

Tesis
Licenciatura en Bromatología

“Estudio de métodos de extracción de compuestos fenólicos de orujos provenientes de vinificación de uvas cv Malbec”

Tesista: Bromatóloga Liliana H. Venanzi

Directora: Lic. en Bromatología Andrea Antonioli

Co Director: Dr. Rubén Bottini

**Tesina presentada para acceder al título de grado
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo**

2014

Índice General

MARCO TEÓRICO.....	4
1.0 Introducción	5
1.1 Vitivinicultura Argentina.....	7
1.1.1 Reseña Histórica. El Malbec y sus orígenes.....	7
1.1.1.1 El Malbec en la Argentina	8
1.2 Uva (<i>Vitisvinifera</i>).....	10
1.2.1 Estructura y desarrollo de la uva	10
1.3 Compuestos fenólicos.....	14
1.3.1 Compuestos fenólicos no flavonoides.....	15
1.3.2 Compuestos fenólico flavonoides.....	16
1.4 El Orujo: Potencial fuente de compuestos bioactivos.....	17
1.4.1 Composición química de los orujos.....	18
1.4.2 Alimentos funcionales.....	19
1.4.3 Radicales libres.....	21
1.5 Los procesos de extracción y los distintos solventes.....	22
1.6 Método Analítico	23
1.6.1 Espectrofotometría.....	24
1.5.1.2 Principio básico del espectrofotómetro.....	25
1.5.1.3 Componentes básicos del espectrofotómetro.....	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
2.0 Hipótesis.....	28

2.1	Objetivos.....	28
2.1.1	Objetivos Particulares.....	28
MARCO EXPERIMENTAL.....		29
3.0	Marco Experimental.....	30
3.1	Materiales y Métodos.....	30
3.1.1	Equipamiento.....	30
3.1.2	Drogas y Reactivos	31
3.2.0	Obtención de los extractos.....	31
3.2.1	Resultados y Discusión	35
ANEXO.....		43
BIBLIOGRAFÍA.....		49
INDICE DE FIGURAS		
Figura N° 1	Uva Malbec.....	7
Figura N° 2	Ubicación Cahors. Francia.....	8
Figura N° 3	Estructura de la uva madura.....	11
Figura N° 4	Desarrollo y maduración de la uva.....	12
Figura N° 5	Distribución de los principales compuestos fenólicos	13
Figura N° 6	Representación molécula fenólica.....	14
Figura N° 7	Los polifenoles del vino.....	14
Figura N° 8	Principales ácidos cinámicos.....	15
Figura N° 9	Principales ácidos benzoicos.....	16
Figura N°10	Principales taninos catequinos.....	17

Figura N° 11 Espectrofotómetro.....	24
Figura N° 12 Diagrama de absorción de un haz.....	25
Figura N° 13 Especificación de los métodos de extracción.....	32
Figura N° 14 Algoritmo gráfico	33
Figura N° 15 Orujo fresco.....	35
Figura N° 16 Extracto obtenido.....	35

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Valores de IPT. Ensayo N°1.....	36
Tabla N° 2 Valores de IPT. Ensayo N°2.....	37
Tabla N° 3 Valores de IPT. Ensayo N°3.....	38
Tabla N° 4 Valores de IPT. Ensayo N°4.....	39
Tabla N° 5 Medida de la absorbancia 280 nm.....	43

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1 Medida de la absorbancia. Ensayo N°1.....	37
Gráfico N°2 Medida de la absorbancia. Ensayo N°2.....	38
Gráfico N°3 Medida de la absorbancia. Ensayo N° 3.....	39
Gráfico N°4 Medida de la absorbancia. Ensayo N°3.....	40
Gráfico N°5 Curva de calibración del método.....	44

1

MARCO TEÓRICO



1.0- Introducción

Argentina es el primer productor de vinos de Latinoamérica y se ubica en el quinto lugar del mundo según la OIV. Aproximadamente el 70 % de la uva producida en la Argentina se cultiva en Mendoza registrándose una producción total de uvas ingresada a establecimientos de 19.974.421,24 quintales métricos, siendo 3.107.535 quintales métricos de uvas cultivar Malbec destinadas a elaborar vinos y mostos (INV 2013).

El orujo es un subproducto originado en el proceso de prensado del vino cuya composición son tallos, semillas, hollejos y constituye de un 10 a 20% en peso húmedo del total de la uva. El orujo habitualmente es extraído de las bodegas y llevado a las destilerías en donde se realiza la extracción de alcohol remanente, ácido tartárico y aceite, a partir de las semillas, originando un segundo subproducto denominado orujo agotado que es utilizado como enmienda orgánica en cultivos ya que actúa como mejorador de suelos, combustible para calderas, o bien es desechado en el vertedero local (Indiveri et al. 2013).

En los últimos años, los residuos sólidos de vinificación han atraído una atención considerable como fuentes potenciales de compuestos fenólicos bioactivos, que pueden ser utilizados para diversos fines en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Estos metabolitos secundarios presentan un potencial beneficio para la salud humana debido a su actividad antioxidante y antimicrobiana (Fontana et al. 2013).

Los antioxidantes presentes en diversos alimentos tienen un papel esencial para la salud. Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de compuestos producto del metabolismo secundario de las plantas, donde desempeñan diversas funciones de protección frente al ataque de patógenos o herbívoros y son pigmentos que atraen a los polinizadores. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen

su acción antioxidante. Estos compuestos pueden además encontrarse en formas conjugadas (glicosiladas) con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático aunque también pueden encontrarse asociados a otros compuestos (Manach et al. 2004).

La adición de antioxidantes a los alimentos es un método para aumentar la vida útil de los mismos, especialmente protegiendo los compuestos lipídicos. El uso de antioxidantes sintéticos tales como butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitotuleno (BHT) se han cuestionado debido a sus posibles efectos toxicológicos, por lo que es importante la búsqueda de antioxidantes seguros y naturales, especialmente de origen vegetal (Bonilla et al.1998).

En este sentido es importante destacar que en años recientes se han dado a conocer investigaciones científicas en la prevención de enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, los cuales permiten atribuir a los compuestos fenólicos como parte importante de los beneficios para la salud (Tomás-Barberan.2003).

1.1. Vitivinicultura Argentina

Malbec, nuestra variedad insignia



Figura 1: Uva Malbec (Wines of Argentina)

1.1.1 Reseña histórica. El Malbec y sus orígenes

Históricamente la producción del cultivar Malbec (Figura 1) fue en Cahors, localidad ubicada en el sudoeste de Francia, cerca de los Pirineos. Se encuentra relativamente cerca de una de las principales regiones vitivinícolas de Francia: Burdeos, la cual se ubica 200 Km al este de Cahors (Figura 2).

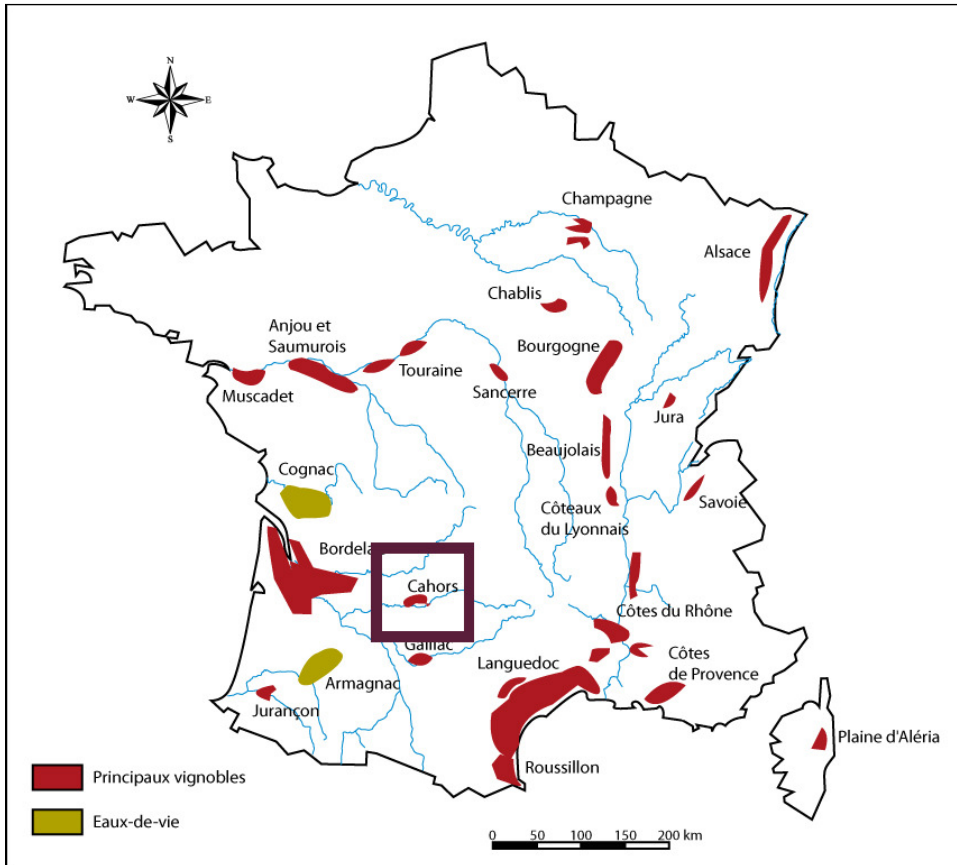


Figura2: Ubicación de la región de Cahors Francia (Wines of Argentina).

1.1.1.1 El Malbec en la Argentina: ingreso, propagación y retorno al mundo

La expansión del Malbec por el mundo, fuera de Francia, se inicia en el siglo XVIII, llegando al Cono Sur de América en los años 1840 y 1850. Las cepas de Malbec se comenzaron a cultivar en las Quintas Normales de Santiago de Chile y Mendoza (Wines of Argentina 2011).

El cultivar Malbec se adaptó muy bien a los suelos y climas de Argentina en general y de Mendoza en particular. Los viticultores lo acogieron con entusiasmo y poco a poco, se expandió como la principal cepa de la viticultura nacional. Al comenzar el siglo XX, la mayor parte de las viñas de Mendoza ya estaban formadas por la entonces llamada “uva

francesa” que era la forma de denominar principalmente al Malbec (Wines of Argentina.2011).

Este cultivar fue apreciado y valorado. En Argentina, el censo de viñedos de 1962 registra 58.600 hectáreas cultivadas con Malbec sobre un total nacional de 259.800 hectáreas. Posteriormente sobrevino una crisis que motivó una fuerte reducción de los viñedos nacionales y del Malbec en particular (Wines of Argentina. 2011).

La vitivinicultura argentina inició su recuperación a partir de 1990, apoyada en el Malbec como cepa estrella. La superficie cultivada con esta variedad trepó de 10.500 hectáreas en 1990 a 16.350 en 2000, 26.900 en 2008 y 28.500 en 2009. El crecimiento en este periodo de veinte años (1990-2009) fue del orden del 173%. El Malbec consolidó su posición como cepa emblemática de la viticultura argentina para sus vinos tintos, y lideró las exportaciones nacionales que, a partir del año 2000, iniciaron un avance progresivo y sin precedentes. Ciento cincuenta años demoró el viticultor argentino, desde que recibió las primeras cepas del Malbec, hasta que se sintió en condiciones de elaborar un vino digno de exportación. Fue un periodo largo de trabajo e interacción entre hombres, plantas, suelos y clima. Los viticultores cultivaron el Malbec con cuidado e interés y permitieron su consolidación como variedad emblemática de la República Argentina. Durante cerca de un siglo y medio, el Malbec estuvo confinado dentro de los límites nacionales: los viticultores argentinos elaboraron sus vinos exclusivamente para el mercado interno. Esta situación cambió en los últimos años del siglo XX, cuando se produjo el cambio de paradigma y se comenzó con el proceso de exportación (Wines of Argentina.2011).

Argentina comenzó a exportar vino en cantidades relevantes al comenzar el siglo XXI. Estuvo preparándose para ello durante un siglo y medio a lo largo del cual, se realizó una intensa labor de cultivar la viña y elaborar el vino, en busca de los métodos más adecuados a las características de sus suelos y climas. Fue un largo proceso de experimentación, de ensayo a través del método de prueba y error. Finalmente, se logró dar el salto y se inició el camino de las

exportaciones. El actual reencuentro del mundo del vino con el Malbec representa, en el fondo, un círculo que se ha vuelto a cerrar. Primero se hizo un camino de ida, desde Europa hacia el sur de América. Y luego se realizó el camino de vuelta, de Argentina hacia el mundo. En ese itinerario cultural de ida y vuelta, el punto clave fue, justamente, el ingreso del Malbec a Mendoza, con la fuerza cohesionadora de una ley que sirvió para coordinar las acciones del Estado, del sector privado, los técnicos y profesionales. Ese instrumento fundamental fue la ley que el gobierno formalizó el 17 de abril de 1853, fecha que naturalmente debe erigirse en el Día Mundial del Malbec (Wines of Argentina 2011).

1.2. Uva (*Vitis vinifera*)

1.2.1 Estructura y desarrollo de la uva

En la estructura de la uva se pueden distinguir dos partes claramente diferenciadas, las semillas y el pericarpio o conjunto de tejidos que las envuelve (Figura 3). Las semillas se desarrollan a partir de los óvulos tras su doble fecundación, mientras que el pericarpio es el resultado del crecimiento y diferenciación de la pared del ovario. En el pericarpio pueden distinguirse tres tipos de tejidos organizados concéntricamente alrededor de las semillas, el endocarpo más interno y con una textura más gelatinosa, el mesocarpo intermedio que ocupa el mayor volumen de la baya y el exocarpo más externo que contiene la epidermis recubierta por una cutícula cerosa y algunas capas celulares subepidérmicas. Comúnmente, el exocarpo se conoce como hollejo y el mesocarpo junto con el endocarpo forman la pulpa de la baya (Carbonell et al. 2013)

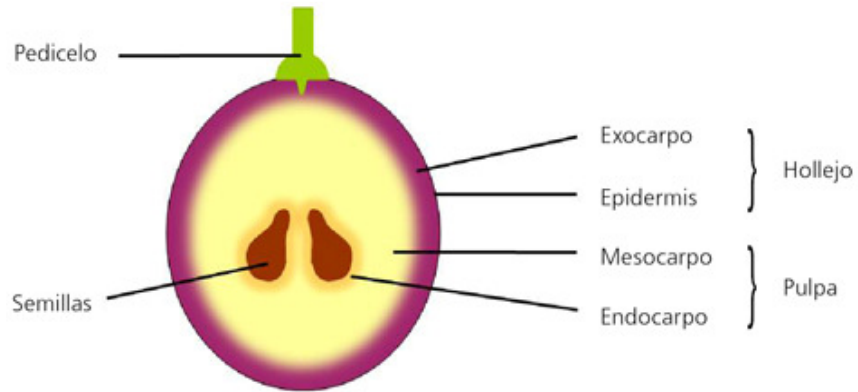


Figura 3. Estructura de una uva madura. Fuente: Modificada a partir de Conde et al. 2007.

El desarrollo de la uva presenta dos períodos de crecimiento sigmoide separados por una fase de latencia en la que no hay cambios de tamaño (Figura 4).

La primera fase de crecimiento del fruto se inicia tras la polinización de las flores y se denomina cuajado. Durante esta fase las células del ovario de la flor que darán lugar al fruto se dividen para generar la estructura de la baya y se inicia el desarrollo de las semillas. El tamaño del fruto aumenta durante esta fase como consecuencia de la división y expansión celular. Al final de esta fase, los frutos son verdes y duros y han alcanzado un tamaño determinado dependiendo de la variedad. El número de células que tendrá el fruto maduro queda prácticamente establecido en esta fase y la baya entra en una fase de latencia en la que su crecimiento se estanca (Prat 1971).

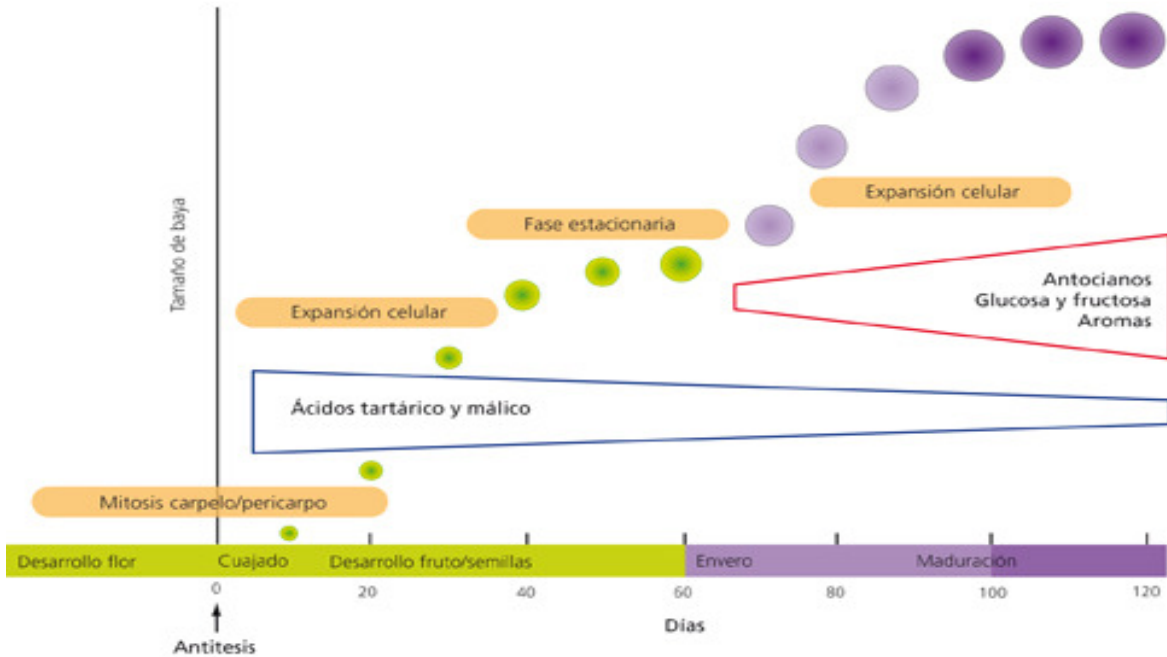


Figura 4. Desarrollo y maduración de la uva. El esquema indica los procesos de división y expansión celular implicados, así como la acumulación de las moléculas más relevantes (Carbonell et al. 2013).

La segunda fase de crecimiento corresponde al proceso de maduración y se inicia con el envero una vez culminado el desarrollo de las semillas. El envero se caracteriza por la acumulación de color (en las uvas tintas), el ablandamiento del fruto y un cambio radical en su composición. Posteriormente, los frutos continúan creciendo y pueden llegar a duplicar su tamaño. Sin embargo, este aumento se debe exclusivamente a la expansión celular asociada con la acumulación de agua y azúcares solubles (Conde et al. 2007). A partir del envero se producen los cambios más relevantes en la composición del fruto desde un punto de vista enológico (Dai et al. 2013).

El hollejo contribuye con un gran número de compuestos del metabolismo secundario que en su conjunto aportan al vino características varietales. Entre ellos los compuestos fenólicos solubles

que contribuyen al color y al sabor del vino y los compuestos aromáticos que contribuyen al sabor y al aroma (Lund et al. 2006).

La figura 5 muestra la distribución de los diferentes compuestos fenólicos en el grano de uva. En el hollejo se concentra una gran cantidad y variedad de polifenoles. Esto tiene consecuencias diferentes sobre la diversidad de riqueza polifenólica de vinos tintos y blancos, ya que durante la elaboración de los vinos tintos el mosto es sometido a un proceso de maceración con los hollejos que permite extraer una cantidad importante de su contenido polifenólico. Esta operación no tiene lugar en la elaboración del vino blanco. Como consecuencia, los vinos tintos tienen una mayor riqueza polifenólica que los blancos. Una botella de vino tinto puede contener unos 1,8 g/L de polifenoles, mientras que una de vino blanco contiene solo 0,2 – 0,3 g/L (Bertelli et al.2009).



Figura 5. Distribución de los principales compuestos fenólicos en la uva (Marín 2014).

1.3 Compuestos Fenólicos

Los polifenoles son los responsables del color de los vinos tintos, de la astringencia, del cuerpo y estructura del vino (Catania y Avagnina 2007). El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Catania y Avagnina 2007) (Figura 6).

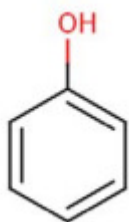


Figura 6. Representación de molécula fenólica (Catania y Avagnina 2007).

Cada cepaje o variedad de uvas tiene una composición fenólica determinada que está condicionada por factores agronómicos o ambientales (Carbonneau et al. 1978). La baya sintetiza polifenoles en respuesta a una situación de estrés como puede ser el ataque de un hongo, la falta de agua (estrés hídrico), radiaciones ultravioleta o variaciones de temperatura y la forma por la cual estas sustancias son transformadas durante la vinificación influye sobre las características del vino (Catania y Avagnina 2007).

Los compuestos polifenólicos se dividen en flavonoides y no flavonoides. Entre los primeros encontramos los ácidos fenólicos y los estilbenos. En los compuestos flavonoides encontramos los flavonoles, las antocianinas y los taninos (Catania y Avagnina 2007) (Figura 7).

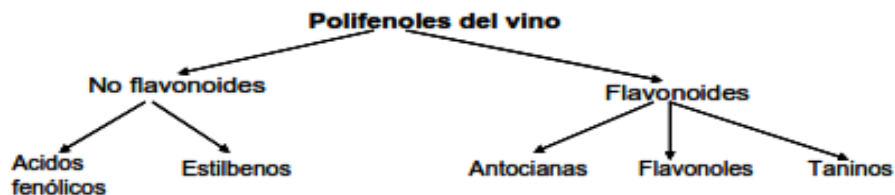


Figura 7. Los polifenoles del vino. (Catania y Avagnina 2007).

1.3.1 Compuestos fenólicos no flavonoides

En este grupo se encuentran las familias de los ácidos fenólicos y estilbenos.

Los ácidos fenólicos se dividen en cinámicos y benzoicos. Los primeros son ácidos hidroxicinámicos bajo la forma de esteres del ácido tartárico (Ribéreau-Gayón1965), se encuentran principalmente en la piel y en la pulpa, disminuyendo con la madurez (figura 8)

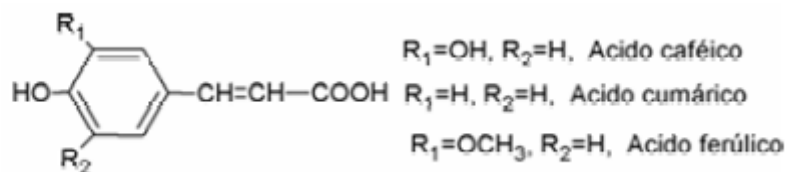


Figura 8. Principales ácidos cinámicos (Catania y Avagnina 2007).

En el vino se encuentran las formas liberadas de estos productos (por hidrólisis). El ácido caféico es uno de los más importantes, reacciona con la polifenoloxidasasa produciendo quinonas que a su vez pueden oxidar otros compuestos. El nivel de este ácido se utiliza para monitorear el grado de oxidación en los vinos. El ácido cumárico y ácido ferúlico son importantes a nivel organoléptico por ser sustratos primarios de la producción de etilfenoles (olores animales muy fuertes) por acción de levaduras del género *Brettanomyces* produciendo defectos en el vino (Catania y Avagnina 2007).

El ácido gálico es muy abundante en vinos tintos, se encuentra en la semilla bajo la forma de ésteres de procianidinas (galocatequinas y epigalocatequinas) y también en forma libre. El ácido gálico posee importante actividad antioxidante, antimutagénica y hepatoprotectora (Leighton et al.1999). Otros ácidos presentes son el ácido siríngico y el p-hidroxibenzoico (Catania y Avagnina 2007) (figura 9).

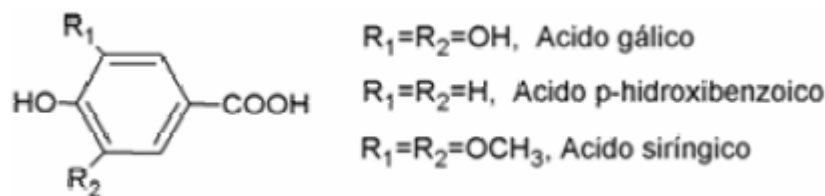


Figura 9. Principales ácidos benzoicos (Catania y Avagnina 2007)

Los estilbenos son sustancias que juegan un rol en la resistencia de las bayas a los ataques de hongos. Son dos núcleos fenólicos unidos por una cadena insaturada. Está presente en la película y se le atribuye notable poder antioxidante (Catania y Avagnina 2007).

1.3.2 Compuestos fenólicos flavonoides

En este grupo encontramos los flavonoles, las antocianinas y los taninos, son los principales responsables de la astringencia, del amargor, del color y de la estructura del vino (Gawel 1998). Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres (Paladino 2008).

Los flavonoles son un grupo de compuestos que se encuentran en el hollejo de uvas tintas, blancas y también en el escobajo, son de color amarillo y pueden encontrarse en forma libre y conjugada a azúcares. Se producen durante todo el proceso de crecimiento de la baya y protegen a la planta contra radiaciones ultravioletas (Gawel 1998).

Las antocianinas (del griego anhos=flor y kyanos= azul) son los pigmentos responsables del color de los vinos tintos. Están localizadas en la vacuola de las células del hollejo y en las tres o cuatro primeras capas celulares de la hipodermis. Están muy presentes en las pulpas de variedades tintoreras como *Vitis vinifera* cvs. Alicante-Bouschet, Aspirant-Bouschet (Gawell 1998).

Los taninos (flavan 3-oles) juegan un rol importante tanto en el plano organoléptico, nutricional, fisiológico y farmacológico. Su capacidad de

formar complejos con las proteínas es el origen de sus múltiples propiedades, principalmente la sensación de astringencia percibida en la cavidad bucal (Gawel 1998). En la baya, los taninos catequinos están localizados principalmente en las semillas y en el hollejo. Los taninos son sintetizados durante la primera etapa del crecimiento de la baya y su síntesis finaliza poco después del envero. Los principales monómeros de flavan-3-oles de la baya de uva son la (+) – catequina, la (-) epicatequina, la galocatequina y la epigalocatequina (Ojeda 2007) (figura 10).

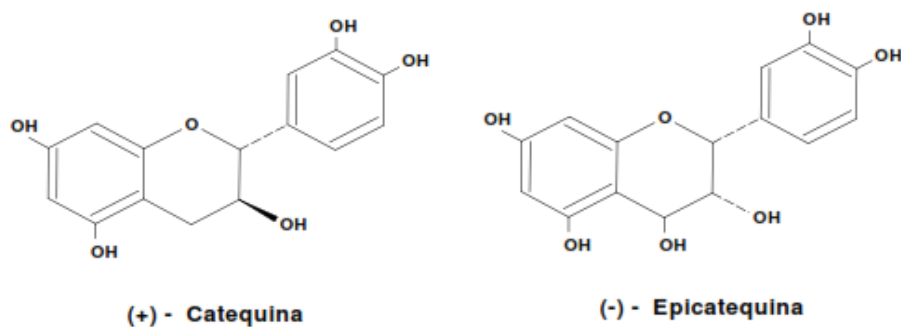


Figura 10. Principales taninos catequinos

De todos los compuestos con principios activos descubiertos en la vid, indudablemente los compuestos polifenólicos han despertado el mayor interés desde el punto de vista de la investigación farmacológica en relación con sus propiedades protectoras del sistema cardiovascular (Paladino 2008).

1.4 El orujo: Potencial fuente de compuestos bioactivos

Teniendo en cuenta la gran variedad de subespecies de vides, los compuestos activos pueden variar principalmente en su concentración más que en el tipo de compuesto. Los compuestos responsables del color de las uvas se encuentran básicamente en los hollejos de las mismas, siendo los pigmentos y taninos (sustancias fenólicas) los más importantes (Paladino 2008).

En el proceso de la producción del vino, la uva se muele, y en el caso particular del vino tinto, quedan en contacto con el mosto los hollejos y las semillas durante los días que dura la fermentación. Este proceso libera los principios antioxidantes presentes en el fruto, por lo tanto, las uvas se someten a una extracción ligera pero prolongada con una mezcla agua-etanol que proporciona al vino tinto un contenido variable de polifenoles. Sin embargo, el residuo restante después de la fermentación (el orujo), que se compone principalmente de pieles y semillas, todavía contiene altos niveles de polifenoles (Fontana et al. 2013).

1.4.1 Composición química de los orujos

Los orujos son los residuos sólidos, desechos del proceso de vinificación y que están compuestos por semillas y hollejos (Flanzy 2000). Tienen una riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos, que comprenden sobre todo los ácidos fenólicos, los antocianos que son pigmentos rojos, los flavonoles pigmentos amarillos y los flavan 3-oles y estilbenos que son incoloros (Flanzy 2000).

Los hollejos de uva corresponden entre un 7-12% del peso total de la baya y se compone principalmente de agua (78-80%), ácidos orgánicos (0,8-1,6%), taninos (0,4-3%), antocianos (0-0,5%), compuestos nitrogenados (1,5-2%), minerales (1,5-2%), ceras (1-2%) y sustancias aromáticas (Flanzy 2000).

Las semillas de la baya corresponden hasta un 6% del peso total y están compuestas principalmente de agua (25-45%), compuestos glucídicos (34-36%), taninos (4-10%), compuestos nitrogenados (4-6,5%), minerales (2-4%), lípidos (13-20%) (Flanzy 2000).

En el hollejo de las uvas tintas se encuentran diferentes sustancias antioxidantes, como las flavonas (que están también presentes en otros alimentos como el té, las cebollas, las manzanas, etc.). La pulpa de la uva también contiene sustancias que tienen efectos beneficiosos para la

salud, tales como fibra (17-21%), taninos (16-27%), compuestos polifenólicos (2-6.5%), lípidos (7-12%), azúcares (3%) y ácido tartárico. Los polifenoles principalmente ácido elágico, quercetina y el resveratrol tienen una importancia excepcional debido a sus propiedades antioxidantes. Una utilización de los residuos del procesado de la uva como materia prima para la producción de compuestos bioactivos puede constituir una alternativa interesante. Los principales componentes bioactivos extraíbles de los residuos del procesado de la uva son polifenoles y más concretamente resveratrol, antocianinas, procianidinas, quercetina, catequinas, y aceite de semillas de uva (Flanzy 2000).

1.4.2. Alimentos funcionales

La alimentación funcional surge como respuesta de la industria a la evolución histórica de la ciencia de la nutrición, en la que se pasa de evitar la mala alimentación y el déficit nutricional en la dieta a la promoción del bienestar y la salud. Bajo esta nueva premisa se considera que un alimento es funcional si queda demostrado científicamente que afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, dentro de un contexto de estilo de vida saludable, contribuyendo a la mejora de la calidad de vida y a la prevención de determinadas enfermedades (Diplock et al. 1999).

El alimento funcional debe reunir similares características de presentación (sabor, color, aroma) que su homólogo no funcional con igual forma de consumo y propiedades nutritivas, pero con el valor biológico añadido y con un efecto positivo sobre la salud. Diversos compuestos bioactivos que poseen efectos farmacológicos terapéuticos provienen de alimentos funcionales de origen animal o vegetal. Los alimentos funcionales se definen como los productos alimenticios de origen animal o vegetal, consumidos en la dieta diaria, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos, estos compuestos

ejercen efectos farmacológicos que modulan funciones terapéuticas en el cuerpo y que resultan benéficas para la salud (Nijveldt et al. 2001).

Dichos componentes bioactivos han sido distribuidos comercialmente como productos nutracéuticos. Los nutracéuticos se caracterizan por ser suplementos dietéticos bioactivos benéficos para la salud que se ingieren en forma concentrada en píldoras, pastillas, capsulas o tónicos (Jones 2002).

En la industria farmacéutica los alimentos funcionales de origen vegetal representan una fuente potencial de componentes bioactivos para el desarrollo de fármacos inocuos y eficaces, siendo los polifenoles un conjunto heterogéneo de moléculas con capacidad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos y flavonoides. Los antioxidantes son sustancias que, en pequeñas cantidades, logran bloquear el efecto nocivo de los radicales libres implicados en los procesos de envejecimiento celular y la posible aparición de determinados tipos de dolencias, como las enfermedades cardiovasculares. Además, ayudan a la conservación de los alimentos, lo cual les otorga verdadera relevancia industrial. Los antioxidantes de mayor relevancia son las vitaminas, tanto hidrosolubles (Vitamina C), como liposolubles (Vitaminas A y E), y los compuestos fenólicos o polifenoles, entre los que se encuentra el resveratrol. La principal fuente de resveratrol la constituyen la piel y las semillas de la uva (Fernández et al. 2012).

Químicamente, los antioxidantes funcionan de varias formas:

- Eliminando eficazmente la especie reactiva.
- Proporcionando un átomo de hidrógeno, o un radical hidruro a un sustrato diana.

La explicación de por qué se encuentran tan altos niveles de antioxidantes en el vino, polifenoles y especialmente flavonoides, se debe a su proceso de elaboración. Originalmente están presentes en las uvas, especialmente en el hollejo y en las semillas, y un porcentaje menor en la pulpa. Sin embargo, son muy difíciles de extraer. De allí que

si se consume la baya como tal, los antioxidantes pasan al tubo digestivo y no son absorbidos en su totalidad (Leighton et al. 1999).

1.4.3 Radicales libres

La mayoría del oxígeno usado en respiración (95%) es utilizado a nivel mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (1-3%), origina especies reactivas de oxígeno (radicales superóxidos, hidroxilo, peróxido, etc.). Los radicales libres se forman como consecuencia natural del metabolismo oxidativo en los humanos, por acción de enzimas tipo oxidasas e hidrolasas, así como por efecto de radiaciones, contaminación ambiental, etc. Son entidades químicas que tienen un electrón desapareado o no compartido. A causa de estos electrones los radicales libres son algo inestables, o sea, son de vida corta; también son altamente reactivos por el hecho de que, para conseguir su estabilidad química, tratan de perder o ganar un electrón. Así estas sustancias son muy propensas a interactuar con muchas moléculas, como los lípidos de membranas y el ADN, dañándolas a menudo irreparablemente. Los radicales libres se forman en diversos procesos químicos, físicos y enzimáticos, ningún tejido o célula está inmune al ataque de estos compuestos. Las especies reactivas de oxígeno pueden atacar componentes celulares vitales, dañar membranas celulares, inactivar enzimas, alterar el material genético a nivel del núcleo celular u oxidar lipoproteínas. El daño al ADN está relacionado con procesos de carcinogénesis mientras que la peroxidación de lípidos está relacionada con enfermedades cardiovasculares. Los radicales de oxígeno también pueden atacar las proteínas, modificando su estructura o función. Ello se relaciona con diversas enfermedades (cardiovasculares, procesos cancerígenos, inflamatorios) e incluso envejecimiento (Middleton et al. 2000).

La paradoja francesa constituyó un interesante punto de partida, al mostrar cómo en Francia existe un riesgo bajo en la población de padecer enfermedades cardiovasculares a pesar del elevado consumo de grasas saturadas de origen animal. Renaud et al. 1992, determinaron

que la dieta de los franceses difiere de la de otros países desarrollados por el consumo de vino tinto.

Hoy en día, son muchos los estudios que abogan por un consumo moderado de vino para prevenir el riesgo de padecer enfermedades coronarias, lo que se justifica por los componentes bioactivos presentes en el mismo (Renaud et al.1992).

Debido a la cantidad de investigaciones realizadas en este campo se ha determinado que los polifenoles tienen efectos muy positivos en la salud humana, tales como inhibición de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) disminuyendo el riesgo de enfermedades cardíacas (Bonilla et al. 1998).

Los polifenoles presentes en subproductos de vinificación como el orujo despiertan gran interés por la posibilidad de extraerlos y utilizarlos en aplicaciones biotecnológicas. Establecer la composición de los extractos en cuanto a los compuestos fenólicos es una herramienta útil para justificar las alegaciones de los mismos sobre efectos benéficos en la salud. De ahí la importancia de encontrar técnicas adecuadas de extracción de compuestos fenólicos a partir de orujo de uvas tintas.

1.5 Los procesos de extracción y los distintos solventes

La extracción de muestras sólidas con solventes químicos, generalmente conocida como extracción sólido-líquido es un proceso diseñado para recuperar compuestos solubles mediante difusión, desde una matriz sólida (solute) hacia una matriz líquida (solvente). Es un método muy utilizado en la recuperación de polifenoles a partir de orujo y otros residuos sólidos agro-industriales (Amendola et al. 2010; Fontana et al. 2013).

Antolovich et al 2000, determinaron que en las extracciones utilizando disolventes acuosos-orgánicos o la mezcla de alguno de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, acetato de etilo) se obtiene un extracto

con diferentes compuestos polifenólicos. De acuerdo a Fontana et al. 2013, la eficiencia del fenómeno de transporte de masa ocurrido durante la extracción sólido líquido puede optimizarse mediante cambios en gradientes de concentración, coeficientes de difusión, factores que son afectados por el tipo de solvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción, como también la presencia de sustancias que son propias de la matriz.

Debido a la naturaleza polar de los polifenoles, estos son fácilmente solubilizados en medios próticos polares como ser las soluciones hidroalcohólicas (Fontana et al. 2013). Diferentes investigaciones realizadas sobre el contenido de polifenoles en alimentos determinaron que la manera más común de extraer estos compuestos es la utilización de soluciones generalmente ácidas y aplicando elevadas temperaturas para poder liberar la mayor parte de los compuestos no extraíbles. Se cree que estos compuestos permanecen en el residuo asociados a componentes de la fibra dietética (polisacáridos) o bien formando complejos con proteínas o unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular. La utilización de soluciones ácidas por un lado permite la liberación de los polifenoles unidos a la matriz vegetal y por otro lado permite la despolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructura más sencilla que puedan ser cuantificados en base a patrones conocidos, aunque es posible también que se produzca la degradación de ciertas estructuras polifenólicas (Saura-Calixto 1998).

La mezcla etanol-agua es el solvente comúnmente empleado para la extracción de fitoquímicos por su ausencia de toxicidad (aceptado por la FDA como solvente grado alimenticio) como así también por su requerimiento mínimo de seguridad en su manipulación (Pitchaon 2011).

1.6 Método analítico

La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo, en encontrar el mejor método de extracción

sino también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos.

Para ello existen numerosos métodos espectrofotométricos basados en diferentes principios químicos por los que se pueden cuantificar desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos. Para determinar estos compuestos polifenólicos se encuentran el método de Folin-Ciocalteu y el método por lectura directa de la absorbancia de la muestra a 280 nm (Ribereau-Gayon et al. 2006).

Diversos autores han estimado que debido a que los anillos bencénicos presentan un máximo de absorbancia a 280 nm, la absorbancia a dicha longitud de onda puede considerarse como un índice válido del conjunto de los polifenoles totales (Elejalde Caravaca 1999).

1.6.1 Espectrofotetría



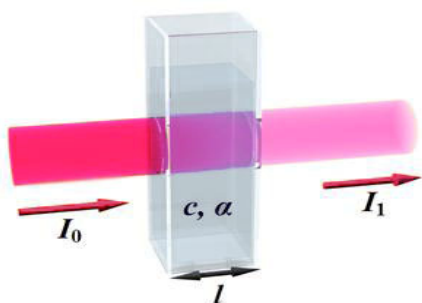
Figura 11. Espectrofotómetro Cary-50. Varian

La espectrofotetría de absorción molecular ultravioleta visible, comúnmente llamada espectrofotetría UV-VIS, tiene una larga y continua historia en el campo de la química analítica. Esta técnica está basada en la medición de absorción de radiación ultravioleta (UV) o visible (VIS) por determinadas moléculas. La radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones

electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular de un compuesto.

1.6.2 Principio Físico de la espectrofotometría

La espectrofotometría aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica es medida la cantidad de luz absorbida como una función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. La espectrofotometría ultravioleta-visible utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 180 a 380 nm y en el de la luz visible de 380 a 780 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro.



<p>Ley de Lambert -Beer</p> $A = -\log_{10} (I/I_0) \quad \text{o} \quad A = -\log_{10} (T)$
--

Figura 12. Diagrama de la absorción de un haz que atraviesa un recipiente de tamaño l .

Cuando un haz de radiación UV-VIS atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta (I). Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos se usará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia (T) ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la

concentración de la especie absorbente según la Ley de Lambert - Beer (Díaz et al.2008).

1.6.3Componentes Básicos del Espectrofotómetro

Un espectrofotómetro típico posee cuatro componentes básicos: una fuente de radiación que tiene intensidad constante en el rango de longitud de onda que cubre (usualmente es lámpara de tungsteno para luz visible, y deuterio para ultravioleta), un compartimiento para la muestra, un monocromador que separa la banda de longitud de onda deseada del resto del espectro y la dispersa al compartimiento de la muestra, y un fotodetector, que mide cuantitativamente la radiación que pasa por la muestra. Miden en porcentaje (%) de transmitancia (T) y absorbancia (A). El porcentaje de transmitancia se refiere a la cantidad de radiación que pasa a través de la muestra y alcanza el detector o sensor. Una solución límpida, no absorbente, mostrara una lectura de 100% de transmitancia en un espectrofotómetro calibrado. Las unidades de absorbancia van de 0 a 2.

Hipótesis y Objetivos



2.0 Hipótesis

Los compuestos fenólicos remanentes en el orujo de uvas cv. Malbec pueden extraerse de forma rápida aplicando una combinación de temperaturas y solventes de extracción.

2.1 Objetivos

Evaluar la efectividad de diferentes condiciones de extracción de polifenoles en orujo de uvas (*Vitis vinífera L.*) cultivar Malbec.

2.1.1. Objetivos Particulares

- Ensayar distintas condiciones, temperatura, tiempo y solventes, para la extracción de compuestos fenólicos de orujos provenientes de uva cv. Malbec.
- Evaluar la efectividad de los métodos de extracción mediante el análisis del contenido de polifenoles totales aplicando espectrofotometría.

3

Marco Experimental



3.0 Marco Experimental

Para la ejecución de los ensayos se utilizó orujo de uvas *Vitis vinifera* cv. Malbec procedente de la vinificación cosecha 2010 del viñedo Adriana localizado en Gualtallary, Bodega Catena Institute of Wine Mendoza.

Luego del procedimiento de vinificación el mosto se prensó y se tomaron las muestras de orujo fresco (Figura 15) colocándose en cajas enfriadas con hielo durante el transporte al laboratorio, los orujos recepcionados fueron separados en fracciones y almacenados en envases cerrados protegidos de la luz a una temperatura de -20°C, con la finalidad de evitar hasta el momento de la extracción la degradación de los compuestos polifenólicos.

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de la Cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo).

A continuación se describen los materiales y equipamiento usados para la realización de los ensayos, como también las técnicas usadas para lograr la extracción de los compuestos fenólicos.

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Equipamiento

- Equipo espectrofotómetro UV-vis marca spectrophotometer Cary-50 (Varian Inc., Mulgrave, Australia)
- Balanza Analítica 0.0001g de sensibilidad
- pHmetroOakon
- Freeze Mabe
- Baño María termostatzado
- Procesadora de laboratorio Omnimixer
- Vortex
- Agitador magnético

- Centrifuga de mesa
- Materiales para laboratorio de vidrio
- Tubos cónicos de 15 mL con tapas tipo Falcon
- Pipetas automáticas 200 - 1000 μ L
- Cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico

3.1.2 Drogas y Reactivos

- Agua bidestilada
- Solución de ácido clorhídrico 1% (p/v)
- Alcohol etílico 96% (v/v)

3.1.3 Obtención de los extractos

En la extracción de compuestos polifenólicos se utilizaron las siguientes variables: temperaturas, tiempos de extracción y mezcla de solventes a diferente pH.

Los ensayos se realizaron por triplicado y el número de tratamientos estuvo dado por la combinación de las variables estudiadas (solvente de extracción, tiempo y temperatura).

Las soluciones extractantes seleccionadas para realizar los ensayos fueron agua acidificada y etanol. El ácido utilizado para la acidificación del agua fue ácido clorhídrico y el etanol utilizado fue azeotrópico (96%).

En cada ensayo realizado (para cada tratamiento que combinó solvente, tiempo y temperatura) se tomaron 2 gramos de orujo. Estos se molieron en homogenizador Omnimixer durante 1 minuto a 6,5 rpm, utilizándose una relación 1:10 (p/v) con las soluciones a ensayar: etanol-agua 1+1 pH 4,5 (método 1), etanol-agua 1+1 a pH 2 (método 2 y 4), y en agua acidificada a pH 2 (método 3).

En este estudio se utilizaron cuatro métodos de extracción que se especifican en la figura N° 13

	Solvente	pH	Temperatura
Método 1	Etanol Agua 1+1	4,5	60°C
Método 2	Etanol Agua 1+1	2	60°C
Método 3	Agua Acidulada	2	60°C
Método 4	Etanol Agua 1+1	2	70°C

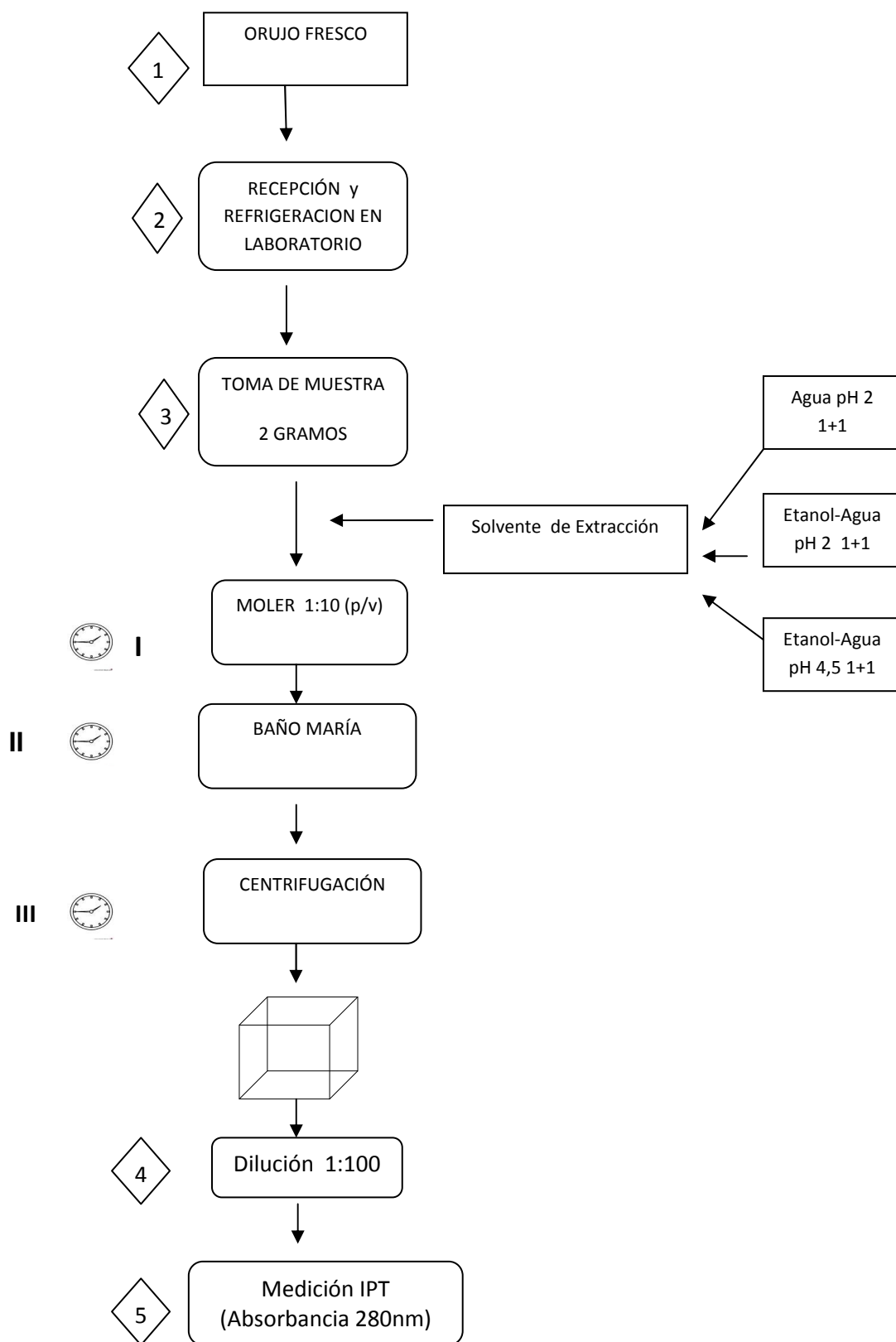
Figura N°13. Especificación de los métodos de extracción

Las mezclas obtenidas se colocaron en tubos con tapas y se llevaron a Baño María con agitación cada 15 minutos. Para los métodos 1, 2 y 3 la temperatura utilizada fue de 60°C, y para el método 4 fue de 70°C. En el caso de los tiempos de extracción estos fueron de 30 minutos hasta 7 horas (con intervalos de 30 minutos). El tiempo máximo fue de 7 horas, excepto en aquellos casos en que no se observó incremento en la extracción en 3 intervalos de tiempo sucesivos.

Cumplidos los tiempos programados para cada tratamiento cada muestra fue trasvasada a tubos cónicos de 15 mL (tipo falcon) y centrifugada a 12300 rpm durante 10 minutos. De cada sobrenadante se extrajeron 2 muestras de 500 µL y se colocaron en matraces de 50 mL para realizar una dilución con agua bidestilada 1:100. En las diluciones obtenidas se midió la absorbancia a 280 nm por espectrofotometría, utilizando cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico, obteniéndose el Índice de Polifenoles Totales (IPT) (proceso detallado en el figura 14). Se realizó un blanco en cada ensayo con agua bidestilada.

El IPT fue expresado como mg/L de ácido gálico mediante una curva de calibración (Gráfico 5) realizada con solución estándar de ácido gálico en un rango entre 0 y 31 mg.L⁻¹ y expresado como miligramos de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante el programa InfoStat Profesional 2012.

Figura 14. **Proceso para la Obtención del extracto. Diagrama de flujo. Algoritmo Gráfico.**



CONTROLES



Extracción orujo fresco en Bodega. Trazabilidad.



Almacenamiento de los orujos en freezera -20°C



Pesada del orujo 2 gramos en balanza analítica



Tomar sobrenadante con pipeta automática



Control calibración espectrofotómetro

EVENTO RELOJ



Moler orujo con solventes de extracción,
Tiempo 1 minuto



II Temperatura Baño María. 60 y 70°C, homogenizar
cada 15 minutos



III Centrifugación a 12300 rpm
Tiempo 10 minutos

4. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se efectuó la comparación de diferentes condiciones de extracción de polifenoles en orujo de uvas cv Malbec. A los orujos frescos (figura 15) se les realizó el procedimiento indicado en el flujograma (figura 14) para cada determinación, obteniéndose los extractos de orujo (figura 16), que fueron analizados mediante espectrofotometría a 280 nm para evaluar la extracción de los compuestos fenólicos mediante el IPT. Este es un procedimiento rápido basado en la absorbancia del anillo aromático (Spigno 2007).

Para la expresión de los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra, se confeccionó una curva de calibración (gráfico N°5 anexo). El coeficiente de determinación resultó $R^2 = 0,994$ este valor es la proporción de la variación de los polifenoles totales que es explicada por el modelo de regresión simple lineal.



Figura 15. Orujo fresco



Figura 16. Extracto obtenido

A continuación se presenta los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos por separado.

Ensayo N° 1. Extracción de Polifenoles Totales

Extractante	pH	Temperatura
Etanol-Agua 1+1	4,5	60°C

Tabla 1: Valores de IPT obtenidos ensayo N°1

Tiempo (min)	Muestra 1		Duplicado		Triplicado	
	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE
0	23,34	659,4	30,15	851,3	26,84	758,0
30	38,49	1086,4	39,72	1121,1	33,82	954,8
60	36,70	1036,0	39,28	1108,7	35,89	1013,1
90	38,09	1075,1	38,38	1083,3	39,12	1104,2
120	41,20	1162,8	40,14	1132,9	35,65	1006,4
150	39,75	1121,9	42,36	1195,5	44,27	1249,3
180	37,80	1067,0	44,45	1254,4	46,99	1326,0
210	33,63	949,4	45,84	1293,6	39,05	1102,2
240	45,77	1291,6	42,65	1203,7	46,51	1312,4

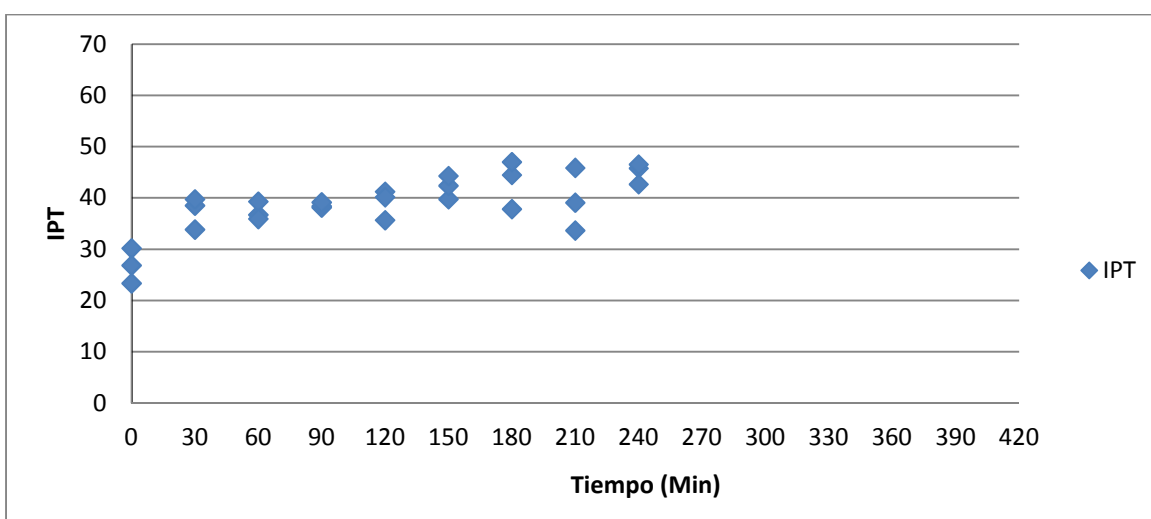


Gráfico 1: Medida de la Absorbancia para Etanol-Agua 1+1 pH 4,5 y 60°C

Ensayo N° 2. Extracción de Polifenoles Totales

Extractante	pH	Temperatura
Etanol-Agua 1+1	2	60 °C

Tabla 2: Valores de IPT obtenido ensayo N°2

Tiempo (min)	Muestra N° 1		Duplicado		Triplicado	
	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE
30	38,07	758,0	29,62	836,4	31,14	879,2
60	35,24	994,8	35,68	1007,2	45,64	1287,9
90	31,79	897,6	44,67	1260,6	42,25	1192,4
120	42,34	1194,9	43,63	1231,3	42,49	1199,1
138	45,40	1281,2	43,50	1227,6	39,76	1122,2
180	41,37	1167,6	42,78	1207,3	41,87	1181,7
240	41,80	1179,7	41,67	1176,0	41,65	1175,5
300	43,52	1228,2	43,13	1217,2	44,01	1242,0
360	48,34	1364,0	48,58	1370,8	49,38	1393,3

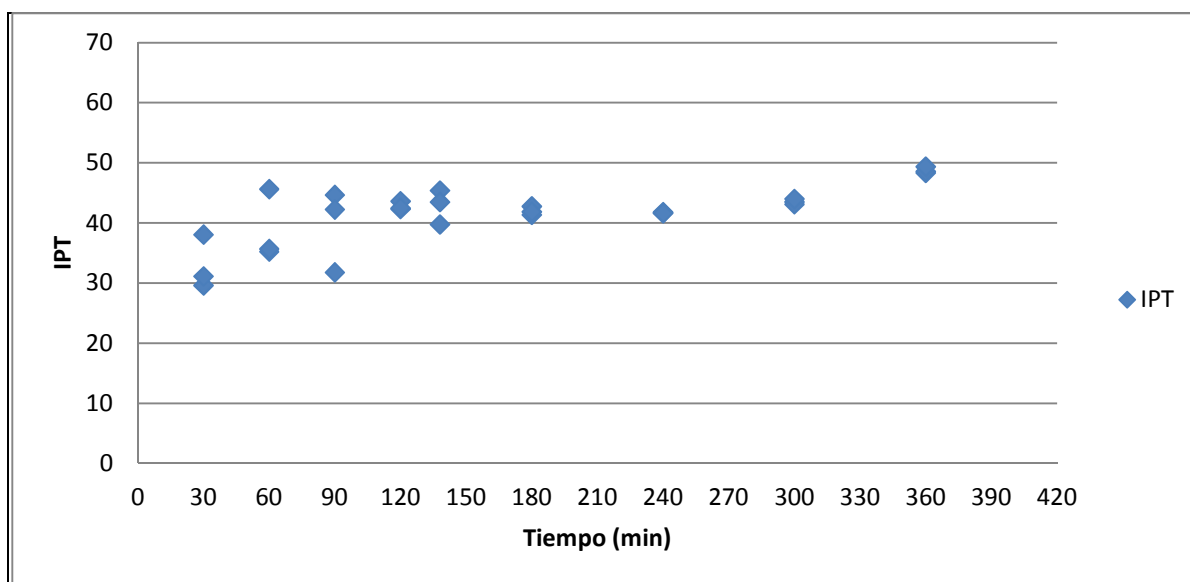


Gráfico 2: Medida de la absorbancia para Etanol-Agua 1+1 pH 2 y 60 °C

Ensayo N° 3. Extracción de Polifenoles Totales

Extractante	pH	Temperatura
Agua acidulada	2	60 °C

Tabla 3. Extracción IPT ensayo N° 3

Tiempo (min)	Muestra N° 1		Duplicado		Triplicado	
	<i>IPT</i>	<i>mg/LGAE</i>	<i>IPT</i>	<i>mg/LGAE 2</i>	<i>IPT</i>	<i>mg/LGAE 3</i>
30	17,58	497,1	13,04	497,1	12,82	362,9
60	16,81	475,4	13,27	375,6	11,59	328,2
90	14,74	417,0	14,20	401,8	14,35	406,0
120	17,27	488,3	19,04	538,2	17,47	494,0
150	19,89	562,2	15,79	446,6	17,09	483,2
180	20,18	570,3	18,38	519,6	21,85	617,4
240	22,81	644,5	19,73	557,7	23,11	652,9
300	27,77	784,3	17,33	490,0	19,06	538,8

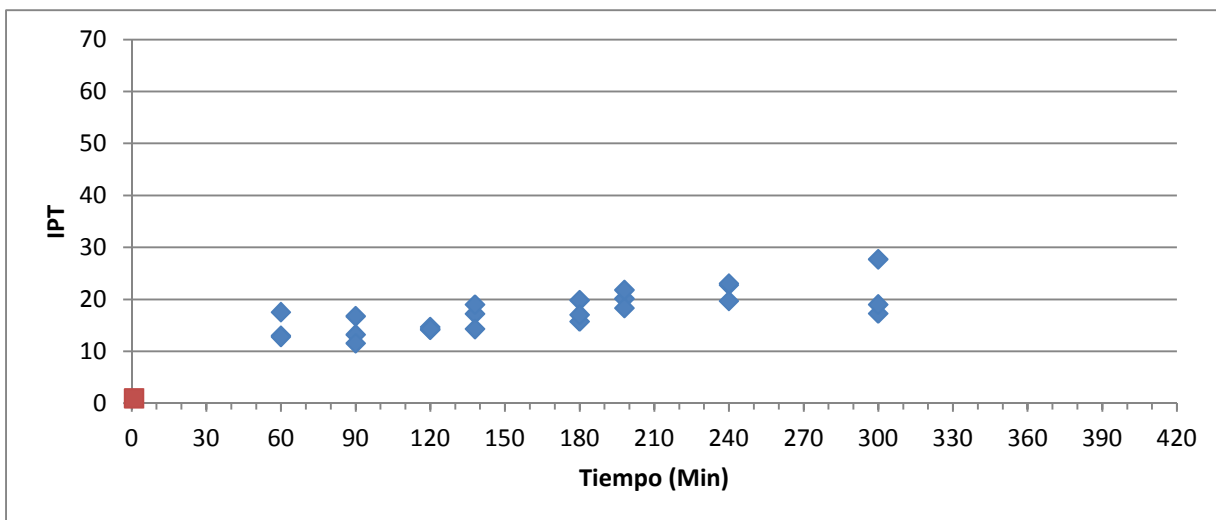


Gráfico 3: Medida de la absorbancia para Agua Acidulada pH2 y 60°C

Ensayo 4. Extracción de Polifenoles Totales

Extractante	pH	Temperatura
Etanol-Agua 1+1	2	70°C

Tabla 4. Valores de IPT obtenido ensayo N° 4

Tiempo (min)	Muestra1		Duplicado		Triplicado	
	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE	IPT	mg/LGAE
30	62,57	1765,1	56,45	1592,6	56,39	1590,9
60	57,71	1628,1	43,98	1241,1	44,11	1244,8
90	45,65	1288,2	46,29	1306,2	46,39	1306,2
120	54,27	1531,2	55,04	1552,9	50,75	1309,1
150	53,03	1496,2	54,33	1532,9	53,67	1432,0
180	53,70	1515,1	51,31	1447,7	55,31	1514,3
210	45,08	1272,1	46,34	1307,7	46,63	1560,5
240	52,54	1482,4	52,02	1467,7	50,91	1315,8
300	52,46	1480,1	48,73	1375,0	46,85	1436,5
360	49,69	1402,1	49,81	1402,1	48,00	1322,0
420	55,90	1577,1	54,41	1535,1	54,20	1354,4

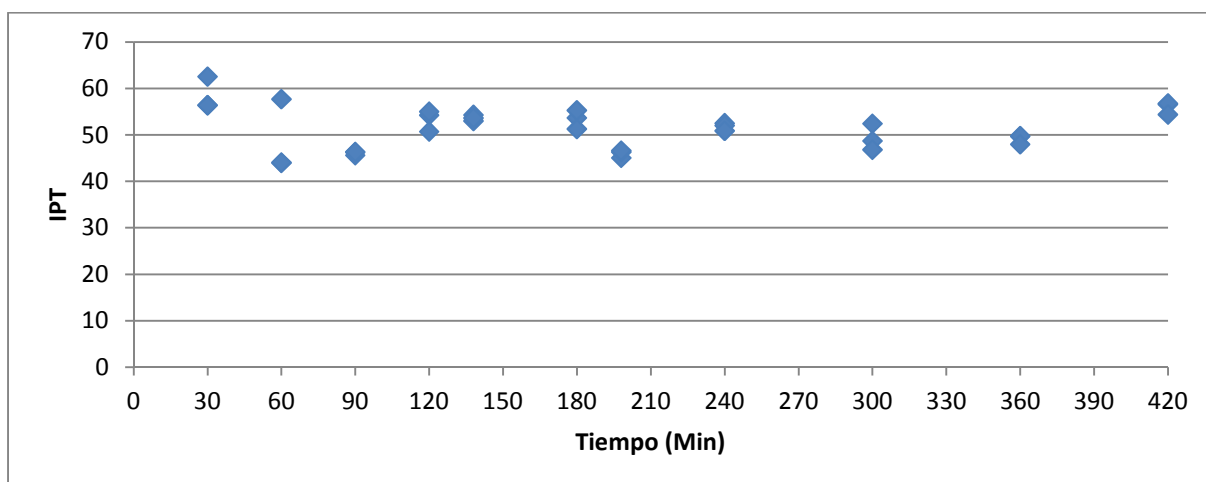


Gráfico 4: Medida de la Absorbancia para Etanol-Agua1+1 pH 2 y 70°C

Los polifenoles totales se estimaron como Índice de Polifenoles Totales (IPT=DO280), donde DO es la Densidad Óptica a 280 nm, determinándose mediante espectrofotometría UV-VIS. Esta longitud de onda es elegida debido a que los compuestos fenólicos presentes en el orujo como también en mostos y vinos absorben fuertemente la luz ultravioleta (Ribéreau-Gayon 1965).

Los métodos más utilizados para la determinación de polifenoles son lectura directa de la absorbancia a 280 nm y la técnica de Folin-Ciocalteu, pero de acuerdo a los estudios realizados por Amendola et al. 2010 se sugiere que la lectura directa de la absorbancia a 280 nm para la determinación de IPT es preferible a la técnica de Folin- Ciocalteu.

Considerando los fenoles extraídos a diferentes temperaturas (60° y 70°C) se comprobó que la temperatura tiene un efecto considerable sobre la capacidad de extracción de compuestos fenólicos. El calentamiento tiene la capacidad de ablandar los tejidos vegetales, debilitar la integridad de la pared celular y por lo tanto favorecer la liberación de compuestos polifenólicos. El pH de la solución de extracción es un parámetro que de acuerdo a Spigno et al. 2007⁽²⁾ mejoró la recuperación de fenoles. Los estudios realizados por Vatai et al. 2009 resultaron en que la adición de ácido clorhídrico al disolvente aumentó la extracción de fenoles en tres veces más.

A continuación se describen los métodos (figura 13) y los valores obtenidos en cada uno de ellos:

Para el método 1, el valor máximo obtenido resultó a los 240 minutos con un valor promedio de 44,98 IPT, correspondiendo a un valor de 1269,23 mg/L en equivalentes de ácido gálico.

Para el método 2, el valor máximo de extracción resultó a los 360 minutos con valor promedio de 48,77 IPT, correspondiendo a un valor de 1376,03 mg/L en equivalentes de ácido gálico.

Para el método 3, el valor máximo de extracción resultó a los 300 minutos obteniéndose un valor promedio de 18,20 IPT correspondiendo a un valor de 604,37mg/L en equivalentes de ácido gálico.

Para el método 4, el valor máximo de extracción resultó a los 30 minutos obteniéndose un valor promedio de IPT de 58,47 correspondiendo a un valor de 1649,53 mg/L en equivalentes de ácido gálico.

De acuerdo al análisis de la varianza (ADEVA) consignada en el anexo, se observó que hubo diferencias significativas (p -valor $<0,0001$) entre las medias de los tratamientos. De acuerdo a la prueba Tukey de comparación de medias, existen diferencias significativas entre las medias de los cuatro tipos de ensayo con $\alpha=0,05$. Por lo tanto esto indica que los distintos tiempos, temperaturas y solventes de extracción influyen en el IPT obtenido. Para realizar el análisis estadístico se tuvieron en cuenta los tiempos de extracción desde 0 a 240 minutos.

Con respecto al método 1 y 2, donde se utilizó como disolvente etanol y agua a diferente pH, el análisis estadístico arrojó que no hubieron diferencias significativas entre estos ensayos ($\alpha=0,05$), no afectando en este caso el pH del medio. En el caso del método 3 (agua acidulada) el IPT fue significativamente inferior al resto de los tratamientos. Se determinó para el método 4 un valor de IPT significativamente superior que en el resto de los métodos. Por lo que se deduce que a temperatura de 70°C con solución etanol-agua a pH 2 se obtiene mayor capacidad de extracción de polifenoles. Dentro de este método, a los 30 minutos de extracción el promedio de IPT fue superior al resto de los ensayo pero no se diferenció significativamente de las muestras extraídas durante más tiempo en las mismas condiciones.

Se concluye que los polifenoles contenidos en orujos de uvas cv. Malbec pudieron extraerse en corto tiempo utilizando altas temperaturas y una solución de extracción hidroalcohólica compuesta por sustancias de grado alimenticio como son agua y etanol. Esto resulta conveniente para la agroindustria dado que se reducen considerablemente los costos

de energía y proceso en la recuperación de compuestos de interés biotecnológico como son los polifenoles.

ANEXO

Preparación de la solución etanol-agua pH2 (para cada tratamiento y dependiendo del tamaño del lote), se utilizó 240 mL de agua destilada y 280 mL de alcohol etílico 96 % acidificándose el medio con ácido clorhídrico 1% 0,43mL, verificado mediante peachimetro.

Curva de calibración del método.

El IPT fue calculado mediante una curva de calibración realizada con solución estándar de ácido gálico en un rango entre 0 y 31,5 mg.L¹ ($R^2=0,994$) y expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de muestra.

Tabla N° 5 Medidas de absorbancia 280 nm para obtener curva de calibración de ácido gálico.

Absorbancia 280 nm	mg ácido gálico /L
0,1195	4,845
0,1234	5,4
0,3105	9,5
0,3019	10,5
0,6634	21
0,8257	23,75
0,9811	28,5
1,0206	31,5

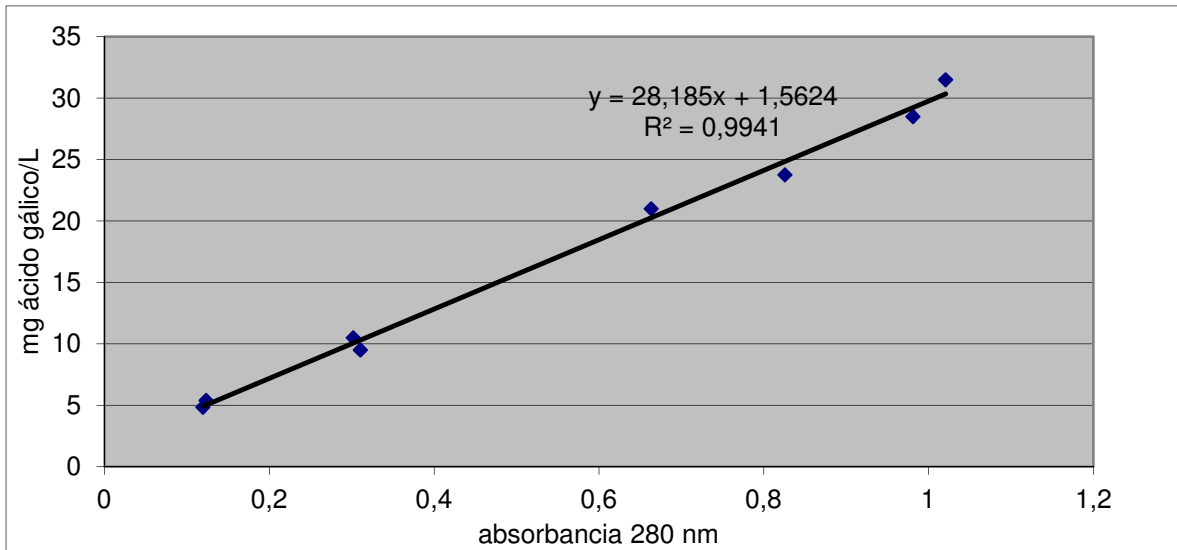


Gráfico 5. Curva de calibración, determinación fenoles totales. La concentración se expresa en mg GAE/L.

Los datos de la Tabla N° 5 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincula las dos variables. Como resultado del mencionado análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste:

Y = Concentración de polifenoles totales en mg de ácido gálico por litro de solución (mg GAE L⁻¹)

$$Y = 28,18 x + 1,562 \text{ (DO 280 nm)}$$

$R^2 = 0,994$ es la proporción de la variación de los Polifenoles Totales que es explicada por el modelo de regresión simple. Por cada unidad que aumenta la absorbancia el IPT aumenta 28,18 mg de ácido gálico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Nueva tabla: 09/12/2014 - 11:14:50 a.m.

Medidas resumen para cada tratamiento combinado

ENSAYO	TIEMPO	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	CV
1	0	IPT	3	26,78	3,41	11,60	12,72
1	30	IPT	3	37,34	3,11	9,69	8,34
1	60	IPT	3	37,29	1,77	3,13	4,75
1	90	IPT	3	38,53	0,53	0,28	1,38
1	120	IPT	3	39,00	2,95	8,68	7,56
1	150	IPT	3	42,13	2,27	5,15	5,39
1	180	IPT	3	43,08	4,75	22,52	11,02
1	240	IPT	3	44,98	2,05	4,20	4,55
2	0	IPT	3	26,78	3,41	11,60	12,72
2	30	IPT	3	32,94	4,50	20,29	13,67
2	60	IPT	3	38,85	5,88	34,59	15,14
2	90	IPT	3	39,57	6,85	46,86	17,30
2	120	IPT	3	42,82	0,71	0,50	1,65
2	150	IPT	3	42,89	2,87	8,23	6,69
2	180	IPT	3	42,01	0,71	0,51	1,70
2	240	IPT	3	41,71	0,08	0,01	0,20
3	0	IPT	3	26,78	3,41	11,60	12,72
3	30	IPT	3	14,48	2,69	7,22	18,56
3	60	IPT	3	13,89	2,66	7,10	19,18
3	90	IPT	3	14,43	0,28	0,08	1,93
3	120	IPT	3	17,93	0,97	0,94	5,41
3	150	IPT	3	17,59	2,10	4,39	11,91
3	180	IPT	3	20,14	1,74	3,01	8,62
3	240	IPT	3	21,88	1,87	3,50	8,55
4	0	IPT	3	24,54	1,99	3,97	8,12
4	30	IPT	3	58,47	3,55	12,61	6,07
4	60	IPT	3	48,60	7,89	62,25	16,23
4	90	IPT	3	46,11	0,40	0,16	0,87
4	120	IPT	3	53,35	2,29	5,23	4,29
4	150	IPT	3	53,68	0,65	0,42	1,21
4	180	IPT	3	53,44	2,01	4,05	3,77
4	240	IPT	3	51,82	0,83	0,69	1,61

Nueva tabla: 09/12/2014 - 11:15:30 a.m.

Medidas resumen para factor A (método de extracción)

ENSAYO	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	CV
1	IPT	24	38,64	5,82	33,90	15,07
2	IPT	24	38,45	6,38	40,67	16,59
3	IPT	24	18,39	4,61	21,25	25,07
4	IPT	24	48,75	10,37	107,49	21,27

Nueva tabla: 09/12/2014 - 11:16:11 a.m.

Medidas resumen

TIEMPO	Variable	n	Media	D.E.	Var (n-1)	CV
0	IPT	12	26,22	2,84	8,07	10,84
30	IPT	12	35,81	16,62	276,06	46,40
60	IPT	12	34,66	14,03	196,80	40,48
90	IPT	12	34,66	12,91	166,64	37,24
120	IPT	12	38,27	13,55	183,50	35,39
150	IPT	12	39,07	13,92	193,85	35,64
180	IPT	12	39,67	12,88	165,90	32,47
240	IPT	12	40,10	11,69	136,70	29,16

Nueva tabla: 09/12/2014 - 11:17:14 a.m.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
IPT	96	0,96	0,94	8,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15702,24	31	506,52	51,45	<0,0001
ENSAYO	11656,40	3	3885,47	394,64	<0,0001
TIEMPO	1729,54	7	247,08	25,10	<0,0001
ENSAYO*TIEMPO	2316,30	21	110,30	11,20	<0,0001
Error	630,12	64	9,85		
Total	16332,36	95			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,39161

Error: 9,8457 gl: 64

ENSAYO	Medias	n	E.E.	
3	18,39	24	0,64	A
2	38,45	24	0,64	B
1	38,64	24	0,64	B
4	48,75	24	0,64	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,01812

Error: 9,8457 gl: 64

TIEMPO	Medias	n	E.E.			
0	26,22	12	0,91	A		
60	34,66	12	0,91		B	
90	34,66	12	0,91		B	
30	35,81	12	0,91		B	C
120	38,27	12	0,91		B	C D

150	39,07	12	0,91	C	D
180	39,67	12	0,91	C	D
240	40,10	12	0,91		D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,15944

ENSAYO	Tiempo	Medias	n	E.E.				
3	60	13,89	3	1,81	A			
3	90	14,43	3	1,81	A B			
3	30	14,48	3	1,81	A B			
3	150	17,59	3	1,81	A B	C		
3	120	17,93	3	1,81	A B	C		
3	180	20,14	3	1,81	A B	C		
3	240	21,88	3	1,81	A B	C		
4	0	24,54	3	1,81	B	C D		
3	0	26,78	3	1,81		C D		
2	0	26,78	3	1,81		C D		
1	0	26,78	3	1,81		C D		
2	30	32,94	3	1,81		D E		
1	60	37,29	3	1,81		E F		
1	30	37,34	3	1,81		E F		
1	90	38,53	3	1,81		E F G		
2	60	38,85	3	1,81		E F G		
1	120	39,00	3	1,81		E F G		
2	90	39,57	3	1,81		E F G		
2	240	41,71	3	1,81		E F G	H	
1	180	42,01	3	1,81		E F G	H	
1	150	42,13	3	1,81		E F G	H	
2	120	42,82	3	1,81		E F G	H	
2	150	42,89	3	1,81		E F G	H	
1	180	43,08	3	1,81		E F G	H	
1	240	44,98	3	1,81		F G	H I	
4	90	46,11	3	1,81		F G	H I	
4	60	48,60	3	1,81		G	H I	J
4	240	51,82	3	1,81			H I	J
4	120	53,35	3	1,81			I	J
4	180	53,44	3	1,81			I	J
4	150	53,68	3	1,81			I	J
4	30	58,47	3	1,81				J

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

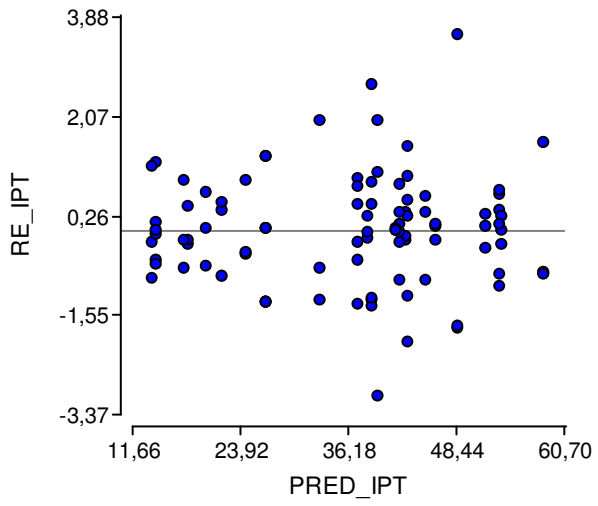


Gráfico de Residuos Estudentizados en el eje de ordenadas y predichos de IPT en abscisas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Amendola D.; De Faveri DM.; Spigno G.(2010) Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts *Journal of Food Engineering*, Volume 97, 384-392 .

Antolovich M.; Prenzler P.; Robards K.; Ryan D. (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125 (5), 989-1009.

Bertelli A.; Das DK. (2009) Grape, wines, resveratrol and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54(6): 468-76.doi:10.1097/ FJC.

Bonilla F.; Mayen M.; Merida J.; Medina M. (1998) Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* 66 209-215.

Carbonneau A.; Casteran P.;Leclair Ph. (1978) Essai de détermination, en biologie de la plante entière, de relations essentielles entre le bioclimat naturel, la physiologie de la vigne et la composition du raisin. *Méthodologie et premiers résultats sur les systèmes de conduite. Ann. Amélior. Plantes* 28:195-221.

Carbonell Bejerano P.; Martínez Zapater JM. (2013) Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. (Disponible en www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estructura_composicion_vino_cienc1013.htm. Con acceso: Julio 2014).

Catania C.; Avagnina S. (2007) Implicancias organolépticas de los polifenoles del vino.EEA.INTA. (Disponible en: www.inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos/.pdf. Con acceso: Julio 2014).

Conde C.; Silva P.; Fontes N.; Dias A.C.P.; Tavares R.M.; Sousa M.J. (2007) Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. *Food* 1: 1-22.

Díaz N.; Bárcena Ruiz A. (2008) Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica biomoléculas.(Disponible en: www.uco.es. Con acceso: Octubre 2014)

Diplock AT.; Fern EB.; Roberfroid MB.(1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition* 81 (Suppl. 1), S1-S27.

Elejalde Caravaca E. (1999) Aplicación de métodos espectroscópicos al estudio de las características cromáticas de los componentes polifenólicos presentes en vinos. (Disponible: www.hedatuz.euskomedia.org/6568/1/05039066.pdf. Con acceso: Julio 2014).

Fernández V.; Berradre M.; Sulbarán B.; Ortega J. (2012) Evaluación de la actividad antioxidante y su relación con el contenido de polifenoles en vinos tintos, rosados y blancos Rev. Fac. Agron. (LUZ), 29: 611-623. (Disponible en: www.revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre_diciembre2012/v29n4a2012611623.pdf Con acceso: Octubre 2014).

Flanzy C. (2000) Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. A. Madrid Vicente, Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa. 783 p.

Fontana A R.; Antonioli A.; Bottini R. (2013) Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem., 61,8987-9003.(Review).

Gawel R. (1998) Red wine astringency (Review). Journal of grape and wine research Volume 4, Issue 2, 74-95

Indiveri M E.; Pérez S.; Angileri N.; Maroto C. (2013) Utilización de Orujo agotado para la producción de biogás. Centro de Estudio de Ingeniería en Residuos Sólidos (CEIRS). (Disponible en: www.imd.uncu.edu.ar/upload/utilizacion-de-orujo-agotado-para-la-produccion-de-biogas.pdf. Con acceso: Agosto 2014).

INV.(2014) (Disponible en: www.inv.gov.ar/pdf/estadisticas/vinos/cosecha/2013.pdf Con acceso: Mayo 2014).

Jones P.(2002) Clinical nutrition Functional foods more than just nutrition. (Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC113804/. Con acceso: Agosto 2014).

Leighton F.; Castro C.; Barriga C.; Urquiaga I. (1997) Vino y Salud. Estudios epidemiológicos y posibles mecanismos de los efectos protectores. Revista Médica de Chile.125:483-491 (Disponible en: www.fac.org.ar/revista/00v29n2/leighton.htm. Con acceso: Octubre 2014)

Lund ST.; Bohlmann J. (2006) The molecular basis for wine grape quality a volatile subject. Science 311: 804-805.

Manach C.; Donovan JL. (2004) Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. (Disponible en: www.europepmc.org/abstract/MED/15493450. Con acceso: Octubre 2014)

Marín R. (2014) El consumo moderado de vino y la salud. Departamento de tecnología de alimentos. (Disponible en: www.hablemosclaro.org/carrusel/vino-salud.aspx. Con acceso: Noviembre 2014)

Middleton Jr E.; Kandaswami C.; Theoharides T C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.

Nijveldt RJ.; van Nood E.; van Hoorn DE.; Boelens PG.; van Norren K.; van Leeuwen PA.(2001) Flavonoids a review of probable mechanisms of action potential applications. *Nutr.*74. (Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/. Con acceso: Octubre 2014)

OIV. (2007) Situación del sector vitivinícola. Estadísticas vitivinícolas anuales., Francia: OIV (Disponible en: www.oiv.int/oiv/cms/404. Con acceso: Julio 2014)

Ojeda H. (2007) Los compuestos fenólicos de la uva. *Revista Enológica* N°4. (Disponible en: www.revistaenologica.com.pdf. Con acceso: Noviembre 2014)

Paladino SC. (2008) Tesis de Posgrado. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de vid. (Disponible en: www.bdigital.uncu.edu.ar/2627. Con acceso: Abril 2014)

Pratt C. (1971) Reproductive Anatomy in Cultivated Grapes A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 22: 92-109.

Pinelo M.; Arnous A.; Meyer A S. (2006) Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579-590

Pitchaon M. (2011) Antioxidant capacity of extracts and fractions from mango (*Mangifera indica* Linn.) seed kernels. *International Food Research Journal* 18: 523-528.

Ribéreau-Gayon P. (1965) Identification d' esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. Vinifera*. *CR AcadSci. France.* 260-341.

Ribéreau-Gayon P. ; Dubourdieu D. ; Donéche B. ; Lonvaud. (2) (2006) Handbook of Enology the Chemistry of wine Stabilization and Treatments. Vol.2 John Wiley &

Sons, Ltd. (Disponible en: www.vinumvine.files.wordpress.com/2011/08/p-ribereau-gayon-y-glories-a-maujean-d-dubourdieu-handbook-of-enology-volume-2-the-chemistry-of-wine-stabilization-and-treatments.pdf. Con acceso: Julio 2014).

Renaud S.; de Lorgeril. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease.339 (8808):1523-6 (Pub Med). (Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351198. Con acceso: Agosto 2014).

Saura-Calixto F. (1998) Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. J. Agric. Food Chem. 46-4303-4306. (Disponible en: www.books.google.com.ar/Saura-Calixto-1998. Con acceso: Julio 2014).

Spigno G.; DeFaveri DM. (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.

Spigno G.; Tramelli L.; DeFaveri D.(2) (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 81 200–208.

Tomás-Barberán FA. (2003) Los polifenoles de los alimentos y la salud. Instituto Danone. Alim.Nutri. Salud Vol10, N°2, pp 41- 53. (Disponible en: www.maqui5000.com/uploads/F_Polifenoles_Beneficios.pdf. Con acceso: Octubre 2014)

Vatai T.; Škerget M.; Knez Z. (2009) Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. Journal of Food Engineering 90 246–254.

Wines of Argentina. (2014) (Disponible en: www.winesofargentina.org/ Con acceso: Agosto 2014)

Zamora F. (2007) Influencia de la crianza en barrica y de la microoxigenación sobre estabilización de la materia colorante del vino y sobre su astringencia. (Disponible en: www.revistaenologia.com/pdf/n20_ENO_ponenciaDr.FernandoZamora.pdf. Con acceso: Junio 2014).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Alonso AM.; Guillen DA.; Barroso CG.; Puertas B.; García A. (2002) Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. J. Agric. Food Chem. 50, 5832-5836.

Arabshahi S.; Urooj A. (2007) Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morusindica L.*) leaves. *Food Chem.* 102: 1233-1240.

Ashoush I.; Gadallah MGE. (2011) Utilization of Mango Peels and Seed Kernels Powders as Sources of Phytochemicals in Biscuit. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 6 (1): 35-42.

Bucic-Kojic A.; Jokic S.; Velic D.; Bilic M.; Planinic M.; Srecko T. (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81 236-242.

Cheng, V. J.; Bekhit, A. E. D. A.; McConnell, M.; Mros, S.; Zhao, J. (2012) Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chem*, 134, 474-482.

Dai, Z.W., Leon, C., Feil, R., Lunn, J.E., Delrot, S.; Gomes, E. (2013) Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitisvinifera L.*), a non-climacteric fleshy fruit. *J Exp Bot* 64: 1345-1355.

Díaz MN.; Frei B.; VitaJA.;KeaneyJF.(1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *NEngl J Med* 337:408-416.

Makris, D. P.; Boskou, G.; Chiou, A.; Andrikopoulos, N. K.(2008) Investigation on factors affecting recovery of antioxidant phenolics and anthocyanins from red grape (*Vitisvinifera L.*) pomace employing water/ethanol-based solutions. *Am. J. Food Technol.*, 3, 164-173.

Makris, D. P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N. K.(2007) Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and agri-food solid waste extracts. *J. Food Compos. Anal.*2007, 20, 132.

Pinelo M.; Arnous A.; Meyer A. (2006) Upgrading of grape skins significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579-590.

Silva M L.; Macedo A. C.; Malcata F. X. (2000) Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Sci. Technol. Int*, 6, 285-300.

Steinberg D. (1997) Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *The Journal of Biological Chemistry* ,272,. 20963-20966.

Tomás-Barberán FA.; Espín JC.(2) (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric*; 81: 853-76.

Zamora Ros.(2009) Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine. Free Radical Biology & Medicine.2009. FRB-09665; 5; 4C

Zhao Y. (2013) Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability yogurt and salad dressing. Food Chem 138, 356-365.