

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE
BAGAZO DE CERVEZA CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO***

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Ana María López Valenzuela

Badajoz, noviembre 2019

TRABAJO FIN DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE
BAGAZO DE CERVEZA CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO***

GRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AUTOR: Ana María López Valenzuela

TUTOR/ES: Ana I. Andrés Nieto, M^a Luisa Timón Andrada

Tutor

Cotutor

Fdo:.....

Fdo:.....

Convocatoria:

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. El sector cervecero	6
2.1.1. La cerveza artesana	7
2.2. Residuos y subproductos de la industria agroalimentaria	11
2.3. Producción de subproductos y residuos en el proceso de fabricación de cerveza	12
2.3.1. Revalorización del bagazo: usos	14
2.4. Compuestos fenólicos	16
2.5. Técnicas de obtención de extractos de subproductos	18
2.5.1. Extracción de líquidos a presión (ELP)	19
2.5.2. Extracción por microondas	20
2.5.3. Ultrasonido (US)	20
2.5.4. Extracción mediante Fluido Supercrítico (FS)	21
3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1. Bagazo	26
4.2. Reactivos	28
4.3. Selección de variables y proceso de extracción	28
4.4. Diseño experimental	30
4.5. Cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antioxidante (DPPH, Poder Reductor y ABTS)	33
4.5.1. Determinación de fenoles totales	33
4.5.2. Determinación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH	34
4.5.3. Poder reductor	35
4.5.4. Capacidad de eliminación del radical ABTS	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1. Ajuste del modelo	39
5.2. Efectos de las variables de extracción sobre el contenido de fenoles totales (CFT)	39
5.3. Efectos de las variables de extracción sobre el potencial antioxidante en extracto de bagazo	43
5.5. Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo.	46
6. CONCLUSIONES	47

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. PÁGINAS WEB CONSULTADAS	57

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Durante el proceso de elaboración de la cerveza se genera una gran cantidad de residuos que pueden revalorizarse. Entre ellos, destaca el bagazo de cerveza, resultante del proceso de malteado y separación del mosto. El bagazo es rico en proteína, fibra y energía pero presenta también una gran cantidad y variedad de compuestos fenólicos con potencial actividad antioxidante. Por lo tanto, la extracción de dichos compuestos a partir del bagazo de cerveza puede ser una importante estrategia de revalorización de los subproductos de la industria cervecera.

En este trabajo se han extraído los fenoles a partir de bagazo de cerveza de trigo mediante una combinación de temperaturas (30-50°C), tiempos (60-180 min) y ratios agua/bagazo (10:1-25:1). Dicha combinación de parámetros se eligió mediante el diseño experimental propuesto por el programa Desing Expert (versión 10.0 Stat-Ease). En los distintos extractos obtenidos se determinó el contenido total de fenoles (CFT) y la actividad antioxidante in vitro. Los mapas de contorno generados mediante el uso de las ecuaciones de superficie de respuesta mostraron que las variables experimentales afectaron de forma significativa a las respuestas (CTF) y actividad antioxidante "in vitro". Los extractos obtenidos presentaron fenoles y actividad antioxidante "in vitro", siendo las condiciones óptimas para maximizar estos parámetros, 30°C, 121,9 min y 10 ml de agua /g de bagazo. Se llevó a cabo la obtención de extracto en estas condiciones óptimas, validándose satisfactoriamente el modelo de regresión calculado. En estas condiciones se obtuvieron 0,049 mg GAE/ml CFT, 98,23% DPPH, 4,638 mg Vitamina C/mL extracto RP y 75, 26% ABTS. Este resultado sugiere que la optimización de las condiciones de extracción es crítica para la correcta obtención y cuantificación de compuestos fenólicos y antioxidantes en bagazo de cerveza, el cual podría ser utilizado en un proceso de extracción industrial.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El sector cervecero

La industria cervecera es una de las más relevantes en el sector agroalimentario español. España es el cuarto país productor de cerveza en la Unión Europea y el décimo del mundo (De Urbina Criado et al., 2015) alcanzando cantidades de producción de 32,7 millones de hL y un consumo per cápita de 46,3 en el año 2013 (De Urbina Criado et al., 2015).

La cerveza es una bebida que en España es consumida por la mayor parte de la población adulta (Cerveceros España, 2017). El consumo de cerveza se ha incrementado en 2017 hasta llegar al entorno de los 40 millones de hL (Cerveceros España, 2017). Hay diversos factores que han contribuido a dicho incremento, como el auge del turismo en nuestro país, la climatología favorable y la consolidación de la recuperación económica, iniciada en 2012, con su consecuente mejora del consumo. Este crecimiento se da mientras se mantienen las pautas de consumo mediterráneas, de manera responsable, moderada y social; prueba de ello es que España tiene el consumo per cápita más bajo de la Unión Europea (Cerveceros España, 2017).

El consumo per cápita en España es de 18,14 L por persona y año (MAPAMA, 2018). El mayor consumo lo realizan los adultos independientes o parejas adultas sin hijos. Si se tiene en cuenta la distribución en volumen por hogar, son los hogares donde residen parejas con hijos medianos o mayores, así como parejas adultas sin hijos donde mayor volumen de cerveza se adquirió en 2018. En relación con las Comunidades Autónomas, según una distribución del volumen por ciclo de vida, los individuos que residen en Murcia, Andalucía, Castilla-La Mancha, Valencias, Islas Baleares y Comunidad de Madrid son consumidores intensivos; mientras que en el consumo per cápita se posicionan primero los andaluces y los murcianos, consumiendo hasta 4,43 y 7L respectivamente más por individuo y año que la media nacional (MAPAMA, 2018)

Los mayores productores de cerveza en España, con una producción del 91%, son las empresas de de Mahou-San Miguel, Heineken España y Grupo Damm, seguidos de Hijos de Riviera, Compañía Cervecera de Canarias S.A. y Grupo Agora (De Urbina Criado et al., 2015). No obstante, en los últimos años están surgiendo en España una gran cantidad de empresas elaboradoras de cerveza artesanal. Este sector se encuentra en pleno crecimiento, siendo este del 1600% entre los años 2008 y 2015. En el año 2012, la producción total de

cerveza artesana era tan solo del 0,1%, unos 500 hL de cerveza al año. En el año 2008, había 21 microcervecerías, llegando a ser unas 750 en el año 2017 (Arce de Mena, 2017).

2.1.1. La cerveza artesana

Como se ha comentado dentro del sector de la cerveza se encuentra un mercado alternativo en plena expansión, la cerveza artesanal. Este comenzó a desarrollarse intensamente en países como Estados Unidos, Reino Unido, Bélgica, Alemania o Irlanda y en los últimos años está comenzando a dejar huella en Italia o España, entre otros (Albán et al., 2015).

El éxito de la cerveza artesana se puede deber a varios factores como la variedad de estilos, costes no muy elevados y el marketing de los fabricantes para crear nuevas marcas y envases con el fin de diferenciar y acercar el producto al consumidor (Albán et al., 2015).

El perfil productor de cerveza artesana es muy variado, desde fabricantes amateurs, hasta aquellos en los que se ha convertido en su actividad profesional principal (Albán et al., 2015).

La fabricación de cerveza artesanal consiste en la “elaboración conforme a lo establecido en la presente norma de calidad, mediante un proceso que se desarrolle de forma completa en la misma instalación y en el que la intervención personal constituye el factor predominante, bajo la dirección de un maestro cervecero o artesano con experiencia demostrable y primando en su fabricación el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose un resultado final individualizado, que no se produzca en grandes series, siempre y cuando se cumpla la legislación que le sea aplicable en materia de artesanía” (B.O.E., 2016).

La cerveza artesana prioriza la utilización de materias primas de buena calidad, realizando la mayor parte del proceso de forma manual. La mayor diferencia con la cerveza industrial, es que en la artesana no se lleva a cabo el proceso de pasteurización. La cerveza industrial se produce en función de una fórmula básica establecida que busca ingredientes y procesos económicamente viables, empleando equipos de grandes dimensiones que producen grandes cantidades de cerveza en poco tiempo; mientras que la artesana se puede modificar la receta las veces que el maestro cervecero considere para que la cerveza tenga un olor y sabor característicos, empleando para ello equipos de menor tamaño, lo que implica que el proceso de producción es más lento y no se puede producir a grandes escalas (Martínez, 2015).

Tanto en la cerveza artesana como en la industrial, los ingredientes principales son los mismos: agua, malta de cebada (o de otro cereal), lúpulo y levadura. No obstante, existen ciertas diferencias entre ambos tipos de cerveza; en las artesanas solo se emplean materias naturales, no se les añade nada artificial como aditivos o coadyuvantes tecnológicos, obligando así a producir menos cantidad porque no se puede almacenar durante largos períodos de tiempo. En las cervezas industriales se emplean mezclas de cereales más económicos, azúcares sintéticos o jarabes que aceleran la fermentación, además de aditivos y coadyuvantes que actúan como colorantes, antioxidantes, estabilizantes, filtrantes y clarificantes (Martínez, 2015).

Otra de las principales diferencias entre cerveza artesanal e industrial se produce a nivel tecnológico. Así, las cervezas artesanas no se pasterizan, conservando de este modo los aromas y sabores propios de la cerveza, al igual que no se destruyen las levaduras, que van a seguir produciendo modificaciones debido a su metabolismo activo. Tampoco se les realiza un filtrado, dando una cerveza final con mayor turbidez, puesto que no se eliminan partículas en suspensión. Debido a que no se realiza ni pasterización ni filtrado, se produce una segunda fermentación en la botella, saturando la cerveza de gas carbónico y etanol y, dando lugar a cervezas más fuertes con mayor graduación alcohólica que las industriales. Por el contrario, a las industriales sí se les realiza la etapa de pasterización, alargando la vida útil de la cerveza y haciendo que pierda características organolépticas. También sufren un filtrado, lo que conlleva la eliminación de partículas en suspensión y los microorganismos, originando cervezas más claras. Por estas razones, es complicado que se produzca una segunda fermentación en botella, de modo que el gas carbónico se tiene que inyectar de forma artificial (Martínez, 2015).

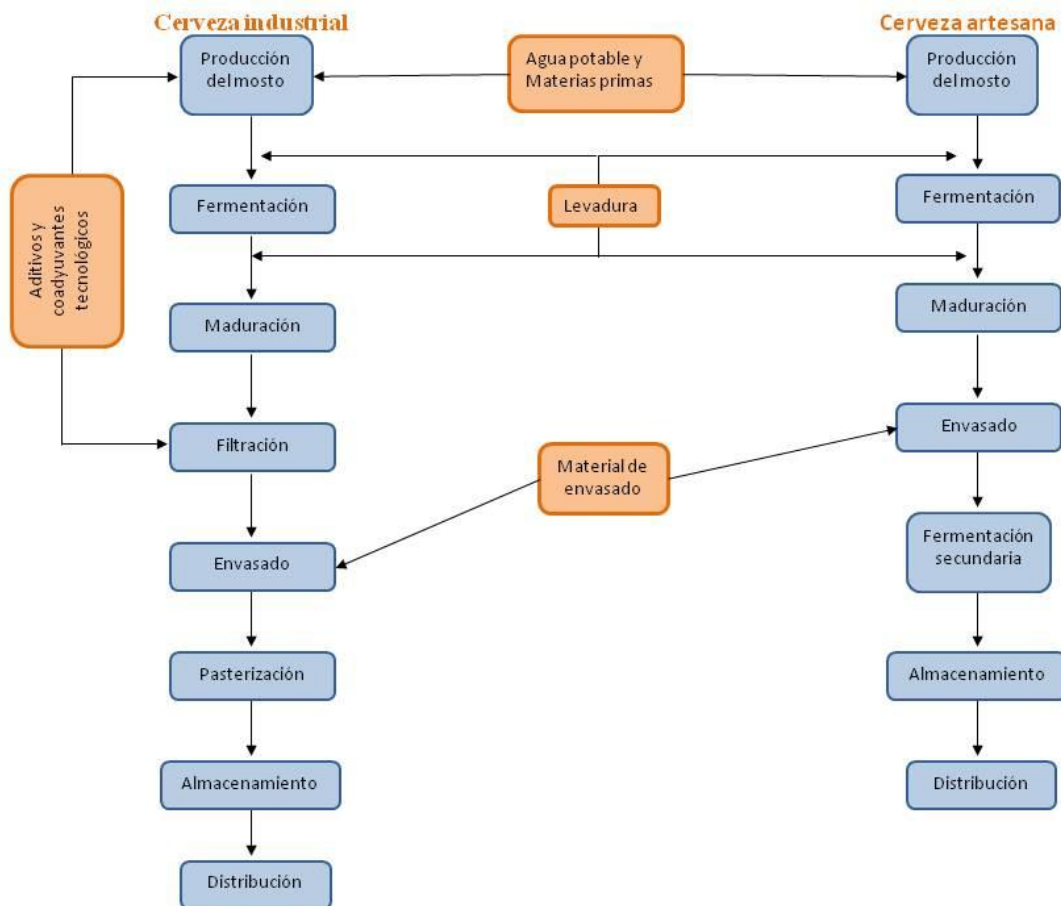


FIGURA 2. 1. Diagramas de flujos comparando las elaboraciones de los tipos de cerveza industrial y artesana. (Fuente: Elaboración propia).

Extremadura, se ha sumado a la moda de la cerveza artesana, existiendo un número importante de industrias cerveceras artesanales. La Asociación de Birrifactores de Extremadura (2016), elaboró una guía de cervezas Extremeñas, donde se muestran las diferentes cervezas artesanas que se elaboran en esta Comunidad Autónoma.

- En la provincia de Cáceres nos podemos encontrar 7 microcervecerías:
 - Con sede en Plasencia, nos encontramos con Cerveza Artesana Blomberg, elaborando 4 tipos de cervezas diferentes: Blomberg Caramel (Belgian Dubbel), Original Blond (Blonde Ale), Blomberg (Blanca Witbier), Original BIO (Blond Ale), Triple (Tripe Belga) y Picota (Fruit Ale). Y Cervezas del Jerte, que elaboran Monteña (Amber Ale).
 - Zarza de Granadilla se ubica Cerex, fundada en 2013 elabora 5 tipos de cervezas: Cerex Pilsen, Cerex Ibérica de Bellota, Cerex Cereza, Cerex Castaña y Cerex Andrades.

- Ambroz con localización en Hervás, en 2016 contaba con dos tipos diferentes de cerveza artesana, Rubia del Ambroz (Blonde Ale) y Castaña del Ambroz (Belgian Dubbel).
- Belona, situada en Trujillo elabora las siguientes cervezas: Belona American Pale Ale, Belona Oatmeal Stout, Belona Special Bitter y Belona Trigo.
- Mangurria, de Cáceres, elabora un total de 9: Luna. (Dry Stout), Lamosca. (India Pale Ale), 927 (Bohemian Pilsener), Pumpky (Pumpkin Ale), Yihapa (American Pale Ale), Wenzegur (Belgian Golden Strong Ale), Trigul (Witbier), Bobáh (Bellota Pilsen), Momo (Saison).
- Tito Blas, de Cáceres, elabora: Liada Parda (Pale Ale), Old Black (Chocolate Porter), Sarracena (Dunkel Wheat Ale), Hey, HO... Let's Hop! (India Pale Ale).
- La provincia de Badajoz tiene un total de 11 cervecerías artesanas:
 - Arcadia, de Villafranca de los Barros, tienen Arcadia (Blonde Ale), Lepus (IPA), Imperial (Imperial Stout).
 - Ballut, de Badajoz, realiza cinco cervezas muy diversas entre sí, Ballut (Blonde Ale), Azarías (Brown Ale), Terapia (IPA), Ballut Zaína (Porter) e Hispanc (doble IPA).
 - Cervecera libre de Mérida, elabora las siguientes: La Loba (India Pale Ale), Medea (Saison), Lagarta (Blonde Ale) y Pero mira como beben (Winter Ale).
 - En Cabeza del Buey se hallan La Rubiatonta, elabora una cerveza con el mismo nombre, La Rubia Tonta (Blonde Ale). Y La Bicha, con Parda (American Pale Ale), Serena (Pilsner).
 - Jara, con localización en Villanueva del Fresno, elabora: Iberica (Lager), Senara (American Pale Ale), Carbonera (Porter), Bled&Jar (Fruit Ale), Picota (Fruit Ale) y ERA (Summer Ale).
 - La Siberia, situada en Herrera del Duque, elabora su cerveza artesana con su mismo nombre.

- Marwan de Badajoz, elabora solo un tipo de cerveza, Marwan (Pale Ale).
- Piporra, de Aceuchal elabora su cerveza Piporra (Belgian Pale Ale).
- Sevebrau, elabora en Villanueva de la Serena un total de 13 cervezas artesanas: Castua (Pale Ale), Gusti (Export Lager), Serona (Strong Ale), Weizen, (Weizen), EX 1 IPA (India Pale Ale), Buzzos (American Pale Ale), Abril (American Light Lager), Arco de Cáceres (American Light Lager), EX 2 IPA (India Pale Ale), Colibri (Doppelbock), Marzen (Amber Lager), Strong Ale. (Strong Ale) y APA (American Pale Ale).
- Soto, con sede en Barcarrota elabora: Alborayque (Blond Ale), Lazarillo (Weizen) y Cazzaria (Strong Ale).
- Vinifera, de Villafranca de los Barros, elabora una cerveza artesana: Vinifera (Pale Ale).

2.2. Residuos y subproductos de la industria agroalimentaria

La producción de residuos en la industria alimentaria está en continuo aumento y la actividad económica vinculada a la misma tiene, cada vez, mayor importancia, tanto por su envergadura como por su repercusión directa a la sostenibilidad del modelo económico europeo (Rodrigo-Ilarri et al., 2014).

Un residuo es cualquier sustancia y objeto que su poseedor deseche o tenga la intención u obligación de desechar (B.O.E., 2011). Los residuos terminan en la tierra y tienen a menudo efectos ambientales negativos como el aumento de emisiones de gases de efecto invernadero o reducción de la biodiversidad y la vida silvestre.

Una sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto, puede ser considerada como subproducto y no como residuo, cuando se cumplan las siguientes condiciones:

- a) Que se tenga la seguridad de que la sustancia u objeto va a ser utilizado ulteriormente,
- b) que la sustancia u objeto se pueda utilizar directamente sin tener que someterse a una transformación ulterior distinta de la práctica industrial habitual,
- c) que la sustancia u objeto se produzca como parte integrante de un proceso de producción, y

- d) que el uso ulterior cumpla todos los requisitos pertinentes relativos a los productos así como a la protección de la salud humana y del medio ambiente, sin que produzca impactos generales adversos para la salud humana o el medio ambiente (BOE, 2011).

Reducir la cantidad de residuos y el aumento de la reutilización de los subproductos, generalmente se considera un resultado positivo en la comunidad de sostenibilidad.

En los últimos años tanto desde las distintas administraciones como desde el sector industrial se están impulsando estrategias para lograr la circularidad de los procesos de producción mediante la reducción simultánea de los desechos y la reutilización de subproductos. Esta economía circular es cada vez más, el objetivo de los gobiernos, especialmente en Europa, donde el Plan de Acción Circular de 2018 tiene medidas de gran alcance para crear y promover sistemas circulares (Springer y Schmitt, 2018).

A pesar de estos esfuerzos, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), aproximadamente un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia en todo el mundo (FAO, 2011). Esta cantidad supone 1,3 mil millones de toneladas al año, refiriéndose tanto a los desechos durante el procesado de alimentos como a las pérdidas o descartes del mismo (Galanakis, 2012).

Por todo ello, existe una gran presión política y social para reducir la contaminación procedente de las actividades industriales. En consecuencia, la mayoría de las grandes empresas ya no consideran los residuos como tal, sino como una materia prima para su uso en otros procesos (Nigam, 2017).

2.3. Producción de subproductos y residuos en el proceso de fabricación de cerveza

La sostenibilidad económica de las cervecerías artesanales ha estado limitada tanto por los altos costes del capital, en lo que se refiere a equipos, dispositivos e instalaciones, como por los costes operativos derivados de impuestos y del consumo de energía, que supone un 10% total de los costes. Aunque hay una gran parte de los consumidores que están dispuestos a pagar más por las cervezas artesanas, existe un amenaza par la sostenibilidad de las cervecerías artesanales debido a que hay un estancamiento económico (Albanese et al., 2018).

La revalorización de los subproductos generados durante el proceso de fabricación de cerveza podría aumentar la sostenibilidad de la industria.

El proceso de fabricación de cerveza consume mucha energía y utiliza grandes volúmenes de agua (Figura 2.2). La producción de cerveza implica la mezcla de los extractos de malta, lúpulo y azúcar con agua, seguido de su posterior fermentación con levadura. En el proceso se emplean grandes cantidades de agua en el lavado, limpieza y esterilización. Los residuos son residuos industriales simples, similares a los residuos urbanos (papel, cartón plástico...) y se clasifican como residuos sólidos. El exceso de levadura y bagazo se consideran subproductos. El bagazo es el subproducto más importante cuantitativamente, siendo su producción en Europa, superior a 3,4 millones de toneladas (Nigam, 2017)

El bagazo queda con un 80% de humedad y representa el 85% del total de los subproductos (14 kg/hL de mosto), 31% del peso de la malta y 20 kg/100 L de cerveza producida, por lo que es necesario su revalorización (Nigam, 2017).

La composición aproximada del bagazo se compone de proteínas (15-26%), lípidos (3,9-10%) y fibra (70%), que consiste en celulosa (15-25%), hemicelulosa (28-35%) y parte de la lignina (Nigam, 2017).

El bagazo resultante se emplea generalmente para la producción de compost, alimentación de ganado o se desecha como residuo. El bagazo se puede hidrolizar para la producción de xilo-oligosacáridos (efecto probiótico), xilitol (edulcorante) o medios de cultivos ricos en pentosa (Olajire, 2012).

Según Thomas y Rahman (2006), la producción de cerveza artesanal genera alrededor de 45 kg de bagazo por cada 100 L.

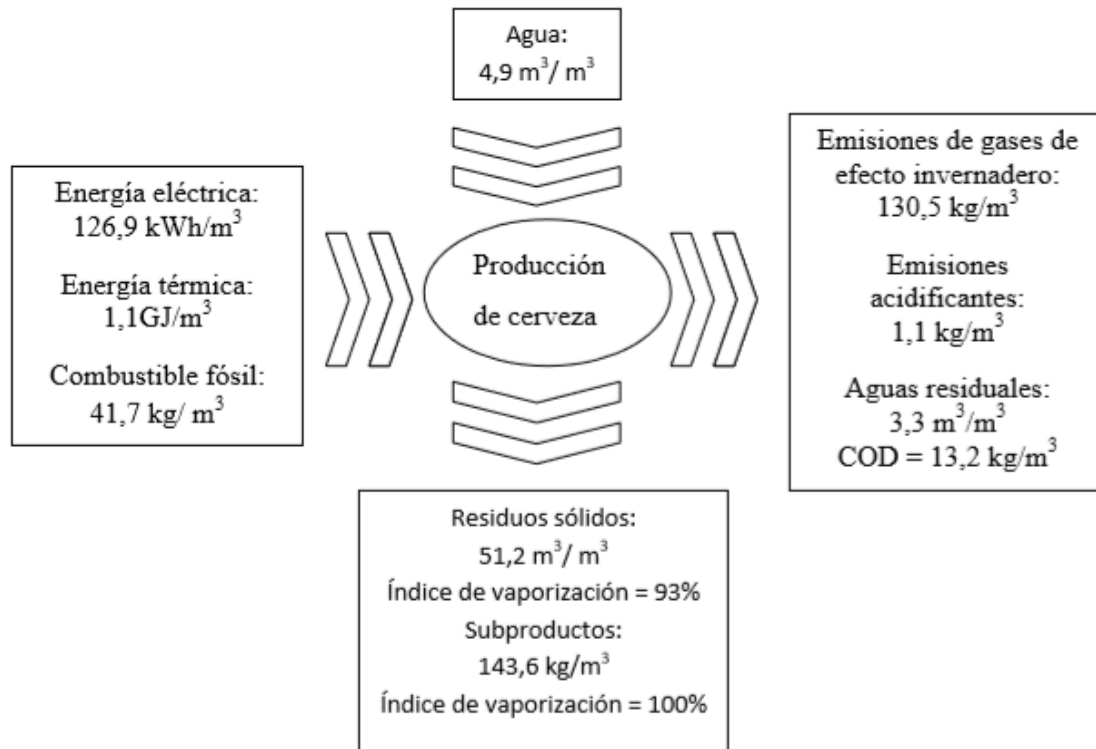


FIGURA 2.2. Balance de masa aplicado a las cervecerías Unicer SA que representan valores específicos, es decir, valores por m^3 de cerveza producida (Fuente: Unicer SA, 2005)

2.3.1. Revalorización del bagazo: usos

Compostaje. Debido a la cantidad significativa de este subproducto, se puede utilizar como un biorrecurso valioso. El método tradicional de revalorización más empleado es el compostaje, que es un tratamiento sencillo de bajo coste. El compostaje es también una tecnología ambientalmente aceptable para convertir este material en producto agrícola útil. Para el compostaje, la deficiencia de nitrógeno en los desechos de cebada se puede complementar con un material de compostaje conjunto, como estiércol de aves de corral sólido o líquido (Nigam, 2017).

Aplicación dietética y nutricional. La alta humedad de los residuos de cebada junto con polisacáridos hace que éstos sean muy susceptibles al crecimiento microbiano, lo que hace que tenga una vida útil muy corta de 7 a 10 días. Por ello, es necesario establecer un proceso de conservación antes o durante el almacenamiento del bagazo. Este subproducto se ha incorporado en los productos alimenticios de consumo humano, especialmente cuando hay un requerimiento para mejorar o actualizar el contenido de fibra. La absorción de la fibra dietética ha sido generalmente relacionada en la ayuda de algunas enfermedades no infecciosas, tales como la colitis ulcerosa (Nigam, 2017).

Se pueden emplear las levaduras como fuente de proteínas ya que contienen entre un 5 y 13% de ácidos nucleicos, dependientes de la tasa de crecimiento y la fase en la que se analice. También se pueden emplear extractos de levaduras para elaborar saborizantes y potenciadores del sabor. Los extractos se obtienen de la cepa *Saccharomyces Cerevisiae* cultivadas sobre mieles finales, se adicionan otras enzimas mezcladas con otras fuentes proteicas como el trigo o la carne. Estos extractos se emplean en la industria alimentaria en diferentes cantidades, desde un 0'2% en salsas cárnicas, hasta un 95% en las salsas de aderezo.

Productos microbianos. El contenido de hidratos de carbono del bagazo hace que sea un sustrato potencial para diversas aplicaciones. Los azúcares que se liberan tras la acción enzimática, se pueden convertir microbiológicamente en varios bioproductos (ácidos orgánicos, etanol, glicerol...). El uso del bagazo como sustrato en medio de cultivo, proporciona una fuente de carbono más barato (Nigam, 2017).

Producción de bioetanol. Debido a la creciente demanda de etanol es necesario buscar tanto sustratos baratos, abundantes y renovables, como un desarrollo eficiente y una tecnología menos costosa. En este sentido, el bagazo es un candidato ideal ya que es una materia prima rica en celulosa que puede utilizarse como sustrato para la producción de bioetanol (Nigam, 2017).

El proceso biotecnológico para producir bioetanol a partir del bagazo requiere una hidrólisis química o enzimática para producir azúcares fermentables (Nigam, 2017).

Producción de ácido láctico. El ácido láctico (ácido-2-hidroxi-propiónico) es un ácido hidroxicarboxílico con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, química y cosmética, entre otras. La importancia de su producción se debe a que puede ser empleado como precursor del ácido poli-láctico (PLA), material de envasado que presenta un gran potencial como sustituto de los plásticos derivados de combustibles fósiles (Nigam, 2017)

Obtención de compuestos fenólicos. El bagazo de cerveza es una buena fuente de compuestos fenólicos y por tanto una alternativa barata al uso de los antioxidantes sintéticos (Farcas et al., 2015)

2.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, siendo uno de los principales metabolitos secundarios esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas. Actúan como agentes protectores frente a patógenos y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (Creus, 2004; Muñoz et al., 2007).

Los compuestos fenólicos engloban a una multitud de sustancias bioquímicas con la presencia de un grupo fenol, que consta de un anillo aromático al que se une un grupo hidroxilo. En la figura 2.3 se encuentra representado un grupo fenol (Martín, 2017).

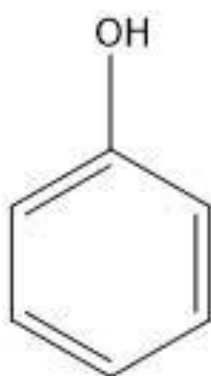


FIGURA 2.3. Representación de grupo fenol. (Fuente: ChemBioDraw Ultra 14.0)

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen según el número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones, et al., 2012). Según su estructura química, los polifenoles se pueden clasificar en dos grandes grupos los no flavonoides, entre los que se encuentran los fenoles no carboxílicos (C6, C6-C1, C6-C3) y los ácidos fenólicos, derivados del ácido benzoico (C6-C1) y derivados del ácido cinámico (C6-C3); y los flavonoides (C6-C3-C6), formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, entre los que se encuentran: antocianos, flaonas, flavononas, flavonoles, flavanonoles, flavanoles, taninos condensados y lignanos (Creus, 2004).

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación (Creus, 2004). Los fenoles con capacidad antioxidante estabilizan los radicales libres, responsables de la iniciación y propagación de las reacciones de oxidación, mediante un mecanismo de deslocalización electrónica, que se ve favorecido por el

incremento de grupos hidroxilo unidos al anillo fenólico, convirtiéndose el grupo fenólico en un radical fenoxi, siendo mucho más estable que el radical libre y parando la cadena de propagación (Martín, 2017).

Por otro lado, pueden actuar de quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Creus, 2004).

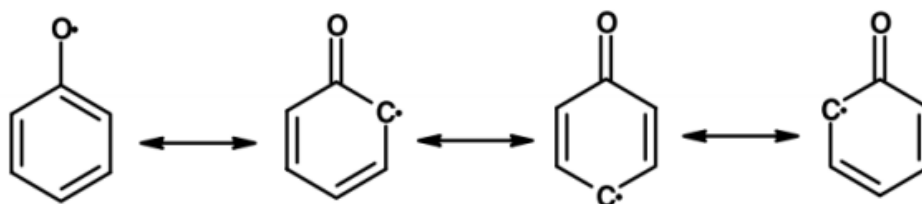


Figura 9. Mecanismo de estabilización del radical fenoxi mediante deslocalización (Vanderhaegen et al. 2006).

FIGURA 2.4. Mecanismos de estabilización del radical fenoxi mediante deslocalización (Fuente: Martín, 2017)

Los polifenoles son considerados como los principales antioxidantes naturales en materiales de cerveza. Los compuestos fenólicos presentes en la cerveza, derivados de la malta de cebada (alrededor del 70%) y de lúpulo (entorno al 30%), son los responsables de la actividad antioxidante total de la bebida. Los extractos de malta y cebada se caracterizan por su alto contenido en flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales confieren gran actividad antioxidante. Algunos compuestos en lúpulo también contribuyen a la estabilidad biológica de la cerveza, y se ha asumido que el lúpulo protege de la contaminación bacteriana. (Barbosa-Pereira et al., 2014)

Existen varios tipos de compuestos fenólicos presentes en la cerveza entre los que se incluyen fenoles simples, derivados del ácido benzoico, ácidos cinámicos, chalconas, flavononas, flavonas, flavo-3-noles, proantocianinas, ácidos alfa, ácidos iso-alfa y otros compuestos misceláneos. (Aron y Shelhammer, 2010). Los polifenoles son extremadamente importantes para la estabilidad de la cerveza durante el almacenamiento, puesto que son los responsables de la formación de turbidez, color, sabor y estabilidad de la espuma (Barbosa-Pereira et al., 2014).

Los polifenoles tienen muchas aplicaciones industriales tales como aditivos naturales con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes (Barbosa-Pereira et al., 2014). Además

tienen beneficios positivos para la salud como en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Barbosa-Pereira et al., 2014).

Hoy en día existe un interés creciente en fitoquímicos como nuevas fuentes de antioxidantes naturales y agentes antimicrobianos. El uso de antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria, tales como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG), hidroquinona terc-butilo (TBHQ) y palmitato de ascorbilo (PA), está severamente restringido en cuanto a la aplicación y concentraciones permitidas por la legislación europea (Reglamento CE de 2008), debido a algunas consideraciones de seguridad relacionadas con la toxicidad residual de estos conservantes químicos. Por lo tanto, la tendencia reciente en todo el mundo para evitar o al menos reducir el uso de aditivos sintéticos es sustituirlos por fuentes baratas renovables naturales, con actividades antioxidantes y antimicrobianas para estabilizar los alimentos contra la rancidez oxidativa y el deterioro microbiano (Barbosa-Pereira et al., 2014).

Actualmente existen investigaciones en las que se han estudiado la forma de extracción de compuestos fenólicos a partir de bagazo de cerveza, como en el caso de Socaci et al. (2018), Barbosa-Pereira et al. (2014), Meneses et al. (2013), García (2017) o Cortés (2017) entre otros. Estos autores intentan poder revalorizar el residuo generado en las cervecerías.

2.5. Técnicas de obtención de extractos de subproductos

La extracción es el paso más importante para aislar los polifenoles a partir de los materiales vegetales. La técnica y el disolvente son factores clave para maximizar la recuperación selectiva y eliminar las sustancias no deseadas. En los métodos tradicionales se emplea un equipo sencillo, pero es muy común que la cantidad, calidad y el tiempo de extracción sean cuestionables (Panja, 2018). Normalmente, para la extracción de polifenoles, se emplean disolventes como el agua con disolventes orgánicos como metanol, acetato de etilo o cloroformo. En este caso, el principal inconveniente radica en que se emplean grandes cantidades de disolventes y el tiempo de extracción suele ser muy largo (Panja, 2018). Además, es necesario a completa eliminación de los disolventes antes de emplearse como nutracéticos, o ingredientes para las industrias alimentarias, cosmética y farmacéutica (Saladana y Valdivieso-Ramirez, 2015)

En los últimos años han surgido nuevas tecnologías más eficientes y más limpias, desprovistas de disolventes orgánicos y con un coste más bajo. (Panja, 2018). Entre las nuevas tecnologías o sistemas de obtención de extractos vegetales, destacan la extracción mediante microondas, ultrasonidos, campo eléctrico pulsado, fluidos supercríticos con ultrafiltración o bien combinación de algunas de las anteriores (Panja, 2018).

2.5.1. Extracción de líquidos a presión (ELP)

En general, las elevadas temperaturas mejoran la extracción de polifenoles, siempre que éstos tengan resistencia a valores altos de las mismas (Panja, 2018). La extracción de líquidos a presión, se fundamenta en que la temperatura del punto de ebullición del líquido es proporcional a la presión, por lo que si la presión del sistema es elevada, se puede mantener la solución en estado líquido. La temperatura máxima de extracción depende tanto del disolvente como del tipo de polifenoles.

Las ventajas de ELP son:

- Recuperación de una gran cantidad de polifenoles con elevadas temperaturas.
- Ahorro de energía en el proceso, puesto que el calor sensible de un líquido es menor que el calor de vaporización, necesitando así menos calor para aumentar la temperatura y se genere vapor.
- Los disolventes empleados son agua y alcoholes acuosos, que no son nocivos para el medioambiente y no son tóxicos.
- Los disolventes al estar compuestos en gran parte por agua, son de bajo coste.
- Los equipos son sencillos.

Como se ha comentado, este sistema puede tener el inconveniente de que las altas temperaturas pueden degradar los componentes bioactivos y además, se pueden disolver compuestos no deseados. Por otra parte, la elección del solvente es limitada, ya que deben tener altas temperaturas de auto ignición y menor corrosividad del metal a altas temperaturas y presiones (Panja, 2018).

La extracción a presión con agua caliente (EPAC), donde se emplea agua como disolvente a temperatura y presión elevadas (2-20 atm, 80-180°C), es más viable económicamente y respetuoso con el medio ambiente (Panja, 2018). La polaridad, viscosidad,

densidad y tensión superficial del agua se reduce a altas temperaturas. Una baja viscosidad y tensión superficial facilitan la extracción de polifenoles a partir de matrices de partes de plantas. La eficiencia mejora mediante la adición de otros disolventes y cambiando el pH por la adición de ácidos (Panja, 2018). Esta técnica de extracción se ha utilizado con éxito para obtener extractos con actividad antioxidante a partir del epicarpio de café de la variedad arábica (Herrera, 2017), o en la cáscara del grano de cebada utilizando etanol acuoso presurizado (Sakar et al., 2014).

2.5.2. Extracción por microondas

La tecnología de microondas se ha convertido en una herramienta que mejora la productividad de los procesos. El microondas trabaja con radiaciones electromagnéticas comprendidas en un rango de 0,3-300 GHz, con una longitud de onda desde 0.001 a 1m. El mecanismo de acción de las microondas consiste en generar calor dentro del material, es decir, hace que las partículas se muevan y generen calor, lo que conlleva a velocidades de calentamiento más rápidas y menores períodos de tiempo.

Martínez-Ramírez et al. (2010), consiguieron extraer fenoles a partir de granada empleando la tecnología del microondas. Por otro lado, Lagüens (2018), obtuvo arabinosidos a partir de bagazo de cerveza. Para ello en la fase de extracción empleó el método de microondas con las condiciones de presión y temperatura de 4 bar y 140°C, respectivamente.

2.5.3. Ultrasonido (US)

Hoover (2000) define la tecnología de ultrasonido como una forma de energía que viaja en ondas de sonido iguales o mayores a 20000 vibraciones por segundo. El ultrasonido es una tecnología emergente, aunque aún no se ha promovido su empleo para su aplicación en productos comerciales. Solo se ha reconocido como una tecnología que ayuda en la modificación de procesos o mejora de los existentes. La generación del ultrasonido se basa en la deformación elástica de materiales ferroeléctricos dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia y es causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas en el campo (Raichel, 2000).

Actualmente es un método de extracción no contaminante, puesto que permite la reducción de la cantidad de solventes y de energía (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Se fundamenta en que las ondas de ultrasonido provocan la aceleración de la transferencia de

masa y calor de forma que interaccionan con el material alterando sus propiedades físicas y químicas y el efecto de cavitación favorece la liberación de los compuestos a extraer y mejora el transporte de masa debido a la rotura de la pared celular (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). El US se emplea como asistente de otros métodos como la extracción con fluidos supercríticos o microondas (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Entre las aplicaciones de US se encuentran las extracciones en hierbas, aceites proteínas y componentes bioactivos de plantas, como los polifenoles. La extracción de fenoles mediante fluido supercrítico, asistido por US es considerada como el mejor método de extracción de estos compuestos (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012). Silva Real y Martínez Corredor (2017) estudiaron los efectos de someter a un pre-tratamiento con US sobre la extracción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en la alcachofa. Como resultados obtuvieron que el pre-tratamiento con US durante 45 minutos permitió alcanzar mejores resultados de compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

2.5.4. Extracción mediante Fluido Supercrítico (FS)

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentra en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de comportarse como un gas, siendo capaz de difundir a través de sólidos, y como un líquido, actuando como disolvente (Velasco et al., 2007).

El CO₂ es el fluido supercrítico que más se emplea debido a que no es tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, de bajo coste, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son fáciles de alcanzar, se consiguen distintos grados de pureza, se puede trabajar a bajas temperaturas, por lo que se pueden separar compuestos termolábiles (Velasco et al., 2007).

Dentro de las aplicaciones agroindustriales de este método de extracción nos encontramos (Velasco et al., 2007):

- Extracción y fraccionamiento de lípidos.
- Extracción de sustancias antioxidantes.
- Extracción de alcaloides, aromas y especias.

Rebolleda Alonso (2011), realizó la extracción de alquilresorcinolos contenidos en el salvado de trigo con CO₂ en condiciones supercríticas, observando una disminución de la capacidad antioxidante cuando conservaba el extracto a temperatura ambiente y en presencia de luz, a cuando se almacenaban a -10°C y en oscuridad.

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Las microcervecías artesanales se han abierto paso en el mercado con una producción cada vez mayor en los últimos años y se prevé un mantenimiento de la tendencia de crecimiento del volumen de producción a corto y medio plazo.

Hoy en día, la idea de convertir los desechos de la industria alimentaria en energía y compuestos útiles, usando tecnologías que respeten el medio ambiente y económicamente sostenibles, representa un área de gran potencial y oportunidades. En este sentido, los desechos de cervecería, principalmente bagazo, representan un gran inconveniente para el medio ambiente debido al alto valor nutricional y alta concentración de compuestos orgánicos que contienen. Algunos estudios han tratado sobre la revalorización de este subproducto como alimentación animal o uso energético. Sin embargo, los estudios relacionados con el uso de este subproducto para la obtención de compuestos de gran valor como antioxidantes son escasos. En este trabajo se pretende estudiar el potencial de revalorización del bagazo que se produce en la elaboración de cerveza artesanal mediante la obtención de extractos acuosos con efecto antioxidante para su uso en la industria alimentaria o sectores relacionados.

Por todo ello, los principales objetivos de este trabajo son:

- Determinar el potencial antioxidante del bagazo procedente de la elaboración de la cerveza de trigo elaborada en la cervecería “Ballut”.
- Concretar cuáles son las mejores condiciones de tratamiento del bagazo para obtener un extracto con máxima actividad antioxidante “in vitro”.
- Iniciar las bases de una línea de investigación con subproductos de la industria cervecera.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Bagazo

El bagazo de trigo fue donado por una cervecería local (Ballut, Badajoz, España). El bagazo de trigo utilizado en esta investigación se obtuvo como un subproducto del proceso de elaboración de la cerveza “Belona”, elaborada a partir de malta de trigo, malta Pilsen, lúpulo (Northern Brewer y Perle), semilla molturada de cilantro, piel de naranja y levadura W06.



FIGURA 4. 1. Bagazo húmedo. (Fuente: Elaboración propia).



FIGURA 4. 2. Bagazo húmedo. (Fuente: Elaboración propia).

La composición química del bagazo utilizado para la realización de este trabajo se muestra en la Tabla 4.1.

TABLA 4.1 Composición química del bagazo obtenido después del proceso de elaboración de la cerveza “Belona”.
(Fuente: Elaboración propia).

Humedad	Grasa	Proteínas	Fibra	Cenizas
75±0,20	39,40±0,15	20,42±0,12	7,10±0,70	1,015±0,10

El bagazo fue desecado en un horno de desecación (Horno Muffla, Badajoz, España) inmediatamente a 100 °C durante 9 horas, hasta llegar a una humedad final de 6,25% (Horno Muffla, Badajoz, España), para evitar su alteración debido a la actividad microbiana. Posteriormente, las muestras secas se empaquetaron en bolsas de polietileno, se sellaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.



FIGURA 4. 3. Bagazo en proceso de desecación. (Fuente: Elaboración propia).

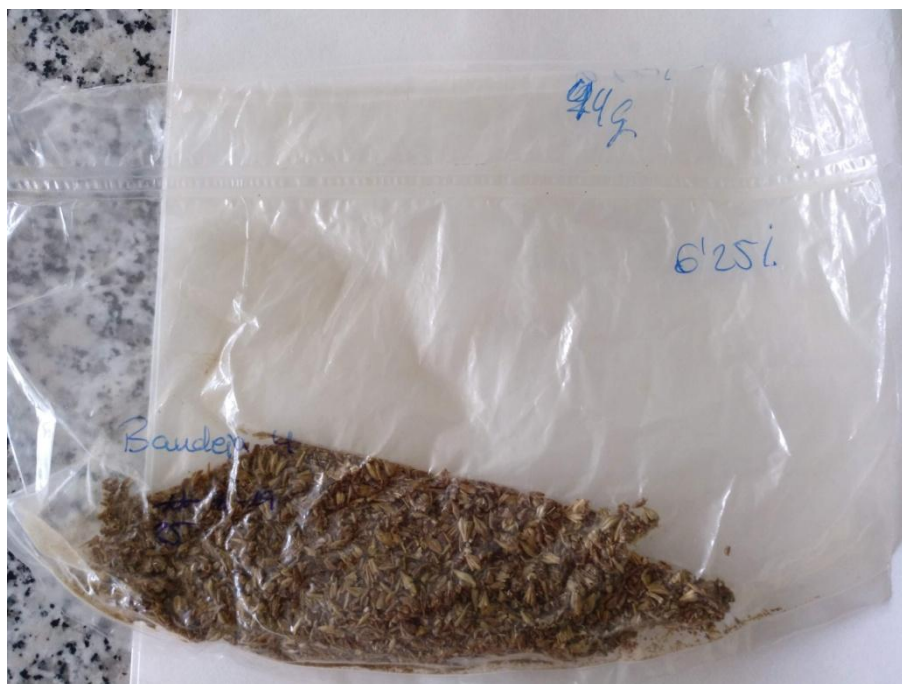


FIGURA 4. 4. Bagazo desecado. (Fuente: Elaboración propia).

4.2. Reactivos

Los reactivos y productos químicos que se han empleado en esta investigación fueron suministrados por distintas marcas comerciales: acético glacial (99,7%) Fisher (Loughborough, UK), Reactivo Folin-Ciocalteu, Fisher (Loughborough, UK), Carbonato sódico, Scharlau (Sentmenat, España), Ácido Gálico, Scharlau (Sentmenat, España), DPPH (0,01%) SIGMA (Steinheim, Alemania), etanol absoluto (99,5%) Scharlau (Sentmenat, España), vitamina C SIGMA (Steinheim, Alemania), Tampón Fosfato (0,2 M, pH 6,6) Scharlau (Sentmenat, España), Ferrocianuro Potásico (1%), Scharlau (Barcelona, España), Ácido Tricloroacético (10%) Fisher, (Geel, Bélgica), Coluro Férrico (0,1%) SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Alemania), ABTS (7 mM) Alfa Aesar (Kandel, Alemania) y Persulfato Potásico (2,45 mM) Scharlau (Sentmenat, España).

4.3. Selección de variables y proceso de extracción

La extracción se llevó a cabo a diferentes temperaturas (X1) entre 30 y 50°C, distintos tiempos (X2), entre 60 y 180 minutos y ratios líquido/sólido de agua/bagazo (X3), entre 10:1 y 25:1 de acuerdo al diseño experimental obtenido mediante el programa informático Design Expert v.9 (Tabla 4.2). La selección de los rangos de los distintos factores se llevó a cabo en base a estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio y en base a publicaciones previas en subproductos de cerveza (García, 2017).

TABLA 4.2 Variables seleccionadas para el proceso de extracción y valores de las mismas. (Fuente: Design Expert v. 9).

Run	T^a (°C)	Tiempo (min)	Ratio (V/P)
1	40	120	17,5
2	50	60	10
3	30	60	25
4	40	220,908	17,5
5	30	180	25
6	50	180	10
7	23,18	120	17,5
8	40	19,09	17,5
9	40	120	17,5
10	50	180	25
11	40	120	30,11
12	40	120	17,5
13	56,82	120	17,5
14	50	60	25
15	30	60	10
16	40	120	17,5
17	40	120	4,89
18	30	180	10
19	40	120	17,5
20	40	120	17,5
21	30	121,9	10

En cada extracto obtenido en las condiciones señaladas en la Tabla 4.2, se midieron los siguientes parámetros o variables dependientes (respuestas): contenido fenólico total (CFT), ensayo de capacidad de eliminación de radicales DPPH (DPPH), poder reductor (RP) y ensayo antioxidante de inhibición de cationes radicales ABTS (ABTS).

Para llevar a cabo el proceso de obtención del extracto a partir del bagazo desecado, este se disolvió en las cantidades y utilizando las temperaturas y tiempos indicados en la Tabla 4.2. Se pesaron las cantidades necesarias, en matraces Erlenmeyer y se le añadió la

proporción de agua destilada para cada extracción (Run). A continuación, se acidificó con ácido acético glacial (99,7%), hasta llegar a un pH de 3, para estabilizar así la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción se llevó a cabo en continua agitación en baño maría, según las condiciones de tiempo y temperatura indicadas en la Tabla 4.2.

TABLA 4.3 Cantidad de bagazo (g) y agua (mL) añadidos según el ratio. (Fuente: Elaboración propia).

Ratio (volumen/peso)	Run	g de bagazo a añadir	Total de g por ratio	Cantidad de agua a añadir (mL)
4,89	1	40,90	40,90	200
10,00	4	20,00	80,00	200
17,50	10	11,43	114,30	200
25,00	4	8,00	32,00	200
30,11	1	6,64	6,64	200
Total	20		273,84	1000

Una vez realizadas las extracciones, los homogeneizados se enfriaron rápidamente en hielo y se filtraron utilizando un tamiz de 45 μm de tamaño de poro (Filtru, Badalona, España). Tras ello, el líquido clarificado obtenido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugados, se almacenaron en congelación a -80°C hasta el momento de su análisis. Cada experimento de extracción (Run) se llevó a cabo por triplicado.

4.4. Diseño experimental

La optimización del experimento se llevó a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) para la extracción del contenido total de fenol (CFT) y la actividad antioxidante in vitro (DPPH, RP y ABTS). Se utilizó un diseño “Central Composite Design (CCD)” que consistió en 20 ensayos experimentales (Runs) que incluyeron 6 en puntos centrales, 6 en puntos axiales y 8 en puntos factoriales (Tabla 4.4). Las variables de extracción fueron la temperatura (X_1 , $^{\circ}\text{C}$), el tiempo (X_2 , min) y la relación volumen de agua/peso del bagazo (X_3 , mL/g).

TABLA 4.4 Factores experimentales y valores medidos de respuesta. Los factores de extracción fueron la temperatura en °C (X₁), el tiempo en minutos (X₂) y la relación v/w (g/mL) (X₃). Las respuestas medidas fueron las concentraciones de contenido total de fenoles (CFT) expresadas como mg de ácido gálico / mL extracto y actividad antioxidante, por los métodos de DPPH, PR y ABTS expresados en%, mg vitamina C / mL extracto y% respectivamente. (Fuente: Elaboración propia).

Run	Variables independientes			Respuestas			
	Temperatura (°C) (X ₁)	Tiempo (min) (X ₂)	Ratio líquido/sólido (mL/g) (X ₃)	CFT	DPPH	PR	ABTS
1	40	120	17,5	0,042	46,38	2,58	46,65
2	50	60	10	0,030	77,56	2,09	78,58
3	30	60	25	0,015	39,83	3,85	34,25
4	40	220,91	17,5	0,020	62,10	3,85	46,75
5	30	180	25	0,009	45,57	3,22	35,96
6	50	180	10	0,036	98,23	3,96	81,43
7	23,18	120	17,5	0,038	96,51	4,50	50,56
8	40	19,09	17,5	0,011	92,49	3,90	44,55
9	40	120	17,5	0,012	93,61	4,46	48,42
10	50	180	25	0,015	84,49	4,17	37,04
11	40	120	30,11	0,029	84,70	3,26	34,30
12	40	120	17,5	0,025	96,67	4,31	47,72
13	56,82	120	17,5	0,016	95,49	4,24	56,15
14	50	60	25	0,017	85,78	4,71	33,76
15	30	60	10	0,051	95,87	4,29	73,97
16	40	120	17,5	0,024	87,60	3,92	39,72
17	40	120	4,89	0,055	93,77	3,80	101,34
18	30	180	10	0,042	90,50	4,71	69,89
19	40	120	17,5	0,025	79,92	4,11	31,45
20	40	120	17,5	0,016	91,79	3,12	43,37

CFT = Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/mL extracto), DPPH = actividad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (%), PR = Poder reductor (mg Vitamina C/mL extracto), ABTS = Capacidad de eliminación del radical ABTS (%),

Las variables de extracción incluidas, (temperatura de extracción (X_1 , °C), tiempo de extracción (X_2 , min), relación líquido a sólido (X_3 , mL/g) (ver Tabla 4.2). Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de ecuación polinomial de segundo orden para obtener los coeficientes de regresión (β_0). El modelo polinomial generalizado de segundo orden utilizado en el análisis de la superficie de respuesta se expresa mediante la Ecuación 4.1:

$$Y = \beta_0 + \sum_{k=1}^n \beta_{ki} X_i + \sum_{k=1}^n \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{k=1}^n \sum_{j=1}^n \beta_{kij} X_i X_j \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde, Y es la variable de respuesta, X_i y X_j son las variables independientes, y n es el número de variables probadas (n=4). El coeficiente de regresión se define como β_0 para la ordenada en el origen (intercept), β_i para lineal, β_{ii} para cuadrático y β_{ij} para la interacción.

Para probar el modelo predicho en la variable de respuesta, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% para evaluar el efecto de cada factor (temperatura, tiempo, volumen/peso). Además, se emplearon el coeficiente de regresión (R^2), el valor p del modelo de regresión y el valor p de la “lack of fit” (LOF) para evaluar la adecuación del modelo de regresión utilizando Expert Design v.9 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, EE. UU). Las condiciones óptimas fueron elegidas considerando las superficies de respuesta.

Las condiciones optimizadas se validaron para el contenido máximo de fenoles totales (CFT) y las actividades antioxidantes (DPPH, RP y ABTS) en función de los valores obtenidos utilizando MSR. Todas las respuestas se determinaron en condiciones optimizadas de extracción. Los valores experimentales se compararon con los valores predichos basados en CV% para determinar la validez del modelo. La verificación de la validez y la adecuación de la extracción predictiva (n = 5) se realizó comparando las predicciones con los valores observados mediante una prueba t de student (p = 0.05).

4.5. Cuantificación de fenoles totales y evaluación de la actividad antioxidante (DPPH, Poder Reductor y ABTS)

4.5.1. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se han determinado según el método Folin-Ciocalteu (Singleton y Rosi, 1965).

El método Folin-Ciocalteu se emplea para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos y el reactivo Folin-Ciocalteu, por la que se produce una coloración azul. Este reactivo está formado por una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en medio ácido), de color amarillo, es reducido por los grupos fenólicos y genera un complejo de color azul intenso, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente para determinar el contenido de polifenoles. (García et al., 2015).

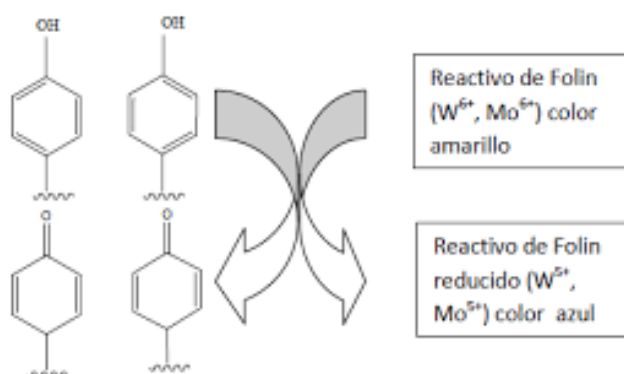
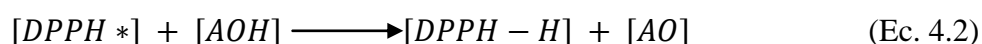


FIGURA 4.5 Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu. (Fuente: García Martínez et al., 2015).

Se tomaron 50 μ L del extracto, a los que se les añadieron 450 μ L de etanol absoluto y 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:10 en agua destilada, se agitó en vórtex para su mezcla. Se dejó reposar durante 3 minutos y a continuación se añadieron 2 mL de carbonato de sodio al 7,5%, agitando de nuevo para su mezcla. Se mantuvo en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, haciendo uso de un espectrofotómetro, se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm de longitud de onda. Para la cuantificación se empleó una curva de calibrado estándar con ácido gálico, expresando los resultados en miligramos de ácido gálico por mL de muestra.

4.5.2 Determinación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH

La actividad secuestradora del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrácilo)(ASR) de los extractos acuosos se ha determinado mediante el método descrito por (Broncano et al., 2011), con alguna modificación. La molécula DPPH es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado. Cuando la solución DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, se produce una coloración morada que se mide espectrofotométricamente. La reacción entre la sustancia antioxidante y el radical libre se puede representar como se muestra en la Ecuación 4.2:



Se diluyeron las muestras a 1/10, se cogieron 50 μL de la muestra añadiendo 450 μL de agua destilada. Se le añadió 500 μL de etanol absoluto y 125 μL de DPPH al 0.01%. Se ha realizado un blanco para cada muestra, añadiendo lo anterior, excepto los 125 μL de DPPH que se añadieron en etanol absoluto.

Se realizó un control negativo, con su correspondiente blanco, añadiendo agua, en vez de muestra; y un control positivo, con su correspondiente blanco, añadiendo vitamina C (ácido D-Hidroascórbico) en vez de la muestra, a las mismas concentraciones de los extractos. Todas las cantidades empleadas se pueden observar en la Tabla 4.5.

TABLA 4.5 Cantidades para la determinación de la actividad secuestradora del radical DPPH. (Fuente: Elaboración propia).

	Extracto	Agua destilada	Etanol absoluto	DPPH
Blanco Muestra	50 μL	450 μL	625 μL	-
Muestra	50 μL	450 μL	500 μL	125 μL
Blanco -	-	500 μL	625 μL	-
Control -	-	500 μL	500 μL	125 μL
Blanco +	500 μL Vit. C	-	625 μL	-
Control +	500 μL Vit. C	-	500 μL	125 μL

Una vez que se realizó todas las mezclas, se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad para después medir su absorbancia, que se hace con una longitud de onda de 517 nm, que es donde tiene su máximo el DPPH en forma de radical. Una baja absorbancia indica la alta capacidad secuestradora del DPPH, por lo que el control positivo y los extractos tendrán menos absorbancia que el control negativo, puesto que este no tiene antioxidantes que puedan ceder el radical.

La actividad secuestradora de radicales se calculó empleando la Ecuación 4.3:

$$\text{Capacidad secuestradora de radicales (\%)} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Donde Am es la absorbancia de la muestra y Ac es la absorbancia del control negativo.

4.5.3. Poder reductor

El poder reductor se determinó de acuerdo con el método de (Broncano et al., 2011), con ciertas modificaciones. Se emplean compuestos inorgánicos para medir la capacidad de ciertas sustancias a reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . La capacidad reductora está ligada a la cantidad de radicales libres que un agente antioxidante es capaz de captar para anular su actividad, que a su vez tiene relación con la concentración del agente antioxidante, puesto que al aumentar su concentración, aumenta el poder de reducción. Debido a ello, a mayor absorbancia, mayor capacidad reductora tendrá la muestra. (Cambizaca y Bermeo, 2015).

Se tomaron 100 μL de extracto y se añadieron 400 μL de agua destilada, 2,5 mL de tampón fosfato (0,2 M, pH 6,6), y 2,5 mL de ferrocianuro potásico al 1%. Esta mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos, añadiéndole posteriormente 2,5 mL de ácido tricloroacético al 10%. Tras ello, se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se cogen 2,5 mL de sobrenadante a los que se les añade 2,5 mL de agua destilada, y 0,5 mL de coluro férrico al 0,1%, registrándose la absorbancia de la mezcla a 700 nm. El incremento de la absorbancia de la mezcla indica un incremento del poder reductor, el cual se expresará en mg de ácido ascórbico por mL de extracto, realizando una curva de calibración de vitamina C.

4.5.4. Capacidad de eliminación del radical ABTS

La capacidad de eliminación del radical ABTS se determinó de acuerdo con el método de Sweica et al. (2014), con algunas modificaciones. El método se basa en la reacción que se produce al mezclar el ABTS, incoloro, con persulfato potásico, por el que se establece un equilibrio con su radical $ABTS^+$, que es cromóforo, de color azul verdoso. El radical $ABTS^+$ se genera a partir de su precursor ABTS. Esta coloración puede revertirse en presencia de sustancias antioxidantes. El radical catiónico obtenido $ABTS^+$, es un compuesto coloreado, estable y con absorbancia en el espectro UV-Visible.

Para obtener la solución madre $ABTS^+$, la solución 7 mM de ABTS se hizo reaccionar con persulfato potásico 2,45 mM (concentración final) y la mezcla se dejó reposar en la oscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente. La solución de trabajo $ABTS^+$ se preparó diluyendo la solución madre de $ABTS^+$ con agua destilada para obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm. Para que la solución madre tenga esa absorbancia, se añadieron 1 mL de la solución madre $ABTS^+$ y 28 mL de agua destilada. A continuación, se añaden a 3 mL del $ABTS^+$ 0,4 mL del extracto, éste se ha diluido a la décima parte, por lo que en los 0,4 mL hay 40 μ L del extracto y 360 μ L de agua destilada. Se hizo un control positivo y otro negativo, el positivo se hizo con vitamina C y el negativo con agua destilada. Tanto las muestras como los controles necesitan un blanco en el que en vez de añadir $ABTS^+$ se añadieron 3 mL de persulfato potásico, tal y como se indica en la Tabla 4.6. La absorbancia se midió a 734 nm tras 30 minutos de incubación.

TABLA 4.6. Cantidades para la determinación de la capacidad de eliminación del radical libre ABTS. (Fuente: Elaboración propia).

	Extracto	Agua destilada	K₂S₂O₈	ABTS⁺
Blanco Muestra	40 μ L	360 μ L	3 mL	-
Muestra	40 μ L	360 μ L	-	3mL
Blanco -	-	400 μ L	3 mL	-
Control -	-	400 μ L	-	3 mL
Blanco +	400 μ L Vit. C	-	3 mL	-
Control +	400 μ L Vit. C	-	-	3 mL

La capacidad para eliminar el radical libre de ABTS se calculó empleando la Ecuación 4.4.

$$\textit{Capacidad quelante (\%)} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100 \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Donde Am es la absorbancia de la muestra y Ac es la absorbancia del control negativo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ajuste del modelo

La optimización del proceso de extracción se llevó a cabo mediante la aplicación de la ecuación polinómica de segundo orden, mencionada en el apartado 4.4. El modelo obtenido mostró un alto ajuste significativo con los datos experimentales (valores de R^2 de 0,89, 0,88, 0,90 y 0,96 para CFT, DPPH, PR y ABTS, respectivamente) (Tabla 5.1)

Los coeficientes de regresión para las variables dependientes se obtuvieron mediante regresiones lineales múltiples, como se muestra en la Tabla 5.1. La temperatura (X_1) mostró un efecto lineal negativo sobre el CFT, así como el tiempo (X_2) para el DPPH y la relación v/p para ambas variables CFT y ABTS. Se observó también que el efecto de interacción de X_{12} (temperatura y tiempo) fue significativo solo para DPPH, que el efecto de interacción de X_{13} (temperatura y ratio v/p) fue significativo solo para RP. También se reportó que el efecto de la interacción de X_{23} (tiempo y ratio v/p) fue significativo tanto para DPPH como para PR. El efecto cuadrático de X_2 (tiempo) produjo un efecto significativo sobre DPPH. Se encontró que el efecto cuadrático de X_3 (relación v/p) produjo además un efecto significativo en todas las variables excepto para DPPH.

El resultado del análisis de la varianza (ANOVA) realizado con el programa Design Expert v. 9 para cada variable de respuesta indica, que al menos uno de los parámetros en el modelo (temperatura, tiempo, ratio v/p) puede explicar la variación experimental para las variables de respuesta. Esto lo demuestra el valor F significativo para el modelo (Tabla 5.1) así como el hecho de que el parámetro “Falta de ajuste” (“lack of fit”) no fuera significativo, lo que indica que el modelo pudo ajustar adecuadamente los datos experimentales para todas las variables de respuesta (Tabla 5.1)

5.2. Efectos de las variables de extracción sobre el contenido de fenoles totales (CFT)

El modelo mostró alto valor significativo ($p < 0,01$) con los datos experimentales. El análisis de la varianza (ANOVA) mostró un efecto significativo negativo y lineal ($p = 0,001$) (X_1 y X_3) y un efecto cuadrático (X_{32}) ($p < 0,01$) sobre el contenido de CFT (Tabla 5.1). No hubo efecto significativo de la interacción entre X_1 , X_2 y X_3 en los datos experimentales. El valor no significativo de “lack of fit” ($F = 1,24$; $p > 0,05$) mostró que el modelo se ajustó a la influencia espacial de las variables para esta respuesta con una buena predicción ($R^2 = 0,89$).

Los resultados del análisis de regresión indicaron que la extracción de CFT fue mayor a temperaturas más bajas y relaciones líquido/sólido más bajas. La relación entre el CFT y las variables del proceso se muestra en la Figura 5.1. La extracción más alta de CFT se observó en el rango de 30-35 °C y 10-13 mL/g. El tiempo de extracción no juega una contribución significativa hacia el CFT.

TABLA 5.1 Coeficiente de regresión (β), coeficiente de determinación (R^2) y valores de prueba F de los modelos polinomiales de segundo orden pronosticados para el contenido total de fenol, DPPH, PR y ABTS. (Fuente: Design Expert v.9).

Coeficientes de regresión (β)				
	CFT	DPPH	PR	ABTS
<i>Intercep</i>				
X ₀	0,020	90,000	4,194	42,856
<i>Linear</i>				
X ₁	-0,004*	0,588	-0,029	0,682
X ₂	0,000	-7,021**	-0,010	0,546
X ₃	-0,011***	-4,189	-0,087	-20,181***
<i>Cross product</i>				
X ₁₂	0,002	10,443**	0,046	1,060
X ₁₃	0,004	3,862	0,448**	-1,946
X ₂₃	-0,001	-9,423**	-0,286**	0,778
<i>Quadratic</i>				
X ₁ ²	0,002	1,709	0,084	2,143
X ₂ ²	-0,002	-4,905*	-0,090	1,188
X ₃ ²	0,007**	-0,682	-0,212**	9,025***
R ²	0,89	0,88	0,90	0,96
F value (model)	7,82**	6,47**	7,13**	29,69***
F value (lack of fit)	1,24	1,22	0,54	0,22

Nivel de significación * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

X₁ = Temperatura de extracción (°C), X₂ = Tiempo de extracción (min⁹, X₃ = Ratio líquido/sólido, CFT = Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/mL extracto), DPPH = actividad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (%), PR = Poder reductor (mg Vitamina C/mL extracto), ABTS = Capacidad de eliminación del radical ABTS (%), R² = Coeficiente de determinación

La relación entre el CFT y las variables del proceso se representa en la Figura 5.1. Los resultados del análisis de regresión indican que la extracción de fenoles totales es mayor a bajas temperaturas y a bajos ratios líquido/sólido hasta cierto punto. En estudios previos centrados en la extracción de compuestos fenólicos a partir de subproductos de uvas, se observó que la temperatura y la relación sólido-líquido eran los parámetros más críticos en la eficiencia de la extracción (Pinelo et al., 2005) al igual que en arroz negro (Pedro et al., 2016). Por el contrario, Zeng et al. (2019) no encontraron ningún efecto significativo en el efecto de la temperatura en la extracción de fenoles en el salvado de arroz. En el presente trabajo la máxima extracción de CFT tuvo lugar en el rango de 30-35°C y 10-13 mL/g. El tiempo de extracción no tuvo contribución significativa en el CFT, lo cual coincide con lo reportado previamente por Liyana-Pathirana y Shahidi (2007). Por lo tanto, puede suponerse que un tiempo mínimo de extracción (60 min) es suficiente para la extracción de fenoles totales en las condiciones de este estudio.

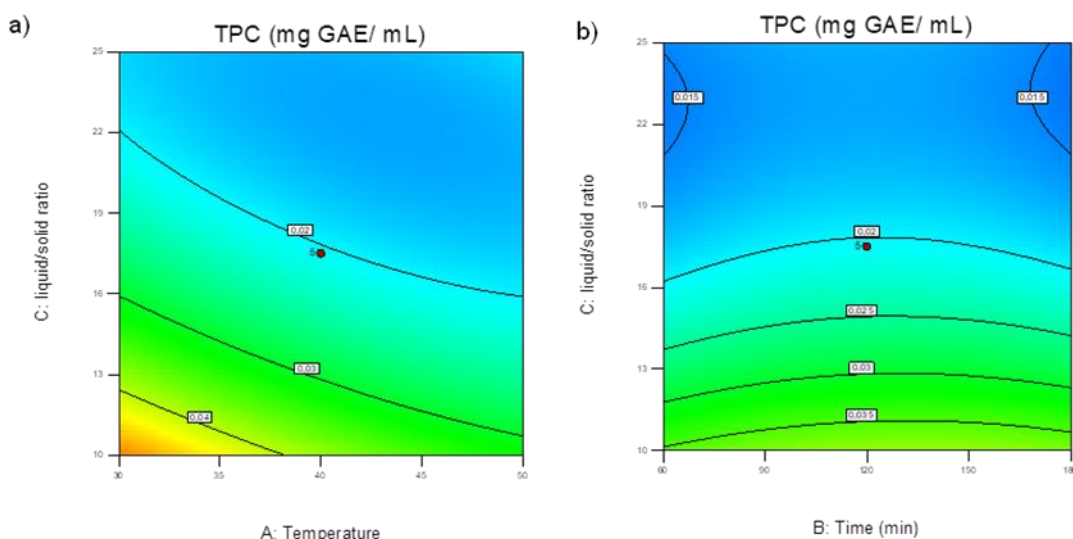


FIGURA 5.1 Gráficos de contorno para el efecto de (A) temperatura y relación líquido/sólido y (B) tiempo y relación líquido/sólido en CFT. (Fuente: Design Expert v.9).

En las condiciones del presente experimento, la temperatura presentó un efecto negativo en la extracción de CFT en bagazo. Hasta la fecha, no existen datos de investigaciones científicas sobre la extracción acuosa de fenoles en este subproducto con los que poder contrastar los resultados obtenidos. En otros estudios, se ha observado que el efecto favorable de la temperatura en la extracción de fenoles en cereales no era concluyente (Balli et al., 2020). Moreira et al. (2013) observaron el efecto negativo al incrementar la temperatura sobre el CFT de bagazo. Cacace y Mazza (2003) observaron que el incremento

de temperatura de 40 a 74°C disminuyó el rendimiento en la extracción de fenoles a partir de grosellas negras.

La temperatura tiene una gran importancia en la eficiencia del proceso de extracción de fenoles (Panja, 2017). Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura, mayor es la solubilidad de los compuestos solubles y el coeficiente de difusión y más baja es la viscosidad del disolvente y tensión superficial así como más débiles son los enlaces fenoles-proteínas y fenoles-polisacáridos. Todo ello se puede explicar como el resultado de la migración de los compuestos fenólicos hacia el disolvente de extracción (Viacava et al., 2015; Panja, 2017). Por el contrario, puede tener lugar la desnaturalización de compuestos fenólicos debido a reacciones químicas y enzimáticas por encima de ciertas temperaturas (Pinelo et al., 2005; Spigno et al., 2007; Akowuah et al., 2009; Heras et al., 2013). Jerez et al. (2006) indicaron que en el proceso de extracción, las altas temperaturas podrían promover la desnaturalización de las membranas y por tanto, la movilidad del disolvente y los solutos. Bajo estas condiciones también se pueden disolver compuestos no deseados (Wettasinghe y Shahidi, 1999; Panja, 2017).

Con respecto al ratio líquido/sólido, cuanto mayor fue dicha relación, menor fue el CFT, como se puede deducir a partir del coeficiente lineal significativo negativo mostrado en la Tabla 5.1. Sin embargo también hubo un efecto cuadrático significativo del ratio líquido/sólido en el CFT ($\beta = 0,722$; $P < 0,01$), lo cual indica que esta variable independiente muestra tanto efectos positivos como negativos en el CFT (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). En este sentido, el CFT disminuyó a medida que aumentaba la relación líquido/sólido, alcanzando una meseta por encima de un ratio de 16:1. Pompeu et al. (2009) también observaron un resultado similar en fruta, con una meseta en la transferencia de masa en la relación sólido/líquido de 1:2 a partir del cual no aumentaba la extracción de CFT. Gubta et al. (2013), también determinaron que el máximo de CFT en residuos de cerveza se alcanzaba con una baja relación líquido/sólido, al igual que Riciputi et al. (2018) al extraer fenoles de subproductos de patatas y Akbari et al. (2019) a partir de semillas de fenogreco. Al optimizar la extracción de fenoles del arroz integral negro, Pedro et al., (2016) no concluyeron que la relación líquido/sólido más alta fuese mejor, sino que consideraron que relaciones más bajas eran más adecuadas para la optimización de la extracción de fenoles. Todaro et al. (2009) observaron que el aumento del ratio líquido/sólido solo aumentó el rendimiento de fenoles (antocianinas) en el caso de emplear metanol acidificado y no en el caso de emplear soluciones acuosas. Sin embargo, Mazza (2003) y Belwal et al. (2016) observaron que el CFT

aumentó al mismo tiempo que lo hizo la relación líquido/sólido de 1:10 a 1:50 (g/mL) en extractos de frutas, pero empleando disolventes orgánicos.

5.3 Efectos de las variables de extracción sobre el potencial antioxidante en extracto de bagazo

El potencial antioxidante de los extractos de bagazo se determinó por tres métodos basados en diferentes criterios, concretamente el 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y 2,2'-azino-bis(3-ethylbenothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), métodos de eliminación de radicales y el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (PR), todos ellos empleados normalmente en extractos de plantas y subproductos.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró un efecto negativo y cuadrático negativo significativo del tiempo (X_2 y X_{22}) ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) sobre los valores de DPPH (Tabla 5.1). Las interacciones tiempo-temperatura (X_{12}) y tiempo-ratio v/p (X_{13}) también fueron significativas en el modelo ($p < 0,01$). Esto se muestra gráficamente en la Figura 5.2. Ello indica que a cierto tiempo, temperatura y ratio, el valor de DPPH alcanzó su valor más alto y comenzó a disminuir. La actividad más alta se observó en el rango de 30-32 °C y 10-12 mL/g (Figura 5.2 a) y el rango de 60-72 min y 10-12 ml/g (Figura 5.2 b). Zeng et al. (2019) encontraron un comportamiento similar de este parámetro en función del tiempo de extracción de fenoles en arroz integral utilizando un disolvente acuoso etanólico.

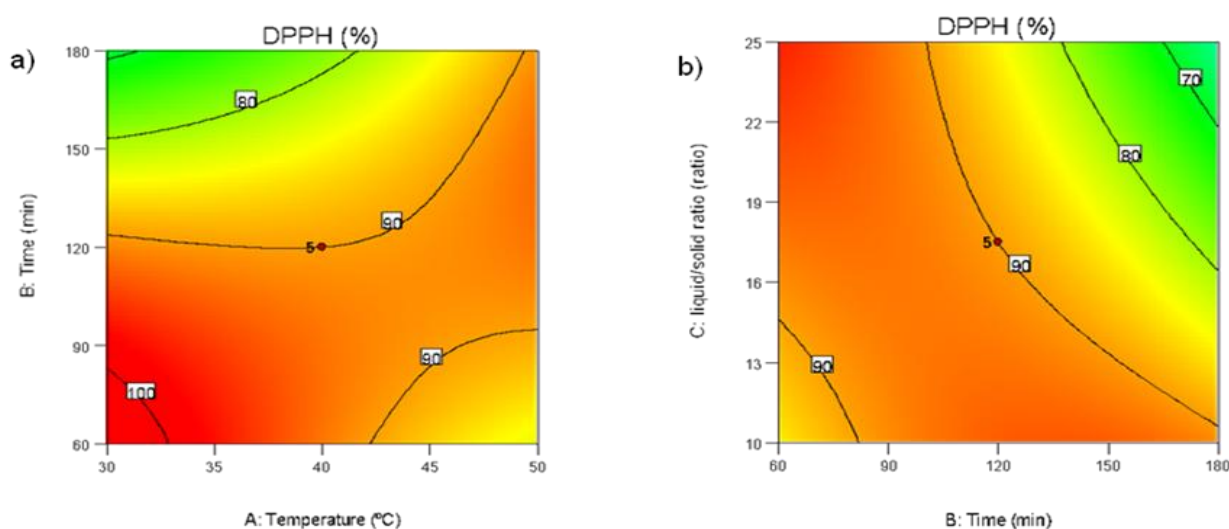


FIGURA 5.2 Gráficos de contorno para el efecto de (a) temperatura y tiempo y (b) tiempo y relación líquido/sólido en los valores de DPPH. (Fuente: Design Expert v.9).

En el caso de los resultados de ABTS, solo el efecto lineal y cuadrático del ratio sólido/líquido (X_3) fue significativo para el modelo en el caso de los valores ABTS ($p < 0.001$) (Tabla 5.1).

Los valores de ABTS fueron mayores a menores ratios, como se muestra en la Figura 5.2 (a y b). Este comportamiento es similar al explicado para el CFT estando estos dos parámetros positivamente correlacionados ($R = 0.788$; $p < 0.01$) (Tabla 5.1), tal y como ocurre en estudios anteriores en trigo (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Socaci et al., 2018). Sin embargo, los valores de ABTS no se correlacionaron significativamente con el parámetro DPPH (Tabla 5.2), lo que no es consistente con la bibliografía previa (Socaci et al., 2018).

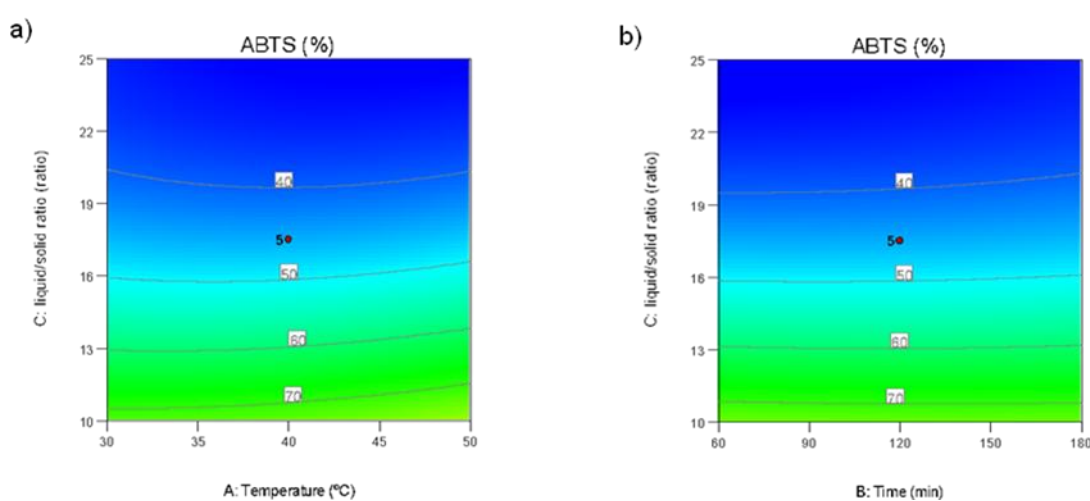


FIGURA 5.3 Gráficos de contorno para el efecto de (a) ratio-temperatura y (b) relación-tiempo en los valores de PR. (Fuente: Design Expert v.9).

La Tabla 5.2 muestra el coeficiente de correlación de Pearson calculado para las variables de respuesta. A partir de esta tabla se puede inferir que los valores de DPPH no estaban significativamente correlacionados con el CFT. Meneses et al. (2013) también reportaron una correlación muy baja y débil entre estos dos parámetros en bagazo así como Aalim et al. (2019) en salvado de arroz y Zhang et al. (2015) en emulsiones. En este sentido, la actividad antioxidante de un extracto fenólico no puede relacionarse únicamente con su CFT, como se ha indicado en extractos vegetales por Kähkönen et al. (1999). Otros compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, proantocianidinas y compuestos aminofenólicos pueden desempeñar un papel más importante en la actividad antioxidante, como constataron Meneses et al., (2013) en bagazo.

TABLA 5.2 Coeficiente de correlación de Pearson para las variables de respuesta. (Fuente: Design Expert v.9).

	CFT	DPPH	PR	ABTS
CFT	1	0,434	0,179	0,788 ^{**}
DPPH	0,434	1	0,513 [*]	0,402
PR	0,179	0,513 [*]	1	0,155
ABTS	0,788 ^{**}	0,402	0,155	1

Level of significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En lo que respecta al Poder Reductor (PR), solo la relación ratio-temperatura (X_{13}), ratio-tiempo (X_{23}) y el efecto cuadrático de la relación fueron significativos en el modelo ($p < 0,01$). El poder reductor más alto se alcanzó en el rango de 30-33°C y 10-14 mL/mg y a 116-120 min y 16-17 mL/mg. Esto se muestra gráficamente en la Figura 5.4.

La actividad reductora y la actividad de eliminación de radical (DPPH) están correlacionados positivamente ($p < 0.05$) (Tabla 5.2), lo que está de acuerdo con los resultados de Meneses et al. (2013) pero no con CFT ($p < 0.05$).

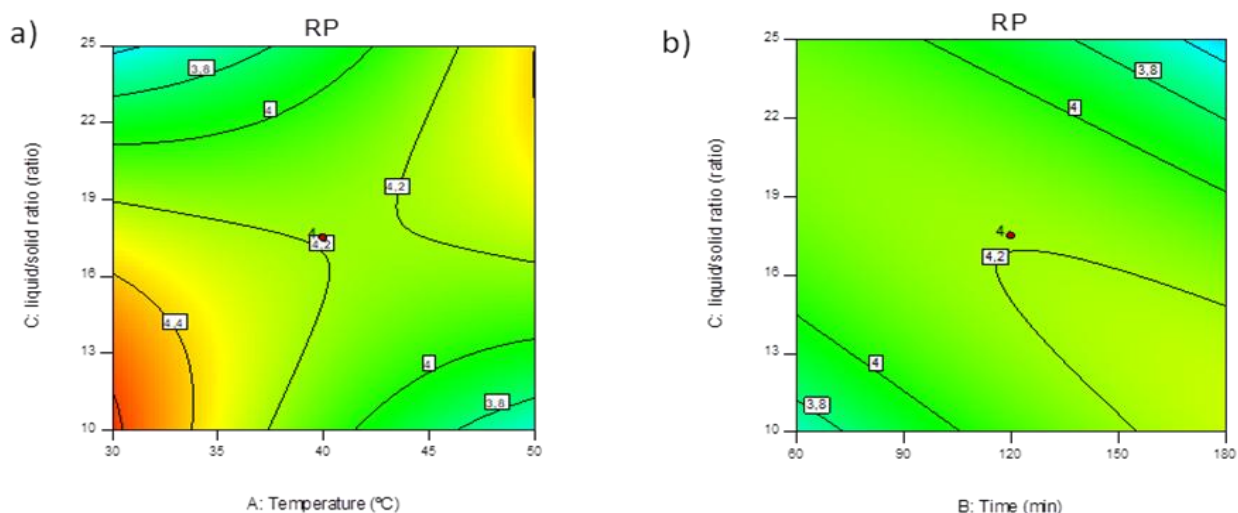


FIGURA 5.4 Gráficos de contorno para el efecto de (a) ratio-temperatura y (b) ratio-tiempo en los valores de PR. (Fuente: Design Expert v.9).

Finalmente, en base al ANOVA, puede decirse que el modelo es estadísticamente significativo y proporciona respuestas válidas en función de las variables independientes. Por lo tanto, esta puede ser una herramienta útil para la optimización estadística de procesos de extracción a partir de subproductos agroalimentarios y concretamente de cerveza.

5.5 Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo.

Las condiciones óptimas se determinaron al maximizar la conveniencia de las respuestas utilizando la versión de prueba de Expert Design v.9 (Sta-Ease, Inc.). Idealmente, la conveniencia máxima debería estar en la concentración máxima de CFT y los valores más altos para los valores de DPPH, PR y ABTS. Estas condiciones óptimas se utilizaron para el proceso de extracción y, posteriormente, las respuestas se determinaron y validaron de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente. Las condiciones óptimas fueron 30°C, 121,9 min y 10 ml/g de ratio líquido/sólido. La deseabilidad obtenida fue de 0,828. Bajo estas condiciones óptimas, los valores experimentales estuvieron de acuerdo con los valores predichos con un rango de CV desde 0,6 a 11,6 (Tabla 5.3). Este parámetro describe el grado de dispersión de los datos.

TABLA 5.3 Datos experimentales de la validación de valores predichos en condiciones óptimas de extracción.

Variables dependientes	Valor predicho	Valor experimental	Coefficiente de Variación (%)
CFT	0.049	0,054	8,3
DPPH	98,229	86,26	9,2
PR	4,638	3,93	11,6
ABTS	75,258	71,58	0,6

, CFT = Contenido de fenoles totales (mg ácido gálico/mL extracto), DPPH = actividad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (%), PR = Poder reductor (mg Vitamina C/mL extracto), ABTS = Capacidad de eliminación del radical ABTS (%), CV: Coeficiente de variación

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La obtención de extractos acuosos a partir de bagazo de cerveza artesanal, con actividad antioxidante *in vitro* en las condiciones del presente trabajo, es viable. Por lo tanto, podría sugerirse que la utilización de agua como disolvente para estos extractos sería interesante en la revalorización de estos subproductos desde el punto de vista económico y medioambiental.
- Las condiciones óptimas para la obtención de la máxima cantidad de fenoles y máxima actividad antioxidante “*in vitro*” fueron 30°C, 121,9 minutos y 10 mL de agua/g de bagazo.
- El correcto y significativo ajuste del modelo de regresión obtenido en bagazo de cerveza artesanal mediante la aplicación de Modelos de Superficie de Respuesta (MSR) indica que los resultados de este trabajo de investigación puede establecerse como un base sólida para el comienzo de una línea de investigación con subproductos de la industria cervecera y en general de la industria agroalimentaria.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalim, H., Belwal, T., Jiang, L., Huang, H., Meng, X. & Luo, Z (2019) Extraction optimization, antidiabetic and antiglycation potentials of aqueous glycerol extract from rice (*Oryza sativa* L.) bran. *LWT*, 103, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.006>.
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., & Yunus, R. M. (2019). Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool. *Comptes Rendus Chimie*. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.07.007>
- Akowuah, G. A., Mariam, A., y Chin, J. H. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of *Gynura procumbens* leaf. *Pharmacognosy Magazine*, 5(17), 81.
- Albán Cabaco, B., Núñez Tabales, J. M., y Sánchez Cañizares, S. M. (2015). El sector cervecero artesanal español y sus posibilidades de internacionalización. *Regional and Sectoral Economic Studies*, 15(2), 145-156.
- Albanese, L., Ciriminna, R., Meneguzzo, F., y Pagliaro, M. (2018). Innovative beer-brewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. *Journal of cleaner production*, 171, 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.027>.
- Arce de Mena, S. (2017). Optimización de la producción de cerveza artesana: empresa Vier.
- Aron, P. M., y Shellhammer, T. H. (2010). A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 369-380. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>
- Balli, D., Bellumori, M., Orlandini, S., Cecchi, L., Mani, E., Pieraccini, G., Mulinacci, N. y Innocenti, M. (2020) Optimized hydrolytic methods by response surface methodology to accurately estimate the phenols in cereal by HPLC-DAD: The case of millet. *Food Chemistry*, 303, 125393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125393>
- Barbosa-Pereira, L., Bilbao, A., Vilches, P., Angulo, I., LLuis, J., Fité, B., y Cruz, J. M. (2014). Brewery waste as a potential source of phenolic compounds: Optimisation

of the extraction process and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. Food chemistry, 145, 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.033>.

- Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., y Pande, V. (2016). Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in Berberis asiatica fruits using response surface methodology (RSM). Food chemistry, 207, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.081>
- BOE, 2011. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE num. 181, de 29/07/2011
- B.O.E., 2016. Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta, «BOE» núm. 304, de 17 de diciembre de 2016, páginas 88520 a 88524
- Broncano, J. M., Timón, M. L., Parra, V., Andrés, A. I., y Petró, M. J. (2011). Use of proteases to improve oxidative stability of fermented sausages by increasing low molecular weight compounds with antioxidant activity. Food Research International, 44(9), 2655-2659. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.011>.
- Cacace, J.E. y Mazza, G. (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering, 59(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1).
- Cambizaca Heredia, L. N., y Bermeo Guerrero, C. M. (2015). Relación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de Jungia rugosa Less en extractos metanólicos y de diclorometano (Bachelor's thesis).
- Cerveceros España, (2017). Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España, 2017
- Creus, E. G. (2004). Compuestos fenólicos. Offarm, 23(6).
- De Urbina Criado, M. O., Montes, C. F. F., y Valentín, E. M. M. (2015). Análisis estratégico del sector cervecero español. Boletín Económico de ICE, (3062), 53-61.
- Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Dulf, F. V., Tofană, M., Mudura, E., & Diaconeasa, Z. (2015). Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of

brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Journal of cereal science*, 64, 34-42.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.003>

- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>.
- García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- García Paz, M. (2017). Los Residuos de cerveza como fuente de antioxidantes naturales (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., y Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1), 57-60.
- Gupta, S., Jaiswal, A.K. y Abu-Ghannam, N. (2013). Optimization of fermentation conditions for the utilization of brewing waste to develop a nutraceutical rich liquid product, *Industrial Crops and Products*, 44, 272-282.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.015>.
- Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (2013). Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (*Solana melonera* L.). *Información tecnológica*, 24(5), 93-102. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011>
- Herrera Rincón, F. R. (2017). Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*coffea arabica* l.) Empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial.
- Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., y Núñez, M. J. (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food chemistry*, 94(3), 406-414.

- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Lagüens Pérez, S. (2018). Planta de obtención de arabinosilanos a partir de bagazo de cerveza para la formulación de alimentos funcionales.
- Liyana-Pathirana, C., y Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*, 93(1), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.050>
- Martínez Muñoz, A. (2015). Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial (Bachelor's thesis).
- Martínez-Ramírez, A., Contreras-Esquivel, J., Belares-Cerda, R., y Saltillo, C. K. D. C. S. (2010). Extracción de polifenoles asistida por microondas a partir de *Punica granatum* L. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4).
- Meneses, N, Martins, S., Teixeira, J.A y Mussatto, S.I. (2013) Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Separation and Purification Technology*, 108, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>.
- Moreira, M.M, Morais, S., Carvalho, D.O., Barros, A.A., Delerue-Matos, C. y Guido, L.F. (2013) Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International*, 54(1) 382-388, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.023>.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C., y Castañeda Castañeda, B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 142-149.
- Nigam, P. S. (2017). An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. *Waste management*, 62, 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.018>.

- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>.
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>.
- Pedro, A.C., Granato, D. y Rosso, N.B. (2016) Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability, *Food Chemistry*, 191, 12-20, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.045>.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food chemistry*, 92(1), 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.015>.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Riciputi, Y., Diaz-de-Cerio, E., Akyol, H., Capanoglu, E., Cerretani, L., Caboni, M. F., y Verardo, V. (2018). Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food chemistry*, 269, 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.154>
- Robles-Ozuna, L. E., y Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Rodrigo-Illari, J., Rodrigo-Clavero, M. E., y Fernández-González, J. M. (2014). Alternativas de valorización y eliminación de residuos sólidos urbanos.
- Saldana, M. D., y Valdivieso-Ramirez, C. S. (2015). Pressurized fluid systems: phytochemical production from biomass. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 228-244. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.037>

- Sarkar, S., Alvarez, V. H., y Saldana, M. D. (2014). Relevance of ions in pressurized fluid extraction of carbohydrates and phenolics from barley hull. *The Journal of Supercritical Fluids*, 93, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.019>
- Silva Leal, M. A., & Martínez Corredor, L. M. (2017). Evaluación del efecto del pre-tratamiento con ultrasonido sobre la extracción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en brácteas y tallos de la alcachofa (*Cynara Scolymus*) cultivada en Cundinamarca.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Socaci, S.A., Fărcaș, A.C, Diaconeasa, Z.M., Vodnar, D.C., Rusu, B. & Tofană, M. (2018). Influence of the extraction solvent on phenolic content, antioxidant, antimicrobial and antimutagenic activities of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 80, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.03.006>
- Spigno, G., Tramelli, L. y De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1) 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>.
- Springer, N. P., y Schmitt, J. (2018). The price of byproducts: Distinguishing co-products from waste using the rectangular choice-of-technologies model. *Resources, Conservation and Recycling*, 138, 231-237.
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., y Czyż, J. (2013). The influence of protein–flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry*, 141(1), 451-458.
- Thomas, K. R., y Rahman, P. (2006). Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. *Aspects of Applied Biology*, 80.

- Todaro, A., Cimino, F. Rapisarda, P., Catalano, A.E. Barbagallo, R.N y Spagna, G. (2009) Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114(2) 434-439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.102>.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., y Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información tecnológica*, 18(1), 53-66. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100009>
- Viacava, G. E., Roura, S. I., & Agüero, M. V. (2015). Optimization of critical parameters during antioxidants extraction from butterhead lettuce to simultaneously enhance polyphenols and antioxidant activity. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 146, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.05.002>.
- Todaro, A., Cimino, F. Rapisarda, P., Catalano, A.E. Barbagallo, R.N y Spagna, G. (2009) Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114(2) 434-439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.102>.
- Wettasinghe, M. y Shahidi, F. (1999) Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds, *Food Chemistry*, 67(4) 399-414, [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00137-5).
- Zeng, Z., Hu, X., McClements, D. J., Luo, S., Liu, C., Gong, E., y Huang, K. (2019). Hydrothermal stability of phenolic extracts of brown rice. *Food chemistry*, 271, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.180>.
- Zhang, Y., Shen, Y., Zhu, Y. y Xu, X. (2015). Assesment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 569-574.

8. PÁGINAS WEB CONSULTADAS

8. PÁGINAS WEB CONNSULTADAS

- Asociación de birrifactores de Extremadura (2016). Guía de Cervezas Artesanas Extremeñas. Disponible en <http://www.birrifactoresdeextremadura.es/>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2018). Informe del consumo alimentario en España 2018. Disponible en <https://www.mapa.gob.es/es/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (2011). Pérdida y desperdicio de alimentos en el mundo. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i2697s.pdf>