propusieron los siguientes diseños experimentales.

#### **3.5.1. Diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen geográfico**

##### ***3.5.1.1. Estudio del terroir de las Islas Baleares***

Para evaluar la diferenciación entre las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGPs) de las Islas Baleares en base a la huella geoclimática ejercida por el *terroir* (**Figura 3.18**), se consideró un número representativo de viñedos de las variedades

*Merlot* y *Cabernet Sauvignon* pertenecientes a cada una de las IGP's (VT Mallorca, VT Illa de Menorca, VT Ibiza y VT Formentera) durante la vendimia de 2009.



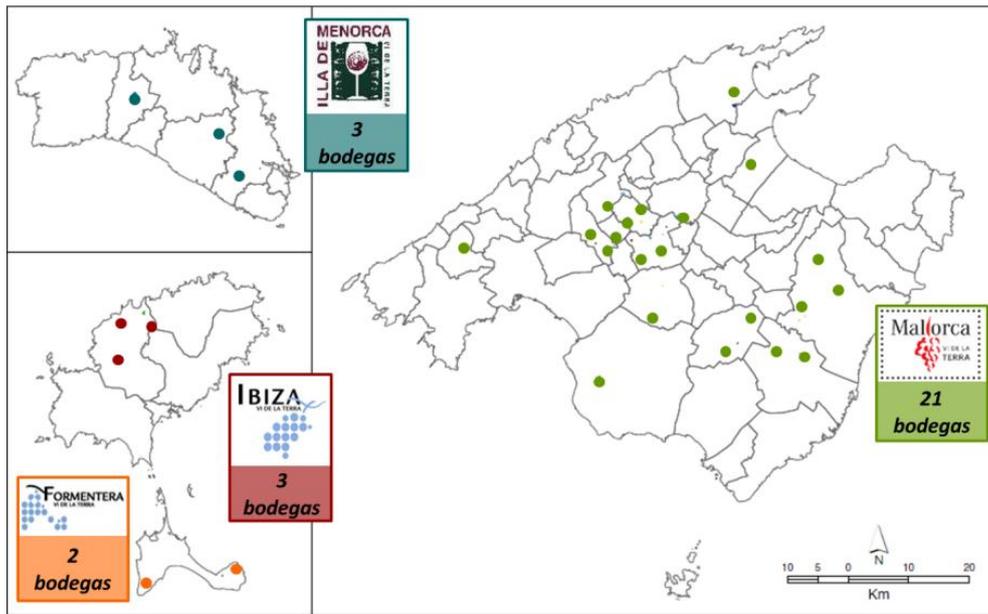
**Figura 3.18.** Diseño experimental I. Diferenciación entre las IGP's de las Islas Baleares.

Se incluyeron en el estudio un total de 28 viñedos de cada variedad de uva (Tabla 3.10). En cada uno de ellos se llevaron a cabo los muestreos de uva (muestra U1) y suelo (muestra S1), así como la geolocalización de los datos climáticos (valores medios mensuales del periodo 2004 – 2008) y de paisaje. En la Figura 3.19, cada punto representa conjuntamente la geolocalización de los viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de las bodegas participantes, donde se realizaron los muestreos.

**Tabla 3.10.** Número de viñedos de las IGP's de las Islas Baleares considerados en el estudio.

Variedad	Indicaciones Geográficas Protegidas			
	VT Mallorca	VT Illa de Menorca	VT Ibiza	VT Formentera
<i>Merlot</i>	20	3	3	2
<i>Cabernet Sauvignon</i>	21	3	2	2

El diseño experimental I consistió, en primer lugar, en una caracterización de cada IGP de las Islas Baleares en términos de los atributos de su uva, suelo, clima y paisaje. A continuación, se aplicó el Análisis de Componentes Principales (ACP) como herramienta estadística multivariable para identificar los patrones de comportamiento de cada región vitivinícola en base a las características de la materia prima y de la huella agroclimática simultáneamente.



**Figura 3.19.** Geolocalización de los viñedos de las IGP de las Islas Baleares considerados en el estudio.

### 3.5.1.2. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva

El diseño experimental II tuvo por objeto estudiar el papel que la añada y la variedad pueden jugar en la diferenciación entre zonas vitivinícolas (**Figura 3.20**).



**Figura 3.20.** Diseño experimental II. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva.

Este estudio se aplicó a las denominaciones de origen vitivinícolas de las Islas Baleares: *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant*. Se consideró un número representativo de viñedos de las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* pertenecientes a cada *DO* durante dos vendimias consecutivas (**Tabla 3.11**). Los muestreos de uva (muestra U2) y suelo (muestra S2), así como la geolocalización de datos climáticos (valores medios mensuales del periodo 2009 – 2010) y de paisaje, se llevaron a cabo en todos y cada uno de ellos. En la **Figura 3.21** se indica la geolocalización de los mismos, representando cada punto conjuntamente los viñedos de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de la misma bodega participante, donde se realizaron los muestreos.

**Tabla 3.11.** Número de viñedos de las *DOs* de las Islas Baleares considerados en el estudio.

Variedad	Denominación de Origen	
	<i>DO Binissalem</i>	<i>DO Pla i Llevant</i>
<i>Merlot</i>	5	8
<i>Cabernet Sauvignon</i>	6	8



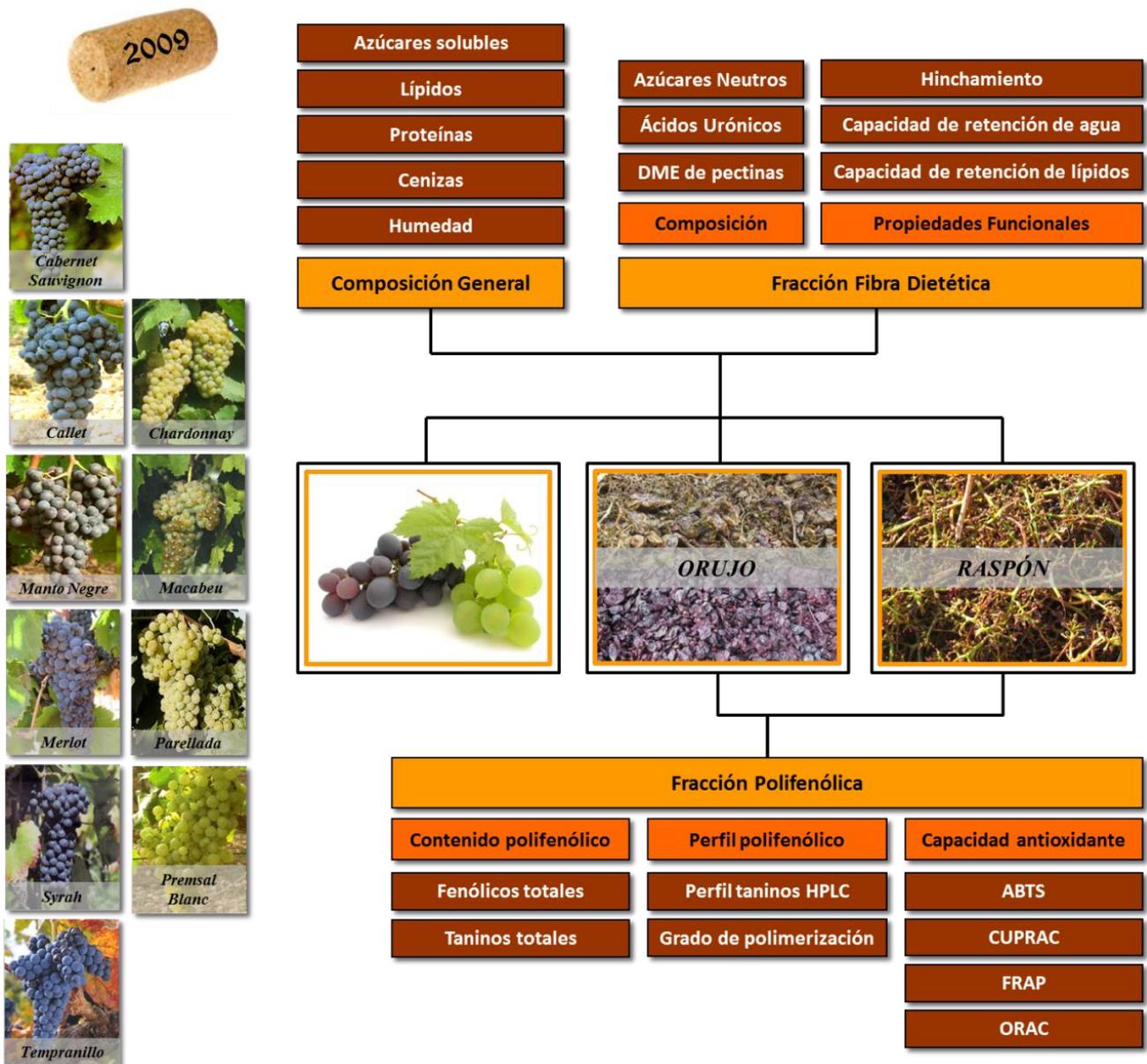
**Figura 3.21.** Geolocalización de los viñedos de las *DOs* de las Islas Baleares considerados en el estudio.

En el diseño experimental II se realizó, en primer lugar, una caracterización de ambas *DOs* vitivinícolas de las Islas Baleares en términos de las características de su uva, suelo, clima y paisaje. Posteriormente, se procedió a aplicar al conjunto de datos dos herramientas estadísticas multivariantes: el Análisis de Clusters (AC) y el Análisis

Discriminante (AD), con el objeto de evaluar el grado de clasificación-asociación de los viñedos-muestra según la *DO* a la que pertenecen (*DO Binissalem, DO Pla i Llevant*), la añada (2009, 2010) y/o la variedad de uva considerada (*Merlot, Cabernet Sauvignon*).

### 3.5.2. Caracterización de los residuos de vinificación

El diseño experimental III, esquematizado en la **Figura 3.22**, consistió en la determinación de la composición general y en la caracterización de la fracción de fibra dietética de 10 variedades de uva (*Vitis vinifera*) (muestra U3) y de sus correspondientes residuos de vinificación, orujo (muestra O1) y raspón (muestra R1).



**Figura 3.22.** Diseño experimental III. Caracterización de los residuos de vinificación.

Asimismo, este diseño comprendió la caracterización de la fracción fenólica del orujo (muestra O1) y raspón (muestra R1), actividad que se desarrolló en la Unité d'Œnologie del Institut de Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV, Bordeaux, Francia). En el caso del orujo se evaluaron seis de las 10 variedades de uva que conforman la muestra, concretamente, *Callet*, *Tempranillo*, *Chardonnay*, *Macabeu*, *Parellada* y *Premsal Blanc*.

### 3.5.3. Extracción acuosa de compuestos bioactivos asistida acústicamente

#### 3.5.3.1. Determinación de la potencia de los equipos de ultrasonidos. Estudio calorimétrico

Con el objetivo de establecer la potencia de ultrasonidos (W) de los equipos, se procedió a realizar una calibración del sistema por calorimetría. Esta metodología consiste en la determinación del incremento de temperatura del disolvente de extracción que tiene lugar durante los primeros instantes de aplicación de ultrasonidos (Raso *et al.*, 1999), en ausencia de muestra y sin termostatación del sistema. La temperatura del medio se registró cada segundo durante los cinco primeros minutos de aplicación de los ultrasonidos, mediante dos sondas termopar tipo K conectadas a un equipo de adquisición de datos HP Data Logger 34970A (Hewlett-Packard, España). La operación se repitió tres veces para cada set de condiciones experimentales. El cálculo de la potencia ultrasónica se realizó de acuerdo con la ecuación [3.12] a partir de la curva temperatura-tiempo determinada experimentalmente.

[3.12] —

#### Equipo extractor I: plato transductor de ultrasonidos

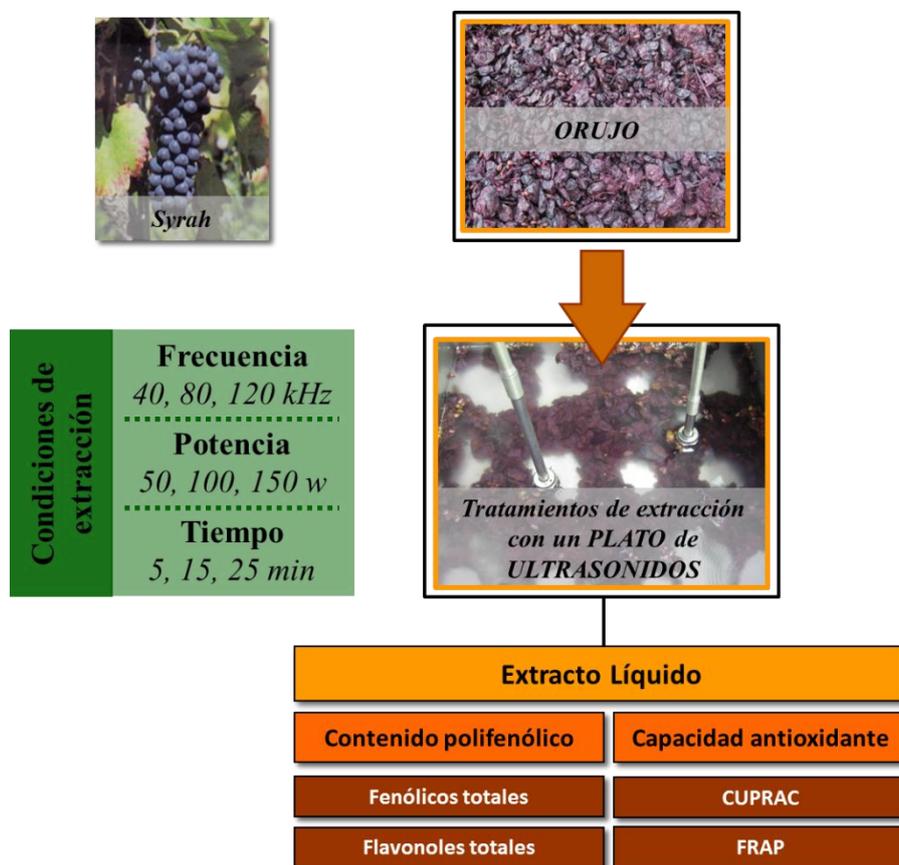
Se evaluó el incremento de temperatura de 1 L de agua (volumen de extracción), producido a razón de la aplicación de ultrasonidos, bajo diferentes condiciones de amplitud (20, 40, 60, 80 y 100%) para cada nivel de frecuencia de trabajo (40, 80 y 120 kHz).

#### Equipo extractor II: sonda de ultrasonidos

Se determinó el incremento de temperatura de 200 mL de agua (volumen de extracción) bajo diferentes condiciones de amplitud (20, 40, 60, 80 y 100%).

**3.5.3.2. Experimentos de extracción acuosa de compuestos fenólicos asistida mediante el equipo extractor I (plato transductor de ultrasonidos). Estudio del efecto de la frecuencia y de la potencia de ultrasonidos sobre el proceso**

El principal objetivo del diseño experimental IV consistió en examinar el efecto de la frecuencia y la potencia de ultrasonidos, así como del tiempo de extracción, sobre la recuperación de los compuestos fenólicos, los flavonoles y la capacidad antioxidante del orujo tras someterlo a un proceso de extracción asistido mediante ultrasonidos de potencia (**Figura 3.23**). Este estudio fue desarrollado en las instalaciones del Process Engineering Science Group del centro de investigación CSIRO – Animal, Food and Health Sciences (Werribee, Australia), utilizando la muestra O2, correspondiente a orujo de la variedad tinta *Syrah*.



**Figura 3.23.** Diseño experimental IV. Estudio del efecto de la frecuencia y potencia acústicas sobre el proceso de extracción acuosa de compuestos bioactivos del orujo.

Condiciones de extracción

El orujo (tamaño de partícula inferior a 9 mm) se sometió a un proceso de extracción haciendo uso del equipo extractor I (**Figura 3.15**) con un ratio

1:5 (w/v, g/mL), siguiendo las recomendaciones de Casazza *et al.* (2010). Se utilizó agua como disolvente de extracción ( $V_{\text{Total}} = 1 \text{ L}$ ) y la temperatura se fijó en  $17 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ , regulándose con un baño externo termostaticado.

Las extracciones se realizaron bajo diferentes condiciones de frecuencia de ultrasonidos (40, 80 y 120 kHz), potencia de ultrasonidos (entendida como densidad volumétrica de potencia, 50, 100 y 150 W/L) y tiempo de extracción (5, 15 y 25 min) (**Tabla 3.12**).

Una vez finalizada la extracción, se determinó el contenido en fenólicos y flavonoles totales, así como la capacidad antioxidante del extracto líquido, previa filtración del mismo (PTPE,  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ). El tratamiento de los datos experimentales se realizó por aplicación de la metodología de superficie de respuesta (RSM).

#### Diseño Box-Behnken

El tratamiento de los datos experimentales se realizó por aplicación de la metodología de superficie de respuesta (RSM). En este contexto, se aplicó un diseño Box-Behnken (BBD) (Box and Behnken, 1960) para evaluar el efecto de la frecuencia de ultrasonidos ( $X_1$ ), la potencia de ultrasonidos ( $X_2$ ) y el tiempo de extracción ( $X_3$ ), sobre el patrón de respuesta de las muestras en términos de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante. Los tres niveles equidistantes de las tres variables independientes (**Tabla 3.12**), se codificaron de acuerdo con la ecuación [3.13].

$$[3.13] \quad \text{---}$$

Donde  $x_i$  y  $X_i$  son, respectivamente, los valores codificados y experimentales de la variable  $i$ ;  $X_0$  es el valor experimental de dicha variable en el punto central; y  $\Delta X$ , es la distancia entre los valores experimentales.

**Tabla 3.12.** Valores experimentales y codificados de las variables independientes utilizadas en el diseño Box-Behnken.

Valores codificados	Valores experimentales		
	Frecuencia US (kHz)	Potencia US (W/L)	Tiempo de extracción (min)
-1	40	50	5
0	80	100	15
+1	120	150	25

El diseño completo consistió en 17 experiencias que se realizaron aleatoriamente para minimizar el error experimental (**Tabla 3.13**). Las experiencias utilizando las condiciones del punto central (80 kHz, 100 W/L, 15 min) se llevaron a cabo por quintuplicado.

El modelo matemático utilizado para predecir la respuesta de cada variable dependiente se basó en una ecuación polinómica de segundo grado (ecuación [3.14]):

$$[3.14]$$

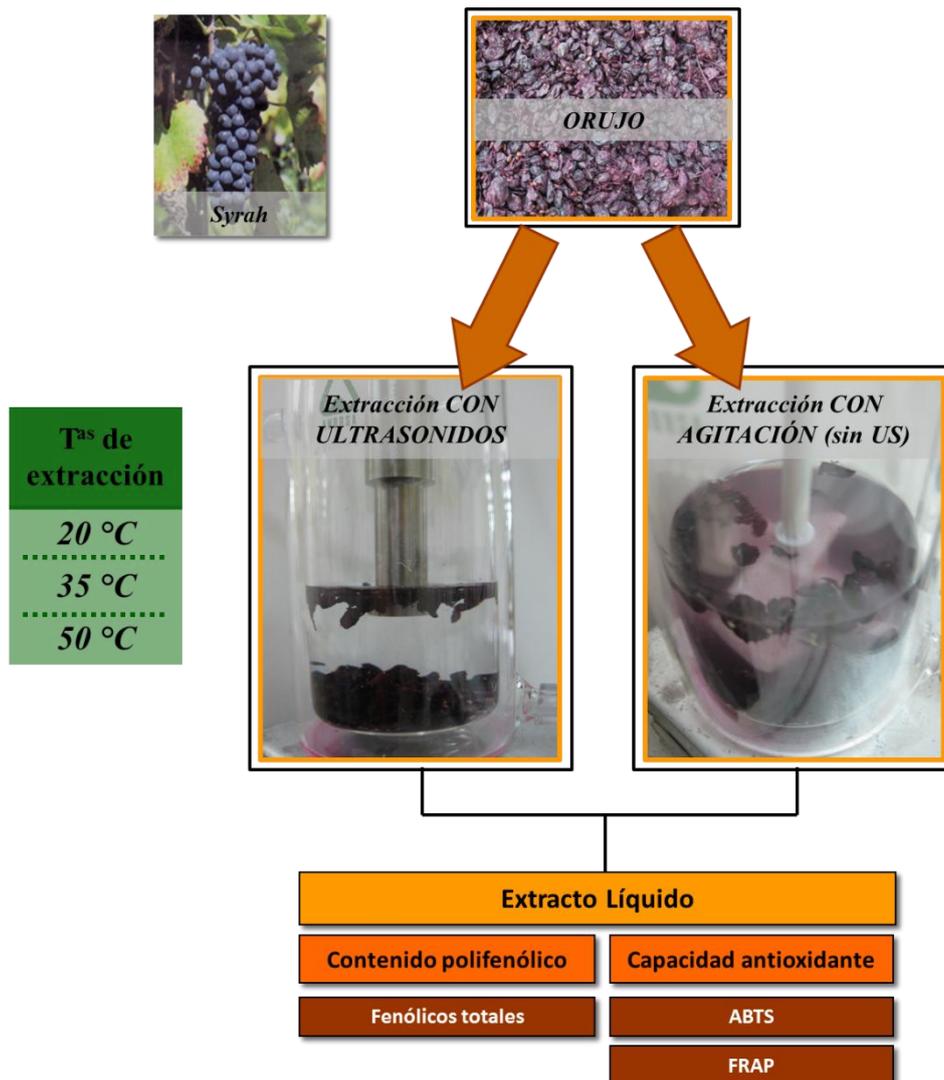
Donde  $Y$  es la respuesta predicha para cada una de la variables dependientes (fenólicos totales, flavonoles totales y capacidad antioxidante);  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  corresponden a las variables independientes;  $\delta_0$  es la constante del modelo; y  $\delta_i$ ,  $\delta_{ii}$  y  $\delta_{ij}$  son, respectivamente, los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción del modelo.

**Tabla 3.13.** Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken.

<b>Experiencia</b>	Frecuencia US (kHz)	Potencia US (W/L)	Tiempo de extracción (min)
<b>1</b>	120	50	15
<b>2</b>	120	100	25
<b>3</b>	120	150	15
<b>4</b>	80	100	15
<b>5</b>	80	100	15
<b>6</b>	80	150	5
<b>7</b>	80	50	25
<b>8</b>	80	100	15
<b>9</b>	40	50	15
<b>10</b>	40	150	15
<b>11</b>	120	100	5
<b>12</b>	80	100	15
<b>13</b>	40	100	5
<b>14</b>	80	100	15
<b>15</b>	40	100	25
<b>16</b>	80	150	25
<b>17</b>	80	50	5

**3.5.3.3. Experimentos de extracción acuosa de compuestos fenólicos asistida mediante el equipo extractor II (sonda de ultrasonidos). Estudio de la cinética y del efecto de la temperatura sobre el proceso**

Por último, el diseño experimental V se planteó con el propósito de establecer la cinética del proceso de extracción del orujo fermentado, al aplicar ultrasonidos de potencia o agitación mecánica (control) a diferentes temperaturas (**Figura 3.24**). Para este estudio se consideró la muestra O3 de la variedad *Syrah*.



**Figura 3.24.** Diseño experimental V. Estudio del efecto de la temperatura sobre el proceso de extracción acuosa de compuestos bioactivos del orujo fermentado bajo condiciones control (con agitación) y acústicas.

Condiciones de extracción

De forma previa a la extracción se realizó el tamizado de la muestra para trabajar con un tamaño de partícula uniforme ( $\leq 5$  mm). La extracción se llevó a cabo en un vaso

encamisado, con recirculación de refrigerante, para asegurar el control de temperatura durante todo el proceso. El ratio sólido-líquido fue de 1:20 (w/v, g/mL), utilizando agua como disolvente de extracción ( $V_{\text{Total}} = 200 \text{ mL}$ ).

Se realizaron dos series de experimentos a tres temperaturas 20, 35 y 50 °C (**Figura 3.24**). La primera serie de experimentos consistió en extracciones asistidas por ultrasonidos, utilizando el equipo extractor II (**Figura 3.16**). Por su parte, la segunda serie (control) consistió en extracciones con agitación mecánica y en ausencia de ultrasonidos, haciendo uso del equipo extractor III (**Figura 3.17**). Se realizaron cuatro replicados de extracción por temperatura y serie de experimentos.

Todas las experiencias tuvieron una duración de 1 h, tomándose alícuotas de 1 mL de extracto líquido a los 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 min. El mismo día del análisis, dichas alícuotas se filtraron (RC, 0.45  $\mu\text{m}$ ) y se sometieron a un análisis del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante.

### 3.6. MODELIZACIÓN

Para la modelización de las cinéticas de extracción del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante del orujo fermentado se utilizó el modelo de Weibull (ecuación [3.15]):

$$[3.15] \quad \frac{C_t}{C_{eq}} = 1 - \exp\left(-\alpha t^\beta\right)$$

Los términos  $C_{eq}$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  fueron los parámetros del modelo. El parámetro  $\alpha$  se interpretó como una constante de reacción cinética dependiente de la temperatura (K) de acuerdo con una ecuación tipo Arrhenius (ecuación [3.16]):

$$[3.16] \quad \alpha = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

La función objetivo a minimizar para la identificación paramétrica del modelo de Weibull fue el error relativo medio (ERM) entre los valores experimentales y los calculados por el modelo.

### 3.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los resultados experimentales se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar de las  $n$  mediciones realizadas. El estudio de la variabilidad de las muestras respecto a los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo con ayuda del paquete

estadístico R (versión 2.14.2, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos para todas las variables en estudio, utilizando el test de *Shapiro-Wilk* y el test de *Levene*, respectivamente. Cuando la población siguió una distribución normal y presentó homogeneidad de varianzas, se utilizaron los tests paramétricos ANOVA y *Tukey* para evaluar, respectivamente, la existencia y grado de diferencias significativas. Dichos análisis estadísticos fueron substituidos por los correspondientes tests no paramétricos, *Kruskal-Wallis* y *pairwise-Wilcox* (con corrección BH), cuando la población no seguía una distribución normal y/o presentaba heterogeneidad de varianzas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

El análisis multivariable de los datos, comprendiendo el análisis de componentes principales (ACP), el análisis de clusters (AC) y el análisis discriminante (AD), también se llevó a cabo mediante el paquete estadístico R. En el AC se aplicó el algoritmo *k-means*, que agrupa iterativamente las muestras en *k* clusters en base a que la suma de las distancias de cada observación al centroide del grupo sea mínima.

Por su parte, para el diseño experimental, el análisis de datos, el cálculo de predicción de las respuestas, la representación gráfica y la modelización, en el contexto de la RSM, se utilizó el software STATISTICA (versión 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EE.UU.). Los parámetros matemáticos de cada modelo se calcularon por análisis de regresión a partir de los datos del BBD. Para determinar la calidad y capacidad de simulación del modelo se examinó la falta de ajuste (LOF), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el valor del test de *Fisher* (*F*-value) proporcionado en el análisis de varianza (ANOVA). Tanto el modelo como los coeficientes de regresión se consideraron significativos cuando  $p < 0.05$ . Las condiciones óptimas de extracción, considerando los factores de respuesta tanto individualmente como de forma conjunta, se calcularon con ayuda del software Minitab (versión 16.1.1, Minitab Inc., State College, PA, EE.UU.).

La identificación de todos los parámetros del modelo de Weibull se llevó a cabo mediante la función '*nlinfit*' de Matlab 7.5 (The MathWorks Inc., EE.UU.). Sus correspondientes intervalos de confianza (IC) se calcularon con la función '*nlparci*' y el error estándar asociado (ES), a partir de la matriz de covarianza.

Para evaluar la correlación entre los valores experimentales ( $X_{\text{exp}}$ ) y los calculados por los modelos matemáticos propuestos ( $X_{\text{calc}}$ ) y, consecuentemente, la

calidad del ajuste de los mismos, se utilizaron los parámetros estadísticos ‘*adequate precision*’ (AP, ecuación [3.17]), error relativo medio (ERM, ecuación [3.18]) y/o porcentaje de varianza explicada (VAR, ecuación [3.19]) (Noordin *et al.*, 2004; Bas and Boyaci, 2007; Eim, 2012):

$$[3.17] \quad \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

$$[3.18] \quad \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

$$[3.19] \quad \text{---}$$

Donde  $n$  es el número de experiencias;  $P$  es el número de términos estadísticamente significativos del modelo matemático (incluyendo la constante del modelo);  $\sigma^2$  es el valor MS del residuo en el ANOVA;  $S_{\text{exp}}$ , la desviación estándar de los valores experimentales; y  $S_{\text{calc}}$ , la desviación estándar de los valores calculados.

## **RESULTADOS y DISCUSIÓN**



## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados experimentales obtenidos en la presente tesis doctoral.

### 4.1. DIFERENCIACIÓN DE LA CALIDAD VITIVINÍCOLA LIGADA AL ORIGEN GEOGRÁFICO

El objetivo de los dos diseños experimentales propuestos en esta primera línea de trabajo fue evaluar la influencia del *terroir*, de la añada y de la variedad de uva en la diferenciación entre las zonas vitivinícolas de calidad reconocida de las Islas Baleares (**Figura 3.18** y **Figura 3.20**).

Concretamente, se deseaba estudiar si las características diferenciales existentes entre las *IGPs* y *DOs* de esta región vitivinícola son consecuencia del entorno geoclimático, o por el contrario, están únicamente vinculadas a la tradición y al saber hacer de los enólogos. Así pues, atendiendo al concepto de *terroir*, sin considerar el factor humano, se estudiaron las características físico-químicas de la uva (*Merlot* y *Cabernet Sauvignon*) y las condiciones agroclimáticas de la viña (suelo, clima y paisaje).

#### 4.1.1. Estudio del *terroir* de las Islas Baleares

A continuación se presentan los resultados experimentales derivados de la aplicación del diseño experimental I. A partir de las muestras de uva procedentes de cada viñedo (muestra U1) se preparó el mosto o zumo de uva y el mosto macerado. El zumo de uva se sometió a un análisis enológico rutinario que incluía los parámetros de pH, acidez total y grado alcohólico probable; mientras que el mosto macerado se utilizó para determinar el contenido de fenólicos totales, la capacidad antioxidante mediante el método ABTS y las características cromáticas. Por su parte, las muestras de suelo procedentes de cada viñedo (muestra S1) se sometieron a un análisis de textura y fertilidad.

En cuanto a los datos climáticos, se consideró el período 2004-2008, calculándose el valor medio de los cinco años para cada parámetro (pluviometría, temperaturas máxima y mínima) y mes (nota: no se observaron diferencias significativas entre los valores medios mensuales de los cinco años,  $p > 0.05$ ). Dado que los valores medios de pluviometría y los correspondientes a las temperaturas máxima y mínima a nivel mensual estaban altamente correlacionados a lo largo del año, sólo se

consideraron para el estudio de las *IGPs* los datos correspondientes al mes de mayo. Dicha elección se argumentó en base al ciclo vegetativo de la viña, dado que el período de floración, altamente afectado por las condiciones climáticas, tiene lugar en dicho mes (Hidalgo, 2002).

El término ‘viñedo-muestra’ quedó definido por las características físico-químicas de la uva y del suelo, conjuntamente con los datos climáticos y de paisaje geolocalizados, para cada viñedo en estudio. En la **Tabla 4.1** se presentan los resultados obtenidos en la caracterización general de los viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de las cuatro *IGPs* de las Islas Baleares. En la misma tabla se incluye el análisis estadístico univariable realizado sobre el conjunto de datos, con el objeto de evaluar la existencia y grado de significación de las diferencias existentes entre las *IGPs* para cada variable en estudio.

Al analizar los resultados obtenidos para las uvas de la variedad *Merlot*, se observó que las de los viñedos-muestra de *VT Mallorca* presentaron un contenido de fenólicos totales y una intensidad de color significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que las de los viñedos-muestra correspondientes a *VT Formentera*. La acidez total del mosto fue menor en las uvas procedentes de *VT Illa de Menorca* ( $p < 0.01$ ). Por su parte, el grado alcohólico probable fue ligeramente superior en las uvas de *VT Mallorca* ( $p < 0.05$ ).

Los resultados de intensidad y tonalidad de color del mosto macerado de *Cabernet Sauvignon* presentaron comportamientos totalmente opuestos, siendo las uvas de *VT Ibiza* las que manifestaron, respectivamente, el menor y mayor valor para dichas variables, de entre las *IGPs* de las Islas Baleares. Por su parte, el pH del zumo de uva fue significativamente mayor en el caso del *VT Formentera* ( $p < 0.001$ ). Cabe indicar que para las uvas de *Cabernet Sauvignon*, el contenido de fenólicos totales, la capacidad antioxidante, la acidez total y el grado alcohólico probable del mosto no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las *IGPs* de las Islas Baleares.

El suelo de los viñedos-muestra de cada *IGP* presentó una textura característica. Para *VT Illa de Menorca*, *VT Formentera* y *VT Ibiza*, la arena fue el principal componente, seguido por la arcilla en las dos primeras *IGPs* y por los limos en el caso de *VT Ibiza*. Por su parte, los suelos vitivinícolas de *VT Mallorca* presentaron una composición totalmente diferente, basada en una proporción similar de limos y arcillas, y un menor contenido en arenas.

En función del contenido de carbonatos del suelo, las *IGPs* de las Islas Baleares se clasificaron en tres grupos diferenciados ( $p < 0.001$ ): los viñedos-muestra de *VT Ibiza* y *VT Formentera* presentaron los niveles más altos, seguidos por valores intermedios en el caso de *VT Mallorca*. Por su parte, los suelos vitivinícolas de *VT Illa de Menorca* mostraron un contenido de carbonatos  $< 1\%$ , siendo entre 30 – 70 veces inferior al del suelo de las otras tres *IGPs*. Los suelos con menor contenido de materia orgánica fueron los correspondientes a los viñedos-muestra de *VT Ibiza*, mientras que todas las muestras de suelo presentaron una conductividad similar. Con respecto a la composición mineral, el contenido de fósforo fue muy superior en los suelos de *VT Mallorca* y *VT Illa de Menorca* ( $p < 0.001$ ), concretamente, entre 3 y 7 veces mayor que los valores detectados en el resto de *IGPs*.

Tal y como se indica en la **Tabla 4.1**, se observaron diferencias significativas entre las *IGPs* con respecto a las condiciones climáticas ( $p < 0.001$ ). *VT Illa de Menorca*, la *IGP* situada más al norte del archipiélago balear, presentó el valor más bajo de pluviometría, mientras que *VT Formentera*, localizada al sur del mismo, manifestó la temperatura mínima más elevada.

Cabe indicar que se detectaron diferencias significativas entre las *IGPs* a un nivel de significación de  $p < 0.001$  para todas las variables de suelo y clima consideradas, exceptuando el contenido de potasio intercambiable ( $p < 0.01$ ), el ratio C/N ( $p < 0.05$ ) y la conductividad ( $p < 0.05$ ) del suelo. Por su parte, la elevación del terreno, como descriptor del paisaje de los viñedos-muestra, también presentó diferencias significativas entre las *IGPs* ( $p < 0.05$ ). Estos resultados ponen de manifiesto que todas las variables agroclimáticas consideradas pueden resultar útiles en el análisis de las diferencias existentes entre *IGPs* de una misma región vitivinícola.

De acuerdo con los valores  $\chi^2$ , las variables relacionadas con las características de la uva con mayor capacidad discriminante fueron: la acidez total, los parámetros de color del mosto, el contenido de fenólicos totales y el pH para las uvas de la variedad *Merlot*, aunque sólo los parámetros de color y el pH en el caso de la variedad *Cabernet Sauvignon*. De entre las variables de textura y fertilidad del suelo destacaron el pH, el contenido de limos y el de carbonatos, presentando los valores  $\chi^2$  más elevados de las 23 variables consideradas. Y con respecto a los descriptores climáticos, todos presentaron una capacidad discriminante muy alta.

**Tabla 4.1.** Caracterización de los viñedos de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje.

	<i>VT Mallorca</i>	<i>VT Illa de Menorca</i>	<i>VT Ibiza</i>	<i>VT Formentera</i>	$\chi^2$	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
<b><i>Uvas Merlot</i></b>						
<i>Fenólicos totales (mg/L)</i>	3066 ± 540 <i>a<sup>b</sup></i>	3474 ± 635 <i>ab</i>	3029 ± 331 <i>a</i>	3588 ± 288 <i>b</i>	10.5	*
<i>ABTS (mg/L)</i>	2.522 ± 0.333 <i>a</i>	2.909 ± 0.424 <i>b</i>	2.666 ± 0.292 <i>ab</i>	2.780 ± 0.293 <i>ab</i>	8.9	*
<i>Intensidad de color (UA)</i>	5.472 ± 0.942 <i>a</i>	5.703 ± 1.171 <i>ab</i>	6.023 ± 0.255 <i>b</i>	6.294 ± 0.341 <i>b</i>	10.4	*
<i>Tonalidad de color (UA)</i>	0.747 ± 0.126 <i>ab</i>	0.809 ± 0.052 <i>ac</i>	0.690 ± 0.036 <i>b</i>	0.882 ± 0.073 <i>c</i>	11.2	*
<i>pH</i>	3.36 ± 0.11 <i>ab</i>	3.42 ± 0.09 <i>ac</i>	3.31 ± 0.03 <i>b</i>	3.50 ± 0.13 <i>c</i>	10.3	*
<i>Acidez total (g/L)</i>	12.0 ± 2.0 <i>a</i>	9.9 ± 1.6 <i>b</i>	13.5 ± 1.4 <i>c</i>	12.1 ± 1.9 <i>ac</i>	15.9	**
<i>Grado alcohólico probable (% vol)</i>	14.7 ± 1.1 <i>a</i>	13.7 ± 1.0 <i>b</i>	13.7 ± 0.9 <i>b</i>	13.9 ± 0.3 <i>b</i>	9.9	*
<b><i>Uvas Cabernet Sauvignon</i></b>						
<i>Fenólicos totales (mg/L)</i>	3724 ± 1097 <i>a</i>	3258 ± 720 <i>a</i>	3230 ± 58 <i>a</i>	2960 ± 111 <i>a</i>	4.0	<i>ns</i>
<i>ABTS (mg/L)</i>	2.812 ± 0.553 <i>a</i>	2.718 ± 0.285 <i>a</i>	2.747 ± 0.349 <i>a</i>	2.626 ± 0.155 <i>a</i>	0.8	<i>ns</i>
<i>Intensidad de color (UA)</i>	5.487 ± 1.509 <i>a</i>	4.852 ± 0.735 <i>a</i>	3.365 ± 0.166 <i>b</i>	3.959 ± 0.155 <i>ab</i>	11.1	*
<i>Tonalidad de color (UA)</i>	0.781 ± 0.145 <i>a</i>	0.888 ± 0.025 <i>b</i>	0.950 ± 0.020 <i>c</i>	0.905 ± 0.020 <i>abc</i>	14.8	**
<i>pH</i>	3.3 ± 0.2 <i>a</i>	3.5 ± 0.0 <i>b</i>	3.4 ± 0.0 <i>a</i>	3.7 ± 0.0 <i>c</i>	16.6	***
<i>Acidez total (g/L)</i>	10.8 ± 1.7 <i>ab</i>	11.7 ± 1.8 <i>a</i>	12.1 ± 0.2 <i>ab</i>	9.7 ± 0.2 <i>b</i>	7.4	<i>ns</i>
<i>Grado alcohólico probable (% vol)</i>	14.3 ± 1.2 <i>a</i>	14.5 ± 1.0 <i>a</i>	13.8 ± 0.1 <i>a</i>	15.0 ± 0.2 <i>a</i>	4.1	<i>ns</i>

<sup>a</sup> Para cada variable, las letras diferentes indican diferencias significativas a \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; *ns*, diferencias no significativas; VT, Vi de la Terra.

**Tabla 4.1.** (continuación) Caracterización de los viñedos de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje.

	<i>VT Mallorca</i>	<i>VT Illa de Menorca</i>	<i>VT Ibiza</i>	<i>VT Formentera</i>	$\chi^2$	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
<b>Suelo</b>						
<i>Arenas (%)</i>	27.3 ± 7.7 <i>a</i>	50.0 ± 18.2 <i>b</i>	40.7 ± 11.8 <i>b</i>	66.0 ± 27.4 <i>b</i>	30.7	***
<i>Limos (%)</i>	37.7 ± 3.3 <i>a</i>	22.7 ± 6.7 <i>b</i>	32.3 ± 4.4 <i>c</i>	15.5 ± 15.9 <i>b</i>	42.4	***
<i>Arcillas (%)</i>	35.0 ± 6.6 <i>a</i>	27.3 ± 13.8 <i>ab</i>	27.0 ± 8.5 <i>b</i>	18.5 ± 11.5 <i>b</i>	16.8	***
<i>Materia orgánica (%)</i>	1.64 ± 0.38 <i>a</i>	1.88 ± 0.45 <i>a</i>	1.09 ± 0.13 <i>b</i>	1.25 ± 1.03 <i>ab</i>	19.1	***
<i>Carbonatos (%)</i>	31.6 ± 15.0 <i>a</i>	0.9 ± 0.1 <i>b</i>	49.4 ± 11.7 <i>c</i>	66.7 ± 13.0 <i>c</i>	41.4	***
<i>Calcaria activa (%)</i>	7.8 ± 3.7 <i>a</i>	0.2 ± 0.0 <i>b</i>	9.7 ± 0.4 <i>a</i>	8.2 ± 4.3 <i>a</i>	26.2	***
<i>pH</i>	8.4 ± 0.3 <i>a</i>	8.0 ± 0.1 <i>b</i>	8.8 ± 0.0 <i>c</i>	8.9 ± 0.5 <i>c</i>	43.4	***
<i>Conductividad (dS/m)</i>	0.14 ± 0.01 <i>a</i>	0.14 ± 0.01 <i>a</i>	0.15 ± 0.01 <i>b</i>	0.16 ± 0.05 <i>ab</i>	9.8	*
<i>N total (%)</i>	0.14 ± 0.03 <i>a</i>	0.17 ± 0.04 <i>b</i>	0.09 ± 0.01 <i>c</i>	0.09 ± 0.06 <i>ac</i>	27.3	***
<i>C/N ratio</i>	6.76 ± 0.52 <i>ab</i>	6.50 ± 0.30 <i>a</i>	6.99 ± 0.21 <i>b</i>	7.53 ± 1.69 <i>ab</i>	5.9	*
<i>P (ppm)</i>	13.63 ± 8.68 <i>a</i>	36.10 ± 28.96 <i>b</i>	3.40 ± 2.71 <i>c</i>	5.11 ± 1.45 <i>c</i>	33.0	***
<i>K (ppm)</i>	423 ± 118 <i>a</i>	377 ± 345 <i>ab</i>	273 ± 113 <i>b</i>	244 ± 211 <i>ab</i>	11.4	**
<b>Clima</b>						
<i>Pluviometría (mm)</i>	1.80 ± 0.60 <i>a</i>	0.94 ± 0.10 <i>b</i>	1.65 ± 0.12 <i>a</i>	1.17 ± 0.13 <i>c</i>	35.8	***
<i>Tª máxima (°C)</i>	23.8 ± 0.6 <i>a</i>	22.5 ± 0.3 <i>b</i>	23.7 ± 0.0 <i>a</i>	22.3 ± 0.2 <i>b</i>	34.2	***
<i>Tª mínima (°C)</i>	12.6 ± 0.5 <i>a</i>	13.2 ± 0.5 <i>b</i>	13.7 ± 0.4 <i>c</i>	15.8 ± 0.4 <i>d</i>	37.8	***
<b>Paisaje</b>						
<i>Elevación (m)</i>	112 ± 64 <i>a</i>	56 ± 38 <i>b</i>	176 ± 115 <i>a</i>	125 ± 35 <i>a</i>	10.2	*

<sup>a</sup> Para cada variable, las letras diferentes indican diferencias significativas a \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001; ns, diferencias no significativas; VT, Vi de la Terra.

Con el objeto de determinar el grado de asociación entre las variables consideradas se calculó la correspondiente matriz de correlación (Mulet *et al.*, 1992). Analizando las características de la uva, los coeficientes de correlación más elevados se observaron entre el contenido de fenólicos totales y la capacidad antioxidante ( $r \geq 0.57$ ), y para el pH con la tonalidad de color ( $r \geq 0.74$ ) y la acidez total del mosto ( $r \leq -0.65$ ). También se observaron correlaciones importantes entre los descriptores del suelo: tal es el caso de la proporción de arenas, limos y arcillas ( $r \geq |0.60|$  en todos los casos); la concentración de carbonatos y caliza activa ( $r \geq 0.75$ ); y el nitrógeno total con la materia orgánica ( $r \geq 0.95$ ) y el nivel de carbonatos ( $r \leq -0.54$ ). En lo que respecta a las variables climáticas y de paisaje no se observaron correlaciones importantes ( $r \geq |0.40|$  en todos los casos).

Esta evaluación preliminar puso de manifiesto la elevada correlación existente entre algunas de las variables, haciendo necesaria la eliminación de aquéllas que describen el mismo fenómeno y/o se utilicen de forma redundante. La selección de las variables para el análisis estadístico multivariable se fundamentó en base a tres criterios: i) variables con valores  $\chi^2$  elevados (**Tabla 4.1**); ii) variables menos correlacionadas con el resto; y iii) variables más utilizadas en la literatura como atributos con mayor capacidad discriminante.

De este modo, en el caso de los viñedos-muestra de *Merlot* de las IGP de las Islas Baleares, sólo nueve de las 23 variables inicialmente analizadas se consideraron en la aplicación del análisis de componentes principales (ACP). Concretamente, el contenido de fenólicos totales, la intensidad y tonalidad de color del mosto de uva macerado, la proporción de limos y carbonatos del suelo, la pluviometría, las temperaturas máxima y mínima, y la elevación del terreno.

Para la realización del ACP correspondiente a los viñedos-muestra de la variedad *Cabernet Sauvignon*, se consideraron las mismas variables, exceptuando el contenido de fenólicos totales dada su escasa capacidad discriminante (**Tabla 4.1**,  $\chi^2 = 4.0$ ,  $p > 0.05$ ).

Los tres primeros componentes principales que resultan de la aplicación del ACP sobre los viñedos-muestra de la variedad *Merlot* explicaron el 70% de la varianza total de la base de datos. En la **Figura 4.1** se representan las variables de la uva, suelo, clima y paisaje como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. Mediante el CP1, correlacionado positivamente con la temperatura mínima y de forma

negativa con la temperatura máxima y el contenido de limos del suelo, pudo explicarse un 30% de la variabilidad total. Por su parte, el CP2, representando un 23% de dicha variabilidad, quedó definido positivamente por la tonalidad de color del mosto y negativamente por su intensidad de color y su contenido de fenólicos totales. Adicionalmente, gracias al tercer componente principal (CP3) se recogió otro 17% de la variabilidad total de la base de datos de los viñedos-muestra de la variedad *Merlot*, presentando una fuerte correlación negativa con las variables de pluviometría, contenido de carbonatos del suelo y elevación del terreno (**Tabla 4.2**).

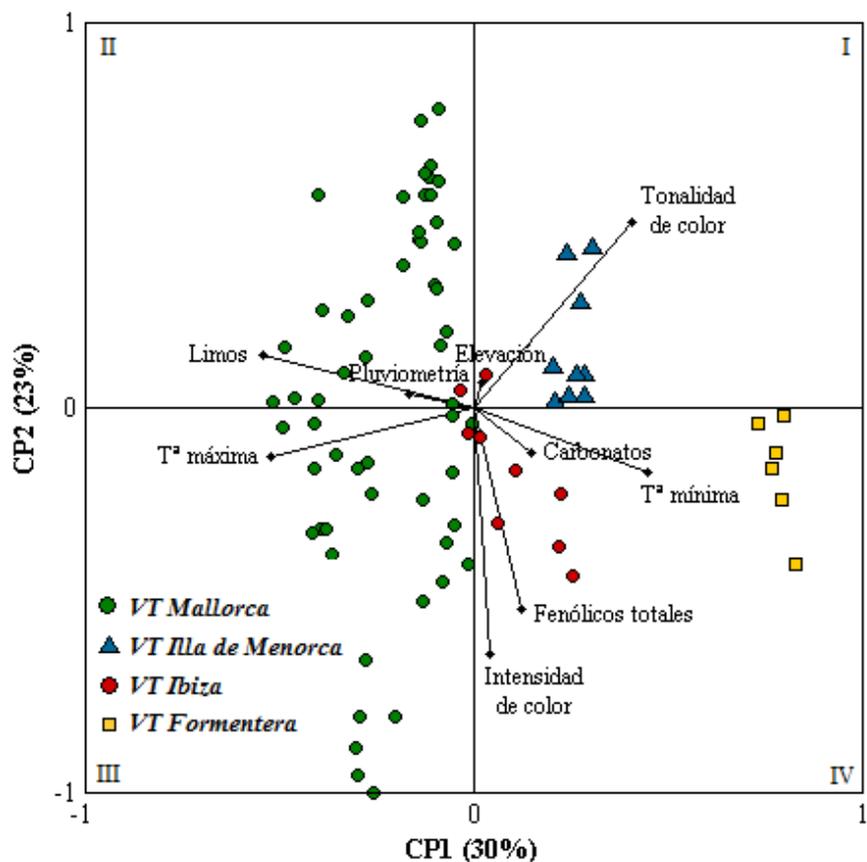
**Tabla 4.2.** Análisis de componentes principales de los viñedos-muestra de *Merlot*. Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales.

	CP1	CP2	CP3
<i>Fenólicos totales</i>	0.125	-0.524	0.040
<i>Intensidad de color</i>	0.041	-0.642	-0.076
<i>Tonalidad de color</i>	0.407	0.480	-0.061
<i>Limos</i>	-0.542	0.134	-0.176
<i>Carbonatos</i>	0.152	-0.121	-0.559
<i>Pluviometría</i>	-0.163	0.034	-0.511
<i>Tª máxima</i>	-0.520	-0.131	0.026
<i>Tª mínima</i>	0.450	-0.169	-0.097
<i>Elevación</i>	0.022	0.063	-0.612

CP, componente principal.

Los viñedos-muestra de *Merlot* de las cuatro *IGPs* en estudio también se han representado como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal en la **Figura 4.1**. La distribución de los mismos en este plano pone de manifiesto su tendencia a distribuirse en cuatro grupos diferenciados. Los viñedos-muestra de *VT Formentera* se separaron claramente del resto al quedar localizados en el cuadrante IV. Dicha posición respecto al eje CP1 se justifica en base al bajo contenido de limos en el suelo de sus viñedos y al registro en los mismos de la temperatura mínima más alta y la máxima más baja, de entre las cuatro *IGPs* de las Islas Baleares.

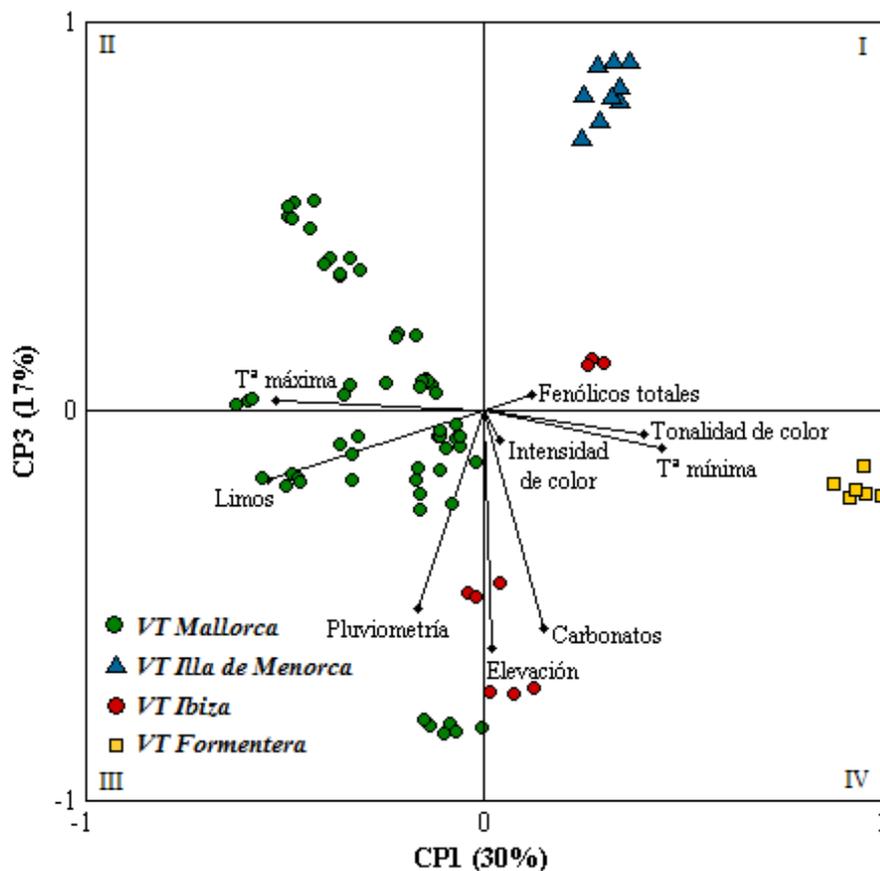
Por su parte, los viñedos-muestra de *VT Illa de Menorca* constituyeron un segundo grupo situado en el cuadrante I, mientras que los de *VT Ibiza* se agruparon principalmente en el cuarto (IV) muy próximos al origen de coordenadas. Tal y como se aprecia en la **Figura 4.1**, se observaron escasas diferencias entre ambos grupos con respecto al CP1.



**Figura 4.1.** Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de *Merlot* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal.

Finalmente, los viñedos-muestra de *VT Mallorca* se emplazaron en la zona negativa del CP1, diferenciándose del resto de acuerdo con los atributos agroclimáticos que describen dicho eje. De este modo, los viñedos-muestra de *Merlot* de *VT Mallorca* se caracterizaron por un elevado contenido de limos de sus suelos y por haber sufrido la temperatura máxima más alta y la mínima más baja durante el mes de mayo.

La representación de los viñedos-muestra de la variedad *Merlot* como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal (**Figura 4.2**) mostró un patrón de distribución similar al establecido en la representación CP1 versus CP2, puesto que los viñedos-muestra de *Merlot* de las IGPs de las Islas Baleares se distribuyeron nuevamente en cuatro grupos. En cualquier caso, destaca una mejor diferenciación entre los viñedos-muestra de *VT Illa de Menorca* y *VT Ibiza* con respecto al CP3, gracias a la mayor pluviometría, elevación del terreno y nivel de carbonatos del suelo en los viñedos-muestra de *VT Ibiza*.



**Figura 4.2.** Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de *Merlot* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal.

En lo que respecta a la variedad *Cabernet Sauvignon*, mediante los tres primeros componentes principales que resultan de la aplicación del ACP sobre sus viñedos-muestra pudo explicarse el 68% de la varianza total de la base de datos. En la **Figura 4.3** se representan las variables de la uva, suelo, clima y paisaje como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. Mediante el CP1 pudo explicarse el 29% de la variabilidad total, presentando una fuerte correlación positiva con las variables de temperatura máxima y contenido de limos en el suelo del viñedo. Por su parte, mediante el CP2 pudo interpretarse un 20% de la variabilidad total de la base de datos; dicho componente se caracterizó por los cuatro descriptores agroclimáticos restantes, de los cuales únicamente presentó una correlación negativa con la temperatura mínima. La explicación de un 19% adicional de la variabilidad se atribuyó al CP3, definido por los atributos de color del mosto macerado. La intensidad y tonalidad de color presentaron una correlación positiva y negativa con el CP3, respectivamente (**Tabla 4.3**).

**Tabla 4.3.** Análisis de componentes principales de los viñedos-muestra de *Cabernet Sauvignon*.  
Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales.

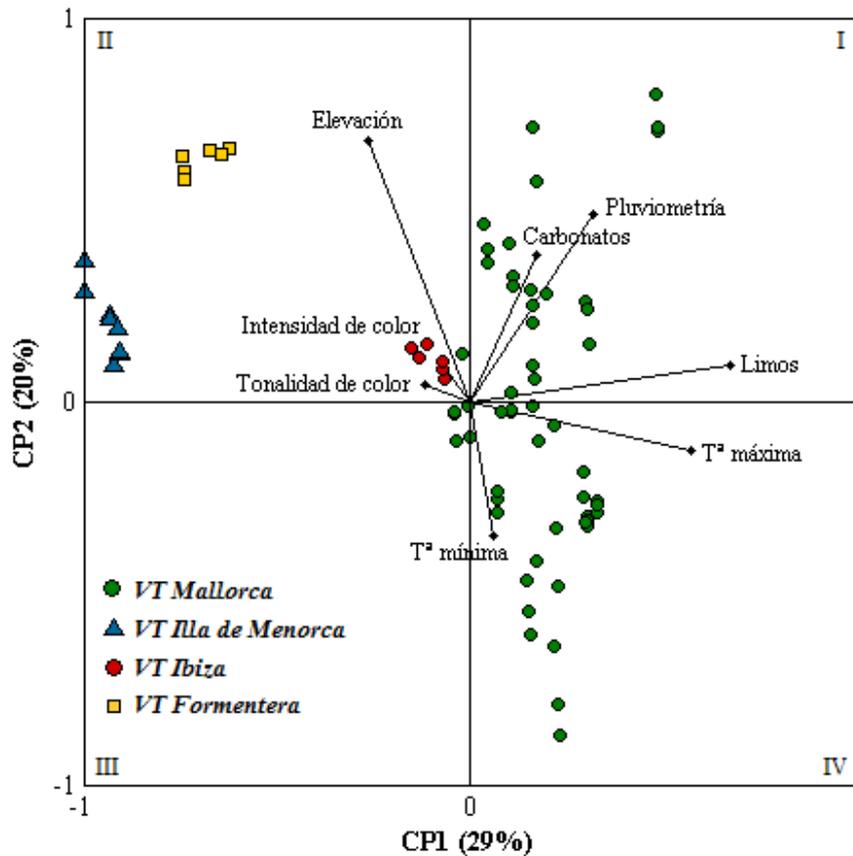
	CP1	CP2	CP3
<i>Intensidad de color</i>	-0.066	0.090	0.693
<i>Tonalidad de color</i>	-0.116	0.042	-0.658
<i>Limos</i>	0.672	0.092	-0.089
<i>Carbonatos</i>	0.174	0.383	-0.141
<i>Pluviometría</i>	0.321	0.485	-0.080
<i>Tª máxima</i>	0.570	-0.129	0.186
<i>Tª mínima</i>	0.063	-0.352	-0.113
<i>Elevación</i>	-0.263	0.678	0.075

CP, componente principal.

En la **Figura 4.3** también se representan los viñedos-muestra de la variedad *Cabernet Sauvignon* de las cuatro *IGPs* en estudio como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. La distribución de los mismos en el plano ACP puso de manifiesto una completa separación entre los viñedos-muestra de *VT Illa de Menorca* y *VT Formentera* pese a estar localizados en el mismo cuadrante (II). Ambos grupos quedaron diferenciados entre sí gracias a las variables agroclimáticas que definen el CP2, dado que los viñedos-muestra de *VT Formentera* presentaron valores de pluviometría, elevación del terreno y contenido de carbonatos del suelo significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ).

Al mismo tiempo, en esta representación, los viñedos-muestra de *VT Illa de Menorca* y *VT Formentera* se diferenciaron totalmente de los de las otras dos *IGPs*, con respecto al CP1. En este caso, la diferenciación se basó principalmente en un contenido de limos en sus suelos y una temperatura máxima significativamente menores ( $p < 0.001$ ). Por su parte, los viñedos-muestra de *VT Mallorca* y *VT Ibiza* se agruparon separadamente aunque muy próximos entre sí y al origen de coordenadas del ACP.

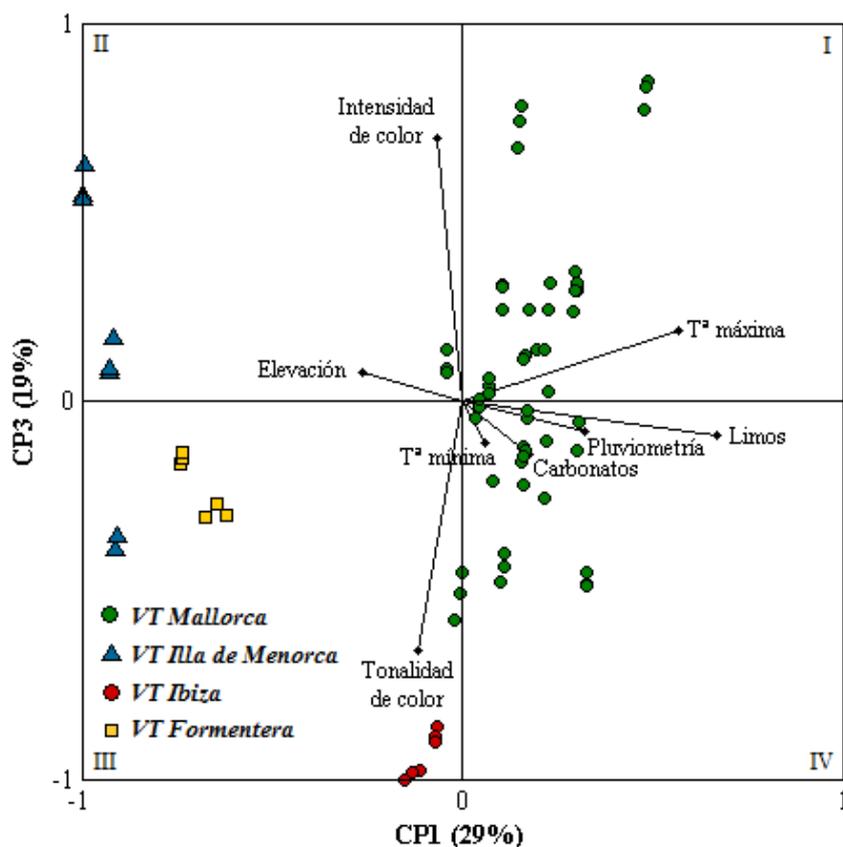
Al considerar la representación de los viñedos-muestra de la variedad *Cabernet Sauvignon* como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal, se observaron cuatro grupos claramente diferenciados (**Figura 4.4**). Los viñedos-muestra de *VT Illa de Menorca* se situaron en la zona negativa del CP1, concretamente en la posición más alejada del origen de coordenadas. Sus características a nivel de pluviometría, temperatura máxima y contenido de limos y carbonatos del suelo, justificaron dicha posición en el plano ACP.



**Figura 4.3.** Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de *Cabernet Sauvignon* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal.

Tanto los viñedos de *VT Formentera* como los de *VT Ibiza* se agruparon en el tercer cuadrante: los correspondientes a *VT Formentera* se situaron en la parte superior izquierda, principalmente diferenciados del resto gracias a los atributos incluidos en el CP1; mientras tanto, los viñedos-muestra de *VT Ibiza* se posicionaron en la parte inferior derecha del cuadrante III, siendo discriminados de acuerdo con las variables que definen el CP3. Por su parte, los viñedos-muestra de *VT Mallorca* se dispusieron mayoritariamente en la parte derecha de la representación CP1 versus CP3, caracterizándose por su elevada pluviometría y temperatura máxima.

En conclusión, independientemente de la variedad de uva considerada, puede afirmarse que los viñedos-muestra de las IGPs de las Islas Baleares se distribuyeron en cuatro grupos diferenciados como resultado de la aplicación del ACP sobre las características físico-químicas de la uva, la textura y fertilidad del suelo, y las condiciones climáticas y de paisaje de sus viñedos.



**Figura 4.4.** Análisis de componentes principales. Representación de las variables de la uva, suelo, clima y paisaje, y de las muestras de *Cabernet Sauvignon* de las indicaciones geográficas protegidas (IGPs) de las Islas Baleares como función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal.

De acuerdo con los resultados del ACP aplicado puede atribuirse un rol específico a cada uno de los tres primeros componentes principales. Tal y como se observa en la **Figura 4.1** y en la **Figura 4.2**, para la variedad *Merlot* el CP1 se define principalmente por las condiciones de temperatura y textura del suelo, mientras que el CP2 queda representado por las características de la uva, y el CP3, por las condiciones de pluviometría, paisaje y fertilidad del suelo. En el caso de la variedad *Cabernet Sauvignon* (**Figura 4.3** y **Figura 4.4**), el CP1 presentó las condiciones de temperatura máxima y textura del suelo como descriptores principales; el CP2 se caracterizó por las variables de pluviometría, paisaje, temperatura mínima y fertilidad del suelo; y el CP3, por las características de la uva. Así pues, para ambas variedades se observaron dos componentes del ACP representativos del medio natural del viñedo o de los descriptores agroclimáticos (CP1 y CP3 para la variedad *Merlot*, CP1 y CP2 para la variedad

*Cabernet Sauvignon*), y un tercero, específico de los atributos de la materia prima (CP2 y CP3 para las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, respectivamente).

Al comparar los resultados obtenidos para ambas variedades, se observa una distribución muy similar de las variables en los tres primeros componentes principales, lo cual pone de manifiesto una determinada relación entre dichos parámetros, completamente independiente de la variedad de uva en estudio. Por ejemplo, la intensidad y tonalidad de color presentaron una relación inversamente proporcional en ambos casos, mientras que el contenido de limos del suelo y la temperatura máxima denotaron una correlación positiva. Soto *et al.* (2011) habían observado con anterioridad una baja intensidad de color para aquellos vinos con mayor tonalidad, y viceversa. Por otra parte, Koundouras *et al.* (2006) ya observaron una relación directa entre el contenido de limos en el suelo del viñedo y la temperatura máxima registrada, quizá debido a que su estudio también se llevó a cabo en la cuenca mediterránea.

En el presente estudio, los tres primeros componentes principales permitieron de forma conjunta la identificación de diferentes patrones de comportamiento de los viñedos-muestra de acuerdo con su origen geográfico, dado que los cuatro grupos obtenidos como resultado del ACP, tanto para la variedad *Merlot* como para la *Cabernet Sauvignon*, se correspondieron con las cuatro *IGPs* reconocidas en la región vitivinícola de las Islas Baleares. Debido a su presencia en el primer componente principal, la temperatura máxima y el contenido de limos del suelo del viñedo fueron los descriptores más importantes del patrón de distribución de los viñedos-muestra en el plano formado por los diferentes componentes principales. De hecho, los viñedos-muestra procedentes de las *IGPs* en estudio se separaron principalmente a lo largo del CP1 (**Figura 4.1** y **Figura 4.3**). Ello se justifica de acuerdo con la literatura, según la cual ambos descriptores ejercen un impacto significativo en el desarrollo de la viña y, consecuentemente, en las características del producto (Andrés de Prado *et al.*, 2007; Soar *et al.*, 2008).

Como resultado del análisis multivariable de la base de datos correspondiente a la variedad *Merlot* se reveló que el CP1 y el CP3, ambos relacionados con las características agroclimáticas, permitían obtener un mejor patrón de diferenciación entre los viñedos-muestra de las cuatro *IGPs*, que el CP2 (**Figura 4.1**). Sin embargo, en el caso del *Cabernet Sauvignon*, el componente principal relacionado con la materia prima (CP3) permitió separar mejor los viñedos-muestra en función de su indicación de

calidad (**Figura 4.4**). En cualquier caso, cabe destacar la importancia de considerar los tres primeros componentes principales para obtener una buena diferenciación entre los cuatro grupos coincidentes con las *IGPs* de las Islas Baleares. De este modo, el presente estudio avala la existencia histórica de dichas indicaciones de calidad, explicándolas en base a un concepto mucho más geográfico.

La atribución de la calidad y de las características propias de un vino a su origen geográfico resulta de gran importancia tanto para productores como para consumidores. En la última década, varios autores han estudiado la caracterización y diferenciación de vinos de acuerdo con su origen geográfico aplicando la técnica ACP sobre una base de datos únicamente constituida por características del propio vino, tales como su perfil aromático, atributos sensoriales, composición fenólica y/o mineral, independientemente de las características de la uva como materia prima y/o de las condiciones agroclimáticas implicadas en su desarrollo.

Por ejemplo, Kallithraka *et al.* (2001) clasificaron vinos tintos procedentes de tres áreas de producción de Grecia, en base a su perfil de antocianos y su análisis sensorial. Por su parte, Miele *et al.* (2010) diferenciaron vinos tintos procedentes de cinco de las siete regiones vitivinícolas de Brasil, al aplicar el ACP sobre su composición físico-química. Y Douglas *et al.* (2001) mostraron la naturaleza y magnitud de las diferencias existentes entre vinos *Riesling* procedentes de los dos *terroirs* vitivinícolas de la península del Niágara (Canadá), basándose exclusivamente en sus atributos sensoriales. Su estudio documentó las características diferenciales existentes entre las dos denominaciones de calidad de dicha región vitivinícola. Tal y como puede observarse, al analizar vinos, dichos trabajos consideraron el factor humano en todo momento y no asociaron las diferencias existentes entre los mismos a los factores agroclimáticos propios de la región.

#### **4.1.2. Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva**

A partir de los resultados obtenidos por aplicación del diseño experimental I, se planteó un estudio complementario con el objeto de evaluar el efecto de la añada y de la variedad de uva sobre la diferenciación de la calidad ligada al origen. En este caso, la región vitivinícola considerada comprendió las dos denominaciones de origen de las Islas Baleares, *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant*. Para examinar ambos efectos, se consideró un número representativo de viñedos-muestra de las variedades *Merlot* y

*Cabernet Sauvignon* pertenecientes a cada *DO* durante dos vendimias consecutivas, 2009 y 2010.

La base de datos correspondiente a la caracterización de los viñedos-muestra se construyó a partir de los descriptores de uva, suelo, clima y paisaje previamente seleccionados por su capacidad discriminante en el diseño experimental I (González-Centeno *et al.*, 2013). Así pues, se determinó el contenido de fenólicos totales y las características cromáticas del mosto de uva macerado (muestra U2); y la textura y contenido de carbonatos del suelo (muestra S2). En cuanto a los datos climáticos, se consideraron los valores medios de pluviometría, temperatura máxima y mínima correspondientes al mes de mayo de 2009 y 2010. Al igual que para el estudio de las *IGPs*, la información climática y de paisaje se geolocalizó para cada uno de los viñedos-muestra considerados. En la **Tabla 4.4** y la **Tabla 4.5** se incluyen los resultados obtenidos en la caracterización de los viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* durante las añadas 2009 y 2010 para cada una de las dos *DOs* vitivinícolas de las Islas Baleares.

**Tabla 4.4.** Caracterización de los viñedos-muestra de la *DO Binissalem*: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje.

	<i>Merlot</i>		<i>Cabernet Sauvignon</i>	
	2009	2010	2009	2010
<b>Uva</b>				
<i>Fenólicos totales (mg/L)</i>	2571 ± 237	2776 ± 183	3853 ± 1653	3435 ± 551
<i>Intensidad de color (UA)</i>	4.565 ± 0.326	3.850 ± 0.535	5.513 ± 1.406	4.491 ± 0.816
<i>Tonalidad de color (UA)</i>	0.833 ± 0.061	0.814 ± 0.062	0.813 ± 0.116	0.859 ± 0.101
<b>Suelo</b>				
<i>Limos (%)</i>	37.2 ± 1.8	36.8 ± 1.0	36.7 ± 1.2	37.0 ± 1.6
<i>Carbonatos (%)</i>	31.5 ± 14.7	32.5 ± 12.3	32.9 ± 12.4	38.6 ± 12.0
<b>Clima</b>				
<i>Pluviometría (mm)</i>	10.17 ± 1.86	100.32 ± 8.79	10.23 ± 1.85	99.63 ± 7.13
<i>Temperatura máxima (°C)</i>	26.7 ± 0.3	22.8 ± 0.0	26.6 ± 0.2	22.8 ± 0.0
<i>Temperatura mínima (°C)</i>	14.0 ± 0.2	11.1 ± 0.4	14.0 ± 0.2	11.1 ± 0.3
<b>Paisaje</b>				
<i>Elevación (m)</i>	119 ± 7		118 ± 7	

Una vez caracterizados los viñedos-muestra de ambas *DOs*, se procedió a aplicar al conjunto de datos dos herramientas estadísticas multivariantes: el análisis de clusters (AC) y el análisis discriminante (AD), con el objeto de evaluar el grado de clasificación-asociación de los viñedos-muestra según la *DO* a la que pertenecen

(*DO Binissalem, DO Pla i Llevant*), la añada (2009, 2010) y/o la variedad de uva considerada (*Merlot, Cabernet Sauvignon*). Para ello se plantearon dos líneas de trabajo paralelas: una primera en la cual se analizaron de forma conjunta el efecto de la añada y del origen de producción sobre la clasificación de los viñedos-muestra de cada una de las variedades objeto de estudio (*Merlot y Cabernet Sauvignon*); y una segunda línea de trabajo que, considerando por separado los viñedos-muestra de 2009 y 2010, evaluó su clasificación en función de la variedad de uva y del origen de producción.

**Tabla 4.5.** Caracterización de los viñedos-muestra de la *DO Pla i Llevant*: atributos de la uva, suelo, clima y paisaje.

	<i>Merlot</i>		<i>Cabernet Sauvignon</i>	
	2009	2010	2009	2010
<i>Uva</i>				
<i>Fenólicos totales (mg/L)</i>	3146 ± 372	3160 ± 487	4007 ± 630	3761 ± 496
<i>Intensidad de color (UA)</i>	5.653 ± 0.500	5.565 ± 0.966	5.679 ± 1.656	5.190 ± 1.346
<i>Tonalidad de color (UA)</i>	0.693 ± 0.112	0.701 ± 0.131	0.763 ± 0.155	0.797 ± 0.093
<i>Suelo</i>				
<i>Limos (%)</i>	37.9 ± 3.0	38.3 ± 2.6	37.4 ± 3.1	37.8 ± 3.4
<i>Carbonatos (%)</i>	31.1 ± 17.4	35.3 ± 10.5	26.4 ± 12.7	26.5 ± 10.1
<i>Clima</i>				
<i>Pluviometría (mm)</i>	19.87 ± 6.90	71.36 ± 44.98	19.76 ± 7.14	69.63 ± 46.31
<i>Temperatura máxima (°C)</i>	26.7 ± 0.4	23.2 ± 0.3	26.7 ± 0.4	23.2 ± 0.3
<i>Temperatura mínima (°C)</i>	13.9 ± 0.4	11.9 ± 0.3	13.9 ± 0.4	11.9 ± 0.2
<i>Paisaje</i>				
<i>Elevación (m)</i>	95 ± 44		99 ± 43	

#### 4.1.2.1. Análisis de clusters

El análisis de clusters (AC) es una técnica estadística exploratoria que pone de manifiesto la asociación natural existente entre las muestras en estudio (Mulet *et al.*, 1992). A modo de estudio preliminar y para evidenciar dicha asociación natural de acuerdo con el origen geográfico, se propuso agrupar el conjunto de viñedos-muestra en dos clusters naturales para cada línea de trabajo.

En primer lugar, se fijó la variedad de uva en estudio y se aplicó el AC sobre las cuatro categorías existentes, combinación de las dos *DOs* y de las dos añadas. En la **Tabla 4.6** se recogen los resultados de la distribución obtenida, observándose que para ambas variedades, los viñedos-muestra se agruparon mayoritariamente en dos clusters según el año de vendimia.

En el caso de la variedad *Merlot*, los viñedos-muestra de 2009 se asignaron principalmente al clúster 2 (88% de asignación global), mientras que todos los de 2010 se agruparon en el clúster 1 (100% de asignación global). Por su parte, en el caso de la variedad *Cabernet Sauvignon*, los viñedos-muestra de 2009 fueron asignados al 100% al clúster 1, y los de 2010, constituyeron el clúster 2 con un 94% de asignación global.

Tal y como puede observarse, el efecto de la añada es tan significativo que determina la pauta de asociación de los viñedos-muestra en estudio, pudiendo enmascarar la posible agrupación natural de los viñedos-muestra en función de la *DO* a la que pertenecen. De ahí que también se aplicara el AC sobre los viñedos-muestra en estudio fijando la añada.

**Tabla 4.6.** Análisis de clusters. Porcentaje de asignación natural en función de la añada y del origen de producción para las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*.

		% Asignación al clúster	
		Clúster 1	Clúster 2
<i>Merlot</i>	<b>DOBi 2009</b>	0	100
	<b>DOPL 2009</b>	25	75
	<b>DOBi 2010</b>	100	0
	<b>DOPL 2010</b>	100	0
<i>Cabernet Sauvignon</i>	<b>DOBi 2009</b>	100	0
	<b>DOPL 2009</b>	100	0
	<b>DOBi 2010</b>	0	100
	<b>DOPL 2010</b>	12	88

*DOBi*, Denominación de origen Binissalem; *DOPL*, Denominación de origen Pla i Llevant.

En la **Tabla 4.7** se indican los resultados de distribución natural obtenidos al aplicar el AC sobre las cuatro categorías existentes al fijar el año de vendimia, combinación de las dos *DOs* y las dos variedades de uva. Se observa que, independientemente de la añada, el 100% de los viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* de la *DO Binissalem* conforman el mismo clúster. Por su parte, los viñedos-muestra de ambas variedades pertenecientes a la *DO Pla i Llevant*, se agrupan mayoritariamente en el clúster contrario a la *DO Binissalem* para ambas vendimias (75% y 79% de asignación global para las añadas 2009 y 2010, respectivamente). Ello pone de manifiesto un importante y significativo efecto del origen de producción sobre

la asociación natural de los viñedos-muestra durante dos añadas consecutivas, y un menor efecto de la variedad de uva.

**Tabla 4.7.** Análisis de clusters. Porcentaje de asignación natural en función de la variedad y del origen de producción para las añadas 2009 y 2010.

		% Asignación al clúster	
		Clúster 1	Clúster 2
<b>Vendimia 2009</b>	<b>DOBi Merlot</b>	0	100
	<b>DOBi Cabernet Sauvignon</b>	0	100
	<b>DOPL Merlot</b>	75	25
	<b>DOPL Cabernet Sauvignon</b>	75	25
<b>Vendimia 2010</b>	<b>DOBi Merlot</b>	100	0
	<b>DOBi Cabernet Sauvignon</b>	100	0
	<b>DOPL Merlot</b>	17	83
	<b>DOPL Cabernet Sauvignon</b>	25	75

*DOBi, Denominación de origen Binissalem; DOPL, Denominación de origen Pla i Llevant.*

#### 4.1.2.2. Análisis discriminante

A diferencia del AC, que manifiesta la asociación natural entre las muestras en estudio, el análisis discriminante (AD) proporciona la combinación lineal de variables más óptima para destacar las diferencias entre los grupos pre-establecidos. De modo que se aplicó el AD para verificar y cuantificar la asociación previamente observada mediante la aplicación del AC.

En la **Figura 4.5** y **Figura 4.6** se representan los viñedos-muestra de las añadas 2009 y 2010 correspondientes a *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant*, en el plano constituido por las dos primeras funciones discriminantes, para las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, respectivamente. En el caso de la variedad *Merlot*, a partir de la primera función discriminante (FD1), caracterizada principalmente por las variables relacionadas con la temperatura, se explicó el 97% de la varianza total; mientras que a partir de la segunda función discriminante (FD2), representada mayoritariamente por la intensidad y tonalidad de color del mosto macerado, se describió un 2% adicional de la variabilidad. Por su parte, para la variedad *Cabernet Sauvignon*, el 99% y el 1% de la varianza total se explicaron, respectivamente, a partir de la FD1 y FD2. En este caso, la FD1 estaba altamente correlacionada con la tonalidad de color del mosto macerado,

mientras que la FD2 denotaba una participación importante tanto de las variables climáticas como de las correspondientes a la uva. Cabe indicar que en ambos casos las tres primeras funciones discriminantes explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos. La contribución de cada variable a las tres primeras funciones discriminantes se indica en la **Tabla 4.8**, para cada variedad de uva considerada.

**Tabla 4.8.** Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Contribución de las variables a las tres primeras funciones discriminantes.

	<i>Merlot</i>			<i>Cabernet Sauvignon</i>		
	<b>FD1</b>	<b>FD2</b>	<b>FD3</b>	<b>FD1</b>	<b>FD2</b>	<b>FD3</b>
<i>Fenólicos totales</i>	0.000	0.001	-0.003	0.000	0.000	0.001
<i>Intensidad de color</i>	0.381	1.026	1.075	-0.324	0.562	-0.427
<i>Tonalidad de color</i>	-1.047	-5.330	7.233	-7.757	2.355	-7.270
<i>Limos</i>	0.072	0.090	-0.088	-0.017	0.096	0.223
<i>Carbonatos</i>	0.023	-0.003	-0.013	0.005	0.049	-0.048
<i>Pluviometría</i>	0.006	0.008	-0.021	0.003	0.030	0.016
<i>Tª máxima</i>	-3.616	-0.359	-1.690	-4.730	2.336	1.028
<i>Tª mínima</i>	-2.455	0.666	1.689	-3.065	-2.697	-1.211
<i>Elevación</i>	-0.027	-0.018	-0.006	-0.028	0.012	0.003

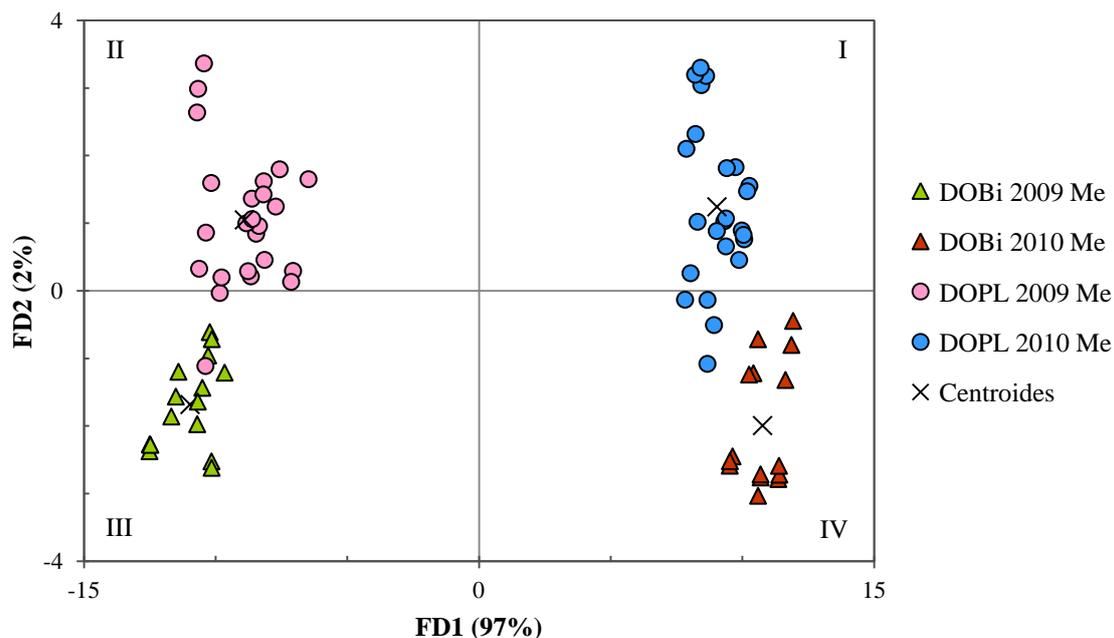
*FD, función discriminante.*

En el plano FD1 – FD2 de ambas variedades de uva en estudio, se observó una completa separación entre los viñedos-muestra correspondientes a las añadas 2009 y 2010, siendo la FD1 la responsable de dicha diferenciación. Tanto para la variedad *Merlot* (**Figura 4.5**) como para la *Cabernet Sauvignon* (**Figura 4.6**), los viñedos-muestra de la añada 2009 se agruparon en los cuadrantes II y III, mientras que los de 2010 quedaron localizados en los cuadrantes I y IV.

En el caso de la variedad *Merlot*, la diferenciación entre los viñedos-muestra pertenecientes a *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant* para las dos añadas consideradas se consiguió mediante la FD2. Tal y como se observa en la **Figura 4.5**, los viñedos-muestra de la *DO Binissalem* se situaron en la zona negativa de la FD2 tanto para 2009 como para 2010, mientras que los correspondientes a la *DO Pla i Llevant* se localizaron principalmente en la zona positiva de dicho eje.

De este modo, en cada uno de los cuadrantes de la representación bidimensional del AD se agruparon los viñedos-muestra que comparten añada y origen de producción.

Dicha diferenciación resulta más evidente al tener en cuenta la localización de los centroides, puesto que la distancia entre ellos se considera proporcional a la similitud entre los grupos (Pérez-Magariño *et al.*, 2002).

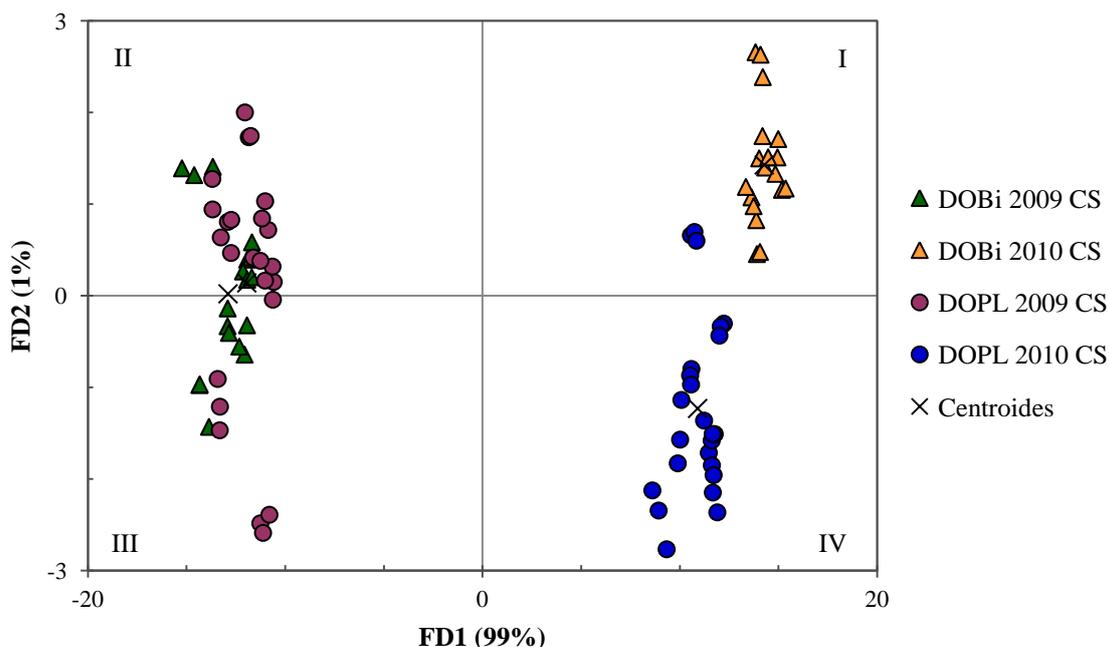


**Figura 4.5.** Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Variedad *Merlot*. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante.

En el caso de la variedad *Cabernet Sauvignon*, mediante la FD2 únicamente pudo diferenciarse entre los viñedos-muestra procedentes de diferente *DO* para la añada 2010, situándose en el primer cuadrante (I) los correspondientes a *DO Binissalem* y en el cuarto (IV), los de *DO Pla i Llevant*. No obstante, para la añada 2009, tal y como evidencia la posición de los centroides de ambos grupos, la aplicación del AD no pudo discernir entre los viñedos-muestra de ambas *DOs*, apareciendo entremezclados en el segundo (II) y tercer (III) cuadrantes (**Figura 4.6**).

A partir de los resultados obtenidos, podría atribuirse un rol específico a cada una de las dos primeras funciones discriminantes: mientras la FD1 permitió la diferenciación de los viñedos-muestra según la añada a lo largo de su eje; la FD2 dio lugar a la diferenciación entre *DOs*. Cabe apuntar que entre ambas funciones discriminantes permitieron una correcta clasificación del 99% y del 87% de los viñedos-muestra de las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, respectivamente.

Globalmente, la aplicación del AD en esta primera línea de trabajo del diseño experimental II, puso de manifiesto una importante diferenciación entre los viñedos-muestra con respecto a la añada, en base a la combinación de las características de la uva y de las condiciones del suelo, clima y paisaje de la viña. Al mismo tiempo, mostró una clara evidencia de diferenciación en función de la *DO*.



**Figura 4.6.** Análisis discriminante. Efecto de la añada y del origen de producción. Variedad *Cabernet Sauvignon*. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante.

En la **Tabla 4.9** se recoge la predicción de grupo de pertenencia calculada a partir del AD para cada viñedo-muestra según la variedad de uva en estudio. Tal y como se observa, el 100% de los viñedos-muestra de la añada 2010 fueron correctamente clasificados, independientemente de la *DO* y/o variedad de uva considerada. Los viñedos-muestra de *Merlot* de la *DO Binissalem* correspondientes a 2009 también presentaron el máximo grado de clasificación, mientras que para los de *DO Pla i Llevant* de la misma añada y variedad, la predicción del grupo de pertenencia se redujo al 96%. Por su parte, en el caso del *Cabernet Sauvignon* para la añada 2009, en la **Tabla 4.9** se refleja el mismo comportamiento previamente observado en la representación gráfica del AD (**Figura 4.6**): los viñedos-muestra de *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant* se entremezclan. No obstante, un porcentaje considerable de los mismos (67% y 80%, respectivamente) fueron clasificados correctamente en sus grupos originales de pertenencia.

La aplicación del AD permitió la clasificación del 100% de los viñedos-muestra de acuerdo con el año de vendimia, puesto que ninguno de los correspondientes a 2009 se clasificó como 2010, ni viceversa. Tal y como se había indicado en el AC, estos primeros resultados ponen de manifiesto un efecto de la añada tan significativo que podría producir cierto enmascaramiento del efecto ejercido por el origen de producción.

Por ello se planteó una segunda línea de trabajo que evaluara la clasificación de los viñedos-muestra en función de la variedad de uva y de la *DO* para cada una de las añadas consideradas, eliminando así su efecto.

**Tabla 4.9.** Análisis discriminante. Predicción de grupo de pertenencia en función de la añada y del origen de producción para las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*.

	<i>Grupo original de pertenencia</i>	<i>Predicción del grupo de pertenencia</i>				<i>% Correcta clasificación</i>
		<b>DOBi 2009</b>	<b>DOPL 2009</b>	<b>DOBi 2010</b>	<b>DOPL 2010</b>	
<i>Merlot</i>	<b>DOBi 2009</b>	15	0	0	0	100
	<b>DOPL 2009</b>	1	23	0	0	96
	<b>DOBi 2010</b>	0	0	15	0	100
	<b>DOPL 2010</b>	0	0	0	24	100
<i>Cabernet Sauvignon</i>	<b>DOBi 2009</b>	12	6	0	0	67
	<b>DOPL 2009</b>	5	19	0	0	80
	<b>DOBi 2010</b>	0	0	18	0	100
	<b>DOPL 2010</b>	0	0	0	24	100

*DOBi*, Denominación de origen Binissalem; *DOPL*, Denominación de origen Pla i Llevant.

En la **Figura 4.7** se representan los viñedos-muestra de *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant* de las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, en el plano constituido por las dos primeras funciones discriminantes, para la vendimia 2009. A partir de la FD1 y la FD2 se explicó, respectivamente, el 80% y 16% de la varianza total de la base de datos. Tal y como se indica en la **Tabla 4.10**, la FD1 se define principalmente a partir de las variables de temperatura máxima y tonalidad de color del mosto macerado, presentando también una participación significativa de la intensidad de color, la pluviometría y el contenido de limos del suelo. Por su parte, la FD2 quedó representada en mayor medida por la temperatura mínima, así como por la tonalidad de color del mosto macerado. Cabe indicar que las tres primeras funciones discriminantes explicaron nuevamente el 100% de la variabilidad de la base de datos.

Para la añada 2009, los viñedos-muestra de diferente *DO* se separaron a lo largo del eje FD1, agrupándose en la parte izquierda de la representación los correspondientes a la *DO Binissalem* y en la derecha, los de la *DO Pla i Llevant*, independientemente de la variedad de uva considerada (**Figura 4.7**). Por su parte, la aplicación de la FD2 denotó una aceptable pero no total diferenciación entre los viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* para cada *DO*: mientras los de la variedad *Merlot* se situaron mayoritariamente por debajo del eje FD1, los de la variedad *Cabernet Sauvignon*

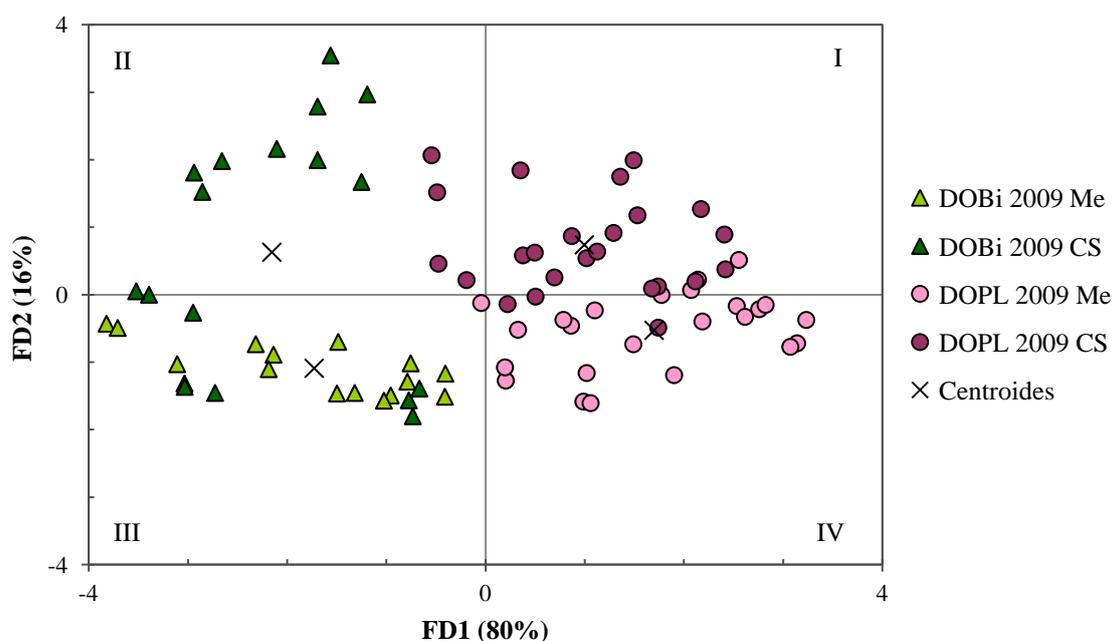
quedaron principalmente localizados por encima del mismo. Globalmente, la aplicación del AD permitió clasificar satisfactoriamente el 82% de los viñedos-muestra de 2009.

**Tabla 4.10.** Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Contribución de las variables a las tres primeras funciones discriminantes.

	2009			2010		
	FD1	FD2	FD3	FD1	FD2	FD3
<i>Fenólicos totales</i>	-0.001	0.002	0.000	0.000	0.001	-0.001
<i>Intensidad de color</i>	1.145	-0.604	0.876	0.218	0.362	1.425
<i>Tonalidad de color</i>	3.808	-2.242	-2.566	0.830	9.710	7.724
<i>Limos</i>	0.285	0.046	-0.003	0.034	0.017	-0.030
<i>Carbonatos</i>	-0.049	0.007	0.045	-0.078	0.035	0.073
<i>Pluviometría</i>	0.336	-0.043	-0.154	-0.011	-0.002	0.013
<i>Tª máxima</i>	-3.458	0.179	-0.602	2.437	0.226	0.861
<i>Tª mínima</i>	0.561	-1.415	-3.247	4.526	-0.008	-0.209
<i>Elevación</i>	0.008	-0.005	-0.028	0.028	-0.001	-0.009

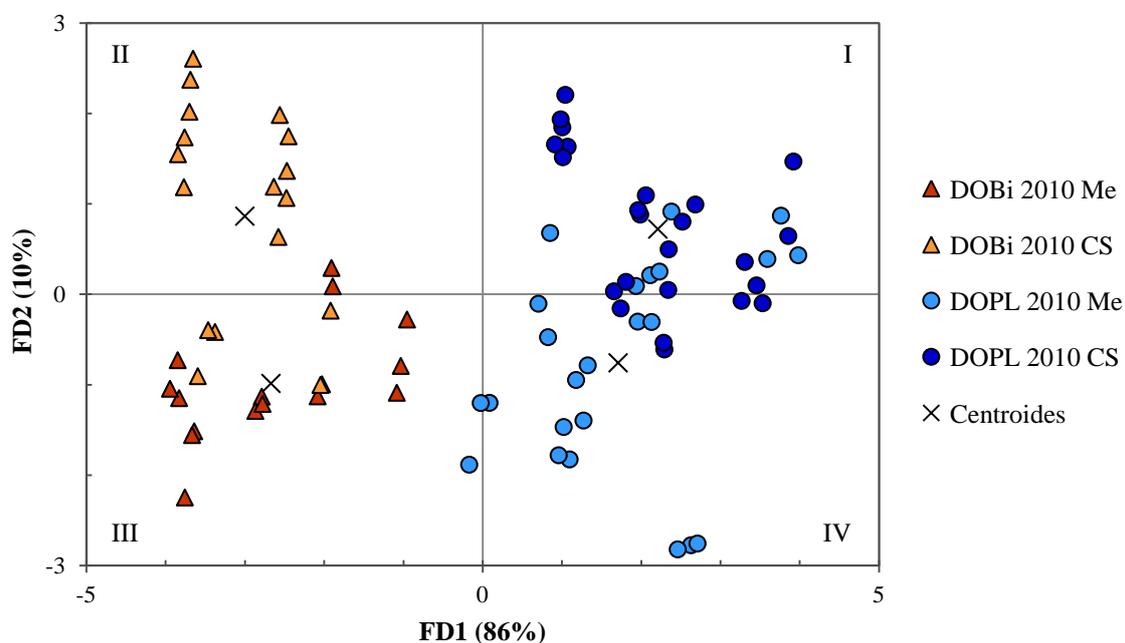
FD, función discriminante.

Pese a que las agrupaciones se sitúan más próximas entre sí y del origen de coordenadas que en las representaciones anteriores (**Figura 4.5** y **Figura 4.6**), tal y como denota la localización de los centroides en la **Figura 4.7**, cada cuadrante acoge mayoritariamente los viñedos-muestra de una misma *DO* y variedad de uva.



**Figura 4.7.** Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Añada 2009. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante.

Un comportamiento similar se observó en la representación de los viñedos-muestra de *DO Binissalem* y *DO Pla i Llevant* de las variedades *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, en el plano constituido por las dos primeras funciones discriminantes, para la vendimia 2010 (**Figura 4.8**). La FD1, con la que pudo explicarse un 86% de la varianza total de los datos, estaba representada positivamente por las variables de temperatura, las características físico-químicas de la uva, el contenido de limos del suelo y la elevación, y negativamente por la pluviometría y el porcentaje de carbonatos de la viña (**Tabla 4.10**). La FD2, por su parte, cuya aplicación explicó un 10% de la varianza, estaba fuertemente correlacionada con la tonalidad de color del mosto macerado.



**Figura 4.8.** Análisis discriminante. Efecto de la variedad y del origen de producción. Añada 2010. Representación de las muestras en función de la primera (FD1) y segunda (FD2) función discriminante.

Al analizar la **Figura 4.8**, se observa una clara diferenciación entre los viñedos-muestra de la *DO Binissalem*, situados en la zona negativa de la FD1, y los de la *DO Pla i Llevant*, localizados en la zona positiva de dicho eje. Por su parte, a lo largo de la FD2, se estableció una moderada separación de las variedades de uva para cada *DO*. Los centroides de cada grupo se situaron en un cuadrante diferente, pese a que algunos viñedos-muestra de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon* se entremezclaron en las proximidades del eje FD2. En cualquier caso, la aplicación del AD logró clasificar

correctamente, a partir de sus dos primeras funciones, un 77% de los viñedos-muestra en estudio para la añada 2010.

Al igual que en el estudio del efecto de la añada, de nuevo se observó un rol específico para cada una de las dos primeras funciones discriminantes: mientras que mediante la FD1 se posibilitó la separación de los viñedos-muestra en función de su origen de producción, a partir de la FD2 se marcó una moderada separación entre las variedades de uva.

En la **Tabla 4.11** se recoge la predicción del grupo de pertenencia calculada para cada viñedo-muestra según la añada en estudio. Tal y como puede observarse ninguno de los grupos establecidos tuvo un 100% de asignación de sus viñedos-muestra. No obstante, cabe destacar que independientemente de la añada y de la variedad de uva considerada, la aplicación del AD permitió la clasificación del 100% de los viñedos-muestra de acuerdo con su *DO*, puesto que ninguno de los correspondientes a la *DO Binissalem* se clasificó como *DO Pla i Llevant*, ni viceversa. Ello pone de manifiesto que, en términos de diferenciación, el efecto del origen de producción es mayor que el de la variedad de uva, fenómeno que ya se dejaba entrever en la **Figura 4.7** y la **Figura 4.8**.

**Tabla 4.11.** Análisis discriminante. Predicción de grupo de pertenencia en función de la variedad de uva y del origen de producción para las añadas 2009 y 2010.

	<i>Grupo original de pertenencia</i>	<i>Predicción del grupo de pertenencia</i>				<i>% Correcta clasificación</i>
		<b>DOBi Merlot</b>	<b>DOBi C. Sauvignon</b>	<b>DOPL Merlot</b>	<b>DOPL C. Sauvignon</b>	
<b>Vendimia 2009</b>	<b>DOBi Merlot</b>	13	2	0	0	87
	<b>DOBi C. Sauvignon</b>	6	12	0	0	67
	<b>DOPL Merlot</b>	0	0	21	3	88
	<b>DOPL C. Sauvignon</b>	0	0	4	20	83
<b>Vendimia 2010</b>	<b>DOBi Merlot</b>	13	2	0	0	87
	<b>DOBi C. Sauvignon</b>	5	13	0	0	72
	<b>DOPL Merlot</b>	0	0	16	8	67
	<b>DOPL C. Sauvignon</b>	0	0	4	20	83

*DOBi*, Denominación de origen Binissalem; *DOPL*, Denominación de origen Pla i Llevant.

A partir de los resultados obtenidos por aplicación del AC y AD se evidencia una clara diferenciación entre las dos *DOs* vitivinícolas coexistentes en la isla de

Mallorca, en base a las características de la materia prima y del entorno agroclimático de la viña, sin tener en cuenta el factor humano.

El presente estudio confirma y cuantifica los efectos que la añada, el origen de producción y la variedad de uva ejercen en la diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen, manifestando una clara reducción de la capacidad de discriminación en ese mismo orden. Los resultados obtenidos coinciden en gran medida con los publicados en las últimas décadas sobre la diferenciación, generalmente de vinos, en base a su añada, origen de producción y/o variedad de uva (**Tabla 4.12**). No obstante, en la mayor parte de estos trabajos no sólo está presente el factor humano, sino que además la diferenciación entre muestras se realiza generalmente con respecto a un único factor de discriminación (añada, origen geográfico o variedad de uva, entre otros), pudiendo todo ello amplificar notablemente el porcentaje global de muestras correctamente clasificadas. Adicionalmente, a diferencia del presente estudio, cabe indicar que en dichos trabajos las variables discriminantes utilizadas para distinguir entre vinos procedentes de diferentes *DOs*, regiones o países, sólo incluyen características propias del vino y no del entorno geográfico del cual proceden, por lo que no asocian las diferencias existentes entre los mismos a la materia prima y los factores agroclimáticos implicados en su elaboración.

Al igual que en los trabajos de Kontkanen *et al.* (2005), Câmara *et al.* (2006), González-Neves *et al.* (2007; 2012), Zhang *et al.* (2010), Minnaar *et al.* (2011) y Figueiredo-González *et al.* (2012) (**Tabla 4.12**), los resultados obtenidos a partir de la aplicación del AD en el presente estudio indican que las dos primeras funciones discriminantes explicaron más del 96% de la variabilidad de la base de datos considerada en cada caso.

De entre las referencias bibliográficas de la **Tabla 4.12**, cabe destacar los trabajos de Mulet *et al.* (1992) y Forcén *et al.* (1993), al haberse realizado sobre las mismas zonas vitivinícolas consideradas en el presente estudio de forma previa a su reconocimiento legal como *DOs*. Ambos autores investigaron los efectos del origen de producción y de la variedad de uva sobre la diferenciación de mostos y/o vinos de ambas zonas, en base a parámetros exclusivamente enológicos, obteniendo porcentajes de correcta clasificación similares o más elevados con respecto a la variedad, pero más bajos con respecto al origen de producción.

**Tabla 4.12.** Revisión bibliográfica del efecto de la añada, origen de producción y/o variedad de uva como criterios de diferenciación de la calidad. Estudios realizados mediante el uso de análisis discriminante.

Tipo de muestra	Variables discriminantes	% Correcta clasificación				Observaciones	Referencia bibliográfica
		Efecto añada	Efecto origen geográfico	Efecto variedad	Otros efectos		
Vinos tintos de 5 DOs, 5 variedades y 4 procesos de elaboración	Antocianos	---	100	100	Proceso elaboración: 100	González-San José <i>et al.</i> (1990)	
Mostos de 3 variedades tintas y 2 regiones de Mallorca (España)	Parámetros enológicos	---	80	83	---	Mulet <i>et al.</i> (1992)	
Mostos / vinos de 2 variedades tintas y 2 regiones de Mallorca	Composición aromática	<i>ns</i> (1986 y 1987)	62 / 90 <sup>a</sup>	78 / 92	---	<sup>a</sup> Clasificación respecto a región y variedad de forma simultánea Forcén <i>et al.</i> (1993)	
Vinos tintos de 5 bodegas de la misma DO	Antocianos / Flavonoles / Color	---	---	---	Bodega: 100	Las dos primeras FD explicaron el 89% de la variabilidad de la base de datos Gómez-Cordovés <i>et al.</i> (1995)	
Vinos tintos de 4 regiones de Francia	Análisis sensorial / Composición aromática	---	64 / 82 <sup>b</sup>	---	---	<sup>b</sup> Se consideran diferentes añadas (1983 – 1988) para cada región Sivertsen <i>et al.</i> (1999)	
Vinos rosados / tintos de 5 DOs (España)	Composición fenólica / Parámetros enológicos / Color	---	88 / 85	---	---	Las dos primeras FD explicaron el 80% / 89% de la variabilidad de la base de datos Pérez-Magariño <i>et al.</i> (2001)	
Vinos rosados de 3 DOs (España)	Composición elemental y fenólica / Parámetros enológicos / Color	---	98	---	---	Pérez-Magariño <i>et al.</i> (2002)	
Vinos tintos de 3 regiones de las Islas Canarias (España)	Composición fenólica	---	89	---	---	Rodríguez-Delgado <i>et al.</i> (2002)	
Vinos tintos de 3 DOs (Valencia, España)	Parámetros enológicos / composición aromática	---	---	97 <sup>c</sup> , 100 <sup>d</sup>	---	<sup>c</sup> Considera vinos de la añada 1994 <sup>d</sup> Considera vinos de la añada 1995 Aleixandre <i>et al.</i> (2002)	
Vinos blancos / tintos (Hungria) <sup>e</sup>	Aminoácidos libres / Aminoácidos biógenos	74 / 82	71 / 65	63 / 72	Proceso elaboración: 95	<sup>e</sup> Vinos blancos de 9 añadas, 18 regiones y 19 variedades; vinos tintos de 6 añadas, 10 regiones y 9 variedades Héberger <i>et al.</i> (2003)	
Vinos blancos de 6 regiones (Grecia) y 7 variedades	Aminoácidos	97	Discriminación de 2 regiones	95	---	Las dos primeras FD explicaron el 100%, 77% y 72% de la variabilidad de la base de datos de la añada, origen geográfico y variedad, respectivamente Soufleros <i>et al.</i> (2003)	
Vinos de 4 regiones de Alemania	Composición elemental	---	89 <sup>f</sup>	---	---	<sup>f</sup> Se consideran diferentes añadas, variedades y calidades de vino para cada región Thiel <i>et al.</i> (2004)	

DO, Denominación de Origen; FD, función discriminante; *ns*, efecto no significativo.

**Tabla 4.12** (continuación) Revisión bibliográfica del efecto de la añada, origen de producción y/o variedad de uva como criterios de diferenciación de la calidad. Estudios realizados mediante el uso de análisis discriminante.

Tipo de muestra	Variables discriminantes	% Correcta clasificación				Observaciones	Referencia bibliográfica
		Efecto añada	Efecto origen geográfico	Efecto variedad	Otros efectos		
Vinos tintos de 4 DOs (Aragón, España)	Trans-resveratrol	---	47 <sup>g</sup> , 60 <sup>h</sup>	---	---	<sup>g</sup> Considera vinos jóvenes y añejos de 4 variedades <sup>h</sup> Considera sólo vinos jóvenes de 4 variedades	Abril <i>et al.</i> (2005)
Vinos blancos y tintos de 3 regiones de Sudáfrica	Composición elemental	---	100	---	Color de la variedad <sup>i</sup>	<sup>i</sup> No se encontró diferenciación entre vinos blancos y tintos de la misma región	Coetzee <i>et al.</i> (2005)
Vinos blancos / tintos de Sudáfrica	Compuestos fenólicos no coloreados	---	---	97 / 100 <sup>j</sup>	---	<sup>j</sup> Vinos blancos de 3 variedades; vinos tintos de 5 variedades. Se consideran diferentes añadas (1988 – 2003) para cada variedad	De Villiers <i>et al.</i> (2005)
Vinos tintos de 3 regiones de Canadá	Análisis sensorial	100	Discriminación incompleta	ns	---	Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	Kontkanen <i>et al.</i> (2005)
Vinos blancos (Madeira, Portugal)	Composición aromática	---	---	96	---	Las dos primeras FD explicaron el 98% de la variabilidad de la base de datos	Câmara <i>et al.</i> (2006)
Vinos tintos de 6 regiones (Grecia) y 6 variedades	Composición fenólica	---	100 <sup>k</sup>	100 <sup>l</sup>	---	Las dos primeras FD explicaron el <sup>k</sup> 77% y <sup>l</sup> 74% de la variabilidad de la base de datos	Makris <i>et al.</i> (2006)
Vinos blancos de 2 DOs (Andalucía, España) y 2 procesos de elaboración	Composición elemental	---	100	---	Proceso elaboración <sup>m</sup>	<sup>m</sup> No se encontró diferenciación entre vinos de la misma DO con diferente sistema de elaboración	Álvarez <i>et al.</i> (2007)
Pielas / vinos de 3 variedades de uva tinta	Antocianos	---	---	100 / 100	---	Se consideran diferentes añadas (2002, 2003) para cada variedad. Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	González-Neves <i>et al.</i> (2007)
Vinos tintos de 4 DOs (Valencia, España)	Composición elemental	---	100	---	---	Se consideran diferentes añadas (1999 – 2006) para cada DO. Las dos primeras FD explicaron el 88% de la variabilidad de la base de datos	González <i>et al.</i> (2009)
Vinos de Jerez de 3 DOs (Andalucía, España)	Composición elemental	---	100	---	---		Paneque <i>et al.</i> (2009)
Vinos tintos / suelos de 3 regiones de Argentina	Composición elemental	---	100 / 92	---	---		Fabani <i>et al.</i> (2010)
Vinos tintos de 5 añadas <sup>n</sup> , 11 regiones (Austria) y 6 variedades	Composición fenólica	95 – 100	84 – 100	65 – 100	---	<sup>n</sup> 2003 – 2007	Jaitz <i>et al.</i> (2010)

DO, Denominación de Origen; FD, función discriminante; ns, efecto no significativo.

**Tabla 4.12** (continuación) Revisión bibliográfica del efecto de la añada, origen de producción y/o variedad de uva como criterios de diferenciación de la calidad. Estudios realizados mediante el uso de análisis discriminante.

Tipo de muestra	Variables discriminantes	% Correcta clasificación				Observaciones	Referencia bibliográfica
		Efecto añada	Efecto origen geográfico	Efecto variedad	Otros efectos		
Vinos blancos de 2 DOs (Andalucía, España) y 2 sistemas de elaboración	Composición elemental	---	98	---	Proceso elaboración: 94 <sup>o</sup>	<sup>o</sup> Clasificación respecto a DO y proceso de elaboración de forma simultánea	Paneque <i>et al.</i> (2010)
Vinos de 4 regiones de los Balcanes	Composición elemental	---	83	---	---		Razic <i>et al.</i> (2010)
Vinos tintos de 10 regiones de Canadá	Atributos químicos	---	100 <sup>p</sup>	---	---	<sup>p</sup> Porcentaje de discriminación al considerar vinos de las añadas 2005 y 2006 independientemente	Rezaei <i>et al.</i> (2010)
Vinos tintos de 5 DOs (España)	Composición aromática	---	98	---	---		Sáenz <i>et al.</i> (2010)
Vinos tintos de 3 variedades	Composición aromática	---	---	100	---	Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	Zhang <i>et al.</i> (2010)
Vinos tintos de 4 países de América del Sur	Composición elemental	---	100 <sup>q</sup>	---	---	<sup>q</sup> Se consideran diferentes regiones vitivinícolas, variedades y añadas (1999 – 2009) para cada país	Bentlin <i>et al.</i> (2011)
Vinos blancos de 2 países de Oceanía	Medidas espectroscópicas	---	67 <sup>r</sup> – 93 <sup>s</sup>	---	---	<sup>r</sup> Considera medidas con UV-Vis <sup>s</sup> Considera medidas con NIR+MIR	Cozzolino <i>et al.</i> (2011)
Vinos de 2 variedades tintas de 2 añadas (2005/2006)	Composición flavan-3-olica	82 <sup>t</sup>	---	100 / 92 <sup>u</sup>	Prácticas enológicas	<sup>t</sup> Clasificación respecto a los 3 efectos de forma simultánea. <sup>u</sup> Clasificación respecto a variedad y práctica enológica simultáneamente	García-Marino <i>et al.</i> (2011)
Vinos de 3 variedades de uva tinta	Composición fenólica	---	---	100	---	Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	Minnaar <i>et al.</i> (2011)
Zumo de uva de 2 variedades blancas	Medidas espectroscópicas	ns (2006 y 2008)	80 <sup>u</sup> , 86 <sup>w</sup>	---	---	<sup>v</sup> Considera medidas con Vis-NIR <sup>w</sup> Considera medidas con ATR-MIR	Cozzolino <i>et al.</i> (2012)
Pieles de 3 variedades de uva tinta	Antocianos / Flavonoles	---	---	100 / 100	---	Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	Figueiredo-González <i>et al.</i> (2012)
Vinos tintos de 3 añadas <sup>x</sup>	Antocianos	100	---	---	---	<sup>x</sup> 2006, 2007, 2009. Las dos primeras FD explicaron el 100% de la variabilidad de la base de datos	González-Neves <i>et al.</i> (2012)
Vinos blancos y tintos de 6 estados de Australia	Composición elemental	66	83 – 100	76	Color de la variedad: 100 <sup>y</sup>	<sup>y</sup> Los autores atribuyen esta elevada discriminación entre vinos blancos y tintos, a las diferentes técnicas de elaboración que implican	Martin <i>et al.</i> (2012)

DO, Denominación de Origen; FD, función discriminante; ns, efecto no significativo.

Jaitz *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la añada, origen de producción y variedad de forma independiente sobre la diferenciación de vinos tintos procedentes de cinco añadas, 11 regiones vitivinícolas de Austria y seis variedades de uva, mediante aplicación de AD sobre la composición fenólica. Sus resultados pusieron de manifiesto una gradación del poder discriminante de los tres efectos muy similar a la obtenida en el presente estudio: un efecto muy significativo de la añada, seguido del correspondiente al origen de producción y finalmente del efecto de la variedad, notablemente superior en algunos casos.

Héberger *et al.* (2003) y Martin *et al.* (2012) también analizaron los tres efectos por separado, en este caso sobre la discriminación de vinos blancos y tintos procedentes de diferentes regiones de Hungría y Australia, respectivamente, en base a su contenido en aminoácidos y aminas biógenas o su composición elemental. Ambos indicaron un efecto de la añada considerablemente inferior al observado en el presente estudio.

Por su parte, Soufleros *et al.* (2003) no consiguieron discriminar aceptablemente los vinos blancos de seis regiones vitivinícolas griegas basándose en su contenido en aminoácidos, pese a alcanzar una diferenciación importante de los mismos con respecto a la añada y la variedad de uva utilizada para su elaboración.

En cualquier caso, cabe apuntar que cada región vitivinícola posee su propia tradición, cultura e historia enológicas, que hacen que durante la producción del vino el factor humano pueda jugar un papel muy significativo en la diferenciación del producto final procedente de una u otra región. Se plantea entonces la cuestión de si dicha diferenciación vitivinícola ligada al origen geográfico es provocada por los propios enólogos o si, por el contrario, ellos únicamente amplifican las diferencias pre-existentes en la uva y forjadas por la huella agroclimática durante el desarrollo de la misma.

Es por todo ello que el presente estudio evaluó la influencia conjunta de la uva y el entorno natural del viñedo sobre las indicaciones vitivinícolas de calidad como un concepto global de *terroir* sin considerar el factor humano, constatando como resultado final la diferenciación entre las zonas de producción vitivinícola o *IGPs* y *DOs* históricamente reconocidas en las Islas Baleares, de forma previa a la elaboración del vino. Se ofrece así a sus Consejos Reguladores el aval científico necesario para justificar, frente al Reglamento Europeo (CE) N° 479/2008, la calidad y características propias de sus vinos, y para conservar la protección que dicho reglamento les brinda.

La combinación de las características de la materia prima y del entorno agroclimático de la viña ha permitido discernir entre las diferentes indicaciones vitivinícolas de calidad en estudio, lo que establece una diferenciación de la calidad de la uva ligada al origen, que se trasladará al vino como producto final, posiblemente de una forma amplificada por el factor humano, durante el proceso de elaboración. Del mismo modo, dicha diferenciación será efectiva en los subproductos vitivinícolas que se deriven, justificándose así la importancia de conocer su origen geográfico para su caracterización, dado que en función del entorno agroclimático en el que evolucione y se desarrolle la materia prima, las características de la uva al entrar en bodega y, por tanto, de los subproductos derivados de ésta, pueden cambiar sustancialmente.



## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS RESIDUOS DE VINIFICACIÓN

En este segundo bloque de resultados de la presente tesis doctoral se incluye una caracterización detallada de la composición química general y de la fracción de fibra alimentaria o dietética presente tanto en la uva (*Vitis vinifera*) como en los residuos orujo y raspón, de un total de 10 variedades de la vendimia 2009 (muestras U3, O1 y R1). Concretamente, se trabajó con las variedades tintas *Cabernet Sauvignon*, *Callet*, *Manto Negro*, *Merlot*, *Syrah* y *Tempranillo*; y las blancas *Chardonnay*, *Macabeu*, *Parellada* y *Premsal Blanc*.

Asimismo, este bloque comprende la caracterización de la fracción polifenólica de ambos subproductos de vinificación, a nivel de su contenido y perfil fenólico y su capacidad antioxidante, determinada mediante los métodos ABTS, CUPRAC, FRAP y ORAC.

### 4.2.1. Composición general

La caracterización química general de la uva (*Vitis vinifera*) y de los subproductos de vinificación incluye el análisis del contenido de humedad, fibra dietética, lípidos, azúcares solubles, proteínas y cenizas. Los resultados experimentales obtenidos a partir de dichas determinaciones se incluyen en la **Tabla 4.13**.

El agua fue el componente mayoritario de los tres tipos de muestra en estudio. Las uvas presentaron humedades comprendidas entre el 74 – 83% (bh), mientras que para el orujo y el raspón variaron entre el 50 – 72% (bh) y el 57 – 77% (bh), respectivamente. Tal y como puede observarse, existió una variabilidad importante en función de la variedad considerada.

En el caso de las uvas, el segundo componente principal fue la fracción de azúcares solubles, con una participación del 12 – 16% (bh) según la variedad. Sin embargo, para ambos subproductos, fue la fracción de fibra dietética, constituida por los polisacáridos de la pared celular. En el orujo, la fibra representó entre el 20 – 41% (bh) de la composición química general, mientras que en el raspón dicha fracción osciló entre el 17 – 35% (bh).

El contenido de azúcares solubles del orujo y del raspón, como era de esperar, fue inferior al de la uva, presentando valores comprendidos entre 2.0 y 6.2 g/100 g bh y entre 1.8 y 3.7 g/100 g bh, respectivamente.

**Tabla 4.13.** Composición química general <sup>a</sup> de la uva (*Vitis vinifera*) y de los residuos de vinificación.

		Humedad	Fibra dietética <sup>b</sup>	Lípidos	Azúcares solubles	Proteínas	Cenizas
<b>CS</b>	<i>Uva</i>	74.0 ± 0.3	5.5 ± 0.3	0.8 ± 0.1	15.6 ± 1.5	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	<i>Orujo</i>	61.5 ± 0.7	30.4 ± 1.2	0.6 ± 0.1	2.3 ± 0.4	3.1 ± 0.4	2.1 ± 0.1
	<i>Raspón</i>	65.8 ± 0.1	23.9 ± 1.5	0.9 ± 0.2	3.1 ± 0.1	2.0 ± 0.3	3.7 ± 0.2
<b>Ca</b>	<i>Uva</i>	76.1 ± 0.2	4.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1	15.5 ± 1.5	2.7 ± 0.3	1.0 ± 0.0
	<i>Orujo</i>	55.6 ± 0.5	37.2 ± 1.1	0.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.5
	<i>Raspón</i>	66.3 ± 0.2	25.5 ± 1.3	0.7 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2
<b>MN</b>	<i>Uva</i>	78.3 ± 0.6	3.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1	15.9 ± 1.1	1.8 ± 0.3	0.5 ± 0.0
	<i>Orujo</i>	63.6 ± 1.0	27.6 ± 1.4	0.7 ± 0.1	3.1 ± 0.5	3.2 ± 0.4	2.1 ± 0.3
	<i>Raspón</i>	59.7 ± 0.3	30.0 ± 1.3	0.4 ± 0.0	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.1
<b>Me</b>	<i>Uva</i>	75.9 ± 0.3	4.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	15.3 ± 1.0	2.4 ± 0.1	0.7 ± 0.0
	<i>Orujo</i>	53.9 ± 0.1	37.4 ± 2.2	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.2	3.8 ± 0.3	2.1 ± 0.2
	<i>Raspón</i>	61.5 ± 0.5	28.8 ± 1.2	0.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2
<b>Sy</b>	<i>Uva</i>	77.9 ± 0.4	4.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	14.4 ± 0.6	2.1 ± 0.2	0.8 ± 0.1
	<i>Orujo</i>	50.2 ± 1.0	40.8 ± 1.4	0.7 ± 0.1	2.1 ± 0.0	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1
	<i>Raspón</i>	64.9 ± 1.2	26.3 ± 1.5	0.9 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2
<b>Te</b>	<i>Uva</i>	74.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2	0.8 ± 0.0	15.4 ± 1.2	2.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1
	<i>Orujo</i>	55.7 ± 0.3	36.9 ± 1.2	0.6 ± 0.2	2.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.0
	<i>Raspón</i>	56.8 ± 0.4	34.8 ± 1.2	0.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	4.3 ± 0.1
<b>Ch</b>	<i>Uva</i>	77.3 ± 0.2	3.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1	14.7 ± 1.3	2.7 ± 0.3	0.8 ± 0.1
	<i>Orujo</i>	63.9 ± 0.3	23.5 ± 1.1	1.0 ± 0.2	6.2 ± 0.2	2.7 ± 0.3	1.8 ± 0.0
	<i>Raspón</i>	67.5 ± 0.6	26.0 ± 1.3	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.3
<b>Ma</b>	<i>Uva</i>	79.3 ± 0.2	3.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	14.8 ± 1.0	2.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1
	<i>Orujo</i>	72.2 ± 0.3	19.9 ± 1.2	0.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.2 ± 0.4	1.9 ± 0.0
	<i>Raspón</i>	72.7 ± 0.3	19.5 ± 1.1	0.5 ± 0.0	3.2 ± 0.1	1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1
<b>Pa</b>	<i>Uva</i>	83.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	0.3 ± 0.0	12.2 ± 0.9	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2
	<i>Orujo</i>	62.8 ± 0.5	30.2 ± 1.4	0.7 ± 0.2	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1
	<i>Raspón</i>	76.7 ± 0.4	16.5 ± 0.9	0.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.4	1.5 ± 0.1
<b>PB</b>	<i>Uva</i>	78.8 ± 0.3	3.1 ± 0.3	0.4 ± 0.1	15.3 ± 1.1	2.1 ± 0.2	0.5 ± 0.0
	<i>Orujo</i>	69.3 ± 0.9	21.9 ± 1.2	0.7 ± 0.1	2.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	2.0 ± 0.1
	<i>Raspón</i>	69.7 ± 0.2	21.2 ± 1.4	0.7 ± 0.0	3.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	1.8 ± 0.1

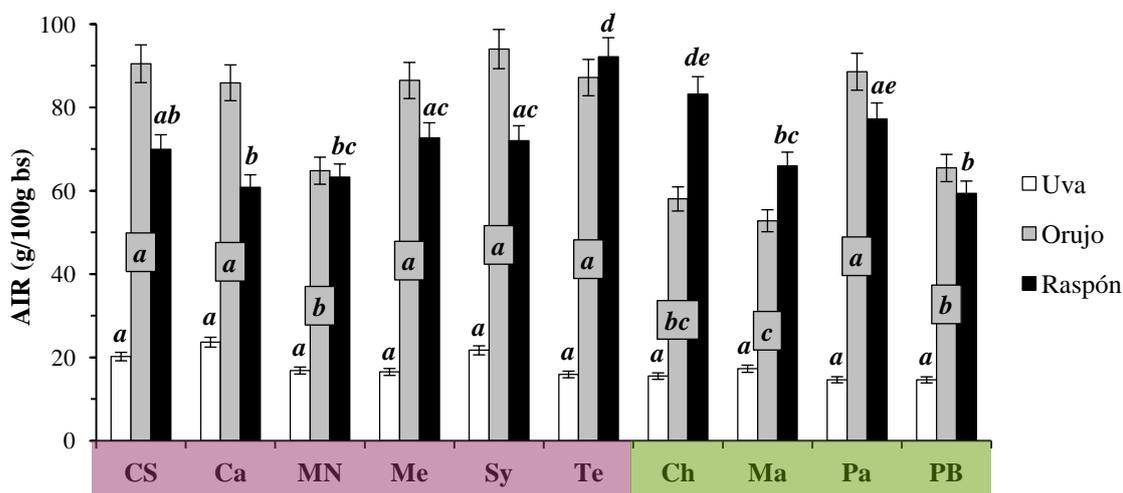
<sup>a</sup> Todos los resultados se expresan en g/100 g bh; <sup>b</sup> Residuo Insoluble en Alcohol (AIR). Variedades: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Prensado Blanc.

Tanto lípidos como proteínas fueron componentes minoritarios para los tres tipos de muestra. El contenido lipídico representó menos del 1% del peso total (bh) en todos los casos, independientemente de la variedad. Por su parte, la fracción proteica osciló entre el 1.8 y el 3.8% (bh) del peso total.

#### 4.2.2. Fracción de fibra dietética

En este apartado se presenta una caracterización detallada de la fracción de fibra dietética de la uva y de los subproductos de vinificación. En primer lugar, se realizó la extracción de fibra de las muestras y a partir de los concentrados obtenidos, se determinaron la composición de los polisacáridos de la pared celular, el grado de metil-esterificación de las pectinas y las propiedades funcionales.

El contenido de fibra dietética o residuo insoluble en alcohol (AIR) de las muestras de uva, orujo y raspón, se presenta en la **Figura 4.9**. Los resultados experimentales correspondientes a la uva presentan un contenido en fibra entre 15.0 y 24.0 g/100 g bs, sin observarse diferencias significativas entre variedades ( $p > 0.05$ ). Por su parte, el contenido de fibra dietética de los subproductos de vinificación fue del orden de 3 a 6 veces mayor que el de la uva. En general, el orujo presentó los valores de AIR más altos, variando entre  $52.8 \pm 2.6$  g/100 g bs y  $94.0 \pm 4.7$  g/100 g bs, para el *Macabeu* y *Syrah*, respectivamente. En general, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades blancas y tintas, exceptuando el alto contenido de fibra dietética del orujo de *Parellada* al compararlo con el valor medio de las variedades blancas, y el bajo contenido del orujo de *Manto Negro* al compararlo con el valor medio de las variedades tintas.



**Figura 4.9.** Contenido de fibra dietética de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Los resultados experimentales del contenido en fibra para el orujo coincidieron con los descritos previamente en la bibliografía (**Tabla 4.14**). No obstante, cabe indicar

que los valores experimentales para los orujos de *Manto Negro* ( $64.8 \pm 3.2$  g/100 g bs) y *Premsal Blanc* ( $65.5 \pm 3.3$  g/100 g bs) fueron ligeramente inferiores a los propuestos por Llobera *et al.* (2007, 2008) para el mismo subproducto y variedad. Por su parte, en el caso del orujo de la variedad *Merlot*, el valor experimental obtenido para el contenido de fibra ( $86.5 \pm 4.3$  g/100 g bs) fue significativamente mayor que el observado por Tseng *et al.* (2012).

**Tabla 4.14.** Contenido de fibra dietética de los subproductos de vinificación. Revisión bibliográfica.

Fibra dietética <sup>a</sup>	FI/FS <sup>b</sup>	Lignina Klason	Tipo de residuo	Variedad	Referencia bibliográfica
59.0	3.5	41.2 ± 1.2	Orujo	Airén	Saura-Calixto <i>et al.</i> (1991)
60.8	1.9	39.7 ± 0.6	Orujo	Garnacha	
62.4	4.6	38.33 ± 0.5	Orujo	Airén	Valiente <i>et al.</i> (1995)
54.2 ± 0.3	6.2	37.6 ± 0.4	Piel	Cencibel	Bravo <i>et al.</i> (1998)
59.0 ± 0.9	3.8	37.9 ± 0.5	Piel	Airén	
56.2 ± 0.5	4.5	38.6 ± 0.3	Pepitas	Airén	Saura-Calixto <i>et al.</i> (1998)
64.6 ± 0.5	---	---	Piel	Vitis vinifera	
77.2 ± 1.4	---	---	Piel	Airén	Goñi <i>et al.</i> (2005)
78.9 ± 2.0	---	---	Pepitas	Airén	
74.5 ± 2.4	3.2	28.7 ± 1.0	Orujo	Manto Negro	Llobera <i>et al.</i> (2007)
74.0 ± 3.5	2.6	---	Orujo	Vitis vinifera	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2007c)
71.6 ± 2.8	3.3	27.8 ± 1.0	Orujo	Premsal Blanc	Llobera <i>et al.</i> (2008)
71.8	2.4	---	Orujo	Vitis vinifera	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008a)
76.4 ± 1.3	2.3	---	Orujo	Airén	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008b)
77.6 ± 3.0	4.0	---	Orujo	Cencibel	Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> (2009)
28.0 ± 1.4	17.0	15.4 ± 0.3	Piel	Muller Thurgan	Deng <i>et al.</i> (2011)
17.3 ± 0.2	10.6	7.9 ± 0.1	Piel	Morio Muscat	
53.2 ± 0.4	26.0	31.6 ± 0.5	Piel	Cabernet Sauvignon	Tseng <i>et al.</i> (2012)
51.1 ± 0.6	14.1	28.4 ± 0.7	Piel	Merlot	
56.3 ± 1.5	10.9	36.1 ± 0.8	Piel	Pinot Noir	Tseng <i>et al.</i> (2012)
57.6 ± 1.6	10.3	39.8 ± 1.1	Orujo	Merlot	
61.3 ± 1.7	13.8	45.5 ± 1.2	Orujo	Pinot Noir	Mildner-Szkudlarz <i>et al.</i> (2013)
50.9 ± 0.5	10.3	---	Piel	Vitis vinifera	
77.2 ± 2.0	11.0	31.6 ± 1.0	Raspón	Manto Negro	Llobera <i>et al.</i> (2007)
79.1 ± 2.5	13.4	22.9 ± 1.1	Raspón	Premsal Blanc	Llobera <i>et al.</i> (2008)

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en g/100 g bs; <sup>b</sup> ratio fibra insoluble/fibra soluble, calculado sin considerar la lignina Klason en la fracción de FI.

En el caso del raspón, los valores de AIR oscilaron entre  $59.4 \pm 3.0$  g/100 g bs y  $92.1 \pm 4.6$  g/100 g bs, para el *Callet* y el *Tempranillo*, respectivamente (**Figura 4.9**). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades de uva en estudio, pero contrariamente al caso del orujo, no se detectaron diferencias al considerar las variedades tintas y blancas por separado ( $p > 0.05$ ).

Son escasas las referencias bibliográficas acerca del contenido total de fibra del raspón (**Tabla 4.14**). De hecho, únicamente se han encontrado los estudios de Llobera *et al.* (2007, 2008) para las variedades *Manto Negro* y *Premsal Blanc*. Cabe indicar que pese a que el contenido de fibra descrito por dichos autores sea superior a los valores experimentales correspondientes al raspón de las mismas variedades, sus resultados concuerdan con el valor medio del contenido de fibra del raspón analizado en el presente estudio ( $71.7 \pm 10.3$  g/100 g bs).

Cabe indicar que los polisacáridos de la pared celular (CWP) y la lignina Klason representaron entre el 95 – 98% del contenido de los AIRs de ambos subproductos de vinificación, independientemente de la variedad considerada. En todos los casos, la presencia de proteínas en el concentrado de fibra fue  $\leq 4\%$ . En general, el contenido de lignina Klason, tanto del orujo (16.8 – 24.2% del AIR) como del raspón (21.3 – 27.2% del AIR) fue ligeramente inferior al descrito previamente en la bibliografía (**Tabla 4.14**).

#### ***4.2.2.1. Composición de los polisacáridos de la pared celular***

En la **Tabla 4.15** se muestra la composición de los diferentes azúcares que conforman los polisacáridos de la pared celular (CWP), tanto de la uva, como de los subproductos orujo y raspón.

Los azúcares más abundantes en los AIRs de la uva y del orujo fueron la glucosa y los ácidos urónicos, seguidos muy de cerca por la xilosa, mientras que la ramnosa y fucosa fueron los azúcares minoritarios. Dicho perfil de monosacáridos, muy similar para las 10 variedades de uva en estudio, así como el ratio azúcares neutros/ácidos urónicos, coincidió con los observados previamente en la bibliografía para orujo, piel y pepitas (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Valiente *et al.*, 1995; Bravo and Saura-Calixto, 1998; Llobera and Cañellas, 2007, 2008; Deng *et al.*, 2011; Tseng and Zhao, 2012; Rondeau *et al.*, 2013).

**Tabla 4.15.** Composición de los polisacáridos de la pared celular de la uva y sus subproductos, orujo y raspón.

	Composición de los carbohidratos <sup>a</sup>									Total <sup>b</sup>	Re sul tad os y Dis cus ión
	Azúcares neutros								Ácidos urónicos		
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (1 M)	Glc			
<i>Uva</i>											
<b>CS</b>	0.4 ± 0.3 a	0.2 ± 0.0 a	7.9 ± 0.5 ab	21.7 ± 2.5 a	6.2 ± 0.5 a	5.2 ± 0.2 a	(3.5 ± 0.2 a)	31.1 ± 1.5 ab	24.0 ± 1.8 ab	4.35 ± 0.73 a	
<b>Ca</b>	0.3 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	8.9 ± 0.8 ab	17.4 ± 2.8 ab	4.2 ± 0.4 b	6.0 ± 0.6 a	(4.1 ± 0.4 a)	37.2 ± 3.2 a	21.9 ± 5.9 a	3.63 ± 0.43 a	
<b>MN</b>	0.3 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	8.0 ± 0.3 ab	11.4 ± 0.4 bc	4.6 ± 0.2 ab	5.7 ± 0.2 a	(3.6 ± 0.1 a)	32.8 ± 1.4 ab	33.4 ± 4.0 abc	2.95 ± 0.21 a	
<b>Me</b>	0.4 ± 0.1 a	0.2 ± 0.0 a	7.8 ± 0.3 ab	18.2 ± 2.0 ab	4.8 ± 0.2 ab	4.8 ± 0.7 a	(3.9 ± 0.2 a)	35.0 ± 2.4 ab	25.0 ± 8.4 ab	3.88 ± 0.43 a	
<b>Sy</b>	0.4 ± 0.2 a	0.2 ± 0.0 a	10.0 ± 1.2 a	9.5 ± 4.0 cd	4.7 ± 0.6 ab	5.3 ± 0.6 a	(3.7 ± 0.4 a)	33.1 ± 3.7 ab	33.1 ± 8.8 abc	4.52 ± 0.21 a	
<b>Te</b>	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	8.8 ± 0.4 ab	6.6 ± 0.2 d	5.0 ± 0.2 ab	5.6 ± 0.4 a	(3.7 ± 0.1 a)	33.5 ± 1.3 ab	36.6 ± 2.3 abc	3.85 ± 0.41 a	
<b>Ch</b>	0.4 ± 0.0 a	0.2 ± 0.0 a	7.8 ± 0.5 ab	13.3 ± 2.9 bd	3.9 ± 0.3 b	5.1 ± 0.4 a	(3.4 ± 0.2 a)	30.7 ± 1.6 ab	35.4 ± 1.7 abc	2.98 ± 0.31 a	
<b>Ma</b>	0.4 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	6.5 ± 0.6 b	18.1 ± 2.0 ab	3.6 ± 0.4 b	4.3 ± 0.4 a	(2.9 ± 0.3 a)	26.2 ± 2.5 b	37.8 ± 9.2 bc	2.79 ± 0.28 a	
<b>Pa</b>	0.4 ± 0.1 a	0.2 ± 0.0 a	9.8 ± 1.1 a	13.4 ± 6.7 bd	4.3 ± 0.4 ab	5.8 ± 0.9 a	(3.9 ± 0.2 a)	35.3 ± 1.5 ab	26.8 ± 1.0 abc	1.75 ± 0.19 a	
<b>PB</b>	0.4 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	7.2 ± 0.2 b	7.4 ± 2.1 d	3.8 ± 0.1 b	5.4 ± 0.0 a	(3.5 ± 0.1 a)	31.3 ± 0.6 ab	40.9 ± 2.4 c	2.58 ± 0.31 a	
<i>Orujo</i>											
<b>CS</b>	0.2 ± 0.1 a	0.4 ± 0.3 ab	5.1 ± 0.3 a	11.6 ± 2.1 ac	7.4 ± 0.3 a	3.6 ± 0.6 a	(4.3 ± 0.2 a)	38.4 ± 1.7 a	29.0 ± 2.5 ab	24.45 ± 1.73 a	
<b>Ca</b>	0.2 ± 0.0 a	1.1 ± 1.1 b	4.9 ± 0.4 a	21.2 ± 5.6 b	6.2 ± 0.2 ab	3.3 ± 0.1 a	(3.8 ± 0.1 a)	34.5 ± 0.5 ab	24.9 ± 6.4 a	29.61 ± 2.13 bc	
<b>MN</b>	0.3 ± 0.0 a	0.3 ± 0.2 a	6.9 ± 0.3 a	8.5 ± 1.9 a	5.6 ± 0.8 ab	4.9 ± 0.4 a	(3.8 ± 0.5 a)	34.6 ± 4.9 ab	34.9 ± 8.7 ab	22.95 ± 1.25 a	
<b>Me</b>	0.1 ± 0.0 a	0.3 ± 0.0 a	5.5 ± 0.0 a	24.2 ± 2.6 b	7.4 ± 0.9 a	3.3 ± 0.1 a	(3.5 ± 0.1 a)	31.2 ± 1.5 ab	24.5 ± 2.9 a	28.35 ± 0.85 b	
<b>Sy</b>	0.2 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	4.8 ± 0.3 a	22.4 ± 2.8 b	6.0 ± 0.6 ab	3.5 ± 0.3 a	(3.8 ± 0.2 a)	33.9 ± 1.9 ab	25.4 ± 2.6 a	29.46 ± 1.22 bc	
<b>Te</b>	0.2 ± 0.1 a	0.3 ± 0.2 a	4.8 ± 3.2 a	16.8 ± 3.0 bc	4.6 ± 2.6 b	3.5 ± 2.2 a	(3.6 ± 2.1 a)	32.7 ± 6.3 ab	33.4 ± 4.9 ab	32.45 ± 1.35 c	
<b>Ch</b>	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	6.4 ± 0.5 a	11.1 ± 1.9 ac	4.8 ± 0.2 b	3.9 ± 0.2 a	(3.0 ± 0.3 a)	26.9 ± 2.8 b	43.6 ± 6.2 b	18.63 ± 1.06 d	
<b>Ma</b>	0.1 ± 0.0 a	0.1 ± 0.0 a	6.0 ± 0.5 a	8.4 ± 1.1 a	5.6 ± 0.1 ab	4.0 ± 0.4 a	(3.6 ± 0.4 a)	32.3 ± 3.9 ab	39.9 ± 8.1 ab	15.62 ± 0.89 d	
<b>Pa</b>	0.2 ± 0.1 a	0.2 ± 0.1 a	6.9 ± 0.7 a	17.0 ± 0.4 bc	5.7 ± 0.9 ab	4.0 ± 0.6 a	(3.9 ± 0.5 a)	34.8 ± 4.9 ab	27.4 ± 6.8 a	23.73 ± 1.30 a	
<b>PB</b>	0.1 ± 0.1 a	0.1 ± 0.1 a	6.2 ± 0.2 a	11.5 ± 0.5 ac	4.7 ± 0.2 b	3.9 ± 0.1 a	(3.6 ± 0.2 a)	32.1 ± 2.1 ab	37.8 ± 2.2 ab	17.37 ± 0.94 d	

---

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en % molar; <sup>b</sup> los resultados se expresan en g/100 g bh. Azúcares neutros: Rha, ramnosa; Fuc, fucosa; Ara, arabinosa; Xyl, xilosa; Man, manosa; Gal, galactosa; Glc, glucosa. Variedades de uva: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Premsal Blanc Para cada tipo de muestra, dentro de cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

**Tabla 4.15.** (continuación) Composición de los polisacáridos de la pared celular de la uva y sus subproductos, orujo y raspón.

	Composición de los carbohidratos <sup>a</sup>									Total <sup>b</sup>
	Azúcares neutros							Ácidos urónicos		
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (1 M)		Glc	
<i>Raspón</i>										
<b>CS</b>	0.8 ± 0.2 <i>ab</i>	0.4 ± 0.1 <i>a</i>	4.0 ± 0.3 <i>a</i>	15.7 ± 0.5 <i>a</i>	1.6 ± 0.1 <i>a</i>	3.9 ± 0.3 <i>a</i>	(4.8 ± 0.2 <i>a</i> )	43.6 ± 1.9 <i>a</i>	25.3 ± 2.2 <i>a</i>	17.93 ± 1.14 <i>a</i>
<b>Ca</b>	0.8 ± 0.0 <i>ab</i>	0.5 ± 0.0 <i>a</i>	3.8 ± 0.2 <i>a</i>	11.2 ± 0.9 <i>a</i>	2.9 ± 0.1 <i>ab</i>	3.9 ± 0.2 <i>a</i>	(4.4 ± 0.2 <i>a</i> )	40.0 ± 1.9 <i>a</i>	32.4 ± 3.8 <i>a</i>	19.48 ± 1.37 <i>ac</i>
<b>MN</b>	1.1 ± 0.1 <i>ab</i>	0.5 ± 0.1 <i>a</i>	4.1 ± 0.2 <i>a</i>	12.8 ± 0.3 <i>a</i>	1.8 ± 0.1 <i>a</i>	4.7 ± 0.2 <i>a</i>	(4.8 ± 0.2 <i>a</i> )	43.3 ± 1.5 <i>a</i>	26.9 ± 2.0 <i>a</i>	23.46 ± 1.03 <i>bc</i>
<b>Me</b>	0.6 ± 0.0 <i>a</i>	0.2 ± 0.0 <i>a</i>	4.2 ± 0.3 <i>a</i>	12.6 ± 0.4 <i>a</i>	4.6 ± 0.4 <i>b</i>	3.7 ± 0.1 <i>a</i>	(6.5 ± 0.6 <i>b</i> )	43.7 ± 1.1 <i>a</i>	24.0 ± 2.7 <i>a</i>	22.67 ± 0.98 <i>cd</i>
<b>Sy</b>	0.9 ± 0.2 <i>ab</i>	0.5 ± 0.0 <i>a</i>	4.0 ± 0.1 <i>a</i>	16.5 ± 1.1 <i>a</i>	1.9 ± 0.3 <i>a</i>	3.8 ± 0.2 <i>a</i>	(5.3 ± 0.1 <i>ab</i> )	47.8 ± 1.2 <i>a</i>	19.2 ± 2.9 <i>a</i>	25.42 ± 1.16 <i>bd</i>
<b>Te</b>	1.2 ± 0.2 <i>b</i>	0.7 ± 0.1 <i>a</i>	4.4 ± 0.3 <i>a</i>	15.1 ± 1.8 <i>a</i>	2.6 ± 0.1 <i>ab</i>	4.7 ± 0.1 <i>a</i>	(4.8 ± 0.5 <i>a</i> )	43.4 ± 4.9 <i>a</i>	23.1 ± 4.2 <i>a</i>	19.32 ± 1.21 <i>a</i>
<b>Ch</b>	1.0 ± 0.5 <i>ab</i>	0.3 ± 0.2 <i>a</i>	4.5 ± 0.5 <i>a</i>	13.1 ± 2.7 <i>a</i>	2.4 ± 0.2 <i>a</i>	4.8 ± 0.8 <i>a</i>	(4.9 ± 0.8 <i>a</i> )	44.3 ± 7.4 <i>a</i>	24.7 ± 3.2 <i>a</i>	18.92 ± 1.12 <i>a</i>
<b>Ma</b>	1.0 ± 0.1 <i>ab</i>	0.5 ± 0.0 <i>a</i>	3.6 ± 0.2 <i>a</i>	17.9 ± 1.6 <i>a</i>	2.1 ± 0.1 <i>a</i>	3.6 ± 0.2 <i>a</i>	(5.2 ± 0.3 <i>ab</i> )	46.4 ± 2.6 <i>a</i>	19.6 ± 1.1 <i>a</i>	14.62 ± 1.14 <i>ef</i>
<b>Pa</b>	0.9 ± 0.2 <i>ab</i>	0.5 ± 0.2 <i>a</i>	4.1 ± 0.5 <i>a</i>	15.5 ± 1.9 <i>a</i>	3.1 ± 0.7 <i>ab</i>	3.7 ± 0.4 <i>a</i>	(5.4 ± 0.1 <i>ab</i> )	48.8 ± 0.9 <i>a</i>	18.1 ± 1.8 <i>a</i>	12.84 ± 1.21 <i>e</i>
<b>PB</b>	0.8 ± 0.5 <i>ab</i>	0.5 ± 0.4 <i>a</i>	5.1 ± 0.5 <i>a</i>	10.2 ± 0.8 <i>a</i>	3.0 ± 0.3 <i>ab</i>	5.2 ± 0.6 <i>a</i>	(4.6 ± 0.3 <i>a</i> )	41.0 ± 2.8 <i>a</i>	29.7 ± 4.6 <i>a</i>	16.39 ± 0.39 <i>af</i>

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en % molar; <sup>b</sup> los resultados se expresan en g/100 g bh. Azúcares neutros: Rha, ramnosa; Fuc, fucosa; Ara, arabinosa; Xyl, xilosa; Man, manosa; Gal, galactosa; Glc, glucosa. Variedades de uva: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Prensal Blanc. Para cada tipo de muestra, dentro de cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

En el caso del raspón, la glucosa fue el monosacárido mayoritario, seguida por los ácidos urónicos y la xilosa, con concentraciones en torno a 1.3 – 2.7 y 2.6 – 4.0 veces menores, respectivamente. Por su parte, la arabinosa, manosa y galactosa presentaron valores inferiores a los determinados para las uvas y orujos correspondientes.

En la **Figura 4.10** se representa la proporción aproximada de celulosa, hemicelulosas y pectinas de la pared celular para el orujo y raspón, calculada a partir de la composición porcentual en azúcares simples de la **Tabla 4.15**, según las ecuaciones [3.4], [3.5] y [3.6], respectivamente. La composición en polisacáridos de la uva no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con la observada para el orujo, probablemente debido a que dicho subproducto tiene su origen en el prensado de la uva.

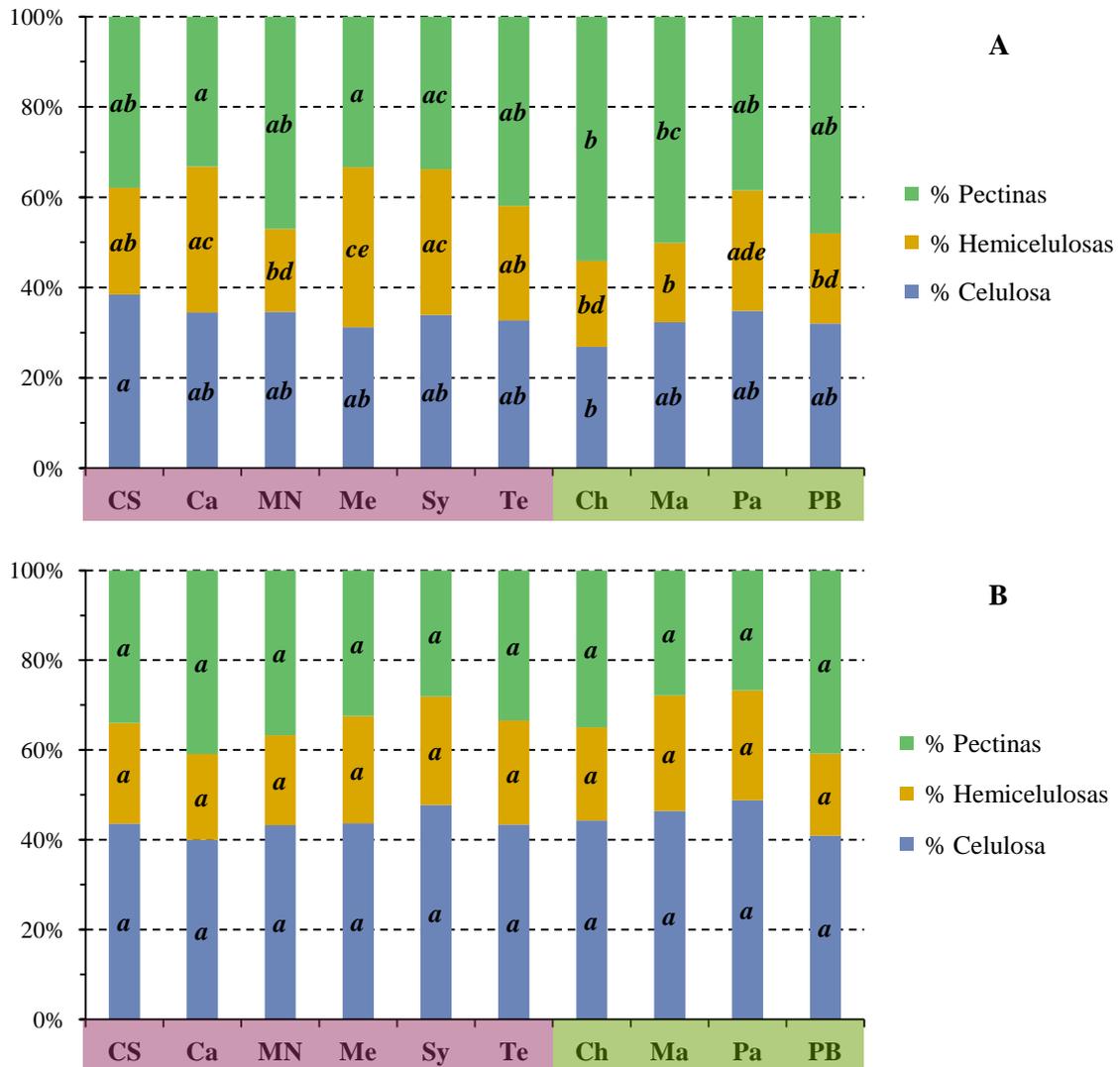
En general, las pectinas fueron el componente mayoritario en el concentrado de fibra del orujo, representando del 33 al 54% CWP. Ello se deduce del elevado contenido en ácidos urónicos que presenta este subproducto, así como de la concentración intermedia de galactosa y arabinosa, y de la presencia, en menor medida, de ramnosa. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre algunas de las variedades en estudio con respecto al contenido de pectinas.

La celulosa, con porcentajes comprendidos entre el 27 y el 38%, constituyó el segundo polisacárido más abundante en el concentrado de fibra del orujo, pudiendo cuantificarse a partir de la glucosa liberada tras someter las muestras a la hidrólisis Saeman (Femenia *et al.*, 2009). Sólo se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de celulosa entre el orujo de las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Chardonnay*.

A diferencia del orujo, la celulosa fue el polisacárido más abundante identificado en el raspón, representando el 40 – 49% CWP, mientras que las pectinas ocuparon la segunda posición, con una participación del 27 – 41% CWP. Cabe indicar que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre variedades con respecto a la composición de la pared celular del concentrado de fibra del raspón.

Por último, la presencia de xilosa, manosa, fucosa y glucosa no celulósica (Glc 1 M) en ambos subproductos, fue indicativo de la existencia de polisacáridos hemicelulósicos en sus paredes celulares. En general, no se observaron diferencias

significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto al contenido de hemicelulosas en el orujo y raspón de una misma variedad, a excepción de los casos del *Callet* y *Merlot*.



**Figura 4.10.** Composición en celulosa, hemicelulosas y pectinas de la fracción de fibra del orujo (A) y raspón (B). Para cada tipo de muestra y polisacárido de la pared celular, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Para beneficiarse de los efectos fisiológicos asociados a las fracciones insoluble (FI) y soluble (FS) de la fibra alimentaria, se establece un ratio de variación entre ambas (FI/FS) que debe estar comprendido entre 1.0 y 2.3 (Spiller, 1986). Si, de forma aproximada, se considera que la fracción insoluble del concentrado de fibra está básicamente constituida por la celulosa y hemicelulosas de la pared celular, y la fracción soluble, únicamente por las pectinas, los ratios FI/FS calculados para la uva y los subproductos de las 10 variedades en estudio se indican en la **Tabla 4.16**.

**Tabla 4.16.** Ratios de fibra insoluble/fibra soluble (FI/FS) para la uva y sus subproductos, orujo y raspón.

	FI/FS		
	<i>Uva</i>	<i>Orujo</i>	<i>Raspón</i>
<b>CS</b>	1.7	1.6	1.9
<b>Ca</b>	1.7	2.0	1.4
<b>MN</b>	1.1	1.1	1.7
<b>Me</b>	1.6	2.0	2.1
<b>Sy</b>	1.0	2.0	<b>2.6</b>
<b>Te</b>	1.0	1.4	2.0
<b>Ch</b>	1.1	<b>0.9</b>	1.9
<b>Ma</b>	1.0	1.0	<b>2.6</b>
<b>Pa</b>	1.3	1.6	<b>2.7</b>
<b>PB</b>	1.0	1.1	1.4

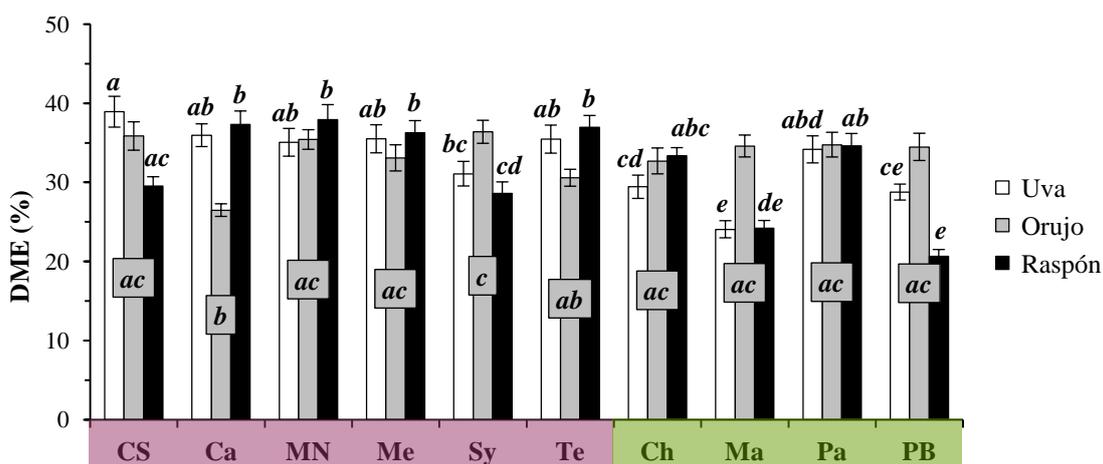
Tal y como se observa en dicha tabla, la mayor parte de las muestras de uva, orujo y raspón presentaron ratios FI/FS dentro del rango establecido por Spiller (1986). Únicamente los concentrados de fibra del orujo de la variedad *Chardonnay* y del raspón de las variedades *Syrah*, *Macabeu* y *Parellada* presentaron valores ligeramente fuera del mismo. Así pues, en términos generales, ambos subproductos de vinificación de las 10 variedades en estudio pueden considerarse fuentes equilibradas de fibra.

Saura-Calixto *et al.* (1991) y Sánchez-Alonso *et al.* (2007c; 2008a; 2008b) indicaron relaciones entre las fracciones de fibra insoluble y soluble para el orujo muy similares a las descritas experimentalmente. No obstante, la mayor parte de referencias bibliográficas sobre el ratio FI/FS de concentrados de fibra procedentes de subproductos de vinificación muestran valores notablemente superiores (**Tabla 4.14**). Concretamente, Llobera *et al.* (2007, 2008) presentaron ratios FI/FS para el orujo y raspón de las variedades *Manto Negro* y *Premsal Blanc*, en torno a 3 y 10 veces superiores, respectivamente, que los indicados en el presente estudio para el mismo subproducto y variedad. Los diferentes enfoques para calcular dicha relación y los diferentes métodos utilizados en la determinación de la fibra podrían ser las razones principales de tales discrepancias. De hecho, analizando la metodología experimental de dicha bibliografía, se observó el uso de métodos enzimáticos para determinar el contenido de fibra, lo que podría inducir una mayor degradación de las pectinas y, por tanto, de la fracción de fibra soluble de las muestras, justificando así el incremento del ratio FI/FS.

#### 4.2.2.2. Grado de metil-esterificación de las pectinas

La funcionalidad de las pectinas como agentes gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria está íntimamente relacionada con su estructura química. En función del grado de metil-esterificación (DME), las pectinas pueden clasificarse como pectinas de alto grado de metil-esterificación (DME > 50%) o de bajo grado de metil-esterificación (DME < 50%) (Guillotin *et al.*, 2007). Dicha clasificación resulta de gran interés a la hora de considerar los concentrados de fibra en estudio como ingredientes funcionales, ya que según el DME de las pectinas, las propiedades estructurales del alimento al cual se adicionen pueden verse totalmente modificadas.

Los resultados experimentales correspondientes al DME de las pectinas de la pared celular se presentan en la **Figura 4.11**. Los valores del DME mostraron intervalos similares para los tres tipos de muestra en estudio: 24 – 39% para la uva, 26 – 36% para el orujo y 21 – 38% para el raspón.



**Figura 4.11.** Grado de metil-esterificación de las pectinas (DME) de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

La totalidad de las muestras presentó valores de DME inferiores al 40 %, de modo que tanto la uva, como el orujo y raspón de las 10 variedades en estudio pueden considerarse fuentes de pectinas de bajo grado de metil-esterificación.

#### 4.2.2.3. Propiedades funcionales

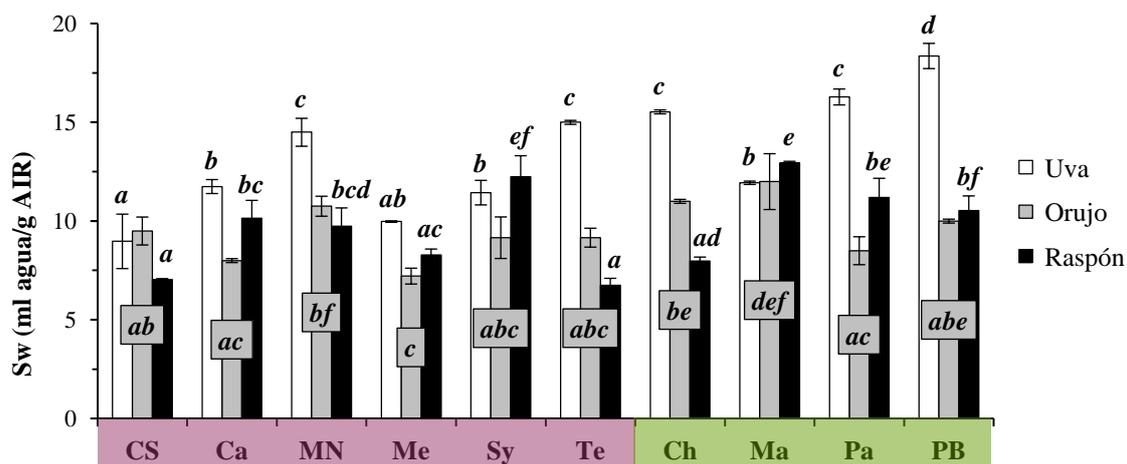
Ante la posible incorporación de los concentrados de fibra de origen vitivinícola a productos alimentarios, resulta de gran importancia tecnológica y fisiológica estudiar sus propiedades funcionales. Se trata de propiedades físico-químicas de los

polisacáridos de la pared celular tales como su capacidad de hinchamiento (Sw) y/o de retener agua (WRC) o aceite (FAC) de la matriz del alimento al que se adicione.

Los resultados correspondientes a las propiedades funcionales de la fracción de fibra dietética de la uva, orujo y raspón se recogen en la **Figura 4.12**, **Figura 4.13** y **Figura 4.14**.

#### Hinchamiento

El valor medio del hinchamiento observado en los concentrados de fibra fue de  $13.4 \pm 1.9$  mL agua/g AIR para la uva,  $9.5 \pm 2.2$  mL agua/g AIR para el orujo y  $9.7 \pm 2.1$  mL agua/g AIR para el raspón (**Figura 4.12**). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades para el mismo subproducto y entre subproductos para la misma variedad, pero no se detectaron ( $p > 0.05$ ) al considerar las variedades tintas y blancas por separado.



**Figura 4.12.** Propiedades funcionales de la fibra. Hinchamiento (Sw) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

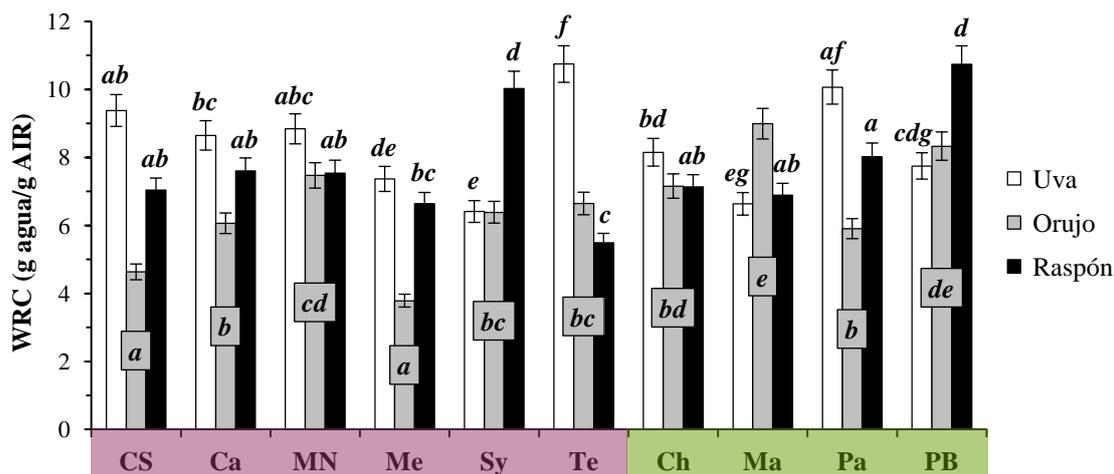
Tal y como se aprecia en la **Figura 4.12**, los concentrados de fibra de la uva presentaron los valores más altos de hinchamiento, destacando significativamente la variedad *Premsal Blanc* ( $18.4 \pm 0.6$  mL agua/g AIR).

En general, los resultados experimentales de hinchamiento para los tres tipos de muestra fueron mayores que los observados por Sánchez-Alonso *et al.* (2008a) para el orujo de una variedad de uva tinta ( $3.9 \pm 0.0$  mL agua/g concentrado de fibra). No obstante, son del orden de los valores descritos para concentrados de fibra obtenidos a partir de diferentes subproductos agrícolas, tales como la pulpa de manzana (Robertson

*et al.*, 2000; Figuerola *et al.*, 2005), la pulpa y piel de cítricos (Robertson *et al.*, 2000; Figuerola *et al.*, 2005; Ubando-Rivera *et al.*, 2005), los tallos de coliflor (Femenia *et al.*, 1997), los corazones de alcachofa (López *et al.*, 1996) y/o las vainas de guisantes (Robertson *et al.*, 2000) (Tabla 4.17).

#### Capacidad de retención de agua

Los valores de la capacidad de retención de agua obtenidos para los concentrados de fibra de la uva, orujo y raspón de las 10 variedades de uva en estudio oscilaron entre 6.4 y 10.7 g agua/g AIR, entre 3.8 y 9.0 g agua/g AIR, y entre 5.5 y 10.7 g agua/g AIR, respectivamente (Figura 4.13). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de WRC para los concentrados de fibra procedentes de la uva y orujo de la misma variedad, a excepción del *Chardonnay*, *Syrah* y *Premsal Blanc*, pero no se detectaron ( $p > 0.05$ ) al considerar de forma independiente las variedades tintas y blancas para ninguno de los tres tipos de muestra.



**Figura 4.13.** Propiedades funcionales de la fibra. Capacidad de retención de agua (WRC) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Cabe destacar la elevada capacidad de retención de agua de los concentrados de fibra obtenidos a partir de la uva de las variedades *Tempranillo* ( $10.7 \pm 0.4$  g agua/g AIR) y *Parellada* ( $10.1 \pm 0.5$  g agua/AIR), y del raspón de las variedades *Syrah* ( $10.0 \pm 0.2$  g agua/g AIR) y *Premsal Blanc* ( $10.7 \pm 0.2$  g agua/g AIR).

Al comparar con la bibliografía, los resultados experimentales de WRC para el orujo fueron significativamente mayores que los descritos por Sánchez-Alonso *et al.* (2008a) para el mismo subproducto de una variedad de uva tinta

( $1.8 \pm 0.0$  g agua/g concentrado de fibra). No obstante, los valores de WRC del presente estudio se encuentran dentro del amplio intervalo de datos bibliográficos para concentrados de fibra obtenidos a partir de diferentes subproductos agrícolas (**Tabla 4.17**).

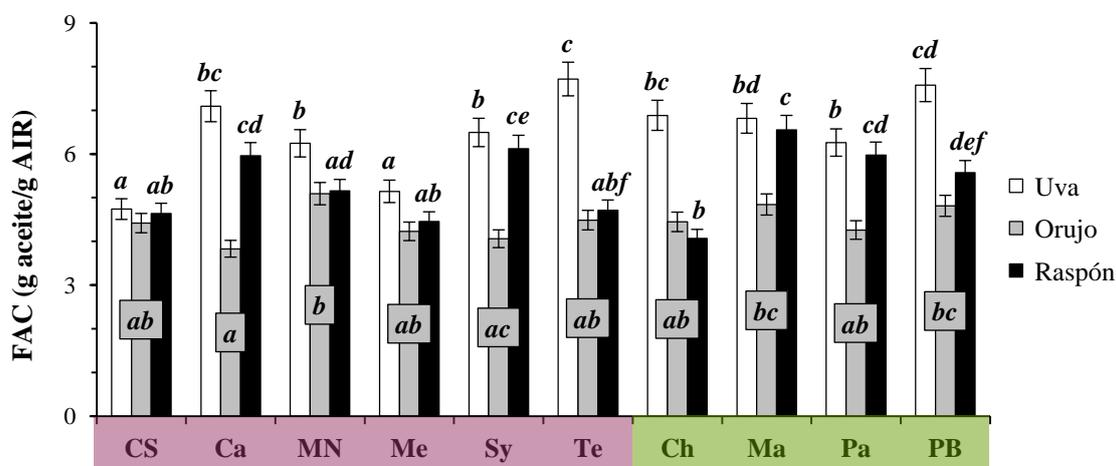
**Tabla 4.17.** Propiedades funcionales de la fibra procedente de diferentes subproductos agrícolas. Revisión bibliográfica.

Sw <sup>a</sup>	WRC <sup>b</sup>	FAC <sup>c</sup>	Fuente de fibra	Referencia bibliográfica
5.2 ± 0.1	7.4 ± 2.2	---	Vaina guisantes	Weightman <i>et al.</i> (1995)
11.0 ± 0.7	5.2 ± 0.2	---	Corazón alcachofa	López <i>et al.</i> (1996)
8.7 – 17.5	9.1 – 13.4	1.2 – 2.1	Tallo coliflor	Femenia <i>et al.</i> (1997)
4.2 – 16.9	5.7 – 12.8	0.9 – 1.3	Flor coliflor	
---	7.3 – 10.3	0.9 – 1.3	Pulpa naranja	Grigelmo <i>et al.</i> (1999a)
---	6.3	---	Pulpa manzana	Grigelmo <i>et al.</i> (1999b)
---	6.8	---	Pulpa pera	
---	12.4	---	Pulpa naranja	
---	12.6	---	Pulpa melocotón	
---	13.2	---	Hojas alcachofa	
---	11.2	---	Espárragos	
---	9.2 – 12.1	1.0 – 1.1	Pulpa melocotón	
6.6 – 7.5	3.9 ± 0.5	---	Vaina guisantes	Robertson <i>et al.</i> (2000)
10.4 ± 1.2	10.7 ± 2.3	---	Pulpa cítricos	
7.4 ± 1.2	5.4 ± 1.2	---	Pulpa manzana	
---	4.9	3.3	Caña de azúcar	Sangnark <i>et al.</i> (2003)
6.6 – 8.3	1.6 – 1.9	0.6 – 1.5	Pulpa manzana	Figueroa <i>et al.</i> (2005)
9.2 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.0	Piel naranja	
7.3 – 9.2	1.7 – 1.9	1.3 – 1.5	Piel limón	
6.7 – 8.0	2.1 – 2.3	1.2 – 1.5	Piel pomelo	
11.3 – 13.6	7.0 – 12.8	---	Piel lima	Ubando-Rivera <i>et al.</i> (2005)
20.0	5.3	4.8	Pulpa coco	Raghavendra <i>et al.</i> (2006)
18.0 ± 0.0	12.5 ± 0.1	1.9 ± 0.0	Pulpa zanahoria	Chau <i>et al.</i> (2007)
~ 22.0	10.6 – 14.0	2.0 – 3.7	Pulpa naranja	Garau <i>et al.</i> (2007)
25.0 – 30.0	10.5 – 16.1	3.0 – 6.5	Piel naranja	
3.9 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.0	Orujo uva	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008a)
---	11.4 – 20.3	5.3 – 8.5 <sup>d</sup>	Espárragos	Fuentes-Alventosa <i>et al.</i> (2009)

Sw, hinchamiento; WRC, capacidad de retención de agua; FAC, capacidad de retención de lípidos. Los resultados se expresan en: <sup>a</sup> mL/g fibra; <sup>b</sup> g agua/g fibra; <sup>c</sup> g aceite/g fibra; <sup>d</sup> mL aceite/g fibra.

### Capacidad de retención de lípidos

Los resultados experimentales de la capacidad de retención de lípidos de los concentrados de fibra en estudio variaron entre 4.7 y 7.7 g aceite/g AIR para la uva, entre 3.8 y 5.1 g aceite/g AIR para el orujo, y entre 4.1 y 6.6 g aceite/g AIR para el raspón (Figura 4.14). A excepción de la variedad *Cabernet Sauvignon*, los orujos presentaron valores de FAC significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que los descritos para sus correspondientes uvas. No obstante, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la capacidad de retención de lípidos de las variedades tintas y blancas para ninguno de los tres tipos de muestra.



**Figura 4.14.** Propiedades funcionales de la fibra. Capacidad de retención de lípidos (FAC) del concentrado de fibra de la uva y sus subproductos, orujo y raspón. Para cada tipo de muestra, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

En el caso del orujo, los valores de FAC fueron entre 2.7 – 3.6 veces mayores, según la variedad, que los publicados por Sánchez-Alonso *et al.* (2008a) para el mismo subproducto. En general, al comparar con los datos bibliográficos de FAC para concentrados de fibra derivados de otros subproductos agrícolas, los resultados del presente estudio fueron significativamente mayores (Tabla 4.17). No obstante, cabe apuntar que coincidieron con los propuestos para los concentrados de fibra obtenidos a partir de piel de naranja (Garau *et al.*, 2007), espárragos (Fuentes-Alventosa *et al.*, 2009), pulpa de coco (Raghavendra *et al.*, 2006) y caña de azúcar (Sangnark and Noomhorm, 2003).

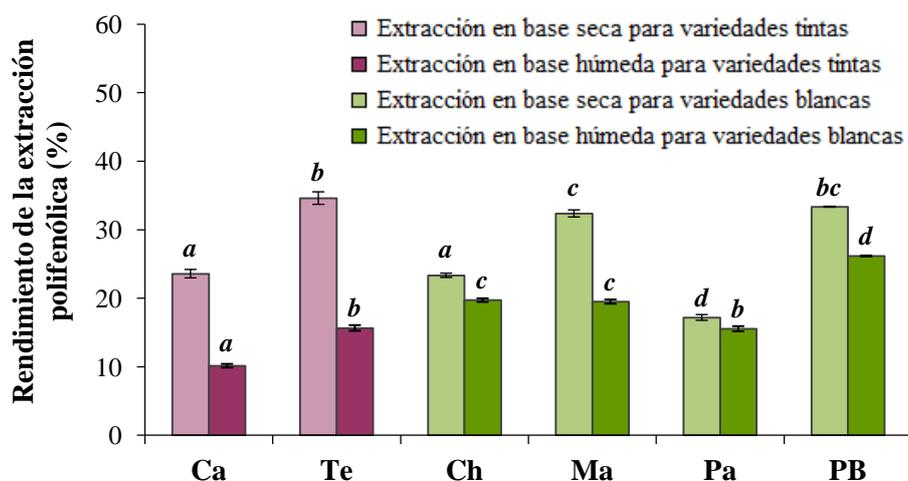
En general, los concentrados de fibra procedentes de ambos subproductos de vinificación presentaron propiedades funcionales adecuadas para su uso como ingredientes funcionales en la industria alimentaria, denotando una variabilidad importante en función de la variedad de uva considerada.

### 4.2.3. Fracción polifenólica

En este apartado se presenta una caracterización detallada de la fracción fenólica de ambos residuos de vinificación, considerándose las muestras utilizadas en la caracterización de la fibra dietética (O1 y R1). En el caso del orujo se evaluaron seis de las 10 variedades de uva que conforman la muestra, concretamente, *Callet*, *Tempranillo*, *Chardonnay*, *Macabeu*, *Parellada* y *Prensal Blanc*.

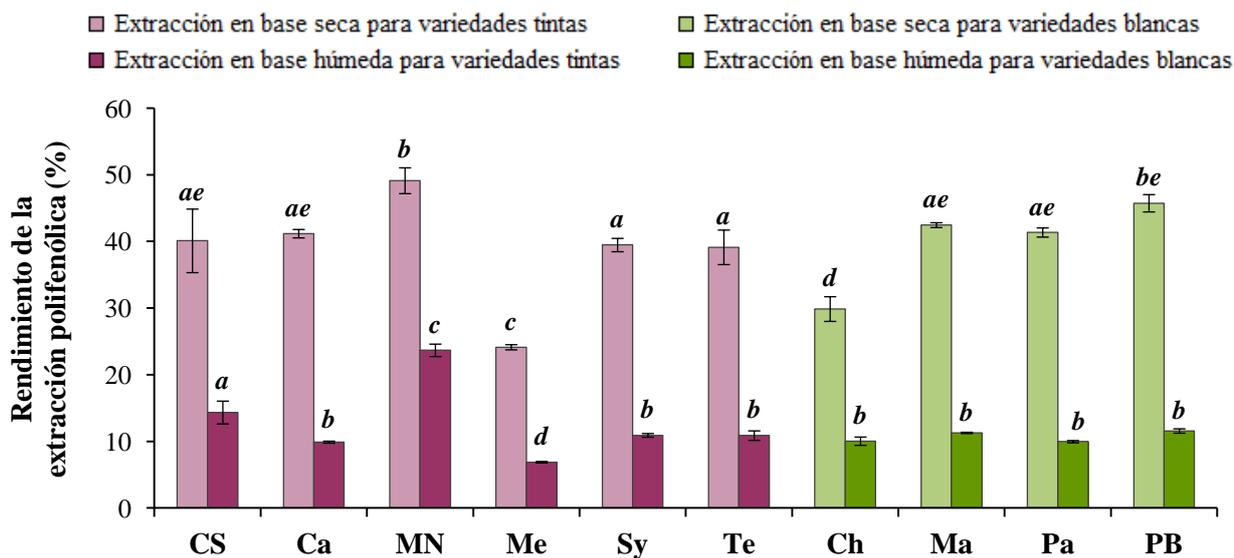
En primer lugar, se realizó una extracción de la fracción polifenólica de las muestras y a partir de los extractos obtenidos, se llevaron a cabo las determinaciones del contenido de fenólicos y taninos totales, la identificación y cuantificación de los taninos monoméricos y oligoméricos, el análisis del grado medio de polimerización de los taninos condensados, y la evaluación de la capacidad antioxidante.

En general, resulta difícil comparar los datos bibliográficos sobre la fracción fenólica de los subproductos de vinificación. En gran parte, ello es debido a la utilización de diferentes unidades de referencia en la literatura, tales como base seca (bs) o base húmeda (bh), y base de extracto fenólico o de muestra en su totalidad. Así pues, con el objeto de mejorar las comparaciones con futuros estudios, en la **Figura 4.15** y **Figura 4.16** se incluyen los correspondientes factores de equivalencia para los rendimientos de extracción de las fracciones fenólicas del orujo y raspón, en unidades de gramos de extracto por 100 g de muestra en base seca y en base húmeda. Para ambos residuos de vinificación se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades en estudio.



**Figura 4.15.** Rendimientos de la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes del orujo. Para cada base de referencia (base seca y base húmeda), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

De acuerdo con Amico *et al.* (2004), cabe indicar que dichos rendimientos de extracción no están totalmente vinculados al contenido polifenólico y/o capacidad antioxidante de las muestras, debido a la posible presencia de compuestos no fenólicos y/o polifenoles inactivos que pueden influir directamente en los valores esperados.



**Figura 4.16.** Rendimientos de la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes del raspón. Para cada base de referencia (base seca y base húmeda), las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

#### 4.2.3.1. Fenólicos totales

Los resultados experimentales del contenido de fenólicos totales de ambos residuos de vinificación se presentan en la **Tabla 4.18**.

En lo que respecta al orujo, el contenido de fenólicos totales de las seis variedades en estudio estuvo comprendido entre  $3093 \pm 266$  mg GA/100 g bs y  $7762 \pm 672$  mg GA/100 g bs para el *Macabeu* y *Tempranillo*, respectivamente (**Tabla 4.18**). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades tintas y las blancas, siendo el orujo de las primeras, tal y como se esperaba, el que presentó los valores de fenólicos totales más altos. De entre las variedades blancas, el orujo de la *Parellada* destacó significativamente por su mayor contenido de fenólicos totales ( $4654 \pm 255$  mg GA/100 g bs). Todas las muestras de orujo procedían de viñedos próximos entre sí pertenecientes a la misma bodega y el proceso de prensado de la uva para su obtención fue el mismo en todos los casos (sin maceración en el caso de las variedades tintas), por lo que las diferencias significativas observadas en el contenido de

fenólicos totales se debieron exclusivamente a las características propias de cada variedad de uva considerada.

**Tabla 4.18.** Fenólicos totales del orujo y raspón.

	Fenólicos totales <sup>a</sup>	
	Orujo	Raspón
<b>CS</b>	---	7076 ± 327 <i>a</i>
<b>Ca</b>	6395 ± 420 <i>a</i>	11525 ± 886 <i>b</i>
<b>MN</b>	---	8470 ± 291 <i>c</i>
<b>Me</b>	---	4704 ± 288 <i>d</i>
<b>Sy</b>	---	9642 ± 804 <i>e</i>
<b>Te</b>	7762 ± 672 <i>b</i>	7622 ± 763 <i>af</i>
<b>Ch</b>	3891 ± 383 <i>c</i>	4764 ± 398 <i>d</i>
<b>Ma</b>	3093 ± 266 <i>d</i>	7809 ± 718 <i>f</i>
<b>Pa</b>	4654 ± 255 <i>e</i>	8924 ± 673 <i>ce</i>
<b>PB</b>	3639 ± 200 <i>c</i>	9002 ± 977 <i>ce</i>

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg GA/100 g bs. Para cada residuo de vinificación, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Los estudios publicados sobre el contenido de fenólicos totales del orujo presentan amplios intervalos que varían desde 1145 mg GA/100 g bs (*Nero d'Avola*, Amico et al.(2008)) hasta 7560 mg GA/100 g bs (*Anceleta*, Rockenbach et al. (2008)) en el caso de las variedades tintas, y desde 1500 mg GA/100 g bs (*Palomino Fino*, Alonso et al. (2002)) hasta 4826 mg GA/100 g bs (*Roditis*, Makris et al. (2007b)) para las blancas, dependiendo de la variedad, añada, origen geográfico y/o metodología de extracción (Lafka et al., 2007).

Los resultados experimentales del presente estudio concordaron con dichos intervalos bibliográficos (**Tabla 4.19**), tanto en el caso de las variedades tintas como en el de las blancas. Concretamente, Llobera et al. (2008) obtuvieron valores del contenido de fenólicos totales muy similares para el orujo de *Premsal Blanc* (3490 ± 40 mg GA/100 g bs). Sin embargo, Alonso et al. (2002) observaron un contenido de fenólicos totales para el orujo de *Tempranillo* ~ 2 veces inferior que el descrito experimentalmente para la misma variedad. Por su parte, Spigno et al. (2007) reportaron valores de fenólicos totales muy bajos en comparación con los anteriores, para el orujo de la variedad tinta *Barbera*.

**Tabla 4.19.** Contenido de fenólicos totales del orujo. Revisión bibliográfica.

Fenólicos totales <sup>a</sup>	Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada, disolvente de extracción)	Referencia bibliográfica
2000 – 4000	<b>C. Sauvignon</b>		
4500	<b>Syrah</b>		
4000	<b>Tempranillo</b>	Jerez de la Frontera, España, 2000. MeOH.	Alonso <i>et al.</i> (2002)
2000	<b>Moscatell</b>	Intervalo bajo diferentes condiciones de riego del viñedo	
1500 – 2000	<b>Palomino Fino</b>		
4190 ± 40	<b>Negro Amaro</b>	Apulia, Italia, 1999. 0.5% HCl en EtOH/H <sub>2</sub> O (4:1, v/v)	Negro <i>et al.</i> (2003)
1570 – 2890	<b>Agiorgitiko</b>	Korinthia, Grecia, 2004. Intervalo utilizando diferentes disolventes de extracción	Lafka <i>et al.</i> (2007)
2630 ± 40	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España. MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) + acetona/H <sub>2</sub> O (70:30, v/v)	Llobera <i>et al.</i> (2007)
5402 ± 266	<b>Agiorgitiko</b>	Korinthia, Grecia. 0.1% HCl en MeOH/Acetona/H <sub>2</sub> O (6:3:1, v/v/v)	Makris <i>et al.</i> (2007a)
4826 ± 111	<b>Roditis</b>	Attica, Grecia. 0.1% HCl en MeOH/Acetona/H <sub>2</sub> O (6:3:1, v/v/v)	
270	<b>Barbera</b>	Piacenza, Italia, 2003. Etilacetato/H <sub>2</sub> O (9:1, v/v)	Spigno <i>et al.</i> (2007)
1366	<b>C. Sauvignon</b>		
2209 – 3659	<b>Nerello Mascalese</b>	CS y Nerello Mascalese de Catania, Italia. Nero d'Avola y Frappato de Ragusa, Italia. 1% HCl en EtOH	Amico <i>et al.</i> (2008)
1145	<b>Nero d'Avola</b>		
2649	<b>Frappato</b>		
3490 ± 40	<b>Premisal Blanc</b>	Mallorca, España. MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) + acetona/H <sub>2</sub> O (70:30, v/v)	Llobera <i>et al.</i> (2008)
1480 – 7950	<b>Ancelota</b>	Santa Catarina, Brasil, 2006. Intervalos utilizando diferentes disolventes de extracción	Rockenbach <i>et al.</i> (2008)
1500 – 6900	<b>Tannat</b>		
5895 ± 150	<b>Vitis Vinifera</b>	Polonia, 2008	Mildner-Szkudlarz <i>et al.</i> (2011)
7475 ± 222	<b>C. Sauvignon</b>	Santa Catarina, Brasil, 2008. 0.1% HCl en MeOH	Rockenbach <i>et al.</i> (2011)
4623 ± 163	<b>Merlot</b>		
4100 ± 500	<b>Merlot</b>	Oregon, EE.UU. Acetona/ H <sub>2</sub> O acidificada al 0.1% HCl (7:3, v/v)	Tseng <i>et al.</i> (2012)
6770 ± 700	<b>Pinot Noir</b>		

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg GA/100 g bs.

En cuanto al raspón, el contenido de fenólicos totales osciló entre 4704 ± 288 mg GA/100 g bs y 11525 ± 886 mg GA/100 g bs para las variedades *Merlot* y *Callet*, respectivamente. Tal y como puede observarse en la **Tabla 4.18**, de las 10 variedades de uva consideradas en el análisis de la fracción fenólica del raspón, la variedad *Callet* destacó notablemente gracias a su alto contenido de fenólicos totales ( $p < 0.05$ ). Le siguieron las variedades  $Syrah \geq Premisal Blanc = Parellada \geq Manto$

*Negro*, en este orden. Cabe apuntar que, exceptuando el caso de la variedad *Syrah*, los raspones con mayor contenido de fenólicos totales proceden de las cuatro variedades autóctonas incluidas en el estudio.

El raspón de las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Tempranillo* y *Macabeu*, presentó valores intermedios del contenido de fenólicos totales, mientras que las variedades *Chardonnay* y *Merlot* mostraron los valores más bajos ( $p < 0.05$ ). Al igual que en el caso del orujo, dado que todas las muestras de raspón procedían de viñedos próximos entre sí pertenecientes a la misma bodega y que el proceso de despalillado fue exactamente el mismo en todos los casos, las diferencias significativas que se observaron en el contenido de fenólicos totales se deben básicamente a las propiedades intrínsecas de cada variedad considerada.

Cabe destacar que, contrariamente a lo observado por Püssa *et al.* (2006), quienes indicaron que el raspón de las variedades tintas presentaba un mayor contenido fenólico que el de las variedades blancas, en el presente estudio no se observó dicho comportamiento, puesto que el contenido de fenólicos totales del raspón de algunas de las variedades blancas consideradas se incluye en el amplio intervalo de valores descrito para el raspón de las variedades tintas. De hecho, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido de fenólicos totales del raspón de *Tempranillo* y *Macabeu*, *Syrah* y *Parellada*, o *Merlot* y *Chardonnay*, entre otros.

En general, los resultados del contenido de fenólicos totales para el raspón presentaron el mismo orden de magnitud que los valores publicados previamente en la literatura (**Tabla 4.20**). No obstante, los valores experimentales del raspón de *Cabernet Sauvignon*, *Tempranillo* y *Syrah* fueron entre 2 y 5 veces mayores que los indicados por Alonso *et al.* (2002) para las mismas variedades. Spigno *et al.* (2007) publicaron contenidos de fenólicos totales para el raspón de la variedad tinta *Barbera*, considerablemente inferiores a los obtenidos en el presente estudio (330 mg GA/100 g bs). En el caso del *Premisal Blanc*, el contenido de fenólicos totales del raspón fue muy similar al descrito por Llobera *et al.* (2008), aunque los mismos autores observaron valores  $\sim 1.5$  veces mayores para el raspón de *Manto Negro* (Llobera and Cañellas, 2007). Todas estas diferencias pueden atribuirse, al igual que en el caso del orujo, a la diferente añada, origen geográfico y/o condiciones de cultivo de las muestras, así como al disolvente utilizado en la extracción de la fracción fenólica (Monagas *et al.*, 2003).

**Tabla 4.20.** Contenido de fenólicos totales del raspón. Revisión bibliográfica.

Fenólicos totales <sup>a</sup>	Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada, disolvente de extracción)	Referencia bibliográfica
2500	<b>C. Sauvignon</b>	Jerez de la Frontera, España, 2000. MeOH.	
1500 – 3500	<b>Syrah</b>	Intervalo bajo diferentes condiciones de riego del viñedo	Alonso <i>et al.</i> (2002)
2500 – 5000	<b>Tempranillo</b>		
11600 ± 190	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España. MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) + acetona/H <sub>2</sub> O (70:30, v/v)	Llobera <i>et al.</i> (2007)
5798 ± 178	<b>Roditis</b>	Attica, Grecia. 0.1% HCl en MeOH/Acetona/H <sub>2</sub> O (6:3:1, v/v/v)	Makris <i>et al.</i> (2007a)
330	<b>Barbera</b>	Piacenza, Italia, 2003. Etilacetato/H <sub>2</sub> O (9:1, v/v)	Spigno <i>et al.</i> (2007)
8730 ± 120	<b>Premsal Blanc</b>	Mallorca, España. MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v) + acetona/H <sub>2</sub> O (70:30, v/v)	Llobera <i>et al.</i> (2008)
5640 – 9344	<b>Savatiano</b>	Attica, Grecia. Optimización de la extracción a diferentes niveles: 40 – 60% EtOH, pH 2 – 6 y tiempos de extracción de 1 – 5 h	Karvela <i>et al.</i> (2009)
8529 – 12960	<b>Moschofilero</b>		
8404 – 11561	<b>Agiorgitiko</b>		

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg GA/100 g bs.

Al comparar los resultados de fenólicos totales obtenidos para ambos residuos de vinificación se observó que el orujo presentaba valores entre 1.5 – 2.5 veces menores que los correspondientes al raspón de la misma variedad. Dicho comportamiento ha sido descrito previamente en la literatura (Llobera and Cañellas, 2007; Makris *et al.*, 2007b; Llobera and Cañellas, 2008), atribuyéndose al hecho de que el raspón se desecha directamente tras la etapa de despalillado durante el proceso de vinificación, permaneciendo prácticamente intacta su composición fenólica original.

#### 4.2.3.2. Taninos totales

En la **Tabla 4.21** se indican los resultados del contenido de taninos totales correspondientes al orujo y raspón.

En cuanto al orujo, la variedad *Tempranillo* mostró el mayor contenido de taninos totales ( $151.2 \pm 1.4$  mg/g bs), mientras que la variedad *Macabeu* presentó el valor más bajo ( $50.8 \pm 0.0$  mg/g bs) (**Tabla 4.21**). Al igual que para el contenido de fenólicos totales, las variedades blancas presentaron menor contenido de taninos totales que las tintas ( $p < 0.05$ ). Cabe apuntar que se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las seis variedades en estudio.

En general, los resultados experimentales de taninos totales para el orujo presentaron el mismo orden de magnitud que los valores publicados previamente en la literatura, pese a utilizar diferentes métodos analíticos y/o estándares (**Tabla 4.22**). En el caso de las variedades tintas, los resultados para el *Callet* y *Tempranillo* fueron consistentes con la fracción superior de un amplio rango bibliográfico, que varía desde  $22.3 \pm 0.8$  mg/g bs (*Negro Amaro*, Negro *et al.* (2003)) hasta  $223.0 \pm 13.6$  mg/g bs (*Manto Negro*, Llobera *et al.* (2007)). No obstante, Llobera *et al.* (2008) mostraron valores de taninos totales 2.3 veces superiores a los observados en el presente estudio, para la variedad *Premisal Blanc*.

**Tabla 4.21.** Taninos totales del orujo y raspón.

	Taninos totales <sup>a</sup>	
	Orujo	Raspón
<b>CS</b>	---	124.9 ± 7.4 <i>ab</i>
<b>Ca</b>	108.4 ± 4.9 <i>a</i>	202.3 ± 6.2 <i>c</i>
<b>MN</b>	---	165.3 ± 11.4 <i>de</i>
<b>Me</b>	---	84.0 ± 2.8 <i>f</i>
<b>Sy</b>	---	161.4 ± 10.9 <i>dg</i>
<b>Te</b>	151.2 ± 1.4 <i>b</i>	147.3 ± 4.4 <i>ad</i>
<b>Ch</b>	71.9 ± 2.0 <i>c</i>	79.1 ± 5.9 <i>f</i>
<b>Ma</b>	50.8 ± 0.0 <i>d</i>	108.8 ± 3.3 <i>bf</i>
<b>Pa</b>	92.1 ± 4.1 <i>e</i>	165.2 ± 9.4 <i>dg</i>
<b>PB</b>	73.2 ± 4.8 <i>c</i>	181.4 ± 9.1 <i>ceg</i>

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg taninos/g bs. Para cada residuo de vinificación, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Por su parte, el intervalo experimental de taninos totales para el raspón varió desde un valor mínimo de  $79.1 \pm 5.9$  mg/g bs en el caso del *Chardonnay*, hasta un valor máximo de  $202.3 \pm 6.2$  mg/g bs para la variedad *Callet* (**Tabla 4.21**). Se observó una tendencia similar a la descrita para el contenido de fenólicos totales, en la que el raspón de *Syrah* junto con el de las cuatro variedades autóctonas consideradas en el estudio, presentaron los valores más elevados de taninos totales ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al considerar el contenido de taninos totales del raspón de las variedades tintas y blancas por separado.

Pese a suscitar un gran interés en los últimos años como fuente de compuestos bioactivos, aún son escasas las referencias bibliográficas relacionadas con el estudio del raspón. Concretamente para la determinación del contenido de taninos totales, Llobera *et al.* (2007, 2008) analizaron el raspón de *Manto Negro* ( $103.0 \pm 5.0$  mg/g bs) y *Premisal Blanc* ( $79.0 \pm 1.3$  mg/g bs), obteniendo valores 1.6 y 2.3 veces inferiores, respectivamente, para las mismas variedades.

**Tabla 4.22.** Contenido de taninos totales de los subproductos de vinificación. Revisión bibliográfica.

Taninos totales <sup>a</sup>	Tipo de residuo	Variedad	Observaciones (origen geográfico, técnica analítica)	Referencia bibliográfica
22.3 ± 0.8	Orujo	<b>Negro Amaro</b>	South Apulia, Italia. Vainillina	Negro <i>et al.</i> (2003)
223.0 ± 13.6	Orujo	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España. HCl-BuOH	Llobera <i>et al.</i> (2007)
168.3 ± 4.1	Orujo	<b>Premisal Blanc</b>	Mallorca, España. HCl-BuOH	Llobera <i>et al.</i> (2008)
148.1 ± 1.9	Orujo	<b>Cencibel</b>	La Mancha, España. HCl-BuOH	Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> (2009)
116.6 ± 19.4	Orujo	<b>Merlot</b>	Oregon, EE.UU. HCl-BuOH	Tseng <i>et al.</i> (2012)
121.1 ± 11.7	Orujo	<b>Pinot Noir</b>	Oregon, EE.UU. HCl-BuOH	Tseng <i>et al.</i> (2013)
103.0 ± 5.0	Raspón	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España. HCl-BuOH	Llobera <i>et al.</i> (2007)
79.0 ± 1.3	Raspón	<b>Premisal Blanc</b>	Mallorca, España. HCl-BuOH	Llobera <i>et al.</i> (2008)

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg taninos/g bs.

Contrariamente al comportamiento observado por Llobera *et al.* (2007, 2008), al comparar los resultados de taninos totales del orujo con los del correspondiente raspón de la misma variedad, los valores fueron considerablemente inferiores en el caso del orujo, exceptuando las variedades *Tempranillo* y *Chardonnay*, que manifestaron un contenido similar para ambos residuos de vinificación.

Cabe apuntar que tanto para el orujo como para el raspón se observó una alta correlación entre los resultados de fenólicos totales y taninos totales ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.05$ ), tendencia previamente detectada por Mandic *et al.* (2008).

#### 4.2.3.3. Identificación y cuantificación de taninos monoméricos y oligoméricos

La composición en flavan-3-oles de ambos residuos de vinificación se incluye en la **Tabla 4.23**. Bajo las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 3.2.8.4, el orden de elución fue el siguiente: procianidina B1, procianidina B3, (+)-catequina, procianidina B4, procianidina B2, (-)-epicatequina y trímico C1.

Tabla 4.23. Perfil flavan-3-olico del orujo y raspón.

	Flavan-3-oles <sup>a</sup>							Total <sup>b</sup>
	C	EC	B1	B2	B3	B4	C1	
<i>Orujo</i>								
<b>Ca</b>	38.9 ± 3.4 a	20.7 ± 2.1 ab	12.1 ± 0.7 a	12.5 ± 0.8 a	11.3 ± 0.9 a	2.6 ± 0.2 a	5.1 ± 0.4 a	103.3 ± 4.3 a
<b>Te</b>	22.3 ± 0.3 b	16.6 ± 0.2 ac	10.1 ± 0.8 ab	13.5 ± 0.6 a	10.2 ± 0.5 a	9.0 ± 0.8 b	8.0 ± 0.6 bc	89.6 ± 1.5 b
<b>Ch</b>	47.3 ± 2.2 a	48.8 ± 3.2 d	9.6 ± 0.6 b	13.1 ± 1.0 a	5.0 ± 0.3 b	3.0 ± 0.7 a	9.1 ± 0.3 b	135.9 ± 4.1 c
<b>Ma</b>	15.4 ± 3.0 b	9.5 ± 1.6 e	3.5 ± 0.7 c	4.7 ± 0.8 b	3.9 ± 0.4 b	2.4 ± 0.4 a	2.2 ± 0.6 d	41.6 ± 3.6 d
<b>Pa</b>	63.3 ± 7.5 c	22.9 ± 1.3 b	17.0 ± 1.2 d	14.2 ± 1.0 a	14.0 ± 0.5 c	2.1 ± 0.1 a	6.6 ± 0.3 ac	140.2 ± 7.8 c
<b>PB</b>	12.5 ± 1.3 b	12.6 ± 1.2 ce	6.7 ± 0.3 e	8.7 ± 0.5 c	5.2 ± 0.1 b	6.0 ± 0.4 c	5.1 ± 1.2 a	56.8 ± 2.3 e
<i>Raspón</i>								
<b>CS</b>	49.3 ± 3.4 ab	3.1 ± 0.2 ab	56.4 ± 2.1 ab	2.1 ± 0.2 ab	12.0 ± 0.7 ab	nd	nd	123.0 ± 4.1 a
<b>Ca</b>	45.3 ± 7.4 ab	1.6 ± 0.1 ac	45.4 ± 6.4 ac	2.0 ± 0.2 ab	15.6 ± 1.4 b	nd	nd	109.9 ± 9.8 ab
<b>MN</b>	57.5 ± 3.5 ac	2.4 ± 0.1 acd	86.8 ± 3.2 b	2.2 ± 0.2 b	13.2 ± 0.7 ab	nd	nd	162.1 ± 4.8 ac
<b>Me</b>	12.2 ± 0.5 d	0.6 ± 0.1 c	24.6 ± 1.2 ac	1.1 ± 0.1 a	4.1 ± 0.3 c	nd	nd	42.7 ± 1.3 d
<b>Sy</b>	114.6 ± 3.1 e	2.4 ± 0.4 ace	132.0 ± 5.5 d	tr	20.8 ± 1.9 d	nd	nd	269.7 ± 6.6 e
<b>Te</b>	126.9 ± 15.8 ef	11.1 ± 1.9 f	195.8 ± 33.6 e	9.4 ± 1.0 c	23.2 ± 3.2 d	nd	nd	366.3 ± 37.3 f
<b>Ch</b>	31.4 ± 3.0 b	1.2 ± 0.1 ac	25.5 ± 4.3 ac	1.5 ± 0.1 ab	5.6 ± 0.3 c	nd	nd	65.2 ± 5.3 bd
<b>Ma</b>	9.3 ± 3.3 d	0.5 ± 0.0 c	13.3 ± 2.6 c	1.1 ± 0.0 a	4.5 ± 0.5 c	nd	nd	28.8 ± 4.2 d
<b>Pa</b>	133.9 ± 1.8 f	5.8 ± 0.9 g	187.7 ± 9.7 e	4.8 ± 0.1 d	22.2 ± 0.5 d	nd	nd	354.5 ± 9.9 f
<b>PB</b>	74.0 ± 6.2 c	4.0 ± 0.3 bde	121.8 ± 2.7 d	4.0 ± 0.0 d	10.4 ± 0.1 a	nd	nd	214.2 ± 6.8 ce

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg/100 g bs; <sup>b</sup> Contenido total de flavan-3-oles calculado como la suma de las concentraciones individuales de C, EC, B1, B2, B3, B4 y C1; nd, no detectado; tr, trazas. Flavan-3-oles: C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; dímeros B1, B2, B3, B4; trímero C1. Variedades: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Premsal Blanc. Para cada residuo de vinificación, dentro de cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

El contenido total en flavan-3-oles del orujo, calculado como la suma de la concentración de cada uno de los compuestos indicados, varió entre  $41.7 \pm 3.6$  mg/100 g bs y  $140.2 \pm 7.8$  mg/100 g bs, para las variedades *Macabeu* y *Parellada*, respectivamente (**Tabla 4.23**). Se trata de un intervalo experimental consistente con el propuesto previamente por González-Paramás *et al.* (2004) (29 – 199 mg/100 g bs) para el mismo tipo de residuo de vinificación. Tal y como se observa en la **Tabla 4.23**, existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las seis variedades consideradas, a excepción de los orujos de las variedades *Parellada* y *Chardonnay*, exhibiendo ambos el mayor contenido total en flavan-3-oles. No obstante, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al comparar las variedades tintas y las blancas, comportamiento previamente observado por Rodríguez Montealegre *et al.* (2006) para piel y pepitas de uva, y por Santos-Buelga *et al.* (1995) y Anastasiadi *et al.* (2010), para pepitas.

En términos de distribución, la fracción monomérica representó entre el 43 y el 71% del contenido flavan-3-olico total, mientras que el porcentaje de dímeros varió entre el 23 y el 48%, en función de la variedad considerada. Exceptuando los orujos de *Tempranillo* y *Premsal Blanc*, que presentaron una proporción similar de ambas fracciones, en general, la fracción monomérica fue superior a la dimérica. Esta observación coincide con los resultados de Monrad *et al.* (2010) para el orujo de la variedad tinta *Sunbelt* (*V. Labrusca* L.), y, también, con los descritos por varios autores para pepitas de uva (*V. vinifera* L.) (Santos-Buelga *et al.*, 1995; Fuleki and Ricardo-da-Silva, 1997; Monagas *et al.*, 2003; Mandic *et al.*, 2008).

Se detectó un perfil flavan-3-olico general en el orujo de todas las variedades consideradas. El monómero (+)-catequina fue el componente mayoritario, representando entre el 49 y el 73% de la fracción monomérica y entre el 22 y el 45% del contenido total de flavan-3-oles del orujo. Por su parte, el monómero (-)-epicatequina fue el segundo componente principal, a excepción de las variedades *Chardonnay* y *Premsal Blanc* cuyos orujos denotaron una contribución similar de ambos monómeros.

Con respecto a los taninos oligoméricos, la procianidina B2 se posicionó principalmente como tercer flavan-3-ol y dímero más abundante en el orujo, coincidiendo con las observaciones de González-Paramás *et al.* (2004). No obstante, cabe indicar que para el orujo de la variedad *Callet*, la proporción de las procianidinas B1 y B2 fue similar, y para el de la variedad *Parellada*, predominó el dímero B1. Por su

parte, los oligómeros B4 y C1 fueron componentes minoritarios en todos los casos, contribuyendo  $\leq 11\%$  al contenido total de flavan-3-oles.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en términos cuantitativos para los siete flavan-3-oles identificados, lo que revela una composición monomérica y oligomérica particular para el orujo de cada variedad en estudio. Ello coincide con los resultados publicados separadamente para pieles de uva (Monagas *et al.*, 2003; Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006) y pepitas (Santos-Buelga *et al.*, 1995; Fuleki and Ricardo-da-Silva, 1997; Monagas *et al.*, 2003; Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006; Tounsi *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe destacar que se han encontrado pocas referencias que apunten a la composición flavan-3-olica del orujo en sí como residuo de vinificación (Tabla 4.24). Entre ellas, se encuentra el trabajo de González-Paramás *et al.* (2004), que indica el contenido total, no individual, de flavan-3-oles del orujo de seis variedades distintas; el de Monrad *et al.* (2010), que investigó el orujo de una variedad de uva *Vitis Labrusca* en lugar de una *Vitis vinifera*; y los estudios de Alonso *et al.* (2002) y Rockenbach *et al.* (2011), pese a que estos autores sólo analizaron las concentraciones de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina. En base a ello, posiblemente el presente trabajo es una de las primeras referencias bibliográficas que compara detalladamente el perfil flavan-3-olico del orujo de diferentes variedades.

**Tabla 4.24.** Contenido de flavan-3-oles del orujo. Revisión bibliográfica.

Flavan-3-oles <sup>a</sup>		Variedad	Referencia bibliográfica
C	EC		
1.5 – 14.9	<i>nd</i>	<b>C. Sauvignon</b>	
7.0 – 8.9	3.4 – 4.5	<b>Tempranillo</b>	Alonso <i>et al.</i> (2002)
5.6 – 9.7	2.4 – 3.2	<b>Palomino Fino</b>	
150.2 ± 0.9	18.2 ± 0.1	<b>C. Sauvignon</b>	
122.3 ± 1.2	26.0 ± 0.6	<b>Merlot</b>	Rockenbach <i>et al.</i> (2011)

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg/100 g bs; *nd*, no detectado. Flavan-3-oles: C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina.

El contenido total de flavan-3-oles del raspón osciló entre  $28.8 \pm 4.2$  mg/100 g bs para la variedad *Macabeu* y  $366.3 \pm 37.3$  mg/100 g bs para la *Tempranillo*, un amplio intervalo que pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre variedades ( $p < 0.05$ ). Concretamente, el raspón de las variedades *Macabeu*, *Merlot* y *Chardonnay* se mostró pobre en flavan-3-oles, mientras que el de

las variedades *Tempranillo*, *Parellada*, *Syrah* y *Premal Blanc*, en este orden, presentó los valores más elevados (**Tabla 4.23**).

Contrariamente a lo observado para el orujo, en términos de distribución, la fracción dimérica fue mayor que la monomérica, variando entre un 57 – 70% del contenido total de flavan-3-oles, con la excepción del raspón de la variedad *Chardonnay*, para la cual se observó una contribución similar de ambas fracciones. La misma tendencia general de distribución y proporción de las fracciones monomérica y dimérica fue descrita por Sun *et al.* (1999) para el raspón de la variedad *Tinta Miúda*.

Para el raspón de todas las variedades en estudio, exceptuando de nuevo el caso del *Chardonnay*, se observó un patrón general de composición en flavan-3-oles. El flavan-3-ol más abundante fue la procianidina B1, representando el 70 – 90% de la fracción dimérica y el 40 – 60% del contenido total en flavan-3-oles. El monómero (+)-catequina fue el segundo componente mayoritario, con una contribución al contenido total que varió entre el 30 y el 42%, según la variedad. Así pues, tal y como observó Souquet *et al.* (2000), la (+)-catequina es el flavan-3-ol monomérico más importante en el raspón. Como excepciones a este patrón general, cabe indicar que el raspón de la variedad *Callet* presentó proporciones similares de los dos componentes principales, procianidina B1 y (+)-catequina, mientras que para la variedad *Chardonnay* predominó la (+)-catequina.

Con respecto a la procianidina B3, este dímero mostró valores moderados comprendidos entre  $4.1 \pm 0.3$  mg/100 g bs y  $23.2 \pm 3.2$  mg/100 g bs, para el raspón de *Merlot* y *Tempranillo*, respectivamente. Por su parte, la procianidina B2 y el monómero (–)-epicatequina se definieron como flavan-3-oles minoritarios en el raspón, con concentraciones inferiores al 4% del contenido total. En contraste con los resultados de la variedad *Tinta Miúda* (Sun *et al.*, 1999), la procianidina B4 y el trímero C1 no se detectaron en ninguna de las muestras de raspón analizadas.

De acuerdo con la literatura (González-Paramás *et al.*, 2004), existen diferencias significativas entre las variedades con respecto a la concentración de cada componente, lo que confiere un perfil particular de flavan-3-oles al raspón de cada variedad en estudio. Son escasas las referencias bibliográficas acerca del perfil flavan-3-olico del raspón (**Tabla 4.25**). De hecho, sólo se han encontrado el estudio de Sun *et al.* (1999), cuyos resultados se expresan en base húmeda; los de Alonso *et al.* (2002) y Souquet *et al.* (2000), que únicamente aportaron las concentraciones de (+)-catequina y

(-)-epicatequina; y el de Anastasiadi *et al.* (2012), que también incluyó el contenido de las procianidinas B2 y B3 en el raspón. En cualquier caso, los datos experimentales del presente trabajo fueron consistentes con dichas referencias en lo que respecta al orden de magnitud de las concentraciones y al orden de distribución de los flavan-3-oles. En este contexto, debe indicarse que posiblemente éste sea uno de los primeros estudios en la literatura en el que se compara detalladamente el perfil flavan-3-olico del raspón de diferentes variedades.

Al tratar en paralelo ambos residuos de vinificación para una misma variedad, se observó un mayor contenido total de flavan-3-oles en el raspón, destacándose importantes diferencias en el caso de la *Parellada*, *Premsal Blanc* y *Tempranillo*. Además, de acuerdo con el ratio monómeros/oligómeros, los orujos presentaron porcentajes de monómeros y trímeros superiores al de los correspondientes raspones, aunque una menor contribución dimérica.

**Tabla 4.25.** Contenido de flavan-3-oles del raspón. Revisión bibliográfica.

Flavan-3-oles <sup>a</sup>							Variedad	Referencia bibliográfica
C	EC	B1	B2	B3	B4	C1		
64.4 ± 6.3	2.2 ± 0.3	128.2 ± 10.2	3.4 ± 0.4	27.1 ± 3.1	3.1 ± 0.4	2.3 ± 0.3	<b>Tinta Miúda</b>	Sun <i>et al.</i> (1999) <sup>b</sup>
6	<i>tr</i>	---	---	---	---	---	<b>Merlot</b>	Souquet <i>et al.</i> (2000)
36.9	0.8	---	---	---	---	---	<b>C. Sauvignon</b>	Alonso <i>et al.</i> (2002)
67.4	33.9	---	---	---	---	---	<b>Tempranillo</b>	
126.1 – 169.1	7.1 – 9.5	---	4.6 – 9.7	48.2 – 99.3	---	---	<b>Mandilaria</b>	
102.7 – 107.7	6.4 – 8.0	---	4.4 – 10.8	24.3 – 58.7	---	---	<b>Mavrotragano</b>	
71.2 – 79.5	18.9	---	<i>nd</i>	13.8 – 34.9	---	---	<b>Voidomato</b>	Anastasiadi <i>et al.</i> (2012)
108.9 – 185.8	1.8 – 2.8	---	3.6 – 16.5	45.4 – 64.6	---	---	<b>Asyrtiko</b>	
69.9 – 73.7	5.2 – 5.8	---	3.6 – 4.9	21.5 – 38.3	---	---	<b>Aidani</b>	
38.5 – 46.2	1.2	---	5.5 – 6.6	16.1 – 19.3	---	---	<b>Athiri</b>	

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg/100 g bs; <sup>b</sup> Resultados de Sun *et al.* (1999) en unidades de mg/kg bh; *tr*, trazas; *nd*, no detectado. Flavan-3-oles: C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; dímeros B1, B2, B3, B4; trímero C1.

#### 4.2.3.4. Grado medio de polimerización y composición de las proantocianidinas

Los resultados correspondientes al grado medio de polimerización (mDP) y a la composición estructural de las proantocianidinas o taninos condensados de ambos residuos de vinificación se resumen en la **Tabla 4.26**.

**Tabla 4.26.** Grado medio de polimerización (mDP) y composición estructural de las proantocianidinas del orujo y raspón.

	mDP	Composición general		Subunidades terminales			Subunidades de extensión		
		% C	% EC	% C	% EC	% ECG	% C	% EC	
<i>Orujo</i>									
<b>Ca</b>	7.6 <i>a</i>	19 <i>a</i>	79 <i>a</i>	55 <i>a</i>	31 <i>a</i>	14 <i>a</i>	14 <i>a</i>	86 <i>a</i>	
<b>Te</b>	9.5 <i>b</i>	17 <i>bc</i>	81 <i>b</i>	47 <i>b</i>	36 <i>b</i>	16 <i>b</i>	13 <i>ab</i>	87 <i>ab</i>	
<b>Ch</b>	4.5 <i>c</i>	17 <i>b</i>	81 <i>b</i>	44 <i>c</i>	47 <i>c</i>	9 <i>c</i>	9 <i>c</i>	91 <i>c</i>	
<b>Ma</b>	7.1 <i>d</i>	18 <i>a</i>	80 <i>a</i>	53 <i>d</i>	34 <i>d</i>	13 <i>d</i>	13 <i>b</i>	87 <i>b</i>	
<b>Pa</b>	5.0 <i>e</i>	24 <i>d</i>	74 <i>c</i>	64 <i>e</i>	24 <i>e</i>	12 <i>e</i>	13 <i>ab</i>	87 <i>ab</i>	
<b>PB</b>	10.1 <i>b</i>	16 <i>c</i>	83 <i>d</i>	47 <i>b</i>	43 <i>f</i>	10 <i>f</i>	13 <i>b</i>	87 <i>b</i>	
<i>Raspón</i>									
<b>CS</b>	5.9 <i>ab</i>	25 <i>ab</i>	74 <i>ab</i>	97 <i>a</i>	<i>tr</i>	3 <i>a</i>	11 <i>a</i>	89 <i>a</i>	
<b>Ca</b>	4.7 <i>c</i>	29 <i>c</i>	70 <i>c</i>	89 <i>b</i>	7 <i>a</i>	4 <i>b</i>	12 <i>b</i>	88 <i>b</i>	
<b>MN</b>	5.8 <i>b</i>	26 <i>bd</i>	73 <i>bd</i>	97 <i>a</i>	<i>tr</i>	3 <i>a</i>	11 <i>a</i>	89 <i>a</i>	
<b>Me</b>	6.0 <i>ab</i>	25 <i>a</i>	75 <i>a</i>	97 <i>a</i>	<i>tr</i>	3 <i>a</i>	10 <i>c</i>	90 <i>c</i>	
<b>Sy</b>	6.1 <i>a</i>	22 <i>e</i>	77 <i>e</i>	97 <i>a</i>	<i>tr</i>	3 <i>a</i>	7 <i>d</i>	93 <i>d</i>	
<b>Te</b>	6.9 <i>d</i>	20 <i>f</i>	79 <i>f</i>	95 <i>c</i>	<i>tr</i>	5 <i>b</i>	8 <i>d</i>	92 <i>d</i>	
<b>Ch</b>	4.6 <i>c</i>	28 <i>cg</i>	71 <i>cg</i>	89 <i>b</i>	6 <i>a</i>	5 <i>b</i>	11 <i>ac</i>	89 <i>ac</i>	
<b>Ma</b>	6.2 <i>a</i>	24 <i>h</i>	75 <i>a</i>	83 <i>d</i>	11 <i>b</i>	6 <i>c</i>	13 <i>b</i>	87 <i>b</i>	
<b>Pa</b>	5.0 <i>e</i>	27 <i>dg</i>	72 <i>dg</i>	95 <i>c</i>	2 <i>c</i>	3 <i>a</i>	10 <i>ac</i>	90 <i>ac</i>	
<b>PB</b>	8.5 <i>f</i>	25 <i>ah</i>	74 <i>a</i>	95 <i>c</i>	<i>tr</i>	4 <i>b</i>	16 <i>e</i>	84 <i>e</i>	

*C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; ECG, (-)-epicatequina-3-O-galato; tr, trazas. Variedades: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Prensal Blanc. Para cada residuo de vinificación, dentro de cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.*

En el caso del orujo, el mDP osciló entre 4.5 y 10.1, siendo las variedades *Tempranillo* y *Premsal Blanc* las que exhibieron los valores más altos, y la variedad *Chardonnay*, la que presentó el valor más bajo (**Tabla 4.26**). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades en estudio; por el contrario, no se detectaron ( $p > 0.05$ ) al considerar el mDP del orujo de las variedades tintas y blancas por separado.

En general, la bibliografía hace referencia al mDP de las proantocianidinas de la piel y pepitas de uva de forma independiente, no encontrándose apenas estudios que lo analicen en el orujo como subproducto directo del proceso de vinificación. Según Pinelo *et al.* (2006a), el mDP de la piel es mayor que el de las pepitas, presentando ambas fracciones, en cualquier caso, una gran variabilidad en función de la variedad, la añada y el origen geográfico de las muestras, y/o de la técnica analítica utilizada para su determinación (**Tabla 4.27**). Si consideramos el mDP de las proantocianidinas del orujo como intermedio entre los valores bibliográficos de los residuos de pepitas y piel de la uva, los resultados experimentales del presente estudio concuerdan con los descritos por Kennedy *et al.* (2000), Fernández *et al.* (2007b), Llaudy *et al.* (2008), Mattivi *et al.* (2009), Obreque-Slier *et al.* (2010), Bordiga *et al.* (2011) y Lago-Vanzela *et al.* (2011a, 2011b), aunque son algo inferiores que los indicados por otros autores (Souquet *et al.*, 1996; Souquet *et al.*, 2000; Monagas *et al.*, 2003; Chira *et al.*, 2009; Cosme *et al.*, 2009; Hanlin and Downey, 2009; Hernández-Jiménez *et al.*, 2009; Travaglia *et al.*, 2011). En el caso concreto de la *Parellada*, el mDP experimental fue más elevado que el observado por Torres *et al.* (2002) para el orujo de la misma variedad.

En cuanto a la composición general de las proantocianidinas del orujo, tal y como se esperaba, la (–)-epicatequina fue la subunidad más abundante, con una participación superior al 74% en todos los casos. La (+)-catequina, por su parte, fue el segundo componente principal, con concentraciones que varían entre el 16 y el 24%. Contrariamente a lo observado por Vivas *et al.* (2004), la (–)-epigallocatequina (EGC) no se detectó en ninguna de las muestras de orujo analizadas en este estudio.

En términos estructurales, las subunidades terminales de las proantocianidinas del orujo estaban constituidas por (+)-catequina y (–)-epicatequina, en una proporción similar para las variedades *Chardonnay* y *Premsal Blanc*, y con una mayor participación de la (+)-catequina en el orujo de las otras cuatro variedades consideradas. Ambos comportamientos se han citado previamente en la bibliografía (Fernández *et al.*, 2007b; Mattivi *et al.*, 2009; Hanlin *et al.*, 2011): el primero de ellos, en la composición de las

proantocianidinas de las pepitas de uva; y el segundo, principalmente en la piel. Por consiguiente, podríamos afirmar que el orujo de las variedades *Chardonnay* y *Premisal Blanc* presenta un mayor contenido de pepitas que el resto. De acuerdo con los trabajos de Souquet *et al.* (1996) y Hanlin *et al.* (2011), la (-)-epicatequina-3-O-galato (ECG) también participa como subunidad terminal en las proantocianidinas del orujo, con contribuciones del 9 al 16%. Tal y como puede observarse en la **Tabla 4.26**, las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) existentes en la composición de la fracción terminal muestran un perfil propio para cada una de las variedades consideradas.

En las subunidades de extensión, la (-)-epicatequina contribuyó en mayor proporción que la (+)-catequina, pues ésta sólo representó entre el 9 y el 14%. Exceptuando el caso del *Chardonnay*, no se encontraron prácticamente diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre variedades, con respecto a la composición de las subunidades de extensión de las proantocianidinas de los orujos.

En general, la composición de las proantocianidinas del orujo descrita en el presente estudio fue consistente con las publicadas anteriormente para los residuos de piel y pepitas por Souquet *et al.* (1996), Monagas *et al.* (2003), Hernández-Jiménez *et al.* (2009) y Lago-Vanzela *et al.* (2011a, 2011b), entre otros. En el caso concreto de la variedad *Tempranillo*, los resultados experimentales coincidieron con los descritos por Monagas *et al.* (2003) para el orujo de la misma variedad.

En el caso del raspón, los valores experimentales del mDP cubrieron un intervalo desde 4.6 hasta 8.5, siendo de nuevo la variedad autóctona *Premisal Blanc* la que presentó el máximo valor. Tal y como se indica en la **Tabla 4.26**, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades en estudio. No obstante, al igual que para el orujo, los resultados muestran que el mDP no puede ser utilizado como factor diferencial entre los raspones de variedades blancas y tintas ( $p > 0.05$ ).

En general, los resultados de mDP del raspón están de acuerdo con la escasa bibliografía referente al mDP de este residuo de vinificación (Souquet *et al.*, 2000; Vivas *et al.*, 2004; Llaudy *et al.*, 2008) (**Tabla 4.28**). En cualquier caso, cabe indicar que los valores experimentales de mDP del raspón de *Chardonnay* y *Merlot* son ligeramente inferiores a los descritos por Souquet *et al.* (2000) para las mismas variedades. Esta diferencia se debe seguramente a que no se aplicó la misma técnica analítica para su determinación, pues la tioacidólisis utilizada por Souquet *et al.* (2000) fue substituida por una reacción de fluoroglucinólisis en el presente estudio.

**Tabla 4.27.** Grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados de orujo, piel y pepitas de uva. Revisión bibliográfica.

mDP			Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada, técnica analítica)	Referencia bibliográfica
Orujo	Piel	Pepitas			
---	33	---	<b>Merlot</b>	Tioacidólisis	Souquet <i>et al.</i> (1996)
---	---	5.6	<b>C. Sauvignon</b>	California, EE.UU. Tiólisis	Kennedy <i>et al.</i> (2000)
---	28.2	10.4	<b>Merlot</b>	Tioacidólisis	Souquet <i>et al.</i> (2000)
1.7	---	---	<b>Parellada</b>	Vilafranca del Penedès, España, 1998. Tiólisis con cisteamina	Torres <i>et al.</i> (2002)
---	85.7	6.4	<b>C. Sauvignon</b>		
---	33.8	7.3	<b>Graciano</b>	Navarra, España, 2000. Tiólisis	Monagas <i>et al.</i> (2003)
---	72.3	7.1	<b>Tempranillo</b>		
---	8.7 – 12.1	5.4 – 7.4	<b>Carménère</b>	Valle Colchagua, Chile, 2004. Fluoroglucinólisis	Fernández <i>et al.</i> (2007b)
---	4.0 – 6.0	~ 3.0	<b>C. Sauvignon</b>	Gratallops, España, 2005. Índice DMACH	Llaudy <i>et al.</i> (2008)
---	21.9 – 26.7	3.6 – 5.5	<b>C. Sauvignon</b>		
---	24.2 – 16.0	2.4 – 3.0	<b>Merlot</b>	Bordeaux, Francia, 2006 y 2007. Fluoroglucinólisis	Chira <i>et al.</i> (2009)
---	28.4	6.2	<b>Touriga Nacional</b>		
---	---	6.1	<b>Trincadeira</b>		
---	41.7	5.1	<b>C. Sauvignon</b>	Lisboa, Portugal, 2005. Tiólisis	Cosme <i>et al.</i> (2009)
---	19.8	7.6	<b>Castelao</b>		
---	---	6.5	<b>Syrah</b>		
---	28 – 32	---	<b>C. Sauvignon</b>		
---	27 – 31	---	<b>Syrah</b>	Sunraysia, Australia, 2004 y 2005. Fluoroglucinólisis	Hanlin <i>et al.</i> (2009)
---	78.6	8.3	<b>Monastrell</b>		
---	77.8	3.7	<b>Syrah</b>	Murcia, España, 2007. Fluoroglucinólisis	Hernández-Jiménez <i>et al.</i> (2009)

**Tabla 4.27.** (continuación) Grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados de orujo, piel y pepitas de uva. Revisión bibliográfica.

Orujo	mDP		Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada, técnica analítica)	Referencia bibliográfica
	Piel	Pepitas			
---	2.5 – 3.7	3.0 – 3.4	<b>C. Sauvignon</b>		
---	2.1	2.8	<b>Carménère</b>		
---	2.6 – 3.6	2.0 – 2.9	<b>Marzemino</b>		
---	3.8 – 4.2	2.9 – 3.0	<b>Merlot</b>	Trentino, Italia. Tioacidólisis	Mattivi <i>et al.</i> (2009)
---	5.7 – 8.0	2.7 – 3.2	<b>Pinot Noir</b>		
---	3.4 – 5.1	3.0 – 3.5	<b>Syrah</b>		
---	4.3 – 4.4	3.9 – 4.4	<b>Teroldego</b>		
---	7.1 ± 1.8	2.7 ± 0.6	<b>C. Sauvignon</b>		
---	3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.0	<b>Carménère</b>	Valle del Maule, Chile, 2008. Fluoroglucinólisis	Obreque-Slier <i>et al.</i> (2010)
---	0.7 ± 0.1	9.7 ± 0.5	<b>C. Sauvignon</b>		
---	0.6 ± 0.1	13.7 ± 0.7	<b>Malvasia Bianca</b>		
---	1.0 ± 0.1	10.9 ± 1.0	<b>Moscato Bianco</b>		
---	0.7 ± 0.1	5.6 ± 0.3	<b>Nascetta</b>	Piedmont, Italia, 2008. Fluoroglucinólisis	Bordiga <i>et al.</i> (2011)
---	1.5 ± 0.1	8.0 ± 0.1	<b>Nebbiolo</b>		
---	0.9 ± 0.0	10.5 ± 0.5	<b>Pinot Bianco</b>		
---	7.0 ± 0.1	---	<b>BRS Clara</b>	Jales, Brasil, 2010. Método de despolimerización ácida con pirogalol.	Lago-Vanzela <i>et al.</i> (2011a)
---	9.9 ± 0.6	---	<b>BRS Morena</b>		
---	12.3 ± 0.6	---	<b>Bordô<sup>a</sup></b>	Jales, Brasil, 2010. Método de despolimerización ácida con pirogalol.	Lago-Vanzela <i>et al.</i> (2011b)
---	5.3 – 40.9	1.9 – 6.5	<b>37 variedades</b>	Piedmont, Italia, 2007. Método de la vainillina-ácido acético	Travaglia <i>et al.</i> (2011)

<sup>a</sup> *Vitis Labrusca L.*

**Tabla 4.28.** Grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados de raspón.  
Revisión bibliográfica.

mDP	Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada, técnica analítica)	Referencia bibliográfica
9.2	<b>Merlot</b>		
10.2	<b>Negrette</b>		
8.2	<b>Pinot</b>		
8.7	<b>Tannat</b>	Tioacidólisis	Souquet <i>et al.</i> (2000)
9.1	<b>Chardonnay</b>		
7.7	<b>Clairette</b>		
5.0	<b>Vitis vinifera</b>	Tioacidólisis	Vivas <i>et al.</i> (2004)
4.0 – 9.0	<b>C. Sauvignon</b>	Gratallops, España, 2005. Índice DMACH	Llaudy <i>et al.</i> (2008)

De acuerdo con los resultados de composición general de la **Tabla 4.26** para el raspón, la fracción polimérica de proantocianidinas está constituida principalmente por (–)-epicatequina, en una proporción del 70 – 80% según la variedad, seguida por la (+)-catequina, con concentraciones ~ 3 veces inferiores. A diferencia de algunos trabajos previos (Souquet *et al.*, 2000; Vivas *et al.*, 2004), la (–)-epigallocatequina (EGC) no se detectó en ninguna de las muestras de raspón.

Se identificaron tres subunidades terminales: la (+)-catequina, como la más abundante; la (–)-epicatequina, cuya concentración no pudo cuantificarse en seis de las 10 variedades consideradas; y la (–)-epicatequina-3-O-galato (ECG), que contribuyó en  $\leq 6\%$  a la fracción terminal de las proantocianidinas. El raspón de las variedades tintas *Cabernet Sauvignon*, *Manto Negro*, *Merlot* y *Syrah* presentó exactamente la misma composición para las subunidades terminales, mostrando el mayor contenido de (+)-catequina de entre las 10 variedades en estudio ( $\sim 97\%$ ,  $p < 0.05$ ). Por su parte, en el raspón de la variedad *Macabeu* se apreció una mayor participación terminal de la (–)-epicatequina ( $\sim 11\%$ ,  $p < 0.05$ ).

Con respecto a las subunidades de extensión, la (–)-epicatequina fue el componente mayoritario, representando entre el 84 y el 93% del total. La participación de la (+)-catequina fue mucho menor, limitándose al porcentaje restante de unidades de extensión (7 – 16%). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variedades con respecto al perfil de las subunidades de extensión de las proantocianidinas. Concretamente, destacó el bajo contenido de (+)-catequina como

subunidad de extensión en el raspón de *Syrah* y *Tempranillo*, en comparación con el de la variedad *Premisal Blanc*, ~ 2 veces mayor ( $p < 0.05$ ).

El perfil de las proantocianidinas del raspón descrito en el presente estudio puede compararse con los observados previamente en la bibliografía (Souquet *et al.*, 2000; Vivas *et al.*, 2004), para las mismas o diferentes variedades. No obstante, cabe indicar que aparte del raspón de las variedades *Chardonnay*, *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, no se ha encontrado mención alguna en la literatura sobre el perfil de proantocianidinas del raspón de las otras siete variedades en estudio.

Al comparar los resultados experimentales sobre las características de las proantocianidinas de ambos residuos de vinificación para una misma variedad, se observaron, en general, valores de mDP mayores en el caso de los orujos, tal y como propuso anteriormente Souquet *et al.* (2000). Las subunidades terminales y de extensión identificadas fueron exactamente las mismas para ambos residuos. En cuanto a la fracción de extensión, orujos y raspones presentaron una composición muy similar. No obstante, se observaron importantes diferencias con respecto a sus fracciones terminales: mientras que el raspón se constituye básicamente de (+)-catequina con una limitada participación de (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato, el correspondiente orujo de la misma variedad presentó una contribución más equilibrada de (+)-catequina y (-)-epicatequina, presentando entre 2 – 4 veces mayor porcentaje de (-)-epicatequina-3-O-galato.

#### **4.2.3.5. Capacidad antioxidante**

Debido a los múltiples y muy variados mecanismos y compuestos químicos implicados en la capacidad antioxidante de una muestra de origen vegetal, ninguna metodología analítica es capaz de determinar dicho potencial en su totalidad (Antolovich *et al.*, 2002). Por ello, con el objeto de proporcionar una visión más global de la capacidad antioxidante de ambos subproductos de vinificación, se utilizaron cuatro técnicas analíticas para su evaluación: ABTS, CUPRAC, FRAP y ORAC. Los resultados experimentales derivados de su aplicación a orujos y raspones se incluyen en la **Tabla 4.29**.

La capacidad antioxidante del orujo según el método ABTS presentó valores entre  $71.6 \pm 1.6$  mg trolox/g bs y  $181.1 \pm 4.0$  mg trolox/g bs, correspondiendo los valores mínimo y máximo a las variedades *Macabeu* y *Tempranillo*, respectivamente.

Cabe apuntar que se observó el mismo orden y diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades, indicados previamente en el análisis de fenólicos totales del orujo (Tabla 4.18).

**Tabla 4.29.** Capacidad antioxidante <sup>a</sup> del orujo y raspón.

	ABTS	CUPRAC	FRAP	ORAC
<i>Orujo</i>				
<b>Ca</b>	153.4 ± 4.4 <i>a</i>	225.6 ± 9.0 <i>a</i>	128.1 ± 7.5 <i>a</i>	131.8 ± 7.7 <i>a</i>
<b>Te</b>	181.1 ± 4.0 <i>b</i>	272.6 ± 13.7 <i>b</i>	141.4 ± 7.1 <i>b</i>	116.4 ± 13.4 <i>b</i>
<b>Ch</b>	92.4 ± 1.0 <i>c</i>	124.2 ± 9.8 <i>c</i>	76.1 ± 4.8 <i>c</i>	93.7 ± 9.0 <i>c</i>
<b>Ma</b>	71.6 ± 1.6 <i>d</i>	106.3 ± 5.1 <i>d</i>	49.0 ± 5.0 <i>d</i>	58.1 ± 7.6 <i>d</i>
<b>Pa</b>	134.0 ± 4.3 <i>e</i>	209.1 ± 12.8 <i>e</i>	124.8 ± 10.7 <i>a</i>	122.2 ± 7.3 <i>ab</i>
<b>PB</b>	93.8 ± 4.0 <i>c</i>	139.7 ± 9.7 <i>f</i>	68.3 ± 6.2 <i>c</i>	62.8 ± 6.2 <i>d</i>
<i>Raspón</i>				
<b>CS</b>	168.9 ± 5.9 <i>a</i>	226.9 ± 14.8 <i>a</i>	114.8 ± 3.5 <i>a</i>	157.2 ± 20.7 <i>a</i>
<b>Ca</b>	253.2 ± 14.8 <i>b</i>	378.6 ± 16.2 <i>b</i>	170.1 ± 16.8 <i>b</i>	282.1 ± 35.5 <i>b</i>
<b>MN</b>	198.2 ± 3.7 <i>c</i>	274.2 ± 5.3 <i>c</i>	134.6 ± 9.5 <i>c</i>	192.9 ± 26.3 <i>c</i>
<b>Me</b>	109.8 ± 2.0 <i>d</i>	160.6 ± 5.1 <i>d</i>	76.6 ± 2.5 <i>d</i>	101.9 ± 8.5 <i>d</i>
<b>Sy</b>	203.1 ± 11.8 <i>c</i>	280.5 ± 7.7 <i>e</i>	155.3 ± 7.6 <i>e</i>	243.5 ± 18.1 <i>e</i>
<b>Te</b>	186.8 ± 11.3 <i>e</i>	254.9 ± 17.2 <i>f</i>	127.4 ± 11.1 <i>c</i>	173.9 ± 18.3 <i>ac</i>
<b>Ch</b>	99.7 ± 4.6 <i>f</i>	145.4 ± 7.2 <i>g</i>	65.4 ± 5.0 <i>f</i>	125.1 ± 11.5 <i>f</i>
<b>Ma</b>	131.7 ± 1.9 <i>g</i>	229.2 ± 3.5 <i>a</i>	85.5 ± 7.4 <i>g</i>	146.6 ± 15.3 <i>a</i>
<b>Pa</b>	223.4 ± 2.3 <i>h</i>	309.9 ± 11.4 <i>h</i>	159.1 ± 4.3 <i>e</i>	224.6 ± 33.4 <i>e</i>
<b>PB</b>	218.5 ± 9.0 <i>h</i>	298.5 ± 15.8 <i>h</i>	169.1 ± 13.4 <i>b</i>	143.2 ± 19.6 <i>af</i>

<sup>a</sup> Todos los resultados se expresan en mg trolox/g bs. Variedades: CS, Cabernet Sauvignon; Ca, Callet; MN, Manto Negro; Me, Merlot; Sy, Syrah; Te, Tempranillo; Ch, Chardonnay; Ma, Macabeu; Pa, Parellada; PB, Premsal Blanc. Para cada residuo de vinificación, dentro de cada columna las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades.

Se observó un mismo patrón de comportamiento en los resultados de capacidad antioxidante según los métodos CUPRAC y FRAP, seguramente debido a que, conjuntamente con el ABTS, estas dos técnicas tienen el mismo mecanismo de acción basado en la transferencia de electrones. Mientras el orujo de la variedad *Tempranillo* alcanzó de nuevo los valores más altos ( $272.6 \pm 13.7$  mg trolox/g bs y  $141.4 \pm 7.1$  mg trolox/g bs, respectivamente para CUPRAC y FRAP), el de la variedad *Macabeu* presentó el menor potencial antioxidante de entre las variedades en estudio ( $p < 0.05$ ), siendo del orden de  $\sim 2.7$  veces menor que para el *Tempranillo*, según ambos métodos.

Al tratar los resultados del ORAC se detectaron algunas diferencias con respecto a la tendencia general descrita por el ABTS, CUPRAC y/o FRAP. Dicha discrepancia puede deberse precisamente al diferente mecanismo químico del ORAC, basado en la capacidad de los antioxidantes de la muestra a actuar como donadores de hidrógeno, en lugar de electrones. Los valores ORAC del orujo oscilaron entre  $58.1 \pm 7.6$  mg trolox/g bs y  $131.8 \pm 7.7$  mg trolox/g bs. En este análisis, fueron los orujos de las variedades *Callet* y *Parellada*, los que mostraron una mayor capacidad antioxidante, mientras que los de *Macabeu* y *Premsal Blanc* presentaron el potencial más bajo ( $p < 0.05$ ).

En general, al igual que en el análisis de fenólicos totales, independientemente de la técnica analítica utilizada, el orujo de las variedades tintas presentó una mayor capacidad antioxidante que el de las blancas ( $p < 0.05$ ). No obstante, cabe exceptuar el caso de la variedad *Parellada*, cuyo potencial antioxidante fue significativamente elevado al compararlo con el resto de variedades blancas ( $p < 0.05$ ). De hecho, según los métodos FRAP y ORAC, la variedad *Parellada* no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con respecto a la capacidad antioxidante del orujo de las variedades tintas *Callet* y/o *Tempranillo*.

Un análisis de la bibliografía sobre la capacidad antioxidante de los residuos de vinificación, pone de manifiesto la dificultad para comparar los diversos estudios, principalmente debido al uso de diferente metodología en su evaluación (ABTS, CUPRAC, DPPH, FRAP, ORAC, TRAP, entre otros) y a la falta de estandarización de la misma en lo que respecta al estándar de calibración utilizado (trolox, vitamina C, vitamina E), las unidades de referencia (extracto polifenólico o materia prima, base húmeda o base seca) y/o la materia prima de referencia (uva, orujo o pieles y pepitas por separado). Adicionalmente, la diferente variedad, añada y origen geográfico de las muestras, así como la metodología de extracción aplicada, son factores determinantes en los resultados de capacidad antioxidante. Pese a todo ello e independientemente de la variedad de uva y técnica analítica considerada, los resultados experimentales de capacidad antioxidante del orujo fueron del mismo orden de magnitud que los descritos previamente en la literatura (**Tabla 4.30**).

Alonso *et al.* (2002) mostró intervalos de capacidad antioxidante para el orujo de variedades blancas y tintas que concuerdan con los resultados experimentales del presente estudio, pese a que el valor de ABTS indicado por dichos autores para el orujo

de la variedad *Tempranillo* fuese ~ 1.4 veces menor. En el caso del orujo de *Chardonnay*, los resultados experimentales del ORAC fueron, tal y como cabría esperar, intermedios entre los valores de capacidad antioxidante citados por Yilmaz *et al.* (2004) para la piel y pepitas de la misma variedad. Por su parte, Rockenbach *et al.* (2011) publicaron valores de ABTS y FRAP para el orujo de *Cabernet Sauvignon* y *Merlot*, entre 1.3 – 3.3 veces menores que los observados para las dos variedades tintas contempladas en este estudio.

**Tabla 4.30.** Capacidad antioxidante del orujo. Revisión bibliográfica.

Capacidad antioxidante <sup>a</sup>	Técnica analítica	Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada)	Referencia bibliográfica
50.1 – 187.7 125.1		<b>C. Sauvignon</b> <b>Syrah</b>		
125.1 – 137.7 62.6	ABTS	<b>Tempranillo</b> <b>Moscateil</b>	Jerez de la Frontera, España, 2000	Alonso <i>et al.</i> (2002)
50.1 – 62.6		<b>Palomino Fino</b> <b>Chardonnay</b>		
25.7 ± 1.8 <sup>b</sup>				
112.8 ± 18.5 <sup>c</sup> 17.5 ± 8.3 <sup>b</sup> 68.3 ± 10.8 <sup>c</sup>	ORAC	<b>Merlot</b>	Georgia, EE.UU.	Yilmaz <i>et al.</i> (2004)
162.0	DPPH	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España	Llobera <i>et al.</i> (2007)
20.3 ± 1.6 <sup>d</sup> 89.9 ± 1.7 <sup>d</sup>	ABTS	<b>Coudere</b> <b>Pinot Gris</b>	Santa Catarina, Brasil	Cataneo <i>et al.</i> (2008)
173.0	DPPH	<b>Premisal Blanc</b>	Mallorca, España	Llobera <i>et al.</i> (2008)
16.5 – 101.0	ABTS	<b>Ancelota</b>		
54.7 – 186.9	FRAP		Santa Catarina, Brasil, 2006	Rockenbach <i>et al.</i> (2008)
9.3 – 119.2	ABTS	<b>Tannat</b>		
50.5 – 171.4	FRAP			
131.4 ± 7.0	FRAP	<b>Vitis vinifera</b>	Ciudad Real, España	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008a)
71.1 ± 6.0	ABTS	<b>Airén</b>	Ciudad Real, España.	Sánchez-Alonso <i>et al.</i> (2008b)
116.6 ± 10.8	FRAP			
250.3	ORAC	<b>Sunbelt<sup>e</sup></b>	Arkansas, EE.UU., 2006	Monrad <i>et al.</i> (2010)
121.5 ± 0.9 62.4 ± 0.5	ABTS FRAP	<b>C. Sauvignon</b>		
126.5 ± 1.2	DPPH		Santa Catarina, Brasil, 2008	Rockenbach <i>et al.</i> (2011)
79.6 ± 0.5	ABTS	<b>Merlot</b>		
42.4 ± 0.2	FRAP			
82.2 ± 0.8	DPPH			

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg trolox/g bs; <sup>b</sup> resultados para pieles; <sup>c</sup> resultados para pepitas; <sup>d</sup> los resultados se expresan en mg trolox/g extracto; <sup>e</sup> *Vitis labrusca*.

Aunque el método DPPH no se consideró en la evaluación de la capacidad antioxidante del orujo, su mecanismo de acción es el mismo que el utilizado por el ABTS, CUPRAC y FRAP, con lo que puede resultar de interés establecer las comparaciones oportunas con los resultados descritos por otros autores. Por ejemplo, el valor de DPPH publicado para el orujo de *Premisal Blanc* (173 mg trolox/g bs) (Llobera and Cañellas, 2008) fue 1.8, 1.2 y 2.5 veces mayor que los correspondientes resultados experimentales de ABTS, CUPRAC y FRAP, respectivamente, para el orujo de la misma variedad. Por otra parte, al considerar los trabajos de Llobera *et al.* (2007) y Rockenbach *et al.* (2011) sobre el potencial antioxidante de los orujos de variedades tintas según el método DPPH, sus resultados coinciden con los valores experimentales de ABTS y FRAP de las variedades *Callet* y *Tempranillo*.

Los resultados experimentales de capacidad antioxidante del raspón se indican en la **Tabla 4.29**. Con respecto al método ABTS, fue la variedad *Callet* la que mostró el mayor potencial antioxidante ( $253.2 \pm 14.8$  mg trolox/g bs), concretamente  $\sim 2.5$  veces superior al del raspón de la variedad *Chardonnay*, que presentó el valor ABTS más bajo ( $99.7 \pm 4.6$  mg trolox/g bs). Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre variedades. Sin embargo, no se observaron ( $p > 0.05$ ) al considerar las blancas y tintas de forma independiente. Cabe destacar que, del mismo modo que para los análisis de fenólicos y taninos totales, cuatro de las cinco variedades cuyos raspones presentaron las mayores capacidades antioxidantes determinadas por el método ABTS fueron variedades autóctonas. Únicamente el raspón de *Syrah* se entremezcló entre sus valores, siguiendo el conjunto la secuencia *Callet* > *Parellada* = *Premisal Blanc* > *Syrah* = *Manto Negro*. Por su parte, el raspón de las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Macabeu*, *Merlot* y *Tempranillo*, presentó valores intermedios de capacidad antioxidante según el método ABTS.

Dado que cada técnica de capacidad antioxidante se basa en un sistema químico y/o reacción diferentes, el valor del potencial antioxidante de cada muestra cambia en función de la técnica aplicada (Pellegrini *et al.*, 2003). La capacidad antioxidante del raspón de las 10 variedades consideradas osciló entre  $145.4 \pm 7.2$  y  $378.6 \pm 16.2$  mg trolox/g bs para el análisis CUPRAC, y entre  $65.4 \pm 5.0$  y  $170.1 \pm 16.8$  mg trolox/g bs para el FRAP. Del mismo modo que para el ABTS, para los métodos CUPRAC y FRAP, los raspones de *Callet* y *Chardonnay* mostraron, respectivamente, el mayor y menor potencial antioxidante de entre las variedades en

estudio ( $p < 0.05$ ). Incluso, a pesar de observarse algunas diferencias en el orden de los valores, los raspones de las cuatro variedades autóctonas mantuvieron su posición dentro de las cinco variedades con mayor capacidad antioxidante según las técnicas CUPRAC y FRAP. Así pues, al igual que para el orujo, se observó un patrón de comportamiento similar para la capacidad antioxidante del raspón, al determinarla indistintamente por los métodos ABTS, CUPRAC y/o FRAP.

De nuevo, al tratar los resultados del ORAC, se detectaron algunas diferencias con respecto a la tendencia general descrita por los tres análisis anteriores. En este caso, fue el raspón de la variedad *Merlot* el que presentó la menor capacidad antioxidante ( $101.9 \pm 8.5$  mg trolox/g bs), mientras que el de la variedad *Callet* destacó de nuevo significativamente por su mayor potencial ( $282.1 \pm 35.5$  mg trolox/g bs) ( $p < 0.05$ ).

La investigación desarrollada sobre la capacidad antioxidante de los residuos de raspón es escasa (**Tabla 4.31**). Entre dichos estudios, Alonso *et al.* (2002) propuso intervalos del potencial antioxidante del raspón para las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Syrah* y *Tempranillo* utilizando el método ABTS, que concuerdan con los valores obtenidos en el presente estudio para las mismas variedades y utilizando la misma técnica analítica.

Entre los trabajos que aplican el método DPPH para la evaluación de la capacidad antioxidante, cabe destacar el de Llobera *et al.* (2007), que observó un potencial antioxidante de 495 mg trolox/g bs para el raspón de la variedad *Manto Negro*: un valor 2.5, 1.8 y 3.7 veces mayor que los resultados experimentales correspondientes al ABTS, CUPRAC y FRAP, respectivamente, para el raspón de la misma variedad. Por su parte, el valor DPPH descrito por los mismos autores (Llobera and Cañellas, 2008) para el raspón de *Premsal Blanc* fue muy similar a la capacidad antioxidante según el método CUPRAC indicada en la **Tabla 4.29** para la misma variedad.

En general, pese a que ambos subproductos de vinificación mostraron una capacidad antioxidante importante, al comparar los resultados experimentales se observó un mayor potencial en el caso del raspón, independientemente de la técnica analítica utilizada (**Tabla 4.29**). Concretamente, para las variedades *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* y *Premsal Blanc*, la capacidad antioxidante del raspón fue entre un 28 – 148% mayor que la de sus orujos. Cabe destacar principalmente el caso del *Premsal Blanc*, variedad cuyo raspón fue un 133%, 114%, 148% y 128% más activo

que el correspondiente orujo, al evaluar su capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS, CUPRAC, FRAP y ORAC, respectivamente. Se trata de un fenómeno observado previamente en la bibliografía por varios autores. Por ejemplo, Makris *et al.* (2007a) y Llobera *et al.* (2008) caracterizaron los residuos de vinificación de las variedades blancas *Roditis* y *Premsal Blanc*, respectivamente, indicando que los correspondientes raspones presentaban un potencial antioxidante alrededor del 43% y 68% mayor que los orujos. Se han publicado resultados similares para algunas variedades tintas, tales como *Tempranillo*, *Cabernet Sauvignon*, *Syrah* y *Manto Negro*, cuyos raspones mostraron del orden del 30%, 115%, 150% y 200% mayor potencial antioxidante que sus orujos (Alonso *et al.*, 2002; Llobera and Cañellas, 2007).

**Tabla 4.31.** Capacidad antioxidante del raspón. Revisión bibliográfica.

Capacidad antioxidante <sup>a</sup>	Técnica analítica	Variedad	Observaciones (origen geográfico, añada)	Referencia bibliográfica
87.6 – 212.8		<b>C. Sauvignon</b>		
87.6 – 312.9	ABTS	<b>Syrah</b>	Jerez de la Frontera, España, 2000	Alonso <i>et al.</i> (2002)
62.6 – 162.7		<b>Tempranillo</b>		
495	DPPH	<b>Manto Negro</b>	Mallorca, España	Llobera <i>et al.</i> (2007)
315.4 ± 2.5	DPPH	<b>Roditis</b>	Attica, Grecia	Makris <i>et al.</i> (2007a)
290	DPPH	<b>Premsal Blanc</b>	Mallorca, España	Llobera <i>et al.</i> (2008)
530.6 – 610.7 <sup>b</sup>		<b>Mandilaria</b>		
510.6 – 605.7 <sup>b</sup>		<b>Mavrotragano</b>		
372.4 – 457.5 <sup>b</sup>	FRAP	<b>Voidomato</b>	Santorini, Grecia, 2009 y 2010	Anastasiadi <i>et al.</i> (2012)
372.4 – 535.6 <sup>b</sup>		<b>Asyrtiko</b>		
420.5 – 600.7 <sup>b</sup>		<b>Aidani</b>		
441.5 – 450.5 <sup>b</sup>		<b>Athiri</b>		

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg trolox/g bs; <sup>b</sup> los resultados se expresan en mg trolox/g extracto.

Con el objeto de evaluar la uniformidad de la expresión de la capacidad antioxidante de ambos residuos de vinificación en función de las cuatro técnicas analíticas aplicadas, se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Pearson. Todas las posibles combinaciones entre las diferentes metodologías indicaron una correlación positiva, alta y significativa ( $r \geq 0.78$ ,  $p < 0.05$ ), apuntando a que todas ellas proporcionan valores comparables e intercambiables en la caracterización de la capacidad antioxidante de orujos y raspones. Los mejores coeficientes de correlación se observaron entre el ABTS y las técnicas CUPRAC ( $r = 0.98$ ) y FRAP ( $r = 0.96$ ), aunque entre las dos últimas también se manifestó una fuerte correlación ( $r = 0.94$ ). En cuanto

al ORAC, la correlación con el resto de metodologías antioxidantes fue ligeramente inferior ( $0.78 \leq r \leq 0.87$ ,  $p < 0.05$ ). Como ya se ha indicado anteriormente, el hecho de que el ABTS, CUPRAC y FRAP utilicen el mismo mecanismo de acción basado en la transferencia de electrones, y el ORAC, un mecanismo diferente fundamentado en la cesión de hidrógeno, justificaría los distintos niveles de correlación entre sus datos experimentales.

Son diversos los autores que han descrito la correlación existente entre los resultados de capacidad antioxidante evaluados con diferentes metodologías (**Tabla 4.32**). En general, las técnicas ABTS y FRAP se describen como las más altamente correlacionadas ( $r \geq 0.92$ ,  $p < 0.05$ ) en un amplio abanico de extractos de origen vegetal (Pellegrini *et al.*, 2003; Thaipong *et al.*, 2006; Dudonné *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009; Rockenbach *et al.*, 2011).

En cuanto al método CUPRAC, Li *et al.* (2008a) indicaron un coeficiente de correlación con el ABTS para la capacidad antioxidante de pepitas de uva ( $r \geq 0.87$ ,  $p < 0.05$ ), menor que el observado en el presente estudio. Por su parte, al comparar los resultados experimentales de capacidad antioxidante según ABTS y ORAC, el grado de correlación entre los mismos coincidió con la fracción superior de un amplio rango bibliográfico de coeficientes de correlación, que varió de  $r < 0.10$  (Tabart *et al.*, 2009) a  $r = 0.90$  (Zulueta *et al.*, 2009) en función del producto evaluado. Con respecto al FRAP, la correlación experimental observada con el ORAC fue mayor que la descrita por Thaipong *et al.* (2006) y Dudonné *et al.* (2009) para el mismo par de métodos antioxidantes. Zulueta *et al.* (2009) justifican dicha variabilidad en la bibliografía en base a la complejidad de la muestra, dado que ésta puede contener antioxidantes de carácter tanto hidrofílico como lipofílico, afines en un mayor o menor grado a los reactivos de las diferentes metodologías y cuyas cinéticas de reacción pueden ser muy diversas.

Un estudio más detallado de la correlación entre los resultados obtenidos en la caracterización de la fracción fenólica de orujos y raspones, pone de manifiesto una correlación elevada y estadísticamente significativa ( $0.87 \leq r \leq 0.97$ ,  $p < 0.05$ ) entre el contenido de fenólicos totales y la capacidad antioxidante de las muestras, independientemente de la técnica utilizada para su evaluación. De hecho, al comparar los resultados experimentales de la **Tabla 4.18** y la **Tabla 4.29**, se observa que las muestras con mayor contenido de fenólicos totales también presentan los valores más

altos de capacidad antioxidante. Estos resultados se corresponden con la afirmación de que el contenido de fenólicos totales de los extractos de origen vegetal contribuye de forma sustancial a la expresión de su capacidad antioxidante (Alonso *et al.*, 2002; Makris *et al.*, 2007a; Dudonné *et al.*, 2009; Rockenbach *et al.*, 2011).

**Tabla 4.32.** Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de fenólicos totales. Revisión bibliográfica.

$r^a$	Métodos correlacionados	Materia prima	Referencia bibliográfica
0.84 – 0.91	TP <sup>b</sup> – ABTS	Subproductos de vinificación	Alonso <i>et al.</i> (2002)
0.92 – 1.00	ABTS – FRAP	Frutas, verduras y bebidas	Pellegrini <i>et al.</i> (2003)
0.94	TP – ABTS	Alimentos de origen vegetal	Saura-Calixto <i>et al.</i> (2006)
0.99	TP – FRAP		
0.97	ABTS – FRAP	Extractos de guayaba	Thaipong <i>et al.</i> (2006)
0.82	ABTS – ORAC		
0.74	FRAP – ORAC		
0.99	TP – ORAC	Piel y pepitas de uva	Yilmaz <i>et al.</i> (2006)
0.93	TP – FRAP	Subproductos de vinificación	Makris <i>et al.</i> (2007a)
0.55	ABTS – ORAC	Extractos de 15 plantas	Silva <i>et al.</i> (2007)
0.65	TP – ABTS	Pepitas de uva	Li <i>et al.</i> (2008a)
0.50	TP – CUPRAC		
0.87	ABTS – CUPRAC		
0.97	TP – ABTS	Extractos de 30 plantas	Dudonné <i>et al.</i> (2009)
0.91	TP – FRAP		
0.83	TP – ORAC		
0.95	ABTS – FRAP		
0.76	ABTS – ORAC		
0.62	FRAP – ORAC	Pepitas de uva	Maier <i>et al.</i> (2009)
0.92	TP – ABTS		
0.93	TP – FRAP		
< 0.10	ABTS – ORAC	Vino y otras bebidas	Tabart <i>et al.</i> (2009)
0.96	ABTS – ORAC	Zumo de naranja	Zulueta <i>et al.</i> (2009)
0.95	TP – ABTS	Subproductos de soja	Tyug <i>et al.</i> (2010)
0.85	TP – FRAP		
0.70	TP – ABTS	Piel y pepitas de fruta	Babbar <i>et al.</i> (2011)
0.97	TP – ABTS	Orujos de vinificación	Rockenbach <i>et al.</i> (2011)
1.00	TP – FRAP		
0.98	ABTS – FRAP		
0.88	TP – ORAC	Vino	Johnson <i>et al.</i> (2012)

<sup>a</sup> Coeficiente de correlación  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> TP, contenido de fenólicos totales.

Finalmente, cabe indicar que también se observó un coeficiente de correlación positivo entre los resultados experimentales del contenido de taninos totales y capacidad antioxidante de los residuos de vinificación ( $r \geq 0.93$ ,  $p < 0.05$ ), siendo ligeramente menor en el caso del método ORAC ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.05$ ).

### 4.3. EXTRACCIÓN ACUOSA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS ASISTIDA ACÚSTICAMENTE

En este tercer y último bloque de resultados de la presente tesis doctoral se presentan los resultados experimentales obtenidos en el proceso de extracción acuosa de los compuestos fenólicos del orujo asistida mediante ultrasonidos de potencia (US), así como su modelización.

Esta línea de investigación se subdividió en dos fases: en la primera se estimó el efecto de las variables ultrasónicas sobre el proceso de extracción acuosa de orujo fresco (muestra O2) haciendo uso de un plato transductor de ultrasonidos, utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para la modelización; y en la segunda fase, se evaluó la cinética y el efecto de la temperatura en el proceso de extracción acuosa de orujo fermentado (muestra O3) asistido por una sonda de ultrasonidos, utilizando el modelo de Weibull para la identificación paramétrica y simulación matemática.

#### 4.3.1. Experimentos de extracción asistidos mediante un plato transductor de ultrasonidos. Estudio del efecto de la frecuencia y de la potencia de ultrasonidos sobre el proceso

Con el objeto de evaluar el efecto de la frecuencia y la potencia ultrasónica, así como del tiempo de operación, en la extracción acústica de los compuestos fenólicos y flavonoles del orujo, y en la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM). Para ello, se utilizó un diseño experimental tipo Box-Behnken (BBD) de tres variables, con tres niveles experimentales para cada una de ellas, realizando un total de 17 experimentos con cinco réplicas del punto central.

De acuerdo con el diseño Box-Behnken propuesto (**Tabla 3.13**), en la **Tabla 4.33** se presentan los valores experimentales y calculados del contenido de fenólicos y flavonoles totales de los extractos obtenidos para cada experimento, así como de la capacidad antioxidante de los mismos analizada por los métodos CUPRAC y FRAP.

Los valores experimentales obtenidos oscilaron entre 15.37 y 31.87 mg GA/100 g bh para los fenólicos totales, y entre 0.96 y 1.84 mg QE/100 g bh para los flavonoles totales. En cuanto a la capacidad antioxidante de los extractos, los

**Tabla 4.33.** Valores experimentales y calculados del contenido de fenólicos y flavonoles totales, y de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la extracción acuosa de orujo asistida por ultrasonidos de potencia.

Experimento	Fenólicos totales <sup>a</sup>		Flavonoles totales <sup>b</sup>		CUPRAC <sup>c</sup>		FRAP <sup>c</sup>	
	Experimental	Calculado	Experimental	Calculado	Experimental	Calculado	Experimental	Calculado
1	17.29 ± 0.63	17.56	1.01 ± 0.00	1.04	32.45 ± 0.77	32.09	21.22 ± 1.79	21.33
2	24.10 ± 1.47	24.11	1.55 ± 0.00	1.62	40.80 ± 4.20	40.64	33.85 ± 2.43	34.84
3	26.22 ± 1.07	24.78	1.68 ± 0.01	1.59	45.44 ± 2.10	43.14	37.93 ± 1.73	34.65
4	18.28 ± 0.52	19.50	1.16 ± 0.02	1.18	32.00 ± 2.92	33.78	24.83 ± 1.79	24.81
5	20.67 ± 1.21	19.50	1.31 ± 0.04	1.18	39.51 ± 1.33	33.78	27.30 ± 2.96	24.81
6	17.23 ± 0.63	17.51	0.96 ± 0.01	1.06	32.21 ± 2.81	31.70	19.48 ± 2.63	20.59
7	21.82 ± 0.48	21.54	1.16 ± 0.03	1.06	32.90 ± 4.28	33.41	23.96 ± 3.44	22.85
8	20.93 ± 0.71	19.50	1.18 ± 0.00	1.18	32.36 ± 2.96	33.78	26.33 ± 1.22	24.81
9	21.68 ± 1.40	23.12	1.24 ± 0.00	1.33	33.74 ± 0.43	36.04	23.38 ± 1.76	26.66
10	25.42 ± 1.67	25.16	1.59 ± 0.00	1.57	43.35 ± 2.68	43.71	33.01 ± 3.99	32.90
11	17.90 ± 1.37	19.07	1.33 ± 0.00	1.32	31.75 ± 1.20	34.56	23.01 ± 1.68	25.18
12	21.03 ± 1.74	19.50	1.21 ± 0.02	1.18	34.84 ± 1.99	33.78	25.90 ± 2.07	24.81
13	18.44 ± 1.27	18.43	1.44 ± 0.00	1.37	31.68 ± 2.47	31.83	25.58 ± 1.38	24.59
14	16.59 ± 1.26	19.50	1.01 ± 0.00	1.18	30.19 ± 1.63	33.78	19.68 ± 2.22	24.81
15	31.87 ± 1.95	30.70	1.84 ± 0.01	1.85	50.69 ± 1.72	47.88	41.17 ± 3.73	39.01
16	25.79 ± 2.32	27.22	1.72 ± 0.02	1.74	43.46 ± 3.58	45.91	35.80 ± 1.56	38.08
17	15.37 ± 0.82	13.94	0.98 ± 0.04	0.95	27.94 ± 1.18	25.49	18.54 ± 3.07	16.26

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en mg GA/100 g bh; <sup>b</sup> los resultados se expresan en mg QE/100 g bh; <sup>c</sup> los resultados se expresan en mg trolox/100 g bh.

resultados comprendieron valores desde 27.94 hasta 50.69 mg trolox/100 g bh y desde 18.54 hasta 41.17 mg trolox/100 g bh, para los análisis CUPRAC y FRAP, respectivamente.

De entre los 17 experimentos realizados, los extractos con mayor contenido de fenólicos y flavonoles totales, así como mayor capacidad antioxidante determinada por ambas técnicas, fueron los obtenidos bajo las condiciones de 40 kHz de frecuencia, 100 W/L de potencia y 25 min de extracción (experimento 15).

#### ***4.3.1.1. Modelización mediante metodología de superficie de respuesta***

A partir de los resultados experimentales obtenidos se construyó la base de datos para el análisis por RSM. Los coeficientes de regresión de los modelos matemáticos correspondientes a la extracción de fenólicos totales, flavonoles totales y capacidad antioxidante del orujo, en función de la frecuencia de US ( $X_1$ ), la potencia de US ( $X_2$ ) y el tiempo de extracción ( $X_3$ ) se recogen en la **Tabla 4.34**. Con la finalidad de evaluar el grado de significación y la bondad del ajuste de los modelos de regresión lineal múltiple generados por la RSM, también se incluyen en la **Tabla 4.34** los resultados del correspondiente análisis de varianza (ANOVA).

Tal y como puede observarse, en general, los modelos obtenidos para la extracción de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante fueron significativos ( $p < 0.05$ ) (**Tabla 4.34**,  $p$ -value de Fisher). Los modelos de regresión lineal múltiple generados por aplicación de la RSM están constituidos por tres componentes que determinan el orden de los mismos: un componente lineal, un componente cuadrático y un componente de interacción lineal. A excepción del caso de los flavonoles, únicamente el componente lineal de los modelos formulados en el presente estudio fue significativo ( $p < 0.01$ ). En base a ello, cabría esperar que el modelo desarrollado para cada respuesta fuera una función lineal o de primer orden. No obstante, a partir del análisis del test de Fisher aplicado a los coeficientes de regresión y de la representación de las superficies de respuesta, se observó que el término cuadrático de la frecuencia era significativo ( $p < 0.05$ ) en todos los casos. De modo que los modelos desarrollados para todas y cada una de las cuatro respuestas en estudio pueden considerarse funciones cuadráticas o bien modelos de segundo orden (ecuación [4.1]) del tipo:

$$[4.1]$$

Se considera que un modelo se ajusta a los datos experimentales, cuando presenta un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) próximo a la unidad y una falta de ajuste (LOF) no significativa ( $p > 0.05$ ) (Bezerra *et al.*, 2008). Los coeficientes de regresión de los cuatro modelos formulados tomaron valores  $r^2 \geq 0.861$ , pudiendo afirmarse que explican más del 86% de la varianza. En cuanto al análisis de la falta de ajuste (LOF), tal y como puede observarse en la **Tabla 4.34**, ésta no fue significativa ( $p > 0.05$ ) para ninguno de los modelos matemáticos formulados, indicando su capacidad e idoneidad para predecir la variación de las respuestas en el sistema considerado.

**Tabla 4.34.** Coeficientes de regresión y parámetros estadísticos de los modelos matemáticos obtenidos por RSM correspondientes a la extracción de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante del orujo con aplicación de ultrasonidos de potencia.

Término	Coeficientes de regresión del modelo <sup>a</sup>			
	Fenólicos totales	Flavonoles totales	CUPRAC	FRAP
$\delta_0$	19.50250 ***	1.17532 ***	33.78076 ***	24.80796 ***
$\delta_1 X_1$	-1.48607 <i>ns</i>	-0.06829 <i>ns</i>	-1.12831 <i>ns</i>	-0.89322 <i>ns</i>
$\delta_2 X_2$	2.31367 *	0.19721 **	4.67847 **	4.89127 **
$\delta_3 X_3$	4.32863 ***	0.19347 **	5.53193 **	6.02099 **
$\delta_{11} X_1^2$	3.08883 *	0.27151 **	4.78462 *	5.26561 *
$\delta_{22} X_2^2$	0.06288 <i>ns</i>	-0.06588 <i>ns</i>	0.18091 <i>ns</i>	-1.18949 <i>ns</i>
$\delta_{33} X_3^2$	0.48568 <i>ns</i>	0.09326 <i>ns</i>	0.16503 <i>ns</i>	0.82880 <i>ns</i>
$\delta_{12} X_1 X_2$	1.29619	0.07972	0.84579	1.76997
$\delta_{13} X_1 X_3$	-1.80693	-0.04432	-2.49259	-1.18902
$\delta_{23} X_2 X_3$	0.52832	0.14253	1.57258	2.72428
Idoneidad del modelo				
<i>p</i> (valor de Fisher)	0.006	0.004	0.025	0.012
$r^2$	0.910	0.922	0.861	0.890
<i>p</i> (LOF) <sup>b</sup>	0.493	0.356	0.477	0.306

<sup>a</sup> Diferencias significativas a \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup> LOF, falta de ajuste; *ns*, diferencias no significativas. Coeficientes de regresión:  $\delta_i$ , del componente lineal;  $\delta_{ii}$ , del componente cuadrático;  $\delta_{ij}$ , del componente de interacción. Variables:  $X_1$ , frecuencia acústica;  $X_2$ , potencia acústica;  $X_3$ , tiempo de extracción.

Para una mejor validación de los modelos propuestos, se compararon los valores experimentales ( $X_{\text{exp}}$ ) y los calculados ( $X_{\text{calc}}$ ) en base a los parámetros estadísticos ‘adequate precision’ (AP, ecuación [3.17]) y error relativo medio (ERM, ecuación [3.18]). El parámetro AP determina la relación existente entre las respuestas calculadas

y el error residual del diseño experimental. Cuando toma valores superiores a 4 se considera que el error residual del conjunto de datos es lo suficientemente pequeño con respecto a los valores calculados, como para que el modelo pueda predecir satisfactoriamente las respuestas en la zona experimental o de operación (Noordin *et al.*, 2004). En el presente estudio, los valores de AP fueron 13.3, 11.8, 9.7 y 10.4 para los resultados de contenido en compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante (CUPRAC y FRAP), respectivamente, denotando en todos los casos un ratio señal/ruido superior a 4.

Por su parte, el parámetro ERM permite evaluar la precisión del modelo, debiendo presentar valores lo menores posible (Bas and Boyaci, 2007). En el presente estudio, el ERM fue 5.1%, 4.8%, 5.1% y 7.0% para los resultados de contenido de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante (CUPRAC y FRAP), respectivamente, confirmando nuevamente la bondad de los modelos propuestos.

En base a los resultados obtenidos en el ANOVA y para el coeficiente de correlación, la falta de ajuste, el AP y el ERM, puede concluirse que los modelos formulados para la extracción acuosa asistida por US de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante del orujo, explican satisfactoriamente el comportamiento del sistema, presentan un buen ajuste de los resultados experimentales a la ecuación de segundo orden [4.1] y pueden, en definitiva, utilizarse para la predicción de las respuestas por interpolación en el dominio experimental considerado.

Los términos de cada uno de los componentes de los modelos de regresión fueron analizados estadísticamente, para determinar aquéllos que afectan de forma significativa a las respuestas. De acuerdo con el test de Fisher, las variables potencia y tiempo de extracción manifestaron un efecto lineal sobre los cuatro factores de respuesta ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente), mientras que la frecuencia de US mostró un efecto cuadrático ( $p < 0.05$ ) (**Tabla 4.34**). Sin embargo, el resto de términos lineales, cuadráticos y de interacción de la ecuación [4.1] no fueron significativos ( $p > 0.05$ ). Contrariamente a los resultados obtenidos, Ghafoor *et al.* (2009b) y Yang *et al.* (2010) indicaron que ambos términos del tiempo de extracción, lineal y cuadrático, eran significativos en la EAU de fenólicos de pepitas de uva y de flavonoides de flores *Citrus aurantium*, respectivamente. Además, Chen *et al.* (2011) indicaron un impacto significativo ( $p < 0.01$ ) del término cuadrático de la potencia sobre la EAU de polisacáridos de las pepitas de lichi (*Litchi chinensis* Sonn.). Se deduce así que el papel

que juega cada variable independiente en el proceso de transferencia de materia depende del sistema de extracción y respuestas en estudio (Pinelo *et al.*, 2005).

Con el objeto de evaluar la jerarquía de influencia de los diferentes términos del modelo sobre las respuestas, se hizo uso de los diagramas de Pareto (**Figura 4.17**). En base al grado de significación de los coeficientes de regresión, se observó que el tiempo de extracción es la variable con mayor influencia en la EAU de los compuestos fenólicos del orujo ( $p < 0.001$ ), mientras que los tres términos significativos (término cuadrático de la frecuencia y términos lineales de la potencia y tiempo de extracción) del modelo impactaron de forma equivalente en la EAU de flavonoles ( $p < 0.01$ ). Con respecto a la capacidad antioxidante, el tiempo de extracción fue nuevamente la variable con mayor impacto sobre los resultados de CUPRAC y FRAP, seguida muy de cerca por la potencia ultrasónica ( $p < 0.01$ ). Ello coincide con las observaciones de Ghafoor *et al.* (2009a; 2009b), quienes indicaron que el efecto ejercido por el tiempo de extracción es el más significativo en la EAU de fenólicos y en la capacidad antioxidante de los extractos de piel y pepitas de uva.

Una vez descartados los términos no significativos, se utilizaron el resto de coeficientes de regresión recogidos en la **Tabla 4.34** para la construcción de las ecuaciones matemáticas de los modelos, asumiendo que éstas son las que mejor describen el efecto de las variables del proceso ( $X_1$ , frecuencia acústica;  $X_2$ , potencia acústica;  $X_3$ , tiempo de extracción) sobre los factores de respuesta considerados ( $Y$ ).

[4.2] Fenólicos totales:

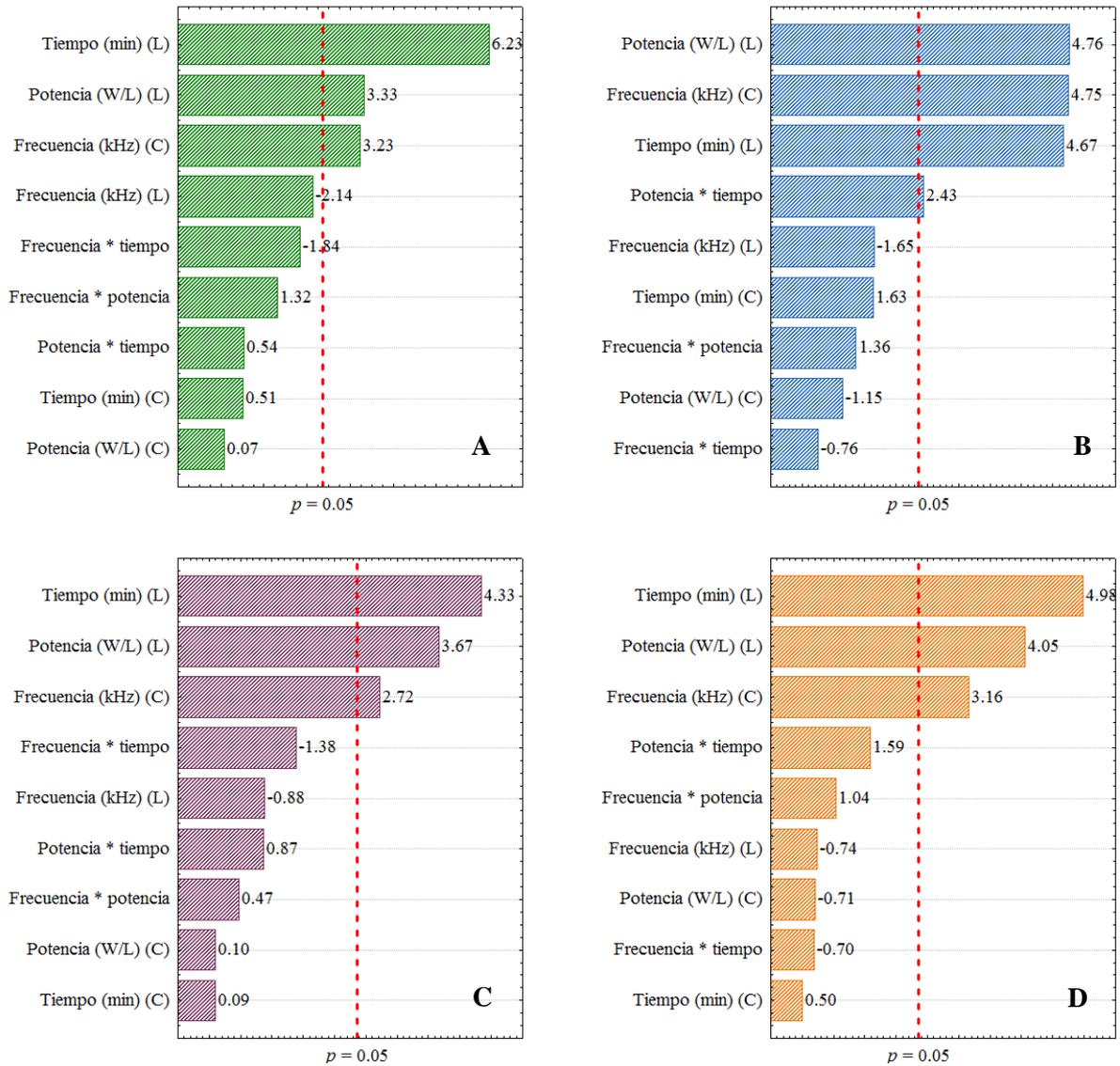
[4.3] Flavonoles:

[4.4] Capacidad antioxidante (ABTS):

[4.5] Capacidad antioxidante (FRAP):

Para ilustrar el comportamiento de las respuestas en función de las variables experimentales, se representaron a partir de dichas ecuaciones ([4.2] a [4.5]) los correspondientes gráficos de contorno (2D) y superficies de respuesta (3D) de los modelos. Ambas representaciones muestran la variación de la respuesta en función de dos de las tres variables consideradas, manteniendo la tercera en el nivel cero o punto

intermedio, siendo éste 80 kHz, 100 W/L y 15 min para la frecuencia, potencia y tiempo de extracción, respectivamente.

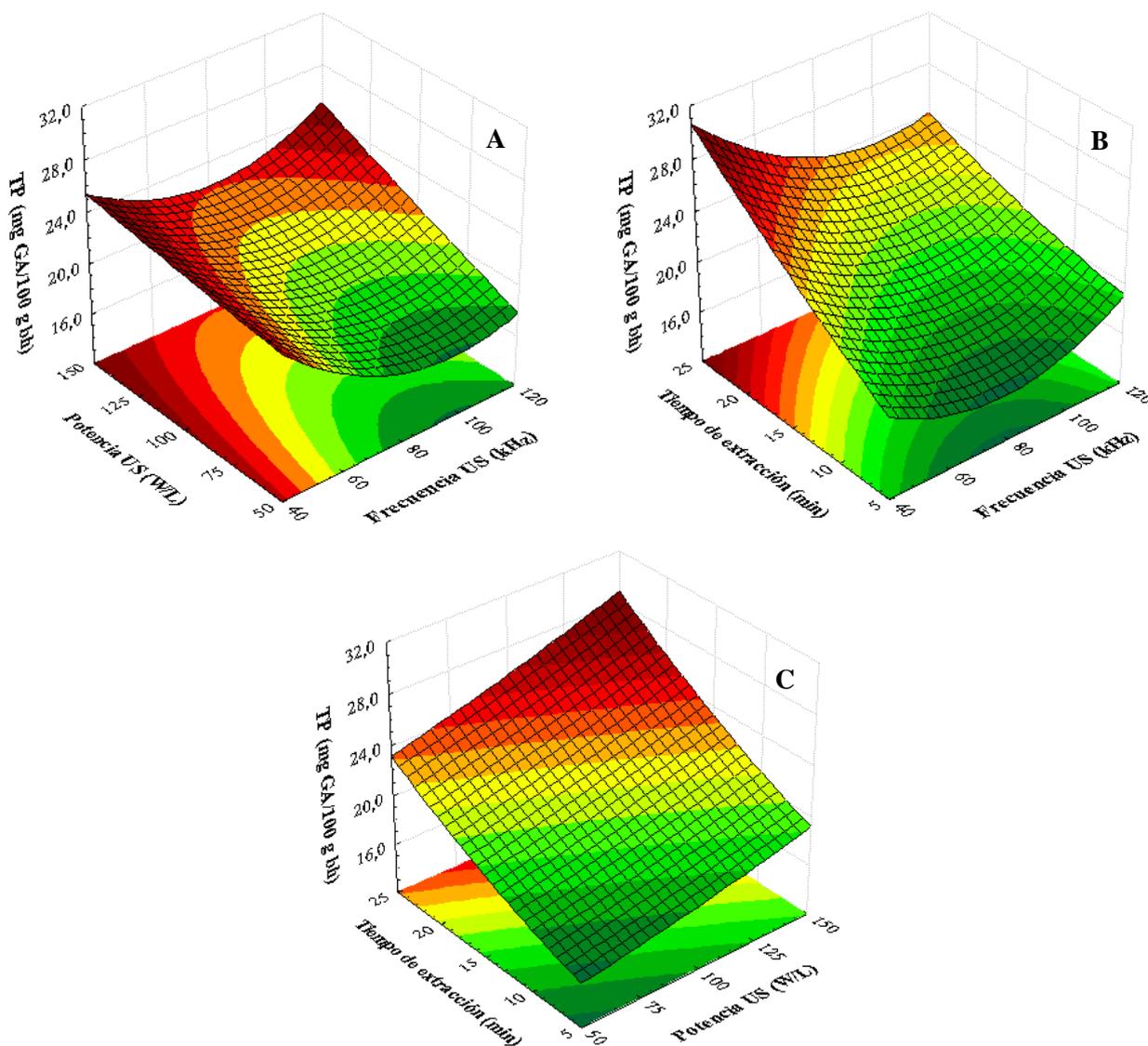


**Figura 4.17.** Diagramas de Pareto para la extracción de compuestos fenólicos (A), flavonoles (B) y capacidad antioxidante, según los métodos CUPRAC (C) y FRAP (D) en función de las variables del proceso. L, término lineal; C, término cuadrático.

#### *Efecto de las variables de extracción sobre los fenólicos totales*

En la **Figura 4.18** se representa el efecto de la frecuencia y potencia acústicas, así como del tiempo de procesado sobre la extracción asistida por US de compuestos fenólicos del orujo. Con respecto al efecto simultáneo de los dos parámetros acústicos (**Figura 4.18A**), se observó un pequeño pero progresivo incremento del rendimiento de extracción al aumentar la potencia de US desde 50 hasta 150 W/L a frecuencias bajas. Este efecto lineal se hizo más notable a medida que la frecuencia aumentaba.

Por su parte, el efecto cuadrático de la frecuencia cambió considerablemente en función de las condiciones de potencia aplicadas. Al trabajar a bajas potencias, se observó una reducción importante de la cantidad de fenólicos totales en el extracto a medida que la frecuencia de US se incrementaba. Por otro lado, al considerar 150 W/L de potencia, la extracción de compuestos fenólicos disminuyó hasta un cierto nivel ( $40 < \text{frecuencia} < 80 \text{ kHz}$ ), para volver a aumentar hasta prácticamente los mismos valores de recuperación de compuestos fenólicos.



**Figura 4.18.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de los compuestos fenólicos del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**).

En base a ello, la mayor extracción de compuestos fenólicos del orujo se observa con la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia a medida que la potencia aumenta. Estos resultados coinciden con las observaciones de Cravotto *et al.* (2008) y Shirsath *et al.* (2012), quienes indicaron que la aplicación de frecuencias acústicas comprendidas en el rango 18 – 40 kHz provocan una cavitación más intensa y, consecuentemente, una mayor transferencia de materia como consecuencia de sus efectos mecánicos sobre el sistema de extracción.

En la **Figura 4.18B** se muestra el comportamiento de la EAU de compuestos fenólicos del orujo cuando se varía simultáneamente la frecuencia y el tiempo de extracción. El efecto de la frecuencia de los US sobre el proceso de extracción de los compuestos fenólicos se modificó considerablemente al incrementar el tiempo de extracción de 5 a 25 min. Mientras que a tiempos largos, el contenido de fenólicos totales de los extractos disminuye progresivamente a medida que se aumenta la frecuencia acústica; a tiempos cortos, los compuestos fenólicos extraídos alcanzan un valor mínimo a 70 – 80 kHz, para volver a incrementarse de forma directamente proporcional con la frecuencia. Dado que el efecto lineal del tiempo de extracción es mayor a 40 kHz que a 120 kHz, las condiciones experimentales para lograr una mayor extracción de compuestos fenólicos del orujo comprenden la aplicación de US a la frecuencia más baja durante tiempos moderado-largos.

En cuanto a la representación del contenido de compuestos fenólicos extraídos en función de la potencia acústica y del tiempo de extracción, la **Figura 4.18C** indica el máximo rendimiento para los niveles más altos en estudio de ambas variables. Tal y como puede observarse, a 150 W/L de potencia acústica, un incremento del tiempo de extracción provocó un aumento lineal del contenido de fenólicos totales de los extractos desde 19 hasta 28 mg GA/100 g bh.

A partir de las superficies de respuesta de la **Figura 4.18**, puede concluirse que la aplicación de una baja frecuencia en combinación con una potencia acústica y un tiempo de operación de moderado a elevado, serían las condiciones más favorables para la extracción acústica de compuestos fenólicos del orujo.

Los resultados experimentales obtenidos pueden compararse con los publicados en la literatura para la extracción acústica (baño de US, 40 kHz) de compuestos fenólicos a partir de piel (Ghafoor and Choi, 2009a) y pepitas de uva (Ghafoor *et al.*, 2009b), variando la concentración de EtOH del disolvente (40 – 60%), la temperatura

de trabajo (30 – 60 °C) y el tiempo de operación (15 – 30 min). Concretamente, en el presente estudio se obtuvo entre un 25 y un 38% de la cantidad de compuestos fenólicos extraídos por Ghafoor *et al.* (2009a; 2009b) a partir de piel y pepitas de uva, utilizando tiempos de extracción muy similares, pero agua como disolvente y una temperatura considerablemente menor. Al comparar los resultados experimentales con los descritos por Casazza *et al.* (2010) para la EAU (21.5 kHz, 60 W) de compuestos fenólicos de piel de uva tinta durante un total de 60 min, usando metanol como disolvente de extracción y trabajando a 25 °C, se observó que el sistema de extracción acústica propuesto en el presente estudio es capaz de extraer ~ 12% del total indicado por dichos autores, sin utilizar disolventes orgánicos y trabajando a menor temperatura y durante menos tiempo.

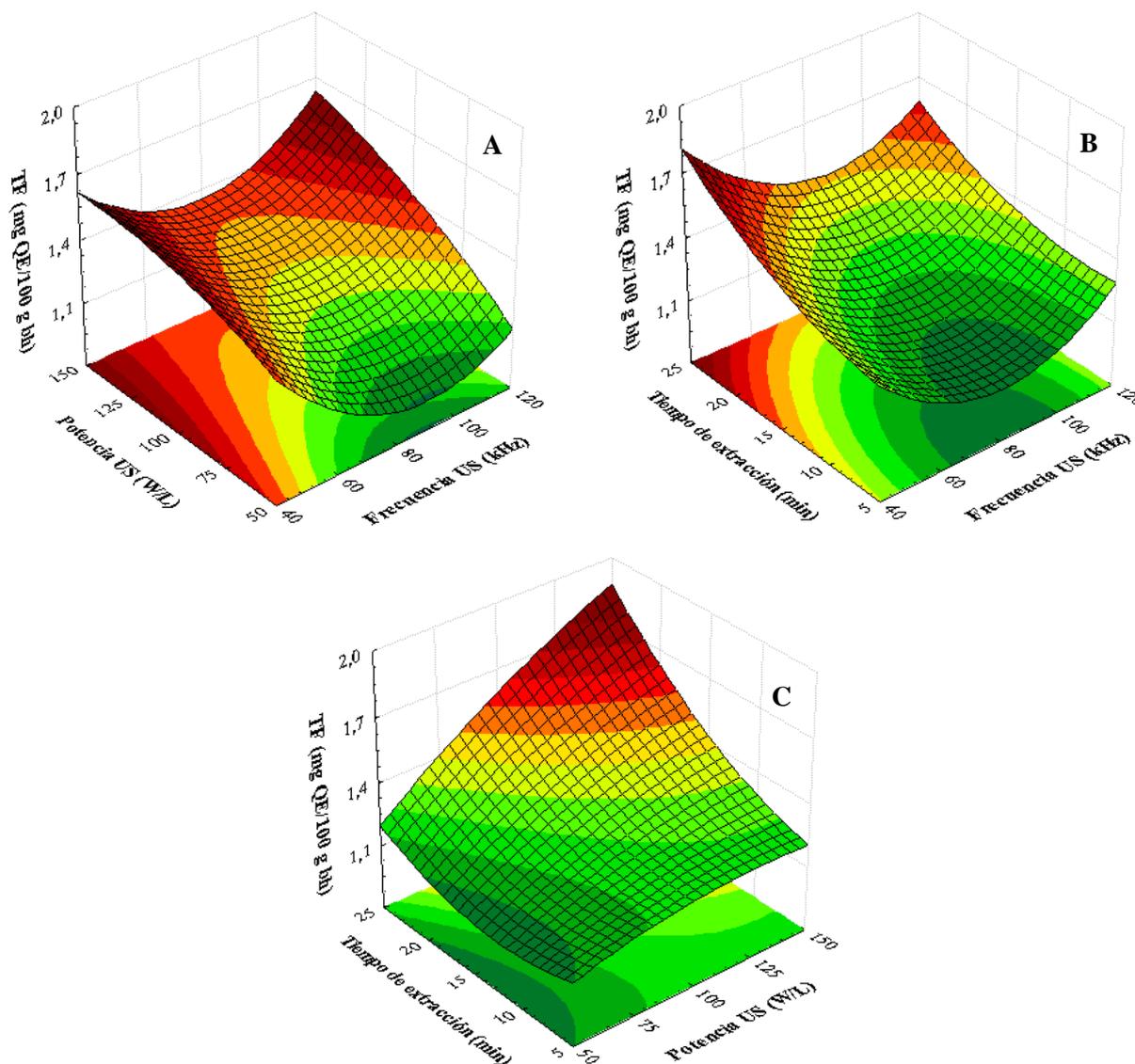
Desde un punto de vista medioambiental y económico, estas comparaciones ponen de manifiesto la posibilidad e interés de introducir en la industria alimentaria sistemas de extracción acústica de compuestos fenólicos de origen vegetal utilizando agua como disolvente, dados los aceptables porcentajes de extracción obtenidos con respecto a las extracciones orgánicas trabajando a menor temperatura y con tratamientos más cortos, evitando así la necesidad de costosos post-tratamientos para la eliminación de los disolventes orgánicos.

#### *Efecto de las variables de extracción sobre los flavonoles totales*

La extracción acústica de flavonoles del orujo presentó un comportamiento similar al observado para los compuestos fenólicos, aunque mostrando ciertas peculiaridades (**Figura 4.19**). Contrariamente al modelo propuesto para la extracción de los compuestos fenólicos, la componente cuadrática del modelo desarrollado para el contenido de flavonoles fue significativa ( $p < 0.01$ ). Por esta razón, aunque los términos cuadráticos de la potencia acústica y del tiempo de extracción no fueran significativos, ambas variables no presentaron un efecto completamente lineal.

Los resultados correspondientes al estudio del efecto de la frecuencia y potencia acústicas indicaron que, a baja potencia, un incremento de la frecuencia de los US aplicados incidía menos negativamente sobre la extracción de flavonoles que de fenólicos totales, dado que la disminución del rendimiento de extracción de los flavonoles bajo dichas condiciones no fue tan brusca (**Figura 4.19A**). No obstante, al aumentar la potencia, se observó el mismo efecto cuadrático de la frecuencia previamente explicado en el caso de los fenólicos totales. Por su parte, para cualquier

frecuencia acústica considerada, el contenido de flavonoles de los extractos aumentó progresivamente con la potencia de US.



**Figura 4.19.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de los flavonoles del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**).

En la **Figura 4.19B** se representa el efecto combinado de la frecuencia ultrasónica y del tiempo de operación sobre la extracción acústica de flavonoles del orujo. Tal y como puede observarse, un incremento gradual de la frecuencia provocó una disminución del contenido de flavonoles de los extractos hasta un mínimo a frecuencias de 80 – 90 kHz, seguida de un aumento moderado del rendimiento de

extracción a frecuencias superiores. Por otro lado, el tiempo de operación presentó una relación directamente proporcional con la extracción de flavonoles del orujo, independientemente de la frecuencia acústica considerada.

La superficie de respuesta que representa el efecto de la potencia y del tiempo sobre la extracción acústica del contenido de flavonoles del orujo mostró, al igual que en el caso de los compuestos fenólicos totales, mayores rendimientos al incrementar ambas variables (**Figura 4.19C**), manifestando, no obstante, un cierto efecto cuadrático. Conjuntamente, las condiciones experimentales para una mayor extracción acuosa de los flavonoles del orujo en un sistema asistido por US fueron las mismas propuestas en el caso de los fenólicos totales.

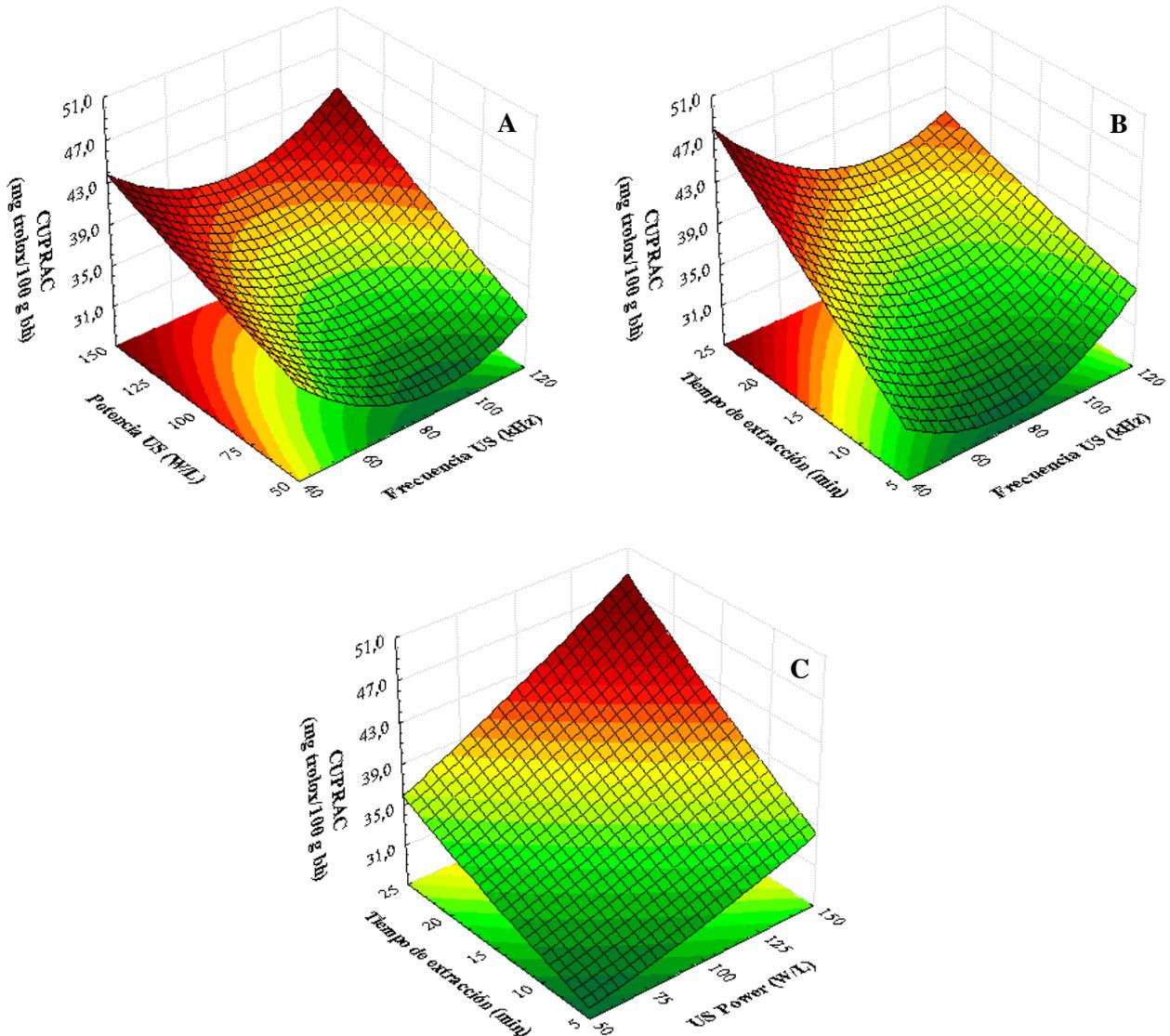
#### *Efecto de las variables de extracción sobre la capacidad antioxidante*

La capacidad antioxidante de los extractos de origen vegetal está altamente asociada con su contenido en compuestos fenólicos (González-Centeno *et al.*, 2012). De hecho, los coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de fenólicos totales de los extractos obtenidos en el presente estudio y su capacidad antioxidante según los métodos CUPRAC y FRAP fueron 0.94 y 0.95 ( $p < 0.05$ ), respectivamente. Por dicha razón, las superficies de respuesta que representan el efecto de las variables experimentales sobre la capacidad antioxidante de los extractos son similares a las obtenidas para la extracción acústica de los compuestos fenólicos.

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, según el método CUPRAC, aumentó linealmente con la potencia acústica aplicada, independiente de la frecuencia de US (**Figura 4.20A**). Al mismo tiempo, se pone de manifiesto el efecto cuadrático de la frecuencia con un mínimo en la capacidad antioxidante a 90 kHz.

Atendiendo a la **Figura 4.20B**, se observó un incremento lineal y progresivo de la capacidad antioxidante con el tiempo de extracción, dado que un mayor tiempo de contacto entre el sólido y el disolvente mejora la difusión de los compuestos de interés (Corrales *et al.*, 2009). Este efecto fue más significativo a bajas frecuencias.

En función del tiempo de extracción, el efecto cuadrático de la frecuencia mostró dos comportamientos totalmente distintos: a tiempos cortos, la capacidad antioxidante de los extractos aumentaron ligeramente (de 33 a 36 mg trolox/100 g bh) al variar la frecuencia desde 40 hasta 120 kHz, mientras que al considerar tiempos de extracción más largos los valores CUPRAC disminuyeron (de 48 a 40 mg trolox/100 g bh) (**Figura 4.20B**).



**Figura 4.20.** Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de la capacidad antioxidante del orujo en función de la frecuencia y potencia acústicas (tiempo de extracción = 15 min, **A**); de la frecuencia acústica y tiempo de extracción (potencia de US = 100 W/L, **B**); y de la potencia acústica y tiempo de extracción (frecuencia de US = 80 kHz, **C**).

En la **Figura 4.20C** se muestra el efecto de la potencia acústica y del tiempo de extracción sobre la capacidad antioxidante de los extractos evaluada según el método CUPRAC, observándose claramente un incremento de la misma con ambas variables.

Las superficies de respuesta obtenidas para la capacidad antioxidante de los extractos según los métodos CUPRAC y FRAP presentaron un comportamiento muy similar, seguramente debido a la elevada correlación de los correspondientes datos experimentales ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.05$ ). Es por ello que únicamente se incluyen las superficies de respuesta correspondientes al método CUPRAC. No obstante, cabe

indicar que en el caso del método FRAP, las variables de potencia acústica y tiempo de extracción mostraron un efecto ligeramente cuadrático sobre la capacidad antioxidante de los extractos.

Tal y como se observa en los gráficos de superficie de respuesta (**Figura 4.18**, **Figura 4.19** y **Figura 4.20**), existe un incremento lineal y progresivo del rendimiento de extracción con la potencia acústica aplicada y el tiempo de operación. Por lo que, en próximos trabajos, sería interesante evaluar el comportamiento del sistema para valores más elevados de ambos parámetros. En cualquier caso, el presente estudio pone de manifiesto y materializa la importancia y necesidad de optimizar los parámetros acústicos para mejorar la eficiencia del proceso de extracción, dada su notable influencia sobre el mismo.

#### ***4.3.1.2. Optimización de las condiciones de extracción***

Cuando son varias las respuestas evaluadas en un mismo proceso, es necesario alcanzar un compromiso de condiciones óptimas para todas ellas (Krishnaswamy *et al.*, 2013). La función de deseabilidad es una de las más utilizadas en la optimización estadística de procesos multi-respuesta. Esta herramienta permite calcular las condiciones óptimas del proceso para una máxima expresión de todas las respuestas consideradas, así como sus valores bajo dichas condiciones. La función de deseabilidad toma valores en una escala de 0 a 1, en la que el cero indica una respuesta totalmente disconforme con la meta deseada y la unidad manifiesta una conformidad total alcanzando la mejor respuesta conjunta posible (Strati and Oreopoulou, 2011). En el presente estudio, se obtuvo un valor global de deseabilidad de 0.92 para la EAU de fenólicos y flavonoles totales y capacidad antioxidante del orujo, aplicando una frecuencia acústica de 40 kHz y una potencia de ultrasonidos de 150 W/L durante un periodo de 25 min. Bajo estas condiciones óptimas, el sistema de extracción utilizado sería capaz de alcanzar una máxima extracción de compuestos fenólicos y flavonoles, valorada en 32.31 mg GA/100 g bh y 2.04 mg QE/100 g bh, respectivamente. En lo que respecta a la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos bajo dichas condiciones, los valores máximos estimados fueron 53.47 and 43.66 mg trolox/100 g bh, según los métodos CUPRAC y FRAP, respectivamente. Cabe indicar que al considerar los factores de respuesta individualmente, las condiciones óptimas de extracción fueron exactamente las mismas.

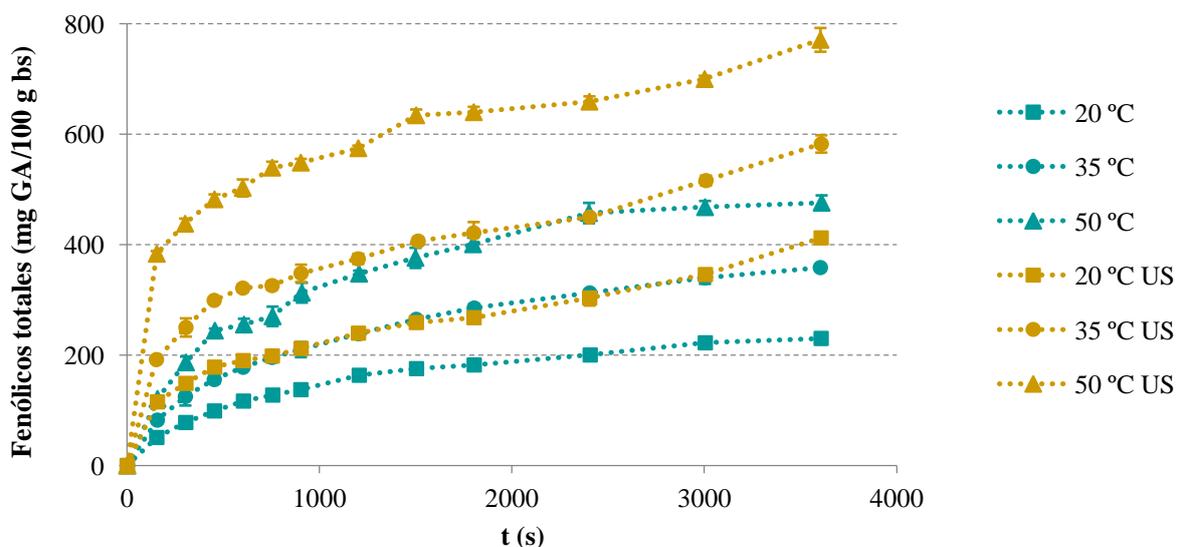
El nivel de frecuencia óptimo estimado es similar a las condiciones acústicas propuestas en la bibliografía para la extracción asistida por US de compuestos bioactivos a partir de subproductos de origen vegetal. Novak *et al.* (2008) aplicaron energía acústica a la extracción de flavonoides de la piel de uva tinta utilizando un baño de ultrasonidos a 35 kHz de frecuencia durante 1h. Por otro lado, Cho *et al.* (2006) llevaron a cabo la extracción de resveratrol del raspón aplicando US de 47 kHz de frecuencia, a una potencia de 14 W/L (volumen total no especificado) durante 15 min. Y Ghafoor *et al.* (2009a) optimizaron la extracción acústica de compuestos fenólicos y antioxidantes de la piel de uva tinta, utilizando un baño de ultrasonidos a la frecuencia de 40 kHz hasta un tiempo máximo de 25 min. En cuanto al tiempo de extracción, según Shirsath *et al.* (2012), valores comprendidos entre 15 y 25 min se encuentran dentro del rango recomendado en la bibliografía para procesos de extracción asistidos por US, al ser tiempos considerablemente menores que los necesarios en una extracción convencional para alcanzar un rendimiento similar.

En la mayoría de referencias bibliográficas que estudian la EAU de materiales de origen vegetal, el volumen total tratado no se especifica. Esta falta de información hace que la densidad de potencia acústica que opera en el sistema no pueda ser calculada, dificultando consecuentemente la comparación entre resultados experimentales. Por ejemplo, Virot *et al.* (2010) trabajaron con una frecuencia de 25 kHz y una potencia de 150 W para la extracción acústica de compuestos fenólicos del orujo de manzana, pero no especificaron el volumen de extracción considerado. Y Ghafoor *et al.* (2009b; 2011) llevaron a cabo la extracción de compuestos fenólicos de pepitas de uva y antocianos de piel de uva tinta utilizando un baño de ultrasonidos con una potencia fija de 250 W, sin hacer mención alguna a la potencia realmente transmitida al sistema de extracción. En cualquier caso, Ye *et al.* (2011) concluyeron que cuanto mayor es la potencia ultrasónica aplicada, mayor es el rendimiento de la extracción, dado que se intensifica el fenómeno de cavitación y los efectos mecánicos derivados del mismo. Dichos autores indicaron, no obstante, que el aumento de la potencia de US incrementa la temperatura de extracción, debiendo controlar ésta durante la totalidad del proceso y optimizar ambas variables junto con el tiempo de procesado, en el caso de la extracción acústica de compuestos bioactivos termolábiles, como en el presente estudio.

### 4.3.2. Extracción de compuestos fenólicos asistida mediante una sonda de ultrasonidos. Estudio de la cinética y del efecto de la temperatura sobre el proceso

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las cinéticas de extracción acuosa de compuestos fenólicos del orujo y para la capacidad antioxidante de los extractos, en ausencia/presencia de ultrasonidos de potencia (US), evaluando al mismo tiempo el efecto de la temperatura sobre el proceso.

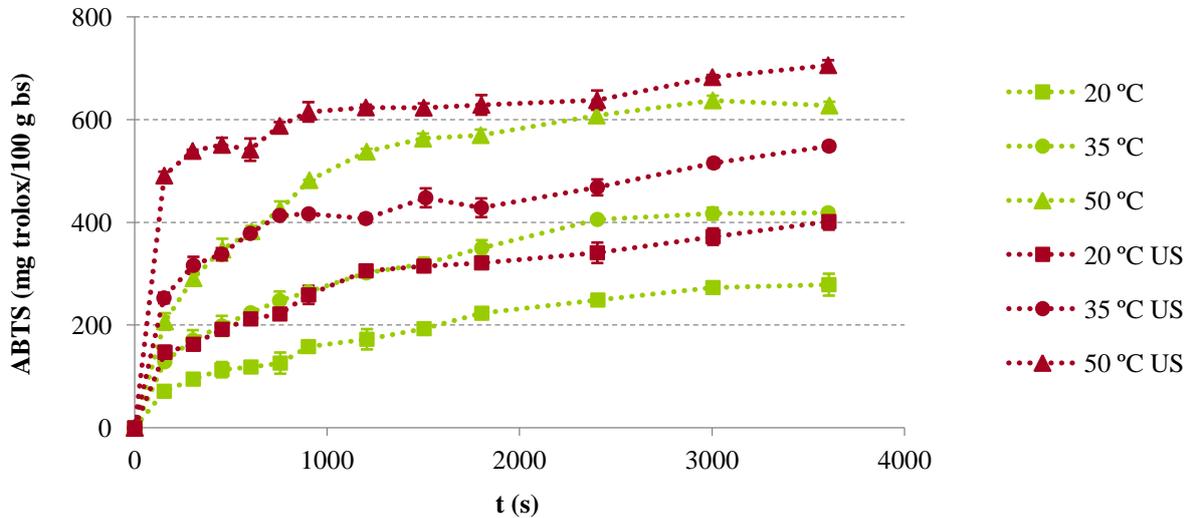
En la **Figura 4.21** se representan los resultados experimentales correspondientes a la extracción realizada con agitación mecánica (control) y a la extracción asistida por US de compuestos fenólicos a partir del orujo fermentado, expresándose en forma de concentración de fenólicos totales con respecto al tiempo de extracción para las diferentes temperaturas de operación (20, 35 y 50 °C). También se representó la capacidad antioxidante de los extractos, evaluada mediante los métodos ABTS (**Figura 4.22**) y FRAP (**Figura 4.23**).



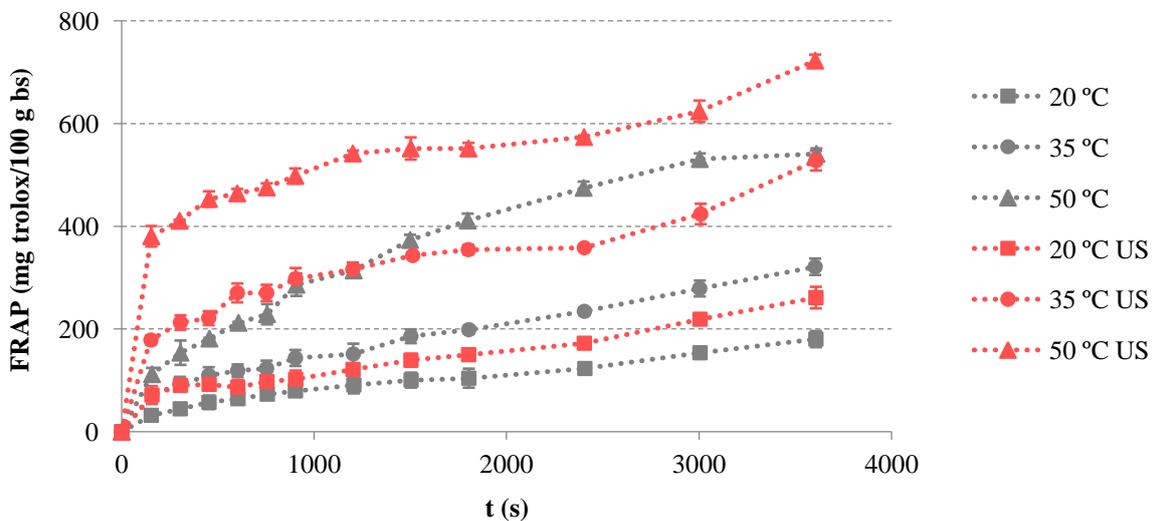
**Figura 4.21.** Contenido de fenólicos totales de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US).

En dichas figuras puede apreciarse un aumento progresivo y significativo del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante de los extractos a medida que se incrementa la temperatura, alcanzando los valores más elevados cuando la extracción se realiza con asistencia acústica. Independientemente del tipo de extracción en estudio, este efecto de la temperatura se justifica en base a la mayor solubilidad de

los analitos y al mayor coeficiente de difusión de los mismos desde la matriz sólida donde se encuentran hacia el medio líquido extractor, a medida que aumenta la temperatura (Ghafoor *et al.*, 2009; González-Montelongo *et al.*, 2010).



**Figura 4.22.** Capacidad antioxidante (método ABTS) de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US).



**Figura 4.23.** Capacidad antioxidante (método FRAP) de los extractos de orujo fermentado tras su extracción a diferentes tiempos y temperaturas. Experimentos con agitación (20 °C, 35 °C, 50 °C) y con asistencia acústica (20 °C US, 35 °C US, 50 °C US).

De este modo, al considerar el proceso de extracción control (con agitación mecánica) a 20 °C, el contenido de fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos de orujo fermentado fueron los más bajos de entre todas las condiciones en estudio ( $p < 0.05$ ). Concretamente, tras 1 h de extracción a dicha temperatura, el

contenido de fenólicos totales fue  $230.1 \pm 24.6$  mg GA/100 g bs, y la capacidad antioxidante,  $278.7 \pm 39.6$  mg trolox/100 g bs y  $180.3 \pm 29.4$  mg trolox/100 g bs, evaluada según los métodos ABTS y FRAP, respectivamente.

Por su parte, transcurrida 1 h de extracción a 50 °C y con aplicación de US, el contenido de fenólicos totales del extracto fue  $\sim 3.3$  veces mayor ( $770.9 \pm 77.5$  mg GA/100 g bs) que en la extracción control a 20 °C, y la capacidad antioxidante fue del orden de  $\sim 2.5$  ( $705.9 \pm 41.7$  mg trolox/100 g bs) y  $\sim 4.0$  veces superior ( $722.4 \pm 41.0$  mg trolox/100 g bs), evaluada según los métodos ABTS y FRAP, respectivamente. Ello pone de manifiesto un posible efecto simultáneo de la temperatura y de los US sobre el proceso de extracción.

Al calcular la relación existente entre la cantidad de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos en presencia de US y bajo condiciones de extracción control (con agitación mecánica), se confirma que la extracción acústica permite obtener extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante que la extracción control (relación  $> 1.0$ ), independientemente de la temperatura y del tiempo de extracción.

Si se comparan los resultados obtenidos en los experimentos control y asistidos por US realizados a una misma temperatura, puede observarse que durante los primeros minutos tuvo lugar una mayor extracción con respecto al control (**Figura 4.21**, **Figura 4.22** y **Figura 4.23**). Concretamente, para el rango de 20 a 50 °C y  $t = 2.5$  min, el grado de extracción acústica fue entre 2.3 y 3.0 veces superior a la control para la concentración de fenólicos totales, entre 2.1 y 2.4 veces mayor para la capacidad antioxidante evaluada según el método ABTS, y entre 2.2 y 3.4 veces mayor para la capacidad antioxidante analizada según el método FRAP.

En este contexto, Corrales *et al.* (2008) destacaron el efecto positivo de los US (35 kHz) en la extracción de antocianos y en la capacidad antioxidante de los extractos de piel de uva tinta con respecto a la extracción convencional (con agitación, condiciones no especificadas), indicando rendimientos 1.8 y 1.6 veces mayores, respectivamente. Khan *et al.* (2010) observaron un incremento del 30 – 40% del contenido de fenólicos totales y actividad antioxidante de los extractos de piel de naranja al trabajar con US (25 kHz, 90 W). Y Viot *et al.* (2010), al comparar la extracción asistida por US (25 kHz, 150 W) con la convencional (con agitación), indicaron un rendimiento de extracción 1.2, 1.4 y 1.3 veces mayor para el contenido de

fenólicos totales, procianidinas y flavan-3-oles en los extractos de orujo de manzana, respectivamente.

Al comparar las curvas de extracción obtenidas para los compuestos fenólicos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre la extracción control a 35 °C y la de 20 °C asistida por US. Del mismo modo, las curvas correspondientes a la extracción control a 50 °C y a 35 °C asistida acústicamente, no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) (**Figura 4.21**). Este comportamiento pone de manifiesto que la extracción asistida por US permite trabajar a temperaturas inferiores sin disminuir el rendimiento de la extracción o incluso mejorándolo (Mason *et al.*, 2011; Shirsath *et al.*, 2012). En el caso de la capacidad antioxidante, se observó un comportamiento similar. No obstante, las cinéticas de la extracción control a 50 °C y las de 35 °C con US presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a tiempos superiores a 15 min y 30 min, respectivamente, para la capacidad antioxidante evaluada según los métodos ABTS y FRAP (**Figura 4.22** y **Figura 4.23**). Al analizar la bibliografía se observó que Cho *et al.* (2006) compararon la extracción convencional sólido-líquido (con agitación) de resveratrol del raspón de uva con la asistida por US (47 kHz, 14 W/L), indicando que en ~ 1 min a temperatura ambiente (no especificada) en presencia de US se recuperaba la misma cantidad de resveratrol que a 60 °C con agitación (condiciones no especificadas) durante 30 min, utilizando EtOH:H<sub>2</sub>O al 80% (v/v) como disolvente de extracción.

Tal y como puede observarse en la **Figura 4.21**, **Figura 4.22** y **Figura 4.23**, el uso de US en el proceso de extracción también permite reducir sustancialmente el tiempo de operación necesario para obtener extractos con las mismas características. En el presente estudio, se observó que la extracción asistida por US necesitaba del orden de 20 min, 15 min y 7.5 min, respectivamente, a 20 °C (~ 230 mg GA/100 g bs), 35 °C (~ 360 mg trolox/100 g bs) y 50 °C (~ 475 mg trolox/100 g bs), para extraer la misma cantidad de compuestos fenólicos que tras 60 min de extracción control a cada temperatura dada. Aunque en menor medida, se observó un comportamiento semejante para la capacidad antioxidante de los extractos.

Ye *et al.* (2011) observaron que tras 12 min de extracción asistida por US (20 kHz, 900 W), la recuperación etanólica de carotenoides del maíz fue mayor que la obtenida tras 300 min de extracción con agitación (condiciones no especificadas). Khan *et al.* (2010) observaron que la extracción de fenólicos totales de piel de naranja en

presencia de US (25 kHz, 90 W) durante 10 min alcanzaba el mismo rendimiento que la extracción Soxhlet en 60 min, trabajando a 40 °C y utilizando EtOH:H<sub>2</sub>O al 80% (v/v) como disolvente. Mientras que Virot *et al.* (2010), en 20 min de extracción asistida por US (25 kHz, 150 W), obtuvieron la misma cantidad de compuestos fenólicos que tras 45 min de extracción con agitación (condiciones no especificadas) a partir de orujo de manzana. Por su parte, Chittapalo *et al.* (2009) concluyeron que los US (20 kHz, 40 – 100 W) reducían de 120 min (extracción control) a 10 min el tiempo necesario para la extracción de proteínas del salvado de arroz, utilizando agua destilada a pH = 11.

#### **4.3.2.1. Modelización**

Con el fin de describir matemáticamente el proceso de extracción acuosa de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas, tanto bajo condiciones de agitación como de asistencia acústica, se utilizó el modelo de Weibull (ecuación [3.15]).

En primer lugar, aceptando una concentración inicial nula ( $C_0 = 0$ ), se realizó la identificación de los parámetros del modelo. Para ello se hizo uso de los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales. Los parámetros a identificar para cada set de condiciones de operación fueron no sólo  $\alpha$  y  $\beta$ , sino también la concentración de equilibrio ( $C_{eq}$ ).

Una vez identificados los tres parámetros para cada experimento, se observó que el parámetro  $\alpha$  variaba con la temperatura de extracción según una ecuación tipo Arrhenius, tal y como se ha propuesto previamente en la bibliografía (Eim *et al.*, 2013). También se observó que la  $C_{eq}$  variaba linealmente con la temperatura (K), tanto en los experimentos asistidos acústicamente como en los realizados con agitación. De modo que para representar dicho efecto se propuso la ecuación [4.6], donde  $a$  y  $C_{eq0}$  son constantes:

$$[4.6]$$

Por su parte, el parámetro  $\beta$  presentó dos comportamientos distintos en función de la presencia/ausencia de US durante el proceso de extracción. En los experimentos de extracción control,  $\beta$  se mantuvo constante e independiente de la temperatura (K); mientras que en los experimentos de extracción acústica, el parámetro  $\beta$  exhibió una dependencia tanto con el tiempo de extracción como con la temperatura, que pudo ser

representada adecuadamente de acuerdo con las ecuaciones [4.7], [4.8] y [4.9], donde  $\beta_{0a}$ ,  $\beta_{0b}$ ,  $\beta_{1a}$  y  $\beta_{1b}$  son constantes:

$$[4.7]$$

$$[4.8]$$

$$[4.9]$$

El hecho de que  $\beta$  varíe durante el proceso de extracción en los experimentos con asistencia acústica podría ser indicativo de que no sólo existe un claro efecto de los US, sino también que éste depende del tiempo de aplicación de los mismos en el sistema.

A continuación, se procedió a la identificación simultánea de todo el conjunto de parámetros del modelo de Weibull modificado (ecuaciones [3.15], [3.16] y [4.6] a [4.9]) para la extracción de cada uno de los atributos objeto de estudio. Para ello se hizo uso de los resultados experimentales obtenidos (compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los extractos) a diferentes tiempos de extracción y temperaturas.

En los experimentos de extracción control, se consideró  $\beta$  constante y, por tanto, únicamente se identificaron cinco parámetros ( $C_{eq0}$ ,  $a$ ,  $\alpha_0$ ,  $E_a$ ,  $\beta$ ). Por otro lado, debido a la dependencia de la temperatura y del tiempo observada para el parámetro  $\beta$  en presencia de US, se identificaron un total de ocho parámetros ( $C_{eq0}$ ,  $a$ ,  $\alpha_0$ ,  $E_a$ ,  $\beta_{0a}$ ,  $\beta_{0b}$ ,  $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{1b}$ ) en los experimentos de extracción acústica.

En la **Tabla 4.35** se presentan los valores de los parámetros identificados para los modelos representativos de la extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado, junto con sus intervalos de confianza (IC) y los correspondientes errores estándar asociados (ES). Como puede observarse en dicha tabla, algunos de los intervalos de confianza fueron amplios y los errores estándar asociados ligeramente elevados, ambos aspectos como consecuencia directa de la identificación simultánea de un elevado número de parámetros. En cualquier caso, los valores simulados obtenidos al prescindir de alguno de ellos no fueron adecuados, por lo que se decidió mantenerlos.

De acuerdo con los parámetros identificados y en función de la temperatura para el rango 20 – 50 °C, en los experimentos de extracción control, los valores de  $\alpha$

(ecuación [3.16]) variaron entre 35.6 y 22.1 min para el contenido de fenólicos totales de los extractos, y entre 56.7 y 13.5 min y entre 1066.7 y 169.4 min, para la capacidad antioxidante, evaluada según los métodos ABTS y FRAP, respectivamente. En el caso de la extracción acústica, los valores de  $\alpha$  oscilaron entre 64.5 y 54.1 min, entre 109.1 y 78.8 min, y entre 58.9 y 38.0 min, para el contenido de fenólicos totales y la capacidad antioxidante según ABTS y FRAP, respectivamente. Dado que los modelos utilizados para simular la extracción convencional y la acústica no son equivalentes, puesto que en la última el efecto de la temperatura se tiene en cuenta tanto en  $\alpha$  como en  $\beta$ , los valores del parámetro  $\alpha$  no son comparables entre ambos tipos de extracción.

En cualquier caso, tal y como puede observarse, independientemente del tipo de extracción, los valores del parámetro  $\alpha$  disminuyeron con la temperatura, fenómeno previamente observado en la modelización de la extracción de saponinas de las pepitas de quinoa (Quispe-Fuentes *et al.*, 2013) y de  $\beta$ -caroteno del escaramujo (fruto del rosal silvestre) (Sturzoiu *et al.*, 2011), mediante el modelo de Weibull en el rango de temperaturas 20 – 60 °C y 25 – 55 °C, respectivamente.

Según Sturzoiu *et al.* (2011), el parámetro  $\alpha$  está relacionado con la inversa de la constante de velocidad ( $k$ ). De modo que, teniendo en cuenta la relación directamente proporcional existente entre la temperatura y la velocidad de extracción (Cacace and Mazza, 2003), se justifica el comportamiento de  $\alpha$  en el presente estudio, observándose una mayor velocidad de extracción cuanto menor es el valor de  $\alpha$ . Así pues, de entre las tres temperaturas en estudio, puede afirmarse que a 50 °C la extracción de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante del orujo fermentado tuvo lugar más rápidamente, tanto en condiciones de agitación como de asistencia acústica. Otros autores también observaron un incremento de la velocidad de extracción con la temperatura, aunque los modelos matemáticos propuestos para describir la cinética del proceso fueron diferentes: Bucic-Kojic *et al.* (2007), en la extracción de compuestos fenólicos de pepitas de uva blanca a temperaturas comprendidas entre 20 y 80 °C, utilizando el modelo de Peleg; Sant'Anna *et al.* (2012a; 2012b) en la extracción de compuestos fenólicos y antocianos del orujo de uva tinta entre 25 y 50 °C, haciendo uso de un modelo de pseudo-primer orden; y Sturzoiu *et al.* (2011), en la extracción de  $\beta$ -caroteno del escaramujo en el intervalo de temperaturas 25 – 45 °C, aplicando los modelos Power Law, Peleg y Weibull.

**Tabla 4.35.** Extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas en ausencia/presencia de US. Parámetros identificados del modelo de Weibull modificado, intervalos de confianza (IC) y error estándar asociado a cada parámetro (ES).

	Fenólicos totales			ABTS			FRAP			
	Valor	IC	ES	Valor	IC	ES	Valor	IC	ES	
<b>Control<sup>a</sup></b>	$\alpha_0$ (s)	12.430	[-32.732 , 57.592]	16.552	$6.653 \cdot 10^{-4}$	[-6.248 $\cdot 10^{-3}$ , 7.578 $\cdot 10^{-3}$ ]	$2.534 \cdot 10^{-3}$	$1.579 \cdot 10^{-4}$	[-5.874 $\cdot 10^{-3}$ , 6.189 $\cdot 10^{-3}$ ]	$2.221 \cdot 10^{-3}$
	$E_a$ (kJ/mol)	12.536	[2.816 , 22.256]	3.563	37.634	[9.438 , 65.829]	10.334	48.286	[-53.372 , 149.943]	37.437
	$Ce_{q_0}$ (mg/100 g bs)	-2228	[-2630 , -1825]	-148	-2331	[-3615 , -1047]	-471	-2221	[-17305 , 12863]	-5555
	a (1/K)	8.658	[6.893 , 10.422]	0.647	9.378	[3.515 , 15.241]	2.149	10.939	[-58.177 , 80.055]	25.453
	$\beta$	0.645	[0.577 , 0.712]	0.025	0.623	[0.507 , 0.738]	0.042	0.598	[0.482 , 0.715]	0.043
<b>US</b>	$\alpha_0$ (s)	584.926	[123.701 , 1046.151]	169.855	196.960	[-737.290 , 1.131.210]	340.465	31.616	[-113.465 , 176.696]	52.871
	$E_a$ (kJ/mol)	4.601	[2.615 , 6.588]	0.731	8.536	[-3.871 , 20.943]	4.521	11.489	[-0.2224 , 23.202]	4.268
	$Ce_{q_0}$ (mg/100 g bs)	-3371	[-3659 , -3083]	-106	804	[-3227 , 4834]	-1469	-4278	[-5.565 , -3.301]	-529
	a (1/K)	13.971	[12.734 , 15.207]	0.455	1.707	[-16.970 , 20.383]	6.806	17.591	[10.828 , 24.354]	2.465
	$\beta_{0a}$	3.081	[2.631 , 3.532]	-0.165	4.173	[3.108 , 5.238]	-0.388	3.529	[2.317 , 4.742]	-0.442
	$\beta_{0b}$ ( $10^3$ ) (1/K)	-8.679	[-10.640 , -6.718]	0.720	-12.230	[-17.137 , -7.322]	1.788	-10.230	[-15.657 , -4.802]	1.978
	$\beta_{1a}$ ( $10^3$ )	2.082	[0.544 , 3.620]	0.565	-1.208	[-3.204 , 0.788]	0.727	1.525	[-0.744 , 3.793]	0.827
$\beta_{1b}$ ( $10^6$ ) (1/K)	-5.758	[-10.815 , -0.701]	1.856	5.104	[-1.222 , 11.430]	2.305	-3.695	[-10.961 , 3.571]	2.648	

<sup>a</sup> Extracción bajo condiciones de agitación mecánica.

No obstante, cabe indicar que el incremento de la velocidad de extracción con la temperatura no se mantiene de forma indefinida, dado que la mayoría de compuestos bioactivos son termolábiles, siendo susceptibles a sufrir degradación a temperaturas más elevadas (Hojnik *et al.*, 2008), disminuyendo en ese caso la constante de velocidad observada.

La interpretación del parámetro  $\alpha$  como constante de reacción cinética dependiente de la temperatura (K) de acuerdo con una ecuación tipo Arrhenius (ecuación [3.16]), permite estimar la energía de activación ( $E_a$ ) del proceso de extracción. Ésta se entiende como la barrera energética que los compuestos bioactivos del orujo fermentado deben superar con el fin de abandonar la matriz del residuo de vinificación. A partir de los resultados experimentales y de acuerdo con los parámetros cinéticos identificados, las  $E_a$  estimadas fueron, respectivamente, en la extracción control y en la extracción asistida por US: 12.5 kJ/mol y 4.6 kJ/mol para los compuestos fenólicos, 37.6 kJ/mol y 8.5 kJ/mol para la capacidad antioxidante según el método ABTS y, 48.3 kJ/mol y 11.5 kJ/mol para la capacidad antioxidante según el método FRAP. Tal y como cabría esperar, la presencia de US disminuyó la  $E_a$  del proceso de extracción acuosa del orujo para todos los atributos en estudio.

De acuerdo con la clasificación descrita por Wang *et al.* (2002), si la  $E_a$  es inferior a 20 kJ/mol, la extracción está controlada por el proceso de difusión y si la  $E_a$  es superior a 40 kJ/mol, está gobernada por el proceso químico de solubilización. Por el contrario, para valores de  $E_a$  comprendidos entre 20 y 40 kJ/mol, la extracción denota un control de régimen mixto. En base a ello, los valores estimados para la  $E_a$  sugieren un régimen difusivo como controlante del proceso de extracción control de los compuestos fenólicos, así como de la extracción acústica de todos los parámetros en estudio, para el rango de temperaturas de 20 a 50 °C.

Los valores estimados para la  $E_a$  están de acuerdo con los descritos en la bibliografía para cinéticas de extracción de diferentes compuestos bioactivos de productos y/o subproductos de origen vegetal (**Tabla 4.36**). En cualquier caso, cabe indicar que el intervalo de valores publicados es bastante amplio debido a que la  $E_a$  depende de diversos factores del proceso de extracción, tales como la matriz del material, el biocompuesto objeto de la extracción, el pretratamiento de la muestra y el disolvente utilizado, entre otros (Sant'Anna *et al.*, 2012a).

**Tabla 4.36.** Evidencia bibliográfica del orden de magnitud de la energía de activación ( $E_a$ ) de procesos de extracción de compuestos bioactivos de productos de origen vegetal.

Material	Biocompuestos a extraer	$E_a$ (kJ/mol)	Modelo utilizado	Condiciones de extracción	Referencia bibliográfica
Grosellas negras	Fenólicos totales	75.3 – 76.7 <sup>a</sup>	Modelo de difusión	S-L con agitación $T^a = 25 - 60$ °C	Cacace <i>et al.</i> (2003)
	Antocianos	70.7 – 97.1 <sup>a</sup>			
Comino de prado ( <i>Carum carvi</i> )	Carvona	14 <sup>b</sup> y 4.1 <sup>c</sup>	Modelo de primer orden	S-L con agitación versus extracción asistida con US ( $T^a = 20 - 55$ °C)	Chemat <i>et al.</i> (2004)
	Limoneno	12 <sup>b</sup> y 17.5 <sup>c</sup>			
Pepitas de uva blanca	Fenólicos totales	1.1 – 7.7 <sup>d</sup>	Modelo de Peleg	S-L <sup>a</sup> con agitación $T^a = 20 - 80$ °C	Bucic-Kojic <i>et al.</i> (2007)
<i>Fumaria officinalis L.</i>	Protopina	3.2 – 5.2 <sup>a</sup>	Modelo de pseudo-segundo orden	S-L con agitación $T^a = 15 - 75$ °C	Rakotondramasy-Rabesiaka <i>et al.</i> (2007)
Piel de naranja	Flavanonas	34.2 <sup>b</sup> y 6.3 <sup>c</sup>	Modelo de segundo orden (RSM)	S-L con agitación versus extracción asistida con US ( $T^a = 10 - 40$ °C)	Khan <i>et al.</i> (2010)
Hierbas de mate	Sólidos solubles en agua	14.3 ± 1.5	Modelo de segundo orden	S-L con agitación $T^a = 40 - 70$ °C	Linares <i>et al.</i> (2010)
Piel de granada	Fenólicos totales	14.5	Modelo de segundo orden	S-L con agitación $T^a = 25 - 95$ °C	Qu <i>et al.</i> (2010)
Maíz	Carotenoides	44.6	---	Extracción asistida con US $T^a = 28 - 38$ °C	Ye <i>et al.</i> (2011)
Orujo de uva tinta	Antocianos	29.5	Modelo de pseudo-primer orden	S-L con agitación $T^a = 25 - 60$ °C	Sant'Anna <i>et al.</i> (2012a)
Orujo de uva tinta	Fenólicos totales	23.0	Modelo de pseudo-primer orden	S-L con agitación $T^a = 25 - 60$ °C	Sant'Anna <i>et al.</i> (2012b)
Pepitas de uva tinta	Fenólicos totales	24.2	Modelo de difusión	S-L con agitación $T^a = 25 - 80$ °C	Bucic-Kojic <i>et al.</i> (2013)
Pepitas de quinoa	Saponinas	11.4	Modelos de Page, Weibull y de Henderson-Pabis	S-L con agitación $T^a = 20 - 60$ °C	Quispe-Fuentes <i>et al.</i> (2013)

<sup>a</sup> Según diferentes disolventes; <sup>b</sup> condiciones control S-L; <sup>c</sup> extracción asistida por US; <sup>d</sup> según diferentes tamaños de partícula; S-L, extracción sólido-líquido; US, ultrasonidos de potencia; RSM, metodología de superficie de respuesta.

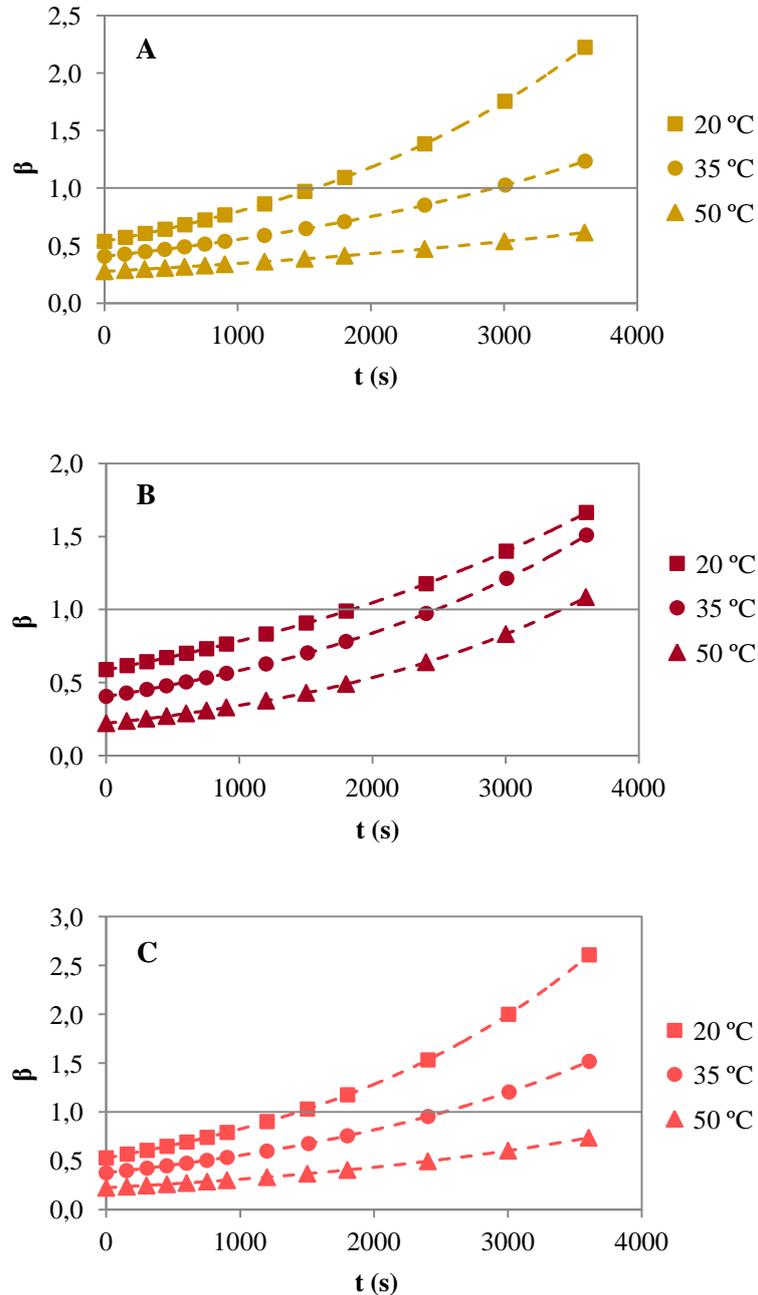
Como se ha indicado previamente, en el modelo de Weibull, el exponente  $\beta$  es un parámetro de forma característico del material, que se asimila como un índice de su comportamiento durante el proceso de extracción (Sturzoiu *et al.*, 2011). Cuando este parámetro es igual a la unidad, el modelo se corresponde con una cinética de primer orden, presentando una velocidad de extracción constante a lo largo del proceso (Eim *et al.*, 2013). No obstante, cuando  $\beta < 1$  la cinética de extracción adquiere forma convexa, presentando una velocidad que disminuye con el tiempo; y cuando  $\beta > 1$ , la cinética asume una forma cóncava y la velocidad de extracción aumenta progresivamente con el tiempo (Odriozola-Serrano *et al.*, 2008). La concavidad y convexidad de las cinéticas de extracción serán tanto más acentuadas cuanto más se aleje de la unidad el valor de  $\beta$ .

En lo que respecta a los experimentos de extracción control,  $\beta$  fue constante, dado que no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con la temperatura en el rango de 20 a 50 °C para ninguno de los parámetros en estudio. Los valores estimados de  $\beta$  fueron 0.645, 0.623 y 0.598 para los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, según los métodos ABTS y FRAP, respectivamente. Se trata de valores inferiores a la unidad, similares a los observados previamente en la bibliografía para la extracción de saponinas de las pepitas de quinoa ( $\beta = 0.206 - 0.305$ ) (Quispe-Fuentes *et al.*, 2013) y de  $\beta$ -caroteno del escaramujo ( $\beta = 0.424 - 0.644$ ) (Sturzoiu *et al.*, 2011).

En el presente estudio, el hecho de que  $\beta < 1$  en la extracción control de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado es indicativo de que la velocidad del proceso disminuyó con el tiempo para el intervalo de temperaturas tratado. Este comportamiento ha sido previamente observado en la bibliografía para diferentes sistemas de extracción (Bucic-Kojic *et al.*, 2007; Sturzoiu *et al.*, 2011; Sant'Anna *et al.*, 2012a; Sant'Anna *et al.*, 2012b; Quispe-Fuentes *et al.*, 2013).

La sustitución de la agitación mecánica por los US es la única diferencia entre los experimentos de extracción control y los de extracción acústica. De modo que el diferente comportamiento de  $\beta$  debe atribuirse al efecto de los US. Tal y como se ha establecido en las ecuaciones [4.7], [4.8] y [4.9], se observó que  $\beta$  dependía del tiempo de extracción y de la temperatura de trabajo. Dado que el parámetro  $\beta$  es una característica propia del material y los US se caracterizan por su capacidad de modificar la estructura y características del mismo, se justifica que el parámetro  $\beta$  pueda sufrir variación a medida que avanza el proceso de extracción acústica.

En la **Figura 4.24** se representan los valores del parámetro  $\beta$  estimados para los experimentos de extracción acústica. En dicha figura se observa que  $\beta$  cambia de forma significativa con el tiempo y la temperatura de extracción, presentando dos comportamientos distintos al variar desde valores menores hasta mayores a la unidad a lo largo del proceso de extracción a cada temperatura dada.



**Figura 4.24.** Representación del parámetro  $\beta$  en función de la temperatura (20 – 50 °C) y del tiempo, para el proceso de extracción acústica de compuestos fenólicos (A) y capacidad antioxidante, según los métodos ABTS (B) y FRAP (C), del orujo fermentado.

Si comparamos la representación del comportamiento de  $\beta$  (**Figura 4.24**) con la forma de las curvas de extracción acústica de los compuestos fenólicos (**Figura 4.21**) y de la capacidad antioxidante según los métodos ABTS (**Figura 4.22**) y FRAP (**Figura 4.23**), se observa que: en el momento en que  $\beta$  pasa de valores inferiores a 1 a valores superiores a 1, la cinética de extracción empieza a adquirir una forma ligeramente cóncava. Todo ello hace que la velocidad de extracción, que hasta el momento disminuía con el tiempo, empiece a incrementarse con el mismo.

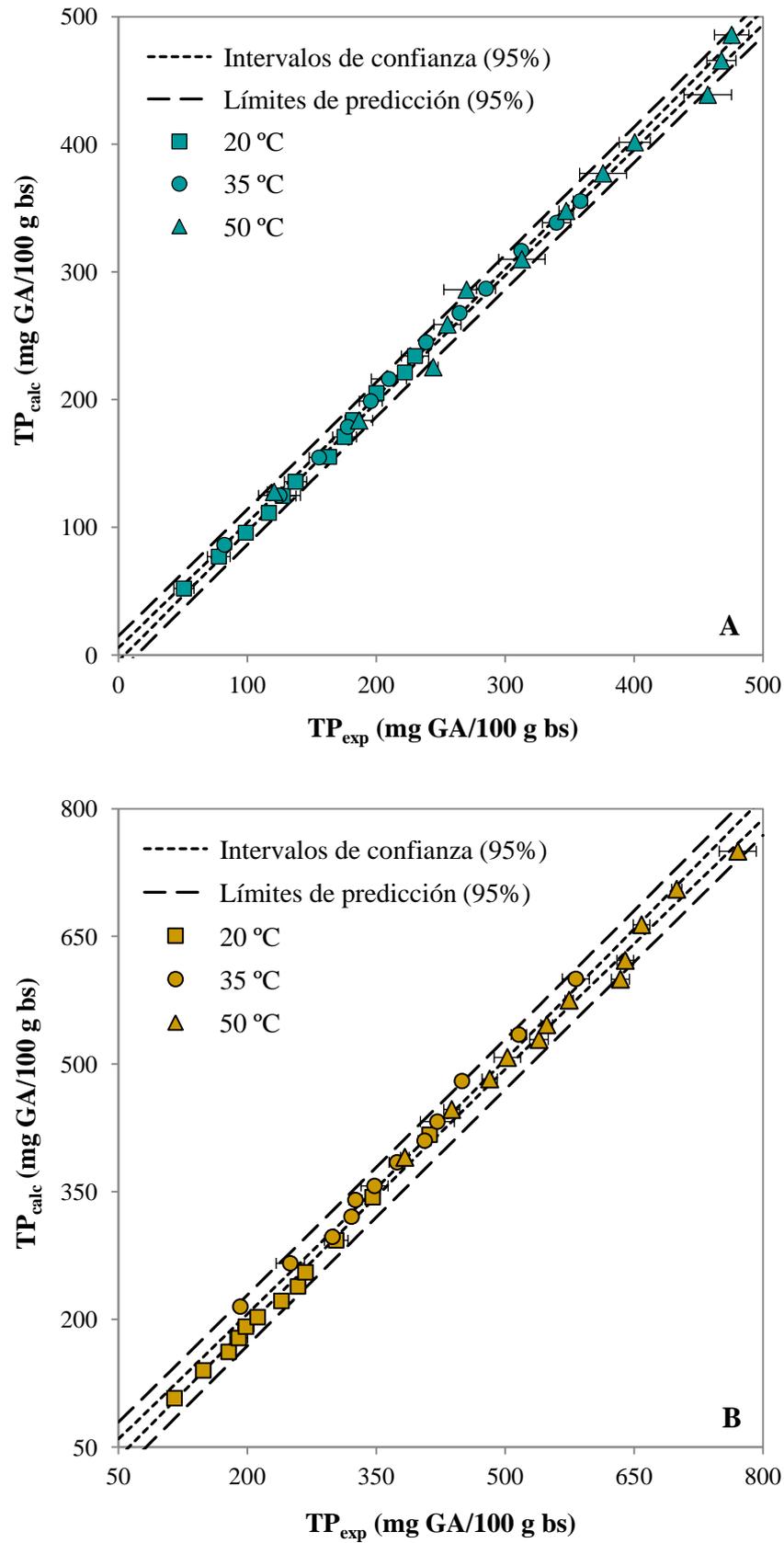
Cabe apuntar que Odriozola-Serrano *et al.* (2008) ya observaron una dependencia exponencial para el parámetro  $\beta$  del modelo de Weibull, concretamente con el campo eléctrico aplicado a zumo de tomate para evitar la degradación de sus compuestos bioactivos y de su capacidad antioxidante durante el almacenamiento.

#### **4.3.2.2. Simulación de las curvas de extracción**

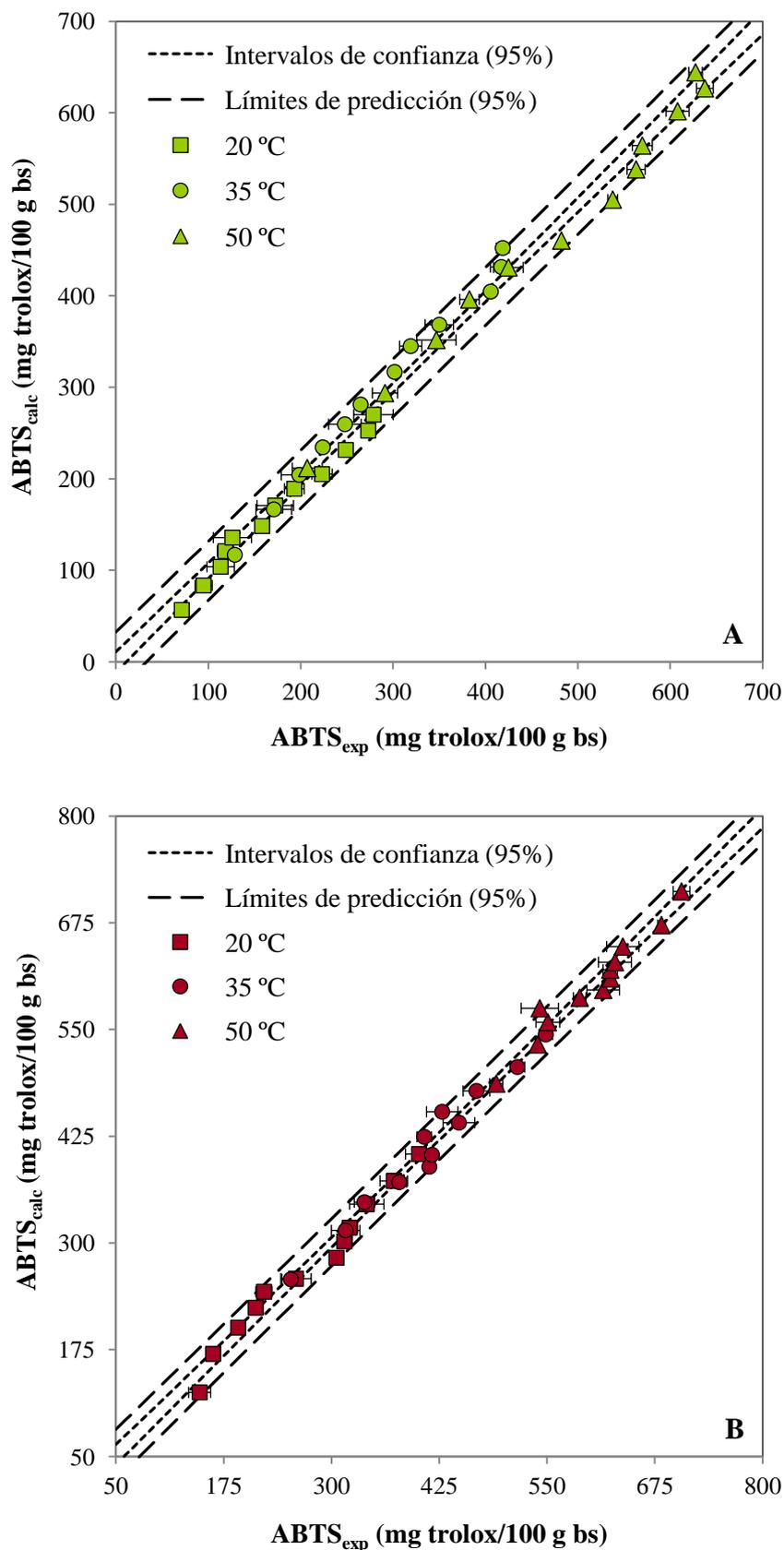
Haciendo uso de los parámetros identificados para el modelo de Weibull modificado (**Tabla 4.35**), se simularon las curvas de extracción de los compuestos fenólicos del orujo fermentado y la capacidad antioxidante de los extractos a diferentes temperaturas en ausencia/presencia de US. En la **Figura 4.25** a **Figura 4.27**, se representan los valores simulados por el modelo de Weibull modificado frente a los resultados experimentales para los tres atributos en estudio, así como el ajuste del modelo, y los correspondientes intervalos de confianza ( $p < 0.05$ ) y límites de predicción ( $p < 0.05$ ).

Independientemente de la variabilidad experimental, principalmente atribuible a la heterogeneidad de la materia prima y al error asociado a las determinaciones analíticas, se obtuvo una elevada correlación entre ambos grupos de datos, experimentales y calculados, para todos los atributos en estudio, presentando un elevado ajuste en todos los casos ( $r^2 \geq 0.992$ ).

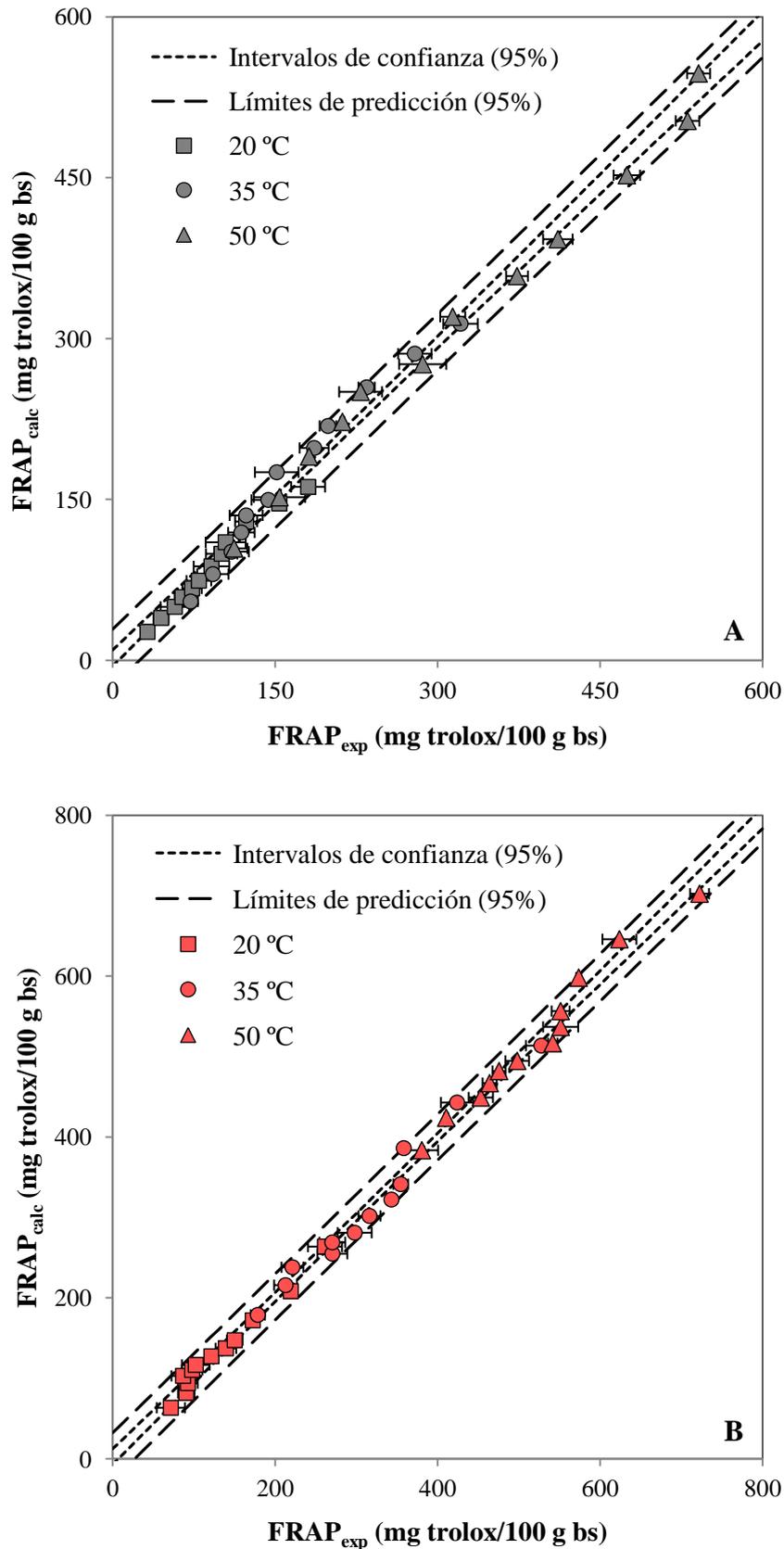
Con el objeto de evaluar estadísticamente la precisión de los modelos matemáticos propuestos y, por tanto, su capacidad para representar los resultados experimentales y predecir variaciones en el sistema, se estimaron el porcentaje de error relativo medio (ERM) y el porcentaje de varianza explicada por el modelo (VAR) para las diferentes condiciones de extracción. Cuanto menor es el ERM y más cercano a 100 el porcentaje de VAR, mejor es la bondad de la simulación proporcionada por el modelo (Bas and Boyaci, 2007).



**Figura 4.25.** Comparación entre los valores del contenido de fenólicos totales simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B).



**Figura 4.26.** Comparación entre los valores de capacidad antioxidante (método ABTS) simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B).



**Figura 4.27.** Comparación entre los valores de capacidad antioxidante (método FRAP) simulados por el modelo de Weibull modificado y los obtenidos experimentalmente durante el proceso de extracción acuosa del orujo fermentado a diferentes temperaturas. Experimentos de extracción control (A) y de extracción acústica (B).

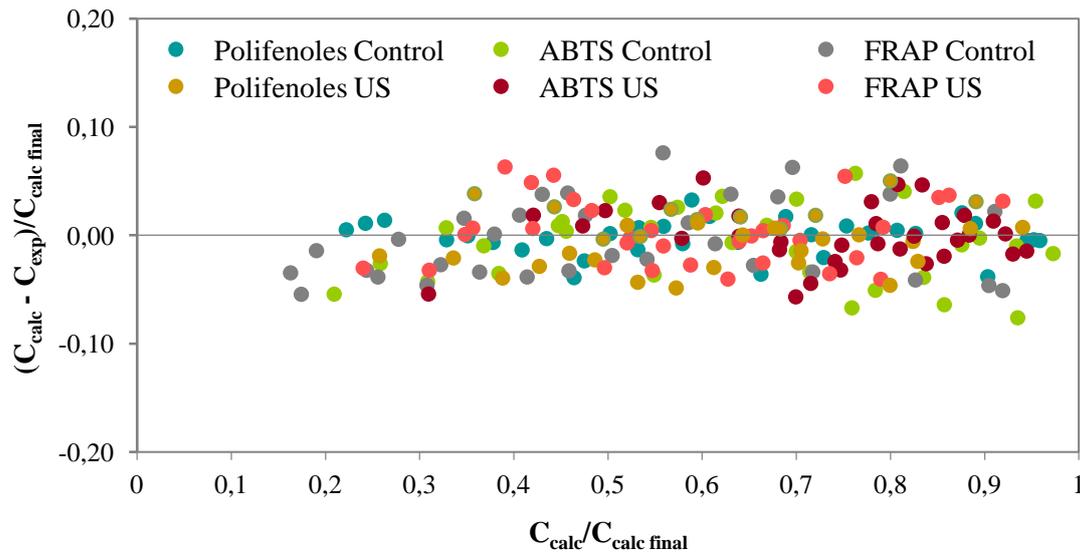
Tal y como puede observarse en la **Tabla 4.37**, los valores de ERM fueron  $\leq 7.0\%$  y los porcentajes de VAR  $\geq 97.9\%$ , indicando la validez de los modelos matemáticos propuestos. Atendiendo a los valores medios de ambos parámetros estadísticos (**Tabla 4.37**), puede afirmarse que los modelos propuestos simulaban satisfactoriamente la extracción de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante del orujo fermentado para todas las temperaturas en estudio, tanto bajo condiciones de agitación mecánica (control) como de asistencia acústica.

**Tabla 4.37.** Error relativo medio (ERM) y varianza explicada (VAR). Comparación entre los valores experimentales y simulados mediante el modelo de Weibull modificado. Extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas en ausencia/presencia de US.

T <sup>a</sup> (°C)	Fenólicos totales		ABTS		FRAP		
	ERM (%)	VAR (%)	ERM (%)	VAR (%)	ERM (%)	VAR (%)	
<i>Control</i> <sup>a</sup>	20	2.4	99.6	7.2	97.5	8.1	97.2
	35	1.4	99.9	5.0	98.3	8.7	97.6
	50	2.5	99.5	2.6	99.2	4.4	99.0
	Media	<b>2.1 ± 0.6</b>	<b>99.7 ± 0.2</b>	<b>4.9 ± 2.3</b>	<b>98.3 ± 0.9</b>	<b>7.0 ± 2.3</b>	<b>97.9 ± 1.0</b>
<i>US</i>	20	5.1	98.6	4.6	98.5	6.9	98.0
	35	3.8	98.9	2.7	99.0	4.2	98.3
	50	1.7	99.4	1.6	99.4	2.2	99.2
	Media	<b>3.5 ± 1.7</b>	<b>99.0 ± 0.4</b>	<b>3.0 ± 1.5</b>	<b>99.0 ± 0.5</b>	<b>4.4 ± 2.4</b>	<b>98.5 ± 0.6</b>

<sup>a</sup> Extracción bajo condiciones de agitación mecánica; US, ultrasonidos de potencia.

Adicionalmente, la validez de los modelos propuestos se evaluó en base a la distribución de los residuos. En la **Figura 4.28** se representan los residuos frente a los valores calculados en base normalizada. La normalización de los datos se realizó dividiendo cada uno de ellos por la concentración final calculada mediante el modelo de Weibull modificado para cada temperatura en estudio ( $t = 1$  h). Tal y como se observa, los residuos presentaron una distribución aleatoria y próxima a cero ( $-0.10 < y < 0.10$ ). Así mismo, el test de Shapiro confirmó que la distribución de los residuos puede considerarse normal ( $p < 0.05$ ) para las tres temperaturas y los dos tipos de extracción considerados.



**Figura 4.28.** Representación de los residuos frente a los valores calculados mediante el modelo de Weibull modificado en base normalizada. Distribución de los residuos de la extracción de fenólicos totales y capacidad antioxidante del orujo fermentado a diferentes temperaturas y en ausencia/presencia de US.

De acuerdo con la elevada concordancia entre los valores experimentales y los simulados, y con la distribución normal y aleatoria de los residuos, puede concluirse que el modelo de Weibull modificado permite predecir con elevada precisión las curvas de extracción de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante del orujo fermentado, asistida o no por US, en el rango de temperaturas comprendido entre 20 y 50 °C.



## **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado, se detallan a continuación las conclusiones más relevantes que pueden extraerse a partir de la experimentación realizada:

### **Diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen geográfico**

- Se ha propuesto una metodología para discriminar entre indicaciones vitivinícolas de calidad, en base a las características de la uva y de los atributos agroclimáticos del *terroir*, sin incluir el factor humano.
- La metodología propuesta se ha validado en el caso de las *IGPs* y *DOs* vitivinícolas de las Islas Baleares, corroborando así su existencia histórica. Asimismo, con este estudio se ha proporcionado a sus consejos reguladores el aval científico necesario para justificar, frente al Reglamento Europeo (CE) nº 479/2008, la vinculación geográfica de dichas indicaciones vitivinícolas de calidad a su zona de producción.
- Se ha justificado la importancia/necesidad de conocer el origen geográfico de un vino como producto final y/o de los residuos de vinificación como subproductos del proceso, como punto de partida para su caracterización físico-química.

### Estudio del *terroir*. Indicaciones Geográficas Protegidas de las Islas Baleares

- Independientemente de la variedad de uva considerada, *Merlot* o *Cabernet Sauvignon*, los viñedos-muestra de las cuatro *IGPs* de las Islas Baleares se distribuyeron en cuatro grupos diferenciados como resultado de la aplicación del ACP sobre las características físico-químicas de la uva, la textura y fertilidad del suelo, y las condiciones climáticas y de paisaje de sus viñedos.
- Los tres primeros componentes principales que resultan de la aplicación del ACP identificaron conjuntamente los diferentes patrones de comportamiento de los viñedos-muestra en base a su origen geográfico, explicando el 68% y 70% de la varianza total de la base de datos correspondiente a las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Merlot* respectivamente.
- De acuerdo con los resultados del ACP, se atribuye un rol específico a cada uno de los tres primeros componentes principales: dos representativos del medio natural del viñedo o de los descriptores agroclimáticos, y un tercero, específico de los atributos de la materia prima.

- La temperatura máxima y el contenido de limos del suelo del viñedo fueron los descriptores más importantes del patrón de distribución de los viñedos-muestra en el plano ACP.

Estudio del efecto de la añada y de la variedad de uva. Denominaciones de Origen de las Islas Baleares

- Al considerar las tres variables en estudio sobre la diferenciación de la calidad vitivinícola ligada al origen geográfico, el efecto de la añada fue el que presentó una mayor capacidad de discriminación entre los viñedos-muestra, seguido del correspondiente al origen de producción, y finalmente del efecto de la variedad.
- Al analizar de forma conjunta el efecto de la añada y del origen de producción sobre la clasificación de los viñedos-muestra de cada una de las variedades de uva objeto de estudio, *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, el 100% de los viñedos-muestra considerados se clasificaron correctamente en función de la añada para ambas variedades por aplicación del análisis discriminante. Un papel específico pudo atribuirse a cada una de las dos primeras funciones discriminantes: la FD1 representó la diferenciación de los viñedos-muestra según la añada, y la FD2, según el origen de producción.
- Al considerar por separado los viñedos-muestra de 2009 y 2010 y evaluar su agrupación en función de la variedad de uva y del origen de producción, la aplicación del análisis discriminante permitió la correcta clasificación del 100% de los viñedos-muestras de acuerdo con la denominación de origen a la que pertenecen. En este caso, el papel específico atribuido a las dos primeras funciones discriminantes fue la separación de los viñedos-muestra en función del origen de producción para la FD1, y en función de la variedad de uva, para la FD2.
- Los resultados del análisis discriminante corroboraron los obtenidos de forma preliminar a partir del análisis de clústers, sobre la asociación natural de los viñedos-muestra de cada *DO* para dos añadas consecutivas y dos variedades de uva.

**Caracterización de los residuos de vinificación**

- El orujo y el raspón constituyen fuentes potenciales de fibra dietética de calidad y compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante, destacándose una

importante variabilidad cualitativa y cuantitativa de acuerdo con el tipo de subproducto y la variedad de uva considerada.

#### Fracción de fibra dietética

- Ambos subproductos de vinificación, orujo y raspón, resultaron ser fuentes equilibradas de fibra de alta calidad, dado su alto contenido en fibra dietética (53 – 94 %, bs), sus adecuadas propiedades funcionales (capacidad de retención de agua: 3.8 – 10.7 g agua/g AIR; capacidad de retención de lípidos: 3.8 – 6.6 g aceite/g AIR) y su ratio FI/FS comprendido entre 1.0 y 2.3, que permite beneficiarse de los efectos fisiológicos, nutricionales y tecnológicos asociados a ambas fracciones de fibra, soluble e insoluble.
- Las pectinas fueron el principal polisacárido de las paredes celulares del orujo (33 – 54% CWP), mientras que en el raspón la celulosa fue el componente mayoritario (40 – 49% CWP), si bien este último subproducto también constituye una importante fuente de pectinas (27 – 41% CWP).
- En ambos subproductos, las pectinas presentaron un bajo grado de metil-esterificación (DME < 40%).

#### Fracción fenólica

- En general, pese a que ambos subproductos de vinificación mostraron un alto contenido en fenólicos totales, el del raspón fue entre 1.5 y 2.5 veces mayor que el correspondiente al orujo de la misma variedad. El mismo comportamiento se observó para la capacidad antioxidante, pues al comparar los resultados experimentales el raspón presentó un mayor potencial, independientemente de la técnica analítica utilizada (ABTS, CUPRAC, FRAP, ORAC). Concretamente, para las variedades *Callet*, *Macabeu*, *Parellada* y *Premsal Blanc*, la capacidad antioxidante del raspón fue entre 1.3 y 2.5 veces mayor que la de sus orujos.
- Se ha realizado una comparación y descripción detallada de la composición flavan-3-olica de ambos residuos para diferentes variedades de uva (*Vitis vinifera* L.), observándose un perfil propio y característico en cada caso. En general, los orujos presentaron un mayor contenido de monómeros (43 – 71% del total de flavan-3-oles) y trímeros (5 – 9% del total de flavan-3-oles), pero menor cantidad de dímeros (23 – 48% del total de flavan-3-oles), que los

correspondientes raspones (monómeros: 30 – 50%, y dímeros: 50 – 70% del total de flavan-3-oles).

- En general, los valores del grado medio de polimerización (mDP) de las proantocianidinas o taninos condensados fueron mayores para los orujos ( $mDP_{\text{orujo}} = 4.5 - 10.1$ ) que para el correspondiente raspón de la misma variedad ( $mDP_{\text{raspón}} = 4.6 - 8.5$ ). Las subunidades terminales y de extensión identificadas fueron exactamente las mismas para ambos residuos. En cuanto a la proporción de las diferentes subunidades de extensión, orujo y raspón presentaron una composición muy similar. No obstante, se observaron importantes diferencias en la composición de la fracción de subunidades terminales: mientras que el raspón está principalmente constituido por (+)-catequina con una limitada participación de (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato, el correspondiente orujo de la misma variedad presentó una contribución más equilibrada de (+)-catequina y (-)-epicatequina, presentando entre 2 – 4 veces mayor porcentaje de (-)-epicatequina-3-O-galato.
- El raspón de las variedades autóctonas destacó, de entre las 10 variedades en estudio, por su mayor contenido en fenólicos totales (TP) y mayor capacidad antioxidante, especialmente en el caso de la variedad *Callet* (TP = 11525 ± 886 mg GA/100 g bs).

### **Extracción acuosa de compuestos bioactivos asistida acústicamente**

- Se ha validado el uso de los ultrasonidos de potencia como técnica para mejorar el proceso de extracción acuosa de compuestos fenólicos a partir de orujo fresco y fermentado. La aplicación de los ultrasonidos de potencia mejora el rendimiento y/o eficiencia del proceso con respecto a la extracción convencional (con agitación mecánica).
- El uso de los ultrasonidos de potencia ha permitido utilizar el agua como disolvente de extracción, obteniendo porcentajes de extracción adecuados con respecto a los reportados en la literatura utilizando disolventes orgánicos.

#### Experimentos con un plato transductor de ultrasonidos de potencia

- Se ha estudiado el efecto de la frecuencia y potencia de ultrasonidos sobre el proceso de extracción, aplicando para ello la metodología de superficie de respuesta. Se ha observado que ambas variables acústicas condicionan de

forma significativa el proceso de extracción, siendo necesaria su optimización para incrementar el rendimiento del proceso.

- Los datos experimentales de la extracción de compuestos fenólicos y flavonoles asistida acústicamente, y de la capacidad antioxidante de los extractos, determinada mediante las técnicas CUPRAC y FRAP, se ajustaron de forma significativa a un modelo cuadrático ( $p < 0.05$ ), capaz de explicar satisfactoriamente el comportamiento del sistema y de predecir por interpolación las respuestas en el dominio experimental considerado.
- Se observó un incremento lineal y progresivo del rendimiento de extracción con la potencia acústica aplicada y el tiempo de operación. De modo que, en próximos trabajos, sería interesante evaluar el comportamiento del sistema para valores más elevados de ambos parámetros.
- Mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta, se estimaron las condiciones óptimas para la máxima extracción acústica de compuestos fenólicos, flavonoles y capacidad antioxidante del orujo, utilizando agua como disolvente. Los valores óptimos obtenidos fueron 40 kHz de frecuencia, 150 W/L de potencia y un tratamiento de 25 min.

#### Experimentos con una sonda de ultrasonidos de potencia

- Se ha estudiado la cinética del proceso de extracción acústica, así como el efecto de la temperatura sobre las mismas, utilizando como control un proceso convencional de extracción con agitación mecánica. Se observó un aumento progresivo y significativo del contenido de fenólicos totales y de la capacidad antioxidante de los extractos a medida que aumentaba la temperatura, alcanzando los valores más altos en el caso de la extracción asistida acústicamente.
- La aplicación de ultrasonidos de potencia mejoró el proceso de extracción. Así, según los resultados experimentales obtenidos, las extracciones convencionales de compuestos fenólicos a 35 y 50 °C no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con las asistidas por ultrasonidos a 20 y 35 °C, respectivamente. En cuanto al tiempo de extracción, la extracción acústica necesitó del orden de 3, 4 y 8 veces menos tiempo, a 20, 35 y 50 °C, que la extracción control para obtener extractos con las mismas características.

- Las curvas de extracción obtenidas para el contenido de fenólicos totales y capacidad antioxidante, según los métodos ABTS y FRAP, del orujo fueron representadas adecuadamente mediante el modelo de Weibull modificado (valores medios de la varianza explicada  $> 97.9\%$ , y del error relativo medio,  $< 7.0\%$ ), tanto para procesos de extracción control como de extracción acústica, dentro del rango de temperaturas 20 – 50 °C. Se observó una elevada correlación ( $r^2 \geq 0.992$ ) entre los valores experimentales y los calculados para todos los atributos en estudio.
- La aplicación del modelo de Weibull modificado indicó que el parámetro  $\alpha$  se ajusta adecuadamente a una ecuación tipo Arrhenius para los tres atributos en estudio, siendo las  $E_a$  estimadas de 12.5, 37.6 y 48.3 kJ/mol para la extracción convencional de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante según los métodos ABTS y FRAP, respectivamente; y de 4.6, 8.5 y 11.5 kJ/mol para las correspondientes extracciones acústicas. Tal y como cabía esperar, la presencia de los ultrasonidos disminuyó la  $E_a$  del proceso.
- El parámetro  $\beta$  del modelo de Weibull mostró dos comportamientos distintos en función del tipo de extracción: mientras que en la extracción control,  $\beta$  fue constante e independiente de la temperatura; en la extracción asistida por ultrasonidos,  $\beta$  varió significativamente no sólo con la temperatura sino también con el tiempo.

## **RECOMENDACIONES**



## 6. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se plantean a continuación una serie de aspectos del mismo por donde podría continuar la investigación:

- I. Validación con otras regiones vitivinícolas de la metodología propuesta para evaluar la calidad ligada al origen geográfico.
- II. Estudio del efecto de la variedad sobre la fracción de antocianos y flavonoles del orujo y del raspón.
- III. Estudio del efecto de la añada sobre la composición fenólica del orujo y raspón de diferentes variedades *Vitis vinifera* L.
- IV. Estudio de viabilidad de la incorporación en alimentos de extractos de fibra antioxidante, procedente del orujo y del raspón, como ingrediente funcional.
  - IV.a. Análisis de la influencia del ingrediente funcional sobre la matriz del alimento: modificaciones físicas, químicas y microbiológicas que tienen lugar como consecuencia de la adición.
  - IV.b. Estudio de aceptación por parte del consumidor.
- V. Estudio del proceso de extracción acuosa de compuestos fenólicos del raspón asistida acústicamente.



## **NOMENCLATURA**



## 7. NOMENCLATURA

<b>a</b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.6])
<b>A<sub>0</sub></b>	Absorbancia inicial o del blanco
<b>A<sub>f</sub></b>	Absorbancia final
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-Azinobis(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico)
<b>AC</b>	Análisis de Clusters
<b>ACP</b>	Análisis de Componentes Principales
<b>AD</b>	Análisis Discriminante
<b>AIR</b>	Residuo insoluble en alcohol (concentrado de fibra, del inglés <i>Alcohol Insoluble Residue</i> )
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza (del inglés <i>ANalysis Of VAriance</i> )
<b>AP</b>	<i>Adequate Precision</i>
<b>Ara</b>	Arabinosa (monosacárido)
<b>AUC</b>	Área bajo la curva (del inglés <i>Area Under the Curve</i> )
<b>BBD</b>	Diseño Box-Behnken (del inglés <i>Box-Behnken Design</i> )
<b>b</b>	Número de variables independientes del sistema (Tabla 1.8)
<b>bh</b>	Base húmeda
<b>bs</b>	Base seca
<b>c</b>	Número de repeticiones del punto central del diseño (Tabla 1.8)
<b>C</b>	(+)-catequina
<b>C-P</b>	Aducto (+)-catequina-fluoroglucinol
<b>Ca</b>	Callet ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>c<sub>e</sub></b>	Calor específico del disolvente (J/(kg·K), ecuación [3.12])
<b>C<sub>eq</sub></b>	Concentración de equilibrio (modelo de Weibull, ecuación [3.15])
<b>C<sub>eq0</sub></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.6])
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentración inicial (modelo de Weibull, ecuación [3.15])
<b>Ch</b>	Chardonnay ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>CS</b>	Cabernet Sauvignon ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>CP</b>	Componente Principal
<b>CUPRAC</b>	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
<b>CWP</b>	Polisacáridos de la pared celular (del inglés <i>Cell Wall Polysaccharides</i> )
<b>DME</b>	Grado de metil-esterificación (del inglés <i>Degree of Methyl-Esterification</i> )
<b>DO</b>	Denominación de Origen

<b>DOBi</b>	Denominación de Origen Binissalem
<b>DOPL</b>	Denominación de Origen Pla i Llevant
<b>E<sub>a</sub></b>	Energía de activación (J/mol, ecuación [3.16])
<b>EAU</b>	Extracción Asistida por Ultrasonidos
<b>EC</b>	(–)-epicatequina
<b>EC-P</b>	Aducto (–)-epicatequina-fluoroglucinol
<b>ECG</b>	(–)-epicatequina-3-galato
<b>ECG-P</b>	Aducto (–)-epicatequina-3-galato-fluoroglucinol
<b>EGC</b>	(–)-epigallocatequina
<b>EGC-P</b>	Aducto (–)-epigallocatequina-fluoroglucinol
<b>ERM</b>	Error Relativo Medio (%)
<b>ES</b>	Error estándar asociado
<b>FAC</b>	Capacidad de retención de lípidos (propiedad funcional de la fibra, del inglés <i>Fat Adsorption Capacity</i> )
<b>FD</b>	Función Discriminante
<b>FI</b>	Fibra Insoluble
<b>FI/FS</b>	Ratio Fibra Insoluble/Fibra Soluble
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Antioxidant Power
<b>FS</b>	Fibra Soluble
<b>Fuc</b>	Fucosa (monosacárido)
<b>GA</b>	Ácido gálico
<b>Gal</b>	Galactosa (monosacárido)
<b>GC</b>	Cromatografía de gases (del inglés <i>Gas Chromatography</i> )
<b>Glc</b>	Glucosa (monosacárido)
<b>Glc (1 M)</b>	Glucosa no celulósica
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>I</b>	Intensidad colorante
<b>IB</b>	Islas Baleares
<b>IC</b>	Intervalos de Confianza
<b>IGP</b>	Indicación Geográfica Protegida
<b>k</b>	Constante de velocidad
<b>LOF</b>	Falta de ajuste (del inglés <i>Lack Of Fit</i> )
<b>m</b>	Masa de disolvente (kg, ecuación [3.12])
<b>Ma</b>	Macabeu ( <i>Vitis vinifera</i> L.)

<b>Man</b>	Manosa (monosacárido)
<b>mDP</b>	Grado medio de polimerización (del inglés <i>Mean Degree of Polymerization</i> )
<b>Me</b>	Merlot ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>MN</b>	Manto Negre ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>n</b>	Número de experimentos (ecuación [3.18])
<b>N<sub>total</sub></b>	Nitrógeno total
<b>nd</b>	No detectado
<b>ns</b>	No significativo
<b>ORAC</b>	Oxygen Radical Absorbance Capacity
<b>P</b>	Número de términos estadísticamente significativos del modelo matemático (ecuación [3.17])
<b>Pa</b>	Parellada ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>PB</b>	Premsal Blanc ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>QE</b>	Quercetina
<b>R</b>	Constante universal de los gases ideales (8.314 J/(mol·K), ecuación [3.16])
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación
<b>RE</b>	Rendimiento de Extracción
<b>Rha</b>	Ramnosa (monosacárido)
<b>RSM</b>	Metodología de Superficie de Respuesta (del inglés <i>Response Surface Methodology</i> )
<b>S<sub>calc</sub></b>	Desviación estándar de los valores calculados por el modelo (ecuación [3.19])
<b>S<sub>exp</sub></b>	Desviación estándar de los valores experimentales (ecuación [3.19])
<b>SIG</b>	Sistemas de Información Geográfica
<b>Sw</b>	Hinchamiento (propiedad funcional de la fibra, del inglés <i>Swelling</i> )
<b>Sy</b>	Syrah ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>t</b>	Tiempo
<b>T</b>	Temperatura
<b>TC</b>	Tonalidad de Color
<b>Te</b>	Tempranillo ( <i>Vitis vinifera</i> L.)
<b>TP</b>	Fenólicos totales (del inglés <i>Total Phenolics</i> )
<b>tr</b>	Trazas
<b>US</b>	Ultrasonidos de potencia
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/Visible
<b>V</b>	Volumen
<b>v/v</b>	relación volumen/volumen

<b>VAR</b>	Varianza explicada (%)
<b>VT</b>	Vi de la Terra
<b>w/v</b>	relación peso/volumen (del inglés weight/volume)
<b>w/w</b>	relación peso/peso (del inglés weight/weight)
<b>WRC</b>	Capacidad de retención de agua (propiedad funcional de la fibra, del inglés <i>Water Retention Capacity</i> )
<b>X<sub>calc</sub></b>	Valores calculados por un modelo matemático
<b>X<sub>exp</sub></b>	Valores experimentales
<b>X<sub>i</sub></b>	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM (ecuación [1.8])
<b>X<sub>j</sub></b>	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM (ecuación [1.8])
<b>X<sub>0</sub></b>	Valor experimental de la variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM para el punto central (ecuación [3.13])
<b>X<sub>1</sub></b>	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente a la frecuencia de ultrasonidos
<b>X<sub>2</sub></b>	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente a la potencia de ultrasonidos
<b>X<sub>3</sub></b>	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente al tiempo de extracción
<b>X<sub>y1</sub></b>	Xilosa (monosacárido)
<b>Y</b>	Respuesta predicha por el modelo (ecuación [1.8])
<b><math>\alpha</math></b>	Parámetro cinético del modelo de Weibull ( $s^{-1}$ , ecuación [3.15])
<b><math>\alpha_0</math></b>	Factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius ( $s^{-1}$ , ecuación [3.16])
<b><math>\beta</math></b>	Parámetro de forma del modelo de Weibull (ecuación [3.15])
<b><math>\beta_0</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.7])
<b><math>\beta_{0a}</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.8])
<b><math>\beta_{0b}</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.8])
<b><math>\beta_1</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.7])
<b><math>\beta_{1a}</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.9])
<b><math>\beta_{1b}</math></b>	Parámetro del modelo de Weibull modificado (ecuación [4.9])
<b><math>\delta_0</math></b>	Constante del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.8])
<b><math>\delta_i</math></b>	Coefficiente de regresión lineal del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.8])

---

$\delta_{ii}$	Coefficiente de regresión cuadrática del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.8])
$\delta_{ij}$	Coefficiente de interacción del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.8])
$\Delta X$	Distancia entre valores experimentales (ecuación [3.13])
$\Delta t$	Incremento de tiempo (ecuación [3.12])
$\Delta T$	Incremento de temperatura (ecuación [3.12])
$\lambda_{\max}$	Longitud de onda de máxima absorción (nm)
<b>% G</b>	Porcentaje de galoilación
<b>% P</b>	Porcentaje de prodelfinidinas
<b>2-dGlc</b>	2-deoxyglucosa (patrón interno para el análisis de azúcares neutros)



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1990. Reglamento (CEE) N° 2676/90 de la Comisión de 17 de Septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. In: Europea, C. (Ed.). Diario Oficial de las Comunidades Europeas, pp. 1-272.
2008. Council Regulation (EC) No 479/2008 of 29 April 2008 on the common organisation of the market in wine, amending Regulations (EC) No 1493/1999, (EC) No 1782/2003, (EC) No 1290/2005, (EC) No 3/2008 and repealing Regulations (EEC) No 2392/86 and (EC) No 1493/1999 In: Commission, E. (Ed.). Official Journal of the European Union, pp. 1-61.
- Abdul-Hamid, A., Luan, Y.S., 2000. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry* 68, 15-19.
- Aboughe-Angone, S., Nguerna-Ona, E., Ghosh, P., Lerouge, P., Ishii, T., Rayb, B., Driouich, A., 2008. Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: Structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Research* 343, 67-72.
- Abril, M., Negueruela, A.I., Pérez, C., Juan, T., Estopañán, G., 2005. Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. *Food Chemistry* 92, 729-736.
- Al-Habib, A., Al-Saleh, E., Safer, A.-M., Afzal, M., 2010. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Toxicological Sciences* 35, 357-364.
- Alexandre, J.L., Lizama, V., Álvarez, I., García, M.J., 2002. Varietal differentiation of red wines in the Valencian region (Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 751-755.
- Alonso, A.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., García, A., 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5832-5836.
- Alvarez, M., Moreno, I.M., Jos, A., Cameán, A.M., Gustavo González, A., 2007. Differentiation of 'two Andalusian DO 'fino' wines according to their metal content from ICP-OES by using supervised pattern recognition methods. *Microchemical Journal* 87, 72-76.
- Amendola, D., De Faveri, D.M., Spigno, G., 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering* 97, 384-392.
- Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., Tringali, C., 2008. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresource Technology* 99, 5960-5966.
- Amico, V., Napoli, E.M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C., Tringali, C., 2004. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar '*Nerello Mascalese*'. *Food Chemistry* 88, 599-607.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., Haroutounian, S.A., 2010. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International* 43, 805-813.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., Haroutounian, S.A., 2012. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology* 48, 316-322.
- Anderson, J.W., 2008. Dietary fiber and associated phytochemicals in prevention and reversal of diabetes. In: Pasupuleti, V.K., Anderson, J.W. (Eds.), *Nutraceuticals, glycemic health and type 2 diabetes*. Blackwell, EE.UU., pp. 97-126.

- Andrés de Prado, R., Yuste-Rojas, M., Sort, X., Andrés-Lacueva, C., Torres, M., Lamuela-Raventós, R.M., 2007. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. Cv. *Grenache* in commercial vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 779-786.
- Anter, J., de Abreu-Abreu, N., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Alonso-Moraga, A., Muñoz-Serrano, A., 2011. Targets of red grapes: Oxidative damage of DNA and leukaemia cells. *Natural Product Communications* 6, 59-64.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC International, Washington (EE.UU.).
- AOAC, 1997. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg (EE.UU.).
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7970-7981.
- Arnous, A., Meyer, A.S., 2009. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3611-3619.
- Arya, L.A., Novi, J.M., Shaunik, A., Morgan, M.A., Bradley, C.S., 2005. Pelvic organ prolapse, constipation, and dietary fiber intake in women: A case-control study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 192, 1687-1691.
- Auger, C., Gerain, P., Laurent-Bichon, F., Portet, K., Bornet, A., Caporiccio, B., Cros, G., Teissèdre, P.-L., Rouanet, J.M., 2004. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5297-5302.
- Auger, C., Teissèdre, P.-L., Gerain, P., Lequeux, N., Bornet, A., Serisier, S., Besancon, P., Caporiccio, B., Cristol, J.P., Rouanet, J.M., 2005. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2015-2021.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M., 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International* 48, 410-427.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S., Patil, R.T., 2011. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International* 44, 391-396.
- Bakkalbasi, E., Yemis, O., Aslanova, D., Artik, N., 2005. Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivators grown in Turkey. *European Food Research and Technology* 221, 792-797.
- Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S.F., 2009. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using Response Surface Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3064-3072.
- Balu, M., Sangeetha, P., Murah, G., Panneerselvam, C., 2005. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: Modulatory role of grape seed extract. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23, 501-507.

- Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., Panneerselvam, C., 2006. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Research Bulletin* 68, 469-473.
- Bas, D., Boyaci, I.H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78, 836-845.
- Baumgaertel, T., Kluth, H., Epperlein, K., Rodehutschord, M., 2007. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. *Small Ruminant Research* 67, 302-306.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 101-110.
- Bentlin, F.R.S., Pulgati, F.H., Dressler, V.L., Pozebon, D., 2011. Elemental analysis of wines from South America and their classification according to country. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 327-336.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N., Ebisuda, N., 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of *Cabernet Sauvignon* and *Grenache* in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 1-7.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965-977.
- Bhaskaracharya, R.K., Kentish, S., Ashokkumar, M., 2009. Selected applications of ultrasonics in food processing. *Food Engineering Reviews* 1, 31-49.
- Bingham, S.A., Day, N.E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjonneland, A., Overvad, K., Martínez, C., Dorronsoro, M., González, C.A., Key, T.J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., Riboli, E., 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): An observational study. *Lancet* 361, 1496-1501.
- Blasco, M., García-Pérez, J.V., Bon, J., Carreres, J.E., Mulet, A., 2006. Effect of blanching and air flow rate on turmeric drying. *Food Science and Technology International* 12, 315-323.
- Blouin, J., Peynaud, E., 2004. *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. In. Mundi-Prensa, Madrid.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489.
- Bois, J.E., Winkel, T., Lhomme, J.P., Raffailac, J.P., Rocheteau, A., 2006. Response of some Andean cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to temperature: Effects on germination, phenology, growth and freezing. *European Journal of Agronomy* 25.
- Bomser, J., Singletary, K., Meline, B., 2000. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse skin ornithine decarboxylase and protein kinase C by polyphenolics from grapes. *Chemico-Biological Interactions* 127, 45-59.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coisson, J.D., Arlorio, M., 2011. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry* 127, 180-187.

- Bordignon-Luiz, M.T., Gauche, C., Gris, E.F., Falcao, L.D., 2007. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT-Food Science and Technology* 40, 594-599.
- Bosaeus, I., 2004. Fibre effects on intestinal functions (diarrhoea, constipation and irritable bowel syndrome). *Clinical Nutrition Supplements* 1, 33-38.
- Box, G., Behnken, D., 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2, 455-475.
- Boyle, M.A., Long, S., 2007. Personal nutrition. Thomson Wadsworth, EE.UU.
- Brauchla, M., Juan, W., Story, J., Kranz, S., 2012. Sources of dietary fiber and the association of fiber intake with childhood obesity risk (in 2-18 Year Olds) and diabetes risk of adolescents (12-18 Year Olds): NHANES 2003-2006. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012, Article ID: 736258 (736257 pages).
- Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Bertuccio, P., Negri, E., La Vecchia, C., 2009. Dietary fiber and stomach cancer risk: A case-control study from Italy. *Cancer Causes & Control* 20, 847-853.
- Bravo, L., Saura-Calixto, F., 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 135-141.
- Brett, C., Waldron, K., 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Unwin Hyman Ltd, United Kingdom.
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., Velic, D., 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81, 236-242.
- Bucic-Kojic, A., Sovova, H., Planinic, M., Tomas, S., 2013. Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry* 136, 1136-1140.
- Buckeridge, M.S., 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154, 1017-1023.
- Bustamante, M.A., Said-Pullicino, D., Paredes, C., Cecilia, J.A., Moral, R., 2010. Influences of winery-distillery waste compost stability and soil type on soil carbon dynamics in amended soils. *Waste Management* 30, 1966-1975.
- Cacace, J.E., Mazza, G., 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59, 379-389.
- Carpenter, R., O'Grady, M.N., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, N.M., Kerry, J.P., 2007. Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science* 76, 604-610.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3, 1-30.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P., 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering* 100, 50-55.
- Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J.L., Fernández Lucas, M., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., Lasunción, M.A., 2006. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 84, 252-262.

- Cataneo, C.B., Caliarì, V., Gonzaga, L.V., Kuskoski, E.M., Fett, R., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of agricultural by-products from wine production. *Semina-Ciências Agrárias* 29, 93-101.
- CCE, 2006. Hacia un sector vitivinícola europeo sostenible. Comunicación de la Comisión de las Comunidades Europeas al Consejo y Parlamento Europeo. In, p. 319.
- Chacón, M.R., Ceperuelo-Mallafre, V., Maymo-Masip, E., Mateo-Sanz, J.M., Arola, L., Guitiérrez, C., Fernández-Real, J.M., Ardevol, A., Simón, I., Vendrell, J., 2009. Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine* 47, 137-142.
- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Grundy, S.M., Brinkley, L.J., 2000. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 342, 1392-1398.
- Chau, C.-F., Wang, Y.-T., Wen, Y.-L., 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry* 100, 1402-1408.
- Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P.V., Chemat, F., 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 188-195.
- Chen, H., Hoover, D.G., 2004. Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 269-276.
- Chen, Y., Luo, H., Gao, A., Zhu, M., 2011. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 305-309.
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., Wu, J.-Y., 2012. Kinetic models for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from medicinal fungi. *Food and Bioprocess Technology* DOI 10.1007/s11947-012-0929-z.
- Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., Moutounet, M., 1997. Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis* 25, M14-M21.
- Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P., 2000. Los compuestos fenólicos. In: Mundi-Prensa (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Madrid (España), pp. 114-136.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., Teissedre, P.-L., 2009. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (*Cabernet Sauvignon* and *Merlot*) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 545-553.
- Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., Teissèdre, P.-L., 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 6, 75-82.
- Chittapalo, T., Noomhorm, A., 2009. Ultrasonic assisted alkali extraction of protein from defatted rice bran and properties of the protein concentrates. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1843-1849.
- Cho, Y.-J., Hong, J.-Y., Chun, H.S., Lee, S.K., Min, H.-Y., 2006. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering* 77, 725-730.
- Choné, X., Van Leeuwen, C., Chéry, P., Ribéreau-Gayon, P., 2001. Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinifera*). Vegetative development, must and wine composition (Example of a Medoc top estate vineyard, Saint Julien area, Bordeaux, 1997). *South African Journal of Enology and Viticulture* 22, 8-15.

- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., Dornier, M., 2012. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* 109, 16-21.
- Clifton, P.M., 2004. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004, 272-278.
- Coetzee, P.P., Steffens, F.E., Eiselen, R.J., Augustyn, O.P., Balcaen, L., Vanhaecke, F., 2005. Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5060-5066.
- Corrales, M., Fernández-García, A., Butz, P., Tauscher, B., 2009. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 90, 415-421.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 85-91.
- Corzo, O., Bracho, N., Pereira, Á., Vásquez, A., 2008. Weibull distribution for modeling air drying of coroba slices. *LWT-Food Science and Technology* 41, 2023-2028.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J.M., Laureano, O., 2009. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry* 112, 197-204.
- Cox, S., Gupta, S., Abu-Ghannam, N., 2012. Effect of different rehydration temperatures on the moisture, content of phenolic compounds, antioxidant capacity and textural properties of edible Irish brown seaweed. *LWT-Food Science and Technology* 47, 300-307.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., Smith, P., 2012. Varietal differentiation of grape juice based on the analysis of near- and mid-infrared spectral data. *Food Analytical Methods* 5, 381-387.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Shah, N., Smith, P.A., 2011. Can spectroscopy geographically classify *Sauvignon Blanc* wines from Australia and New Zealand? *Food Chemistry* 126, 673-678.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 15, 898-902.
- Crowe, F.L., Key, T.J., Appleby, P.N., Overvad, K., Schmidt, E.B., Egeberg, R., Tjonneland, A., Kaaks, R., Teucher, B., Boeing, H., Weikert, C., Trichopoulou, A., Ouranos, V., Valanou, E., Masala, G., Sieri, S., Panico, S., Tumino, R., Matullo, G., Bueno-de-Mesquita, H.B., Boer, J.M.A., Beulens, J.W.J., van der Schouw, Y.T., Quiros, J.R., Buckland, G., Sanchez, M.J., Dorronsoro, M., Huerta, J.M., Moreno-Iribas, C., Hedblad, B., Jansson, J.H., Wennberg, P., Khaw, K.T., Wareham, N., Ferrari, P., Illner, A.K., Chuang, S.C., Norat, T., Danesh, J., Riboli, E., 2012. Dietary fibre intake and ischaemic heart disease mortality: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Heart study. *European Journal of Clinical Nutrition* 66, 950-956.
- Cruz, J.M., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2004. Assessment of the production of antioxidants from winemaking waste solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5612-5620.
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., 2012. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 54, 557-563.

- Cummings, J.H., Mann, J.I., Nishida, C., Vorster, H.H., 2009. Dietary fibre: An agreed definition. *The Lancet* 373, 365-366.
- Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R., Oliveira, J.C., 1998. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering* 37, 175-191.
- Cárcel, J.A., 2003. Tesis doctoral: Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia. In, Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V., Benedito, J., Mulet, A., 2012. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering* 110, 200-207.
- Câmara, J.S., Alves, M.A., Marques, J.C., 2006. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* 68, 1512-1521.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Pasquali, M.A.B., Oliveira, M.R., Umezu, F.M., Salvador, M., Moreira, J.C.F., Henriques, J.A.P., 2008. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *Journal of Medicinal Food* 11, 127-132.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Umezu, F.M., Pasquali, M.A.B., Salvador, M., Fonseca Moreira, J.C., Pegas Henriques, J.A., 2009. Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice-organic and conventional-in adult rats. *Journal of Medicinal Food* 12, 1111-1118.
- De Villiers, A., Majek, P., Lynen, F., Crouch, A., Lauer, H., Sandra, P., 2005. Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *European Food Research and Technology* 221, 520-528.
- Deng, Q., Penner, M.H., Zhao, Y., 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International* 44, 2712-2720.
- Derriche, R., Berrahmoune, K.S., 2007. Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering* 78, 1149-1154.
- DeVries, J.W., 2004. Dietary fiber: The influence of definition on analysis and regulation. *Journal of AOAC International* 87, 682-706.
- Di Stefano, R., Cravero, M.C., 1991. Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva *Rivista di Viticoltura ed Enologia* 44, 37-45.
- Douglas, D., Cliff, M.A., Reynolds, A.G., 2001. Canadian *terroir*: characterization of *Riesling* wines from the Niagara Peninsula. *Food Research International* 34, 559-563.
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J.A., Teissedre, P.-L., Saucier, C., 2007. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6292-6299.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M., 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1768-1774.
- Dulundu, E., Ozel, Y., Topaloglu, U., Toklu, H., Ercan, F., Gedik, N., Sener, G., 2007. Grape seed extract reduces oxidative stress and fibrosis in experimental biliary obstruction. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22, 885-892.
- Eim, V., 2012. Tesis doctoral: Optimización del proceso de secado en base a criterios de calidad. Aplicación al diseño de un alimento cárnico enriquecido en fibra alimentaria. In, Departamento de Química. Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca (España).

- Eim, V., Urrea, D., Rosselló, C., García-Pérez, J.V., Femenia, A., Simal, S., 2013. Optimization of the drying process of carrot (*Daucus carota* v. Nantes) on the basis of quality criteria. *Drying Technology* 31, 951-962.
- Elez-Martínez, P., Aguilo-Aguayo, I., Martín-Belloso, O., 2006. Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 71-81.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications – A review. *Food Chemistry* 124, 411-421.
- Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., Cárcel, J.A., 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews* 3, 108-120.
- Eshak, E.S., Iso, H., Date, C., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Wada, Y., Wakai, K., Tamakoshi, A., Grp, J.S., 2010. Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women. *Journal of Nutrition* 140, 1445-1453.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A.M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V., 2005. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International* 38, 1167-1173.
- Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Basora-Gallisa, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas, M.I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M.C., Escoda, R., Peña, M.A., Diez-Espino, J., Lahoz, C., Lapetra, J., Saez, G., Ros, E., 2009. Effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *Journal of Epidemiology and Community Health* 63, 582-588.
- Fabani, M.P., Arrúa, R.C., Vázquez, F., Dáaz, M.P., Baroni, M.V., Wunderlin, D.A., 2010. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. *Food Chemistry* 119, 372-379.
- Femenia, A., García-Pascual, P., Simal, S., Rosselló, C., 2003. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers* 51, 397-405.
- Femenia, A., Lefebvre, A.-C., Thebaudin, J.-Y., Robertson, J.A., Bourgeois, C.-M., 1997. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. *Journal of Food Science* 62, 635-639.
- Femenia, A., Rosselló, C., Mulet, A., Cañellas, J., 1995. Chemical composition of bitter and sweet apricot kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 356-361.
- Femenia, A., Sastre-Serrano, G., Simal, S., Garau, M.C., Eim, V.S., Rosselló, C., 2009. Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT-Food Science and Technology* 42, 106-112.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., 2013. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50, 161-166.
- Fernández, A., López, M., Bernardoa, A., Condon, S., Raso, J., 2007a. Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* 24, 372-379.
- Fernández, K., Kennedy, J.A., Agosín, E., 2007b. Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. *Carménère* grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3675-3680.
- Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J.L., Martínez, M.C., Simal-Gándara, J., 2012. Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes

- varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry* 130, 9-19.
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I., Asenjo, F., 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* 91, 395-401.
- Forcén, M., Berna, A., Mulet, A., 1993. Using aroma components to characterize Majorcan varietal red wines and musts. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 26, 54-58.
- Formica, J.V., 2007. Terroir is not just a grapevine phenomenon. *American Wine Society Journal* 39, 7-11.
- Fraeye, I., De Roeck, A., Duvetter, T., Verlent, I., Hendrickx, M., Van Loey, A., 2007. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry* 105, 555-563.
- Fuentes-Alventosa, J.M., Rodríguez-Gutiérrez, G., Jaramillo-Carmona, S., Espejo-Calvo, J.A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Bolanos, J., Guillén-Bejarano, R., Jiménez-Araujo, A., 2009. Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fibre powders obtained from asparagus by-products. *Food Chemistry* 113, 665-671.
- Fuleki, T., Ricardo-da-Silva, J.M., 1997. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1156-1160.
- Galgano, F., Favati, F., Camso, M., Scarpa, T., Palma, A., 2008. Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. *LWT-Food Science and Technology* 41, 1808-1815.
- Gan, C.-Y., Latiff, A.A., 2011. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using Response Surface Methodology. *Food Chemistry* 124, 1277-1283.
- Garau, M.C., 2008. Tesis doctoral: Optimización del proceso de secado de diferentes productos agrícolas para la obtención de concentrados de frutas y hortalizas de elevada calidad. In, Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- Garau, M.C., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., 2007. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry* 104, 1014-1024.
- García Pérez, J.V., 2007. Tesis doctoral: Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos. In, Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J.M., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T., 2011. Multivariate analysis of the polyphenol composition of *Tempranillo* and *Graciano* red wines. *Talanta* 85, 2060-2066.
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibáñez, E., García-Moreno, C., 2006. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta* 563, 44-50.
- Garrido, M.D., Auqui, M., Martí, N., Linares, M.B., 2011. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2238-2243.

- Ghafoor, K., Choi, Y.H., 2009a. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through Response Surface Methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52, 295-300.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4988-4994.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009b. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4988-4994.
- Ghafoor, K., Hui, T., Choi, Y.H., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry* 35, 735-746.
- Giner, J., Grouberman, P., Gimeno, V., Martín, O., 2005. Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: Comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1613-1621.
- Goldner, M.C., Zamora, M.C., 2007. Sensory characterization of *Vitis Vinifera* CV. *Malbec* wines from seven viticulture regions of Argentina. *Journal of Sensory Studies* 22, 520-532.
- Gollucke, A.P., Aquiar, O.J., Barbisan, L.F., Ribeiro, D.A., 2013. Use of grape polyphenols against carcinogenesis: Putative molecular mechanisms of action using *in vitro* and *in vivo* test systems. *Journal of Medicinal Food* 16, 199-205.
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.-L., 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11850-11858.
- González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M.C., López, F., Femenia, A., 2010. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1580-1586.
- González-Centeno, M.R., Simal, S., Femenia, A., Frau, M., Rosselló, C., 2013. Identification of behaviour patterns of viticultural regions according to their agroclimatic fingerprint and grape characteristics. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19, 53-61.
- González-Montelongo, R., Lobo, M.G., González, M., 2010. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Separation and Purification Technology* 71, 347-355.
- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M., Carbonneau, A., 2007. Varietal differentiation of *Tannat*, *Cabernet Sauvignon* and *Merlot* grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology* 225, 111-117.
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., Ferrer, M., 2012. Influence of grape composition and winemaking on the anthocyanin composition of red wines of *Tannat*. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 900-909.
- González-Paramás, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 234-238.
- González-San José, M.L., Santa-María, G., Díez, C., 1990. Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 3, 54-66.

- González, A., Llorens, A., Cervera, M.L., Armenta, S., De la Guardia, M., 2009. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry* 112, 26-34.
- Goñi, I., Martín, N., Saura-Calixto, F., 2005. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chemistry* 90, 281-286.
- Gremaud, G., Quaile, S., Piantini, U., Pfammatter, E., Corvi, C., 2004. Characterization of Swiss vineyards using isotopic data in combination with trace elements and classical parameters. *European Food Research and Technology* 219, 97-104.
- Grigelmo-Miguel, N., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., 1999c. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient. *Food Chemistry* 65, 175-181.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., 1999a. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International* 31, 355-361.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., 1999b. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 32, 503-508.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P., Kefalas, P., 2005. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera*) cultivated in Greece: Implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals. *Phytochemical Analysis* 16, 17-23.
- Guillotin, S.E., Van Loey, A., Boulenger, P., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2007. Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids* 21, 85-91.
- Gupta, N.K., Dixit, V.K., 2011. Absorption enhancement of grape seed polyphenols by complexation with phosphatidyl choline. *Drug Delivery* 18, 312-319.
- Gómez-Cordovés, C., González-San José, M.L., Junquera, B., Estrella, I., 1995. Correlation between flavonoids and color in red wines aged in wood. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 295-298.
- Gómez-Míguez, M.J., Gómez-Míguez, M., Vicario, I.M., Heredia, F.J., 2007. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering* 79, 758-764.
- Hanlin, R.L., Downey, M.O., 2009. Condensed tannin accumulation and composition in skin of *Shiraz* and *Cabernet Sauvignon* grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 13-23.
- Hanlin, R.L., Kelm, M.A., Wilkinson, K.L., Downey, M.O., 2011. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of *Shiraz* and *Cabernet Sauvignon* wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 13265-13276.
- Hayta, M., Özugur, G., Etgü, H., Tugkan Seker, I., 2013. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) pomace on the quality, total phenolic content and anti-radical activity of bread. *Journal of Food Processing and Preservation* DOI: 10.1111/jfpp.12054.
- Hernández-Jiménez, A., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., Kennedy, J.A., 2009. Grape skin and seed proanthocyanidins from *Monastrell* x *Syrah* Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10798-10803.
- Hidalgo, L., 2002. Tratado de viticultura general. Mundi-Prensa, Madrid.
- Hidalgo Togoies, J., 2003. Tratado de enología. Mundi-Prensa, Madrid.
- Hidalgo Togoies, J., 2006. La calidad del vino desde el viñedo. Mundi-Prensa, Madrid.

- Hilz, H., Bakx, E.J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2005. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries – Characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers* 59, 477-488.
- Hipsley, E.H., 1953. Dietary fibre and pregnancy toxemia. *British Medical Journal* 2, 420-422.
- Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A., Essassi, E.M., 1996. Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 186-192.
- Hojnik, M., Skerget, M., Knez, Z., 2008. Extraction of lutein from Marigold flower petals - Experimental kinetics and modelling LWT - *Food Science and Technology* 41, 2008-2016.
- Hoye, C.J., Ross, C.F., 2011. Total phenolic content, consumer acceptance, and instrumental analysis of bread made with grape seed flour. *Journal of Food Science* 76, S428-S436.
- Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856.
- Hudson, T.S., Hartle, D.K., Hursting, S.D., Nunez, N.P., Wang, T.T.Y., Young, H.A., Arany, P., Green, J.E., 2007. Inhibition of prostate cancer growth by *Muscadine* grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Research* 67, 8396-8405.
- Héberger, K., Csomós, E., Simon-Sarkadi, L., 2003. Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 8055-8060.
- Iacumin, L., Manzano, M., Cecchini, F., Orlic, S., Zironi, R., Comi, G., 2012. Influence of specific fermentation conditions on natural microflora of pomace in "Grappa" production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1747-1759.
- Isken, F., Klaus, S., Osterhoff, M., Pfeiffer, A.F.H., Weickert, M.O., 2010. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21, 278-284.
- Iwasaki, Y., Matsui, T., Arakawa, Y., 2004. The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in Wistar rats. *Journal of Gastroenterology* 39, 831-837.
- Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., Hann, S., 2010. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry* 122, 366-372.
- Jiménez-Escrig, A., Sánchez-Muniz, F.J., 2000. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research* 20, 585-598.
- Johnson, M.H., De Mejia, E.G., 2012. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. *Journal of Food Science* 77, C141-C148.
- Jokic, S., Velic, D., Bilic, M., Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., 2010. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences* 28, 206-212.
- Ju, Z.Y., Howard, L.R., 2005. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *Journal of Food Science* 70, S270-S276.
- Jung, H.J., Hwang, I.A., Sung, W.S., Kang, H., Kang, B.S., Seu, Y.B., Lee, D.G., 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of Pharmacal Research* 28, 557-560.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I.S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., Psarra, E., 2001. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component

- analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry* 73, 501-514.
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., Turkoglu, H., 2011. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1065-1072.
- Karacabey, E., Mazza, G., 2010. Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* 119, 343-348.
- Karvela, E., Makris, D.P., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T., 2009. Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta* 79, 1311-1321.
- Kendall, C.W.C., Esfahani, A., Jenkins, D.J.A., 2010. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* 24, 42-48.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77-85.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 268-274.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., Chemat, F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* 119, 851-858.
- Khanna, S., Roy, S., Bagchi, D., Bagchi, M., Sen, C.K., 2001. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 38-42.
- Khanna, S., Venojarvi, M., Roy, S., Sharma, N., Trikha, P., Bagchi, D., Bagchi, M., Sen, C.K., 2002. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1089-1096.
- Kitanovic, S., Milenovic, D., Vejkovic, V.B., 2008. Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Biochemical Engineering Journal* 41, 1-11.
- Kontkanen, D., Reynolds, A.G., Cliff, M.A., King, M., 2005. Canadian terroir: sensory characterization of Bordeaux-style red wine varieties in the Niagara Peninsula. *Food Research International* 38, 417-425.
- Kostadinovic, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., Winterhalter, P., 2012. Stilbene levels and antioxidant activity of *Vranec* and *Merlot* wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chemistry* 135, 3003-3009.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., van Leeuwen, C., 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. *Agiorgitiko* (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5077-5086.
- Krikorian, R., Nash, T.A., Shidler, M.D., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., 2010. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *British Journal of Nutrition* 103, 730-734.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., Garipey, Y., Thangavel, K., 2013. Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food and Bioprocess Technology* 6, 441-455.

- Ku, C.S., Mun, S.P., 2008. Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology* 99, 8325-8330.
- Lafka, T.-I., Lazou, A.E., Sinanoglou, V.J., Lazos, E.S., 2013. Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods* 2, 18-31.
- Lafka, T.-I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S., 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry* 104, 1206-1214.
- Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., 2011a. Phenolic composition of the Brazilian seedless table grape varieties *BRS Clara* and *BRS Morena*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 8314-8323.
- Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I., 2011b. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of *Bordo* grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 13136-13146.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71, 214-222.
- Lazze, M.C., Pizzala, R., Gutiérrez Pecharrmán, F.J., Gatón Garnica, P., Antolin Rodríguez, J.M., Fabris, N., Bianchi, L., 2009. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *Journal of Medicinal Food* 12, 561-568.
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y., 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* 28, 729-737.
- Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., La Vecchia, C., 2001. Dietary fibre and the risk of colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 37, 2091-2096.
- Li, H., Jiang, D., Wollenweber, B., Dai, T., Cao, W., 2010. Effects of shading on morphology, physiology and grain yield of winter wheat. *European Journal of Agronomy* 33, 267-275.
- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H., 2008a. Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 16, 67-73.
- Li, W.G., Zhang, X.Y., Wu, Y.J., Tian, X., 2001. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacologica Sinica* 22, 1117-1120.
- Li, X.-L., Cai, Y.-Q., Qin, H., Wu, Y.-J., 2008b. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86, 841-849.
- Linares, A.R., Hase, S.L., Vergara, M.L., Resnik, S.L., 2010. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: Influence of temperature. *Journal of Food Engineering* 97, 471-477.
- Lindström, J., Peltonen, M., Eriksson, J.G., Louheranta, A., Fogelholm, M., Uusitupa, M., Tuomilehto, J., 2006. High-fibre, low-fat diet predicts long-term weight loss and decreased type 2 diabetes risk: The Finnish diabetes prevention study. *Diabetologia* 49, 912-920.
- Llady, M.C., Canals, R., Miquel Canals, J., Zamora, F., 2008. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology* 226, 337-344.
- Llobera, A., Cañellas, J., 2007. Dietary fibre content and antioxidant activity of *Manto Negro* red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* 101, 659-666.

- Llobera, A., Cañellas, J., 2008. Antioxidant activity and dietary fibre of *Prensal Blanc* white grape (*Vitis vinifera*) by-products. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1953-1959.
- Loening-Baucke, V., Miele, E., Staiano, A., 2004. Fiber (glucomannan) is beneficial in the treatment of childhood constipation. *Pediatrics* 113, E259-E264.
- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R., 2008. Differentiation of co-winemaking wines by their aroma composition. *European Food Research and Technology* 227, 777-787.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissèdre, P.-L., 2011. Phenolic composition of *Merlot* and *Cabernet Sauvignon* grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry* 126, 1991-1999.
- Lukic, I., Milicevic, B., Banovic, M., Tomas, S., Radeka, S., Persuric, D., 2011. Secondary aroma compounds in fresh grape marc distillates as a result of variety and corresponding production technology. *Food Technology and Biotechnology* 49, 214-227.
- Lunn, J., Buttriss, J.L., 2007. Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin* 32, 21-64.
- López, G., Ros, G., Rincón, F., Periago, M.J., Martínez, M.C., Ortuño, J., 1996. Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2773-2778.
- López, J., Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., González, E., Di Scala, K., 2010. Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety *O'Neil*. *Food and Bioprocess Technology* 3, 772-777.
- Maestre, R., Micol, V., Funes, L., Medina, I., 2010. Incorporation and interaction of grape seed extract in membranes and relation with efficacy in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 8365-8374.
- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., Carle, R., 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 112, 551-559.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007a. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 125-132.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., 2007b. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology* 98, 2963-2967.
- Makris, D.P., Boskou, G., Andrikopoulos, N.K., Kefalas, P., 2008. Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. *Roditis*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 226, 1075-1079.
- Makris, D.P., Kallithraka, S., Mamalos, A., 2006. Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta* 70, 1143-1152.
- Mandic, A.I., Dilas, S.M., Cetkovic, G.S., Canadanovic-Brunet, J.M., Tumbas, V.T., 2008. Polyphenolic composition and antioxidant activities of grape seed extract. *International Journal of Food Properties* 11, 713-726.
- Manrique, G.D., Lajolo, F.M., 2002. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25, 99-107.

- Mantena, S.K., Baliga, M.S., Katiyar, S.K., 2006. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27, 1682-1691.
- MAPA, 1994. Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riego. In, *Métodos Oficiales de Análisis*, Madrid.
- Marabi, A., Livings, S., Jacobson, M., Saguy, I.S., 2003. Normalized Weibull distribution for modeling rehydration of food particulates. *European Food Research and Technology* 217, 311-318.
- Martin, A.E., Watling, R.J., Lee, G.S., 2012. The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chemistry* 133, 1081-1089.
- Marín, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry* 100, 736-741.
- Mason, T.J., 1998. Power ultrasound in food processing. The way forward. In: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing* Chapman & Hall, Londres (Reino Unido).
- Mason, T.J., Chemat, F., Vinatoru, M., 2011. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry* 15, 237-247.
- Mateus, N., Machado, J.M., de Freitas, V., 2002. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1689-1695.
- Mateus, N., Marques, S., Gonçalves, A.C., Machado, J.M., De Freitas, V., 2001. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley during ripening: Influence of cultivation altitude. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 115-121.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., Trainotti, D., 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 27-35.
- Matías, A.A., Serra, A.T., Silva, A.C., Perdigo, R., Ferreira, T.B., Marcelino, I., Silva, S., Coelho, A.V., Alves, P.M., Duarte, C.M.M., 2010. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61, 357-368.
- Mayne, S.T., 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *Journal of Nutrition* 133, 933S-940S.
- McKee, L.H., Latner, T.A., 2000. Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* 55, 285-304.
- Medina, I., Lois, S., Lizarraga, D., Pazos, M., Tourino, S., Cascante, M., Torres, J.L., 2006. Functional fatty fish supplemented with grape procyanidins. Antioxidant and proapoptotic properties on colon cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3598-3603.
- Meyer, K.A., Kushi, L.H., Jacobs, D.R., Slavin, J., Sellers, T.A., Folsom, A.R., 2000. Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 921-930.
- Miele, A., Rizzon, L.A., Zanús, M.C., 2010. Discrimination of Brazilian red wines according to the viticultural region, varietal, and winery origin. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30, 268-275.

- Mielnik, M.B., Olsen, E., Vogt, G., Adeline, D., Skrede, G., 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT-Food Science and Technology* 39, 191-198.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., Gorecka, D., 2013. White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Journal of the science of food and agriculture* 93, 389-395.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A., Pacynski, M., 2011. Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1485-1493.
- Minnaar, P.P., Booyse, M., 2011. Differentiation among young and market-ready *Cabernet Sauvignon*, *Pinotage* and *Shiraz* wines: Application of canonical discriminant analysis using flavonoid and non-flavonoid compositional data. *South African Journal of Enology and Viticulture* 32, 251-261.
- Mohammed, A.R., Tarpley, L., 2010. Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *European Journal of Agronomy* 33, 117-123.
- Monagas, M., Bartolomé, B., 2009. Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* Springer, New York, EE.UU., pp. 439-456.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45, 85-118.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo-Da-Silva, J.M., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. *Graciano*, *Tempranillo*, and *Cabernet Sauvignon*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6475-6481.
- Monrad, J.K., Howard, L.R., King, J.W., Srinivas, K., Mauromoustakos, A., 2010. Subcritical solvent extraction of procyanidins from dried red grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 4014-4021.
- Mori, K., Sugaya, S., Gemma, H., 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105, 319-330.
- Morlat, R., Bodin, F., 2006. Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on oil depth - II. Validation of the grape yield and berry quality in the Anjou vineyard (France). *Plant and Soil* 281, 55-69.
- Mouton, G.D., 2006. *Terroir* - The footprint of great wines. In. Cape Wine Academy, South Africa.
- Mrad, N.D., Boudhrioua, N., Kechaou, N., Courtois, F., Bonazzi, C., 2012. Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing* 90, 433-441.
- Mulet, A., Berna, A., Forcén, M., 1992. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts and wines from majorcan origin. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 221-226.
- Murphy, N., Norat, T., Ferrari, P., Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, B., Skeie, G., Dahm, C.C., Overvad, K., Olsen, A., Tjonneland, A., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.C., Racine, A., Kaaks, R., Teucher, B., Boeing, H., Bergmann, M.M., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Lagiou, P., Palli, D., Pala, V., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Siersema, P., van Duijnhoven, F., Peeters, P.H.M., Hjartaker, A., Engeset, D., Gonzalez,

- C.A., Sanchez, M.-J., Dorronsoro, M., Navarro, C., Ardanaz, E., Quiros, J.R., Sonestedt, E., Ericson, U., Nilsson, L., Palmqvist, R., Khaw, K.-T., Wareham, N., Key, T.J., Crowe, F.L., Fedirko, V., Wark, P.A., Chuang, S.-C., Riboli, E., 2012. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Plos One* 7.
- Nabli, R., Achour, S., Jourdes, M., Teissèdre, P.-L., Helal, A.N., Ezzili, B., 2012. Anthocyanin composition and extraction from *Grenache Noir* (*Vitis vinifera* L.) vine leaf using an experimental design I- by ethanol or sulfur dioxide. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 46, 295-304.
- Naczk, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* 87, 41-44.
- Noordin, M.Y., Venkatesh, V.C., Sharif, S., Elting, S., Abdullah, A., 2004. Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel. *Journal of Materials Processing Technology* 145, 46-58.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta* 630, 107-115.
- Obrique-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O., 2010. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from *Carménère* and *Cabernet Sauvignon* grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3591-3599.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Ano, V., Martín-Belloso, O., 2008. Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 89, 210-216.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Influence of storage temperature on the kinetics of the changes in anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in fresh-cut strawberries stored under high-oxygen atmospheres. *Journal of Food Science* 74, C184-C191.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A., 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. *Shiraz*. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 261-267.
- Olas, B., Wachowicz, B., Stochmal, A., Oleszek, W., 2012. The polyphenol-rich extract from grape seeds inhibits platelet signaling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Platelets* 23, 282-289.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Use of Weibull distribution for describing kinetics of antioxidant potential changes in fresh-cut watermelon. *Journal of Food Engineering* 95, 99-105.
- Overman, A., Bumrungpert, A., Kennedy, A., Martínez, K., Chuang, C.C., West, T., Dawson, B., Jia, W., McIntosh, M., 2010. Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *International Journal of Obesity* 34, 800-808.
- Ozen, B.O., Eren, M., Pala, A., Özmen, I., Soyer, A., 2011. Effect of plant extracts on lipid oxidation during frozen storage of minced fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 724-731.

- Ozvural, E.B., Vural, H., 2011. Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Science* 88, 179-183.
- Palma, M., Barroso, C.G., 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta* 458, 119-130.
- Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M.T., Clavijo, A., Gómez, I.A., 2010. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. *Microchemical Journal* 94, 175-179.
- Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M.T., Gómez, I.A., 2009. Metal contents in "oloroso" sherry wines and their classification according to provenance. *Food Chemistry* 117, 302-305.
- Panouillé, M., Ralet, M.C., Bonnin, E., Thibault, J.F., 2007. Recovery and reuse of trimmings and pulps from fruit and vegetable processing. In: Waldron, K. (Ed.), *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 417-447.
- Park, H.S., Im, N.G., Kim, K.H., 2012. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT-Food Science and Technology* 45, 73-78.
- Pasinetti, G.M., 2012. Novel role of red wine-derived polyphenols in the prevention of Alzheimer's disease dementia and brain pathology: Experimental approaches and clinical implications. *Planta Medica* 78, 1614-1619.
- Patist, A., Bates, D., 2008. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.
- Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Medina, I., 2005. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* 92, 547-557.
- Pearson, D., 1981. *Laboratory techniques in food analysis*. Butterworths and Co. Ltd., London.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition* 133, 2812-2819.
- Pelucchi, C., Talamini, R., Levi, F., Bosetti, C., La Vecchia, C., Negri, E., Parpinel, M., Franceschi, S., 2003. Fibre intake and laryngeal cancer risk. *Annals of Oncology* 14, 162-167.
- Peng, X., Ma, J., Cheng, K.-W., Jiang, Y., Chen, F., Wang, M., 2010. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry* 119, 49-53.
- Perde-Schrepler, M., Chereches, G., Brie, I., Tatornir, C., Postescu, I.D., Soran, L., Filip, A., 2013. Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 118, 16-21.
- Pereira, M.A., O'Reilly, E., Augustsson, K., Fraser, G.E., Goldbourt, U., Heitmann, B.L., Hallmans, G., Knekt, P., Liu, S.M., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W.C., Ascherio, A., 2004. Dietary fiber and risk of coronary heart disease - A pooled analysis of cohort studies. *Archives of Internal Medicine* 164, 370-376.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006a. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* 17, 579-590.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Núñez, M.J., Nicoli, M.C., 2005. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry* 92, 109-117.

- Pinelo, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., 2006b. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering* 77, 57-63.
- Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2011. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products* 33, 200-204.
- Post, R.E., Mainous, A.G., III, King, D.E., Simpson, K.N., 2012. Dietary fiber for the treatment of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Journal of the American Board of Family Medicine* 25, 16-23.
- Pradhan, A.K., Li, M., Li, Y., Kelso, L.C., Costello, T.A., Johnson, M.G., 2012. A modified Weibull model for growth and survival of *Listeria innocua* and *Salmonella Typhimurium* in chicken breasts during refrigerated and frozen storage. *Poultry Science* 91, 1482-1488.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T., 1995. Cluster sun exposure and quercetin in *Pinot Noir* grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 187-194.
- Pridham, J.B., 1965. Low molecular weight phenols in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 16, 13-36.
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2008. Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Research Reviews* 21, 158-173.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M.E., García-Diz, L., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 24, 646-653.
- Pérez-Jiménez, J., Sáyago-Ayerdi, S.G., 2009. Grape antioxidant dietary fibre. A natural food additive and a dietary supplement. *Agro Food Industry Hi-Tech* 20, 17-19.
- Pérez-Magariño, S., González-San José, M.L., 2001. Differentiation parameters of Ribera del Duero wines from other Spanish denominations of origin. *Food Science and Technology International* 7, 237-244.
- Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-San José, M.L., 2002. Multivariate classification of rosé wines from different Spanish Protected Designations of Origin. *Analytica Chimica Acta* 458, 187-190.
- Püssa, T., Floren, J., Kuldepp, P., Raal, A., 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7488-7494.
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H., 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering* 99, 16-23.
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Moncada, R., Lozano, M., Ah-Hen, K., 2013. A kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) seeds. *Journal of Food Process Engineering* 36, 202-210.
- Rababah, T.M., Yucel, S., Ereifej, K.I., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Yang, W., Muhammad, A.-u.d.H., Ismael, K., 2011. Effect of grape seed extracts on the physicochemical and sensory properties of corn chips during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society* 88, 631-637.
- Radha Krishnan, K., Sivarajan, M., Babuskin, S., Archana, G., Azhagu Saravana Babu, P., Sukumar, M., 2013. Kinetic modeling of spice extraction from *S. aromaticum* and *C. cassia*. *Journal of Food Engineering* 117, 326-332.
- Raghavendra, S.N., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Tharanathan, R.N., 2004. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research and Technology* 218, 563-567.

- Raghavendra, S.N., Swamy, S.R.R., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Kumar, S., Tharanathan, R.N., 2006. Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *Journal of Food Engineering* 72, 281-286.
- Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J.-L., Porte, C., Fauduet, H., 2007. Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L. - Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology* 54, 253-261.
- Ramulu, P., Rao, P.U., 2003. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 677-685.
- Raso, J., Mañas, P., Pagán, R., Sala, F.J., 1999. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 5, 157-162.
- Razic, S., Onjia, A., 2010. Trace element analysis and pattern recognition techniques in classification of wine from central Balkan countries. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 506-511.
- 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, 1231-1237.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Mateos-Aparicio, I., 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chemistry* 108, 1099-1105.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Rodríguez-Sevilla, M.D., Mateos-Aparicio, I., 2007. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). *Food Chemistry* 101, 1216-1222.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., Valdivia-López, M.A., 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry* 107, 656-663.
- Rezaei, J.H., Reynolds, A.G., 2010. Characterization of Niagara Peninsula *Cabernet Franc* wines by sensory analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 1-14.
- Rhodes, P.L., Mitchell, J.W., Wilson, M.W., Melton, L.D., 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety *Ribier*. *International Journal of Food Microbiology* 107, 281-286.
- Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Teguo, P., Teissèdre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C., Mérillon, J.M., 1999. Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2666-2670.
- Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique* 48, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, J., 1963. Les acides phénols de *Vitis vinifera*. *C. R. Académie des Sciences* 256 4108-4111
- Ribéreau-Gayon, J., 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Paris.
- Rivas-Gonzalo, J.C., Gutiérrez, Y., Polanco, A.M., Hebrero, E., Vicente, J.L., Galindo, P., Santos-Buelga, C., 1993. Biplot analysis applied to enological parameters in the geographical classification of young red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 302-308.
- Robertson, J.A., de Monredon, F.D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., Thibault, J.F., 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 33, 72-79.

- Rockenbach, I.I., da Silva, G.L., Rodrigues, E., Kuskoski, E.M., Fett, R., 2008. Solvent influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from *Tannat* and *Anceleta* - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, 238-244.
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliar, V., Genovese, M.I., de Souza Schmidt Gonçalves, A.E., Fett, R., 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry* 127, 174-179.
- Rodrigo, D., Barbosa-Canovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M., 2003. Pectin methyl esterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 66, 2336-2342.
- Rodrigo, D., Martínez, A., Harte, F., Barbosa-Canovas, G.V., Rodrigo, M., 2001. Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of pulsed electric fields: Comparison of inactivation kinetics models. *Journal of Food Protection* 64, 259-263.
- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascuena, J., García Romero, E., 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 687-693.
- Rodríguez-Delgado, M.A., González-Hernández, G., Conde-González, J.E., Pérez-Trujillo, J.P., 2002. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry* 78, 523-532.
- Rodríguez-Fernández, M., Balsa-Canto, E., Egea, J.A., Banga, J.R., 2007. Identifiability and robust parameter estimation in food process modeling: Application to a drying model. *Journal of Food Engineering* 83, 374-383.
- Rodríguez-González, V.M., Femenia, A., Minjares-Fuentes, R., González-Laredo, R.F., 2012. Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: Optimization using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology* 47, 225-232.
- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., Brosse, N., 2013. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Industrial Crops and Products* 43, 251-254.
- Rosselló, C., Bestard, I., Cañellas, J., Femenia, A., Simal, S., 2003. Conèixer i gaudir els aliments de les Illes Balears. Universitat de les Illes Balears. Servei de Publicacions i Intercanvi Científic, Palma de Mallorca (Espanya).
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., De Tommasi, N., 2007. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry* 100, 203-210.
- Sabir, A., Unver, A., Kara, Z., 2012. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 1982-1987.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yilmaz, M.T., Yetim, H., 2011. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *Journal of Food Science* 76, M515-M521.
- Saha, J., Biswas, A., Chhetri, A., Sarkar, P.K., 2011. Response surface optimisation of antioxidant extraction from kinema, a *Bacillus*-fermented soybean food. *Food Chemistry* 129, 507-513.
- Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., Yamaji, N., 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1460-1464.

- Salette, J., Asselin, C., Morlat, R., 1998. Le lien du *terroir* au produit: Analyse du système *terroir*-vigne-vin et possibilité d'applications à d'autres produits. *Sciences des Aliments* 18, 251-265.
- Sangnark, A., Noomhorm, A., 2003. Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. *Food Chemistry* 80, 221-229.
- Sant'Anna, V., Brandelli, A., Ferreira Marczak, L.D., Tessaro, I.C., 2012a. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. *Separation and Purification Technology* 100, 82-87.
- Santos, P.H.S., Silva, M.A., 2009. Kinetics of L-ascorbic acid degradation in pineapple drying under ethanolic atmosphere. *Drying Technology* 27, 947-954.
- Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E.M., Escribano-Bailón, M.T., 1995. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry* 53, 197-201.
- Sant'Anna, V., Damasceno, L., Marczak, F., Tessaro, I.C., 2012b. Kinetic modeling of anthocyanin Extraction from grape marc *Food and Bioprocess Technology* DOI 10.1007/s11947-012-1016-1.
- Saura-Calixto, F., 1998. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4303-4306.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., 2006. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry* 94, 442-447.
- Saura-Calixto, F., Goñi, I., Manas, E., Abia, R., 1991. Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fiber constituents. Determination in grape pomaces. *Food Chemistry* 39, 299-309.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61, 263-289.
- Scheppach, W., Luehrs, H., Melcher, R., Gostner, A., Schaubert, J., Kudlich, T., Weiler, F., Menzel, T., 2004. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. *Clinical Nutrition Supplements* 1, 51-58.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - Recent developments. *Trends in Food Science and Technology* 12, 401-413.
- Sehirli, O., Ozel, Y., Dulundu, E., Topaloglu, U., Ercan, F., Sener, G., 2008. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytotherapy Research* 22, 43-48.
- Shahidi, F., Naczk, M., 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals: Sources, applications and health effects*, Boca Raton, Florida, United States.
- Shanmuganayagam, D., Warner, T.F., Krueger, C.G., Reed, J.D., Folts, J.D., 2007. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 190, 135-142.
- Shin, M.-O., Moon, J.-O., 2010. Effect of dietary supplementation of grape skin and seeds on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Nutrition Research and Practice* 4, 369-374.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status. *Chemical Engineering and Processing* 53, 10-23.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y., 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101, 1012-1018.

- Silva, M.A., Ky, I., Jourdes, M., Teissèdre, P.-L., 2012. Rapid and simple method for the quantification of flavan-3-ols in wine. *European Food Research and Technology* 234, 361-365.
- Silva, M.L., Macedo, A.C., Malcata, F.X., 2000. Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Science and Technology International* 6, 285-300.
- Simal, S., Garau, M.C., Femenia, A., Rosselló, C., 2006. A diffusional model with a moisture-dependent diffusion coefficient. *Drying Technology* 24, 1365-1372.
- Singh, A., Kuila, A., Yadav, G., Banerjee, R., 2011. Process optimization for the extraction of polyphenols from *Okara*. *Food Technology and Biotechnology* 49, 322-328.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Sivertsen, H.K., Holen, B., Nicolaysen, F., Risvik, E., 1999. Classification of French red wines according to their geographical origin by the use of multivariate analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 107-115.
- Slavin, J.L., 2005. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21, 411-418.
- Soar, C.J., Sadras, V.O., Petrie, P.R., 2008. Climate drivers of red wine quality in four contrasting Australian wine regions. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 78-90.
- Soliva-Fortuny, R., Bendicho-Porta, S., Martín-Belloso, O., 2006. Modeling high-intensity pulsed electric field inactivation of a lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science* 89, 4096-4104.
- Soto, M.U.R., Brown, K., Ross, C.F., 2012. Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 592-602.
- Soto Vázquez, E., Río Segade, S., Cortés Dieguez, S., 2011. Classification of red and white wines by denomination of origin according to phenolic composition and colour characteristics and correlation with standard parameters. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 542-548.
- Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., Biliaderis, C.G., 2003. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry* 80, 261-273.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43, 509-512.
- Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M., 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1076-1080.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., Ferguson, J.C., 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. *Merlot* berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 171-182.
- Spigno, G., De Faveri, D.M., 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78, 793-801.
- Spiller, G.A., 1986. Suggestions for a basis on which to determine a desirable intake of dietary fibre In: Spiller, G.A. (Ed.), *CRC handbook of dietary fibre in human nutrition* CRC Press, Florida, pp. 281-283.
- Stagos, D., Kazantzoglou, G., Theofanidou, D., Kakalopoulou, G., Magiatis, P., Mitaku, S., Kouretas, D., 2006. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium*

- strain TA102. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 609, 165-175.
- Strati, I.F., Oreopoulou, V., 2011. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry* 129, 747-752.
- Streppel, M.T., Ocke, M.C., Boshuizen, H.C., Kok, F.J., Kromhout, D., 2008. Dietary fiber intake in relation to coronary heart disease and all-cause mortality over 40 years: The Zutphen Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 88, 1119-1125.
- Sturtzel, B., Mikulits, C., Gisinger, C., Elmadfa, I., 2009. Use of fiber instead of laxative treatment in a geriatric hospital to improve the wellbeing of seniors. *Journal of Nutrition Health and Aging* 13, 136-139.
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A.S., Dobre, T., 2011. Empirical models applied for kinetics extraction of beta-carotene from *Rosa canina*. *Revista de Chimie* 62, 344-348.
- Su, X., D'Souza, D.H., 2011. Grape seed extract for control of human enteric viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 3982-3987.
- Sun, B.S., Pinto, T., Leandro, M.C., Ricardo-Da-Silva, J.M., Spranger, M.I., 1999. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 179-184.
- Sáenz, C., Cedrón, T., Cabredo, S., 2010. Classification of wines from five Spanish origin denominations by aromatic compound analysis. *Journal of AOAC International* 93, 1916-1922.
- Sánchez-Alonso, I., Borderías, A.J., 2008a. Technological effect of red grape antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1009-1018.
- Sánchez-Alonso, I., Borderías, J., Larsson, K., Undeland, I., 2007b. Inhibition of hemoglobin-mediated oxidation of regular and lipid-fortified washed cod mince by a white grape dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5299-5305.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., Borderías, A.J., 2007c. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry* 101, 372-378.
- Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., Borderías, A.J., 2008b. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT-Food Science and Technology* 41, 42-50.
- Sánchez-Alonso, I., Solas, M.T., Borderías, A.J., 2007a. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *Journal of Food Science* 72, E94-E101.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Brenes, A., Goñi, I., 2009. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT-Food Science and Technology* 42, 971-976.
- Tabaraki, R., Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 1279-1286.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Dommès, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, 1226-1233.
- Tarascou, I., Souquet, J.M., Mazauric, J.P., Carrillo, S., Coq, S., Canon, F., Fulcrand, H., Cheyrier, V., 2010. The hidden face of food phenolic composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501, 16-22.

- Teoh, Y.P., Mat Don, M., Ujang, S., 2012. Application of Box-Behnken design to the extraction of flavonoid fraction of *Schizophyllum commune* and the empirical kinetic study Chemical Product and Process Modeling 7, Article 11.
- Terra, X., Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardevol, A., Blade, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvado, J., Arola, L., Blay, M., 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. Journal of Nutritional Biochemistry 20, 210-218.
- Terrier, N., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V., 2009. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In: Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.), Wine Chemistry and Biochemistry. Springer, New York, EE.UU., pp. 463-496.
- Tesic, D., Woolley, D.J., Hewett, E.W., Martin, D.J., 2002a. Environmental effects on cv *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinifera* L.) grown in Hawke's Bay, New Zealand. 1. Phenology and characterisation of viticultural environments. Australian Journal of Grape and Wine Research 8, 15-26.
- Tesic, D., Woolley, D.J., Hewett, E.W., Martin, D.J., 2002b. Environmental effects on cv *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinifera* L.) grown in Hawke's Bay, New Zealand. 2. Development of a site index. Australian Journal of Grape and Wine Research 8, 27-35.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis 19, 669-675.
- Thebaudin, J.Y., Lefebvre, A.C., Harrington, M., Bourgeois, C.M., 1997. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. Trends in Food Science and Technology 8, 41-48.
- Thiel, G., Geisler, G., Blechschmidt, I., Danzer, K., 2004. Determination of trace elements in wines and classification according to their provenance. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, 1630-1636.
- Tonietto, J., 2008. Geographical indicators for grapes. Acta Horticulturae 785, 467-476.
- Torres, J.L., Varela, B., García, M.T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J.J., Cascante, M., Sort, X., Bobet, R., 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 7548-7555.
- Torrijos, M., Moletta, R., 2000. Efluentes vinícolas y procedimientos de tratamiento. In, Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Mundi-Prensa, Madrid (España), pp. 769-783.
- Tosh, S.M., Yada, S., 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. Food Research International 43, 450-460.
- Tounsi, M.S., Ouerghemmi, I., Wannes, W.A., Ksouri, R., Zemni, H., Marzouk, B., Kchouk, M.E., 2009. Valorization of three varieties of grape. Industrial Crops and Products 30, 292-296.
- Travaglia, F., Bordiga, M., Locatelli, M., Coisson, J.D., Arlorio, M., 2011. Polymeric proanthocyanidins in skins and seeds of 37 *Vitis vinifera* L. cultivars: A methodological comparative study. Journal of Food Science 76, C742-C749.
- Trowell, H., 1972. Dietary fiber and coronary heart-disease. Revue Européenne d'Études Cliniques et Biologiques 17, 345-349.
- Tseng, A., Zhao, Y., 2012. Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (*Pinot Noir* and *Merlot*). Journal of Food Science 77, H192-H201.

- Tseng, A., Zhao, Y., 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry* 138, 356-365.
- Tyug, T.S., Prasad, K.N., Ismail, A., 2010. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chemistry* 123, 583-589.
- Ubando-Rivera, J., Navarro-Ocana, A., Valdivia-López, M.A., 2005. Mexican lime peel: Comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity. *Food Chemistry* 89, 57-61.
- Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Oyanadel, R., Saavedra Torrico, J., Miranda, M., 2011. Characteristics of convective drying of pepino fruit (*Solanum muricatum* Ait.): Application of Weibull distribution. *Food and Bioprocess Technology* 4, 1349-1356.
- USDA, 1999. Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture.
- Valiente, C., Arrigoni, E., Esteban, R.M., Amado, R., 1995. Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science* 60, 818-820.
- van de Vijver, L.P.L., van den Bosch, L.M.C., van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., 2009. Whole-grain consumption, dietary fibre intake and body mass index in the Netherlands cohort study. *European Journal of Clinical Nutrition* 63, 31-38.
- Van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., Dubourdieu, D., 2004. Influence of climate, soil, and cultivar on *terroir*. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 207-217.
- Vaudour, E., 2003. Les *terroirs* viticoles. Définitions, caractérisation et protection. Dunod, Paris (Francia).
- Vaudour, E., Shaw, A.B., 2005. A worldwide perspective on viticultural zoning. *South African Journal for Enology and Viticulture* 26, 106-115.
- Vera, M., Martín, F., Frau, M.A., 2011. Diagnosi de la producció i comercialització dels productes amb denominació de qualitat. Denominacions de qualitat i indicacions geogràfiques de les Illes Balears en 2010. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori. Govern de les Illes Balears
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J., Bello-Pérez, L.A., 2007. Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT-Food Science and Technology* 40, 722-729.
- Versari, A., Castellari, M., Spinabelli, U., Galassi, S., 2001. Recovery of tartaric acid from industrial enological wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, 485-488.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilariño, F., Sieiro, C., 2007. Effect of *terroir* on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. *Albariño*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1252-1256.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 161-169.
- Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.C.G., Chemat, F., 2010. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 17, 1066-1074.
- Vivas, N., Nonier, M.F., de Gaulejac, N.V., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M., 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis*

- vinifera*) and heartwood of quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513, 247-256.
- Wang, F., Fraise, C.W., Kitchen, N.R., Sudduth, K.A., 2003. Site-specific evaluation of the CROPGRO-soybean model on Missouri claypan soils. *Agricultural Systems* 76, 985-1005.
- Wang, J., Santa-Maria, I., Ho, L., Ksiezak-Reding, H., Ono, K., Teplow, D.B., Pasinetti, G.M., 2010a. Grape derived polyphenols attenuate Tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 22, 653-661.
- Wang, L.J., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology* 17, 300-312.
- Wang, Y.-H., Yang, X.-L., Wang, L., Cui, M.-X., Cai, Y.-Q., Li, X.-L., Wu, Y.-J., 2010b. Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, 888-898.
- Wang, Y.G., Yue, S.T., Li, D.Q., Jin, M.J., Li, C.Z., 2002. Kinetics and mechanism of Y(III) extraction with CA-100 using a constant interfacial cell with laminar flow. *Solvent Extraction and Ion Exchange* 20, 345-358.
- Wang, Z.Q., Zuberi, A.R., Zhang, M.H., Macgowan, J., Qin, J., Ye, X., Son, L., Wu, Q., Lian, K., Cefalu, W.T., 2007. Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. *Metabolism-Clinical and Experimental* 56, 1635-1642.
- Wannamethee, S.G., Thomas, M.C., Whincup, P.H., Sattar, N., 2009. Associations between dietary fiber and inflammation, hepatic function, and risk of type 2 diabetes in older men potential mechanisms for the benefits of fiber on diabetes risk. *Diabetes Care* 32, 1823-1825.
- Weightman, R.M., Renard, C., Gallant, D.J., Thibault, J.F., 1995. Structure and properties of the polysaccharides from pea hulls. 2. Modification of the composition and physicochemical properties of pea hulls by chemical-extraction of the constituent polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 26, 121-128.
- Wong, J.M.W., de Souza, R., Kendall, C.W.C., Emam, A., Jenkins, D.J.A., 2006. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40, 235-243.
- Yalcin, D., Ozcalik, O., Altiok, E., Bayraktar, O., 2008. Characterization and recovery of tartaric acid from wastes of wine and grape juice industries. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 94, 767-771.
- Yang, J., Wang, H.-P., Zhou, L., Xu, C.-F., 2012. Effect of dietary fiber on constipation: A meta analysis. *World Journal of Gastroenterology* 18, 7378-7383.
- Yang, L., Cao, Y.-L., Jiang, J.-G., Lin, Q.-S., Chen, J., Zhu, L., 2010. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science* 33, 1349-1355.
- Yasui, Y., Yunoki, K., Naito, A., Kawaguchi, M., Ohnishi, M., 2002. Effects of weather conditions and aging on resveratrol concentration in red wines. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 49, 220-227.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., Xiong, Y., 2011. Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 2131-2136.
- Yi, C., Shi, J., Kramer, J., Xue, S., Jiang, Y., Zhang, M., Ma, Y., Pohorly, J., 2009. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry* 114, 570-576.

- Yilmaz, Y., Toledo, R.T., 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 255-260.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 41-48.
- Yu, J., Ahmedna, M., 2013. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology* 48, 221-237.
- Zamora, F., 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*, Madrid (España).
- Zamora-Ros, R., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Martínez, C., Sánchez, M.J., Navarro, C., Chirlaque, M.D., Tormo, M.-J., Quirós, J.R., Amiano, P., Dorransoro, M., Larrañaga, N., Barricarte, A., Ardanaz, E., González, C.A., 2008. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *British Journal of Nutrition* 100, 188-196.
- Zhang, C., Liu, S., Solomon, C.G., Hu, F.B., 2006. Dietary fiber intake, dietary glycemic load, and the risk for gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29, 2223-2230.
- Zhang, J., Li, L., Gao, N., Wang, D., Gao, Q., Jiang, S., 2010. Feature extraction and selection from volatile compounds for analytical classification of Chinese red wines from different varieties. *Analytica Chimica Acta* 662, 137-142.
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y.-S., Simmons, C.W., Zhang, R., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., 2012. Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11128-11134.
- Zhou, K., Raffoul, J.J., 2012. Potential anticancer properties of grape antioxidants. *Journal of oncology* 2012, Article ID: 803294 (803298 pages).
- Zou, T.-B., Wang, M., Gan, R.-Y., Ling, W.-H., 2011. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using Response Surface Methodology. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 3006-3017.
- Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A., 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114, 310-316.



**CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL  
DESARROLLO DE LA TESIS**



---

## 9. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL DESARROLLO DE LA TESIS

### Artículos en revistas indexadas en el Journal Citations Reports (JCR)

- Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems (2010). González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M.C., López, F., Femenia, A. *LWT - Food Science and Technology*, 43:10, 1580-1586.
- Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) (2012). González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Rosselló, C., Teissèdre, P.-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:48, 11850-11858.
- Identification of behaviour patterns of viticultural regions according to their agroclimatic fingerprint and grape characteristics (2013). González-Centeno, M.R., Simal, S., Femenia, A., Frau, M., Rosselló, C. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 59:1, 53-61.

### Artículos en revistas no indexadas

- Comparación de la actividad antioxidante y contenido en polifenoles de vinos procedentes de variedades minoritarias de vid de las Islas Baleares (2011). Luna, J.M., Negre, A., March, J., Martorell, A., González-Centeno, M.R., Garau, M.C. *Enoviticultura*, 10, 14-23.

### Artículos enviados para su publicación en revistas indexadas en el Journal Citations Reports (JCR)

- Winemaking byproducts as polyphenol and antioxidant rich sources. Characterization of white grape pomaces (*Vitis vinifera* L.). González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Teissèdre, P.-L. *Submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Phenolics, flavonols and antioxidant capacity of grape pomace – a Response Surface Approach to an aqueous ultrasonic-assisted extraction. González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A. *Submitted to Ultrasonics Sonochemistry*.