PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

EXTRACCION SUBCRITICA DE ORUJO DE UVA CABERNET SAUVIGNON PRE Y POST FERMENTACION VÍNICA. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

PEDRO MANUEL BULNES DEL VALLE

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
RICARDO PEREZ C.

Santiago de Chile, Agosto, 2012

© 2012, Pedro Bulnes.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

EXTRACCION SUBCRITICA DE ORUJO DE UVA CABERNET SAUVIGNON PRE Y POST FERMENTACION VÍNICA. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

PEDRO MANUEL BULNES DEL VALLE

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

RICARDO PEREZ C.

EDUARDO AGOSIN T.

MARIA E. ZUÑIGA H.

JUAN CARLOS MUÑOZ A.

Para completar las exigencias del grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Santiago de Chile, Agosto, 2012

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, a mis Padres, hermanos y amigos que me motivaron y apoyaron mucho. A mis amigos de laboratorio José Vergara, Sandro Bernasconi, Franco de Lucca, José Cuevas, Pedro Saa, Francisco Palma, María Carolina Zuñiga, Nicolás Ovalle y a la viña Carmen por proveer la materia prima para la investigación.

Agradezco al profesor Eduardo Agosín y especialmente al Profesor Ricardo Pérez por sus consejos, guiamientos y paciencia, sin los cuales este trabajo no habría podido realizarse.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS III

RESUMEN X

ABSTRACT XI

I.-INTRODUCCIÓN 1

1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL Y MOTIVACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN 1

1.2 POLIFENOLES: DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN GENERAL 3

1.2 POLIFENOLES PRESENTES EN LA UVA. 8

Principales polifenoles no flavonoides en la uva 9

(a) Ácidos fenólicos 9

(b) Ácidos hidroxicinámicos 10

(c) Estilbenoides 11

(d) Lignanos 12

Principales polifenoles flavonoides 13

(a) Flavonas 13

(b) Flavonoles 14

(c) Flavanoles 16

(d) Antocianidinas 17

(e) Taninos 18

(f) Taninos condensados o proantocianidinas 18

1.4 MEDICIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS 22

1.5 CARACTERIZACIÓN DE FENOLES Y OTROS COMPUESTOS EN LOS EXTRACTOS 32

1.6 MÉTODO DE MEDICIÓN E IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POLIMÉRICOS: PROANTOCIANIDINAS EN LOS EXTRACTOS, TÉCNICA MALDI-TOF. 34

1.7 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NATURALES 38

1.8 HIPÓTESIS DEL TRABAJO 42

1.9 OBJETIVOS DEL TRABAJO 43

II.-METODOLOGÍA 44

2.1 EXTRACCIONES 44

2.2 METODOLOGÍAS ESTADÍSTICAS 45
2.3 METODOLOGÍA ANALÍTICA 46
2.3.1 PODER ANTIOXIDANTE O DE REDUCCIÓN DE HIERRO: FRAP 46
2.3.2 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO: DPPH. 47
2.3.3 DETERMINACIÓN DE LOS FENOLES TOTALES POR COLORIMETRÍA FOLIN-CIOCALTEAU. 47
2.3.4.ENSAYO MODIFICADO DE H-ADAMS PARA FENOLES (MODIFIED HARBERTSON-ADAMS ASSAY PREPARED BY MARK DOWNEY, KIRSTEN SKOGERSON & MARICA MAZZA , 2006) 49
2.3.5 MALDI-TOF: IDENTIFICACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS 54
III.-RESULTADOS Y DISCUSION 56
3.1 ANÁLISIS DE MASA DE PROANTOCIANIDINAS 57
3.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS 60
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS. 68
3.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS 70
IV.-CONCLUSIONES 74
REFERENCIAS 76
APÉNDICE A: EQUIPAMENTO 86
APÉNDICE B: METODOLOGÍA 88
APÉNDICE C: RESULTADOS 89
C.1: RESULTADOS MALDI-TOF (DE CADA CONDICIÓN) 89
C.2.1 CORRELACIONES AGRUPADAS POR GRUPOS DE DOS TEMPERATURAS 164
C. 2.1.1 Frap 164
C.2.1.2 DPPH 171
C.2.1.3 Frap y DPPH 176
C.2.2 CORRELACIONES POR TEMPERATURAS INDIVIDUALES 176
C.2.2.1 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 50°C 176

C.2.2.2 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 100°C 177
C.2.2.3 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 150°C 179
C.2.2.4 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 200°C 180
C.2.2.5 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO NO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 50°C 181
C.2.2.6 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO NO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 100°C 183
C.2.2.7 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO NO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 150°C 184
C.2.2.8 ANÁLISIS DE CORRELACIONES PARA EXTRACTOS DE ORUJO NO FERMENTADO. CONDICIONES DE 5 Y 30 MIN A 200°C 186
C.2.3 CORRELACIONES POR GRUPO: SIN DIFERENCIAR FERMENTACIÓN. TODAS LAS TEMPERATURAS Y TIEMPOS 187
C.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS EFECTOS DE TEMPERATURA, FERMENTACIÓN Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN. 188
C.2.5 RESUMEN DE RESULTADOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS. 189
APÉNDICE D: PROCESO DE EXTRACCIÓN Y COLOR DE EXTRACTOS 192
APÉNDICE E: LITERATURA DE EXTRACTOS DE UVA 193
APÉNDICE F: RESULTADOS CON ANALISIS ESTADÍSCO COMPARATIVO. 194

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.1: Principales clases de compuestos polifenólicos. Extraído de Bravo (1998)... 5
Tabla 1.2: Clasificación de flavonoides de alimentos. Extraído de Bravo, 1998 7
Tabla 1.3: Composición fenólica de la variedad Cabernet Sauvignon (Di Stefano, 2008; Yang & Chien, 2000) 8
Tabla 1.4 Ensayos de Capacidad Antioxidante 25
Tabla 3.1.1 Proantocianidinas en cada condición de extracción, MALDI-TOF. 58
Tabla 3.1.2 Resumen MALDI-TOF: grado de polimerización y número de distintas proantocianidinas identificadas, bajo distintas condiciones de extracción 59
Tabla 3.2.1 Resultados general de ensayos químicos 61
Tabla 3.3.1 Resumen de Correlaciones entre los ensayos, con su respectiva significancia estadística. 68
Tabla C.1 Tipos de proantocianidinas encontradas en los extractos 89
Tabla C.2 Interacciones entre efectos 188
Tabla C.2.5.1 Síntesis de resultados químicos: FRAP y DPPH. 189
Tabla C.2.5.2 Síntesis de resultados químicos: Folin y Fenoles H-A. 190
Tabla C.2.5.3 Síntesis de resultados: Antocianinas, LPP/SPP y Taninos H-A. 191

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.1 Ácidos hidroxibenzoicos en la uva. Extraído de di Stefano (2008) 9
Figura 1.2 Ácidos hidroxicinámicos. Extraído desde (Chen & Ho, 1997) 10
Figura 1.3 Estructura de hidroxiestilbenos de uva. Extraído desde (Di Stefano, 2008) 11
Figura 1.4 Lignanos enterodiol y enterolactona. 12
Extraído desde (Meagher, Beecher, Flanagan & Li, 1999) 12
Figura 1.5 Sistema de numeración de flavonoides y estructura básica. Extraído de (Bravo, 1998) 13
Figura 1.6 Estructura molecular de una flavona. 14
Figura 1.7: Estructura de Flavonoles 15
Figura 1.8: Aglicona de los Flavonoles. Extraído desde Stefano, Flamini, 2008 15
Figura 1.9 Estructura de los flavan-3-oles en uva. Extraído desde Di Stefano, 2008 16
Figura 1.10 Antocianidinas de uva tinta, extraído desde (Di Stefano, 2008) 17
Figura 1.11 Dímeros comunes tipo A- y B- encontrados en proantocianidinas, extraído desde (Serrano, Puupponen-Pimiä, Dauer, Aura & Saura-Calixto, 2009) 20
Figura 1.12 Arriba: Disparo láser, ionizante. Abajo: Diagrama simplificado TOF. (http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html) 37
Figura 3.1 Actividad antioxidante: FRAP 62
Figura 3.2 Actividad antioxidante: DPPH 63
Figura 3.3 Medición de Fenoles 64
Figura 3.4 Medición de Antocianinas 65
Figura 3.5 Medición de proporción LPP/SPP 66
Figura 3.6 Medición de Taninos 67
Figura 3.7.- Comparación MALDI-TOF por fermentación. 71
Figura 3.8.- Comparación MALDI-TOF por temperatura 72
Figura A.1 Extracción Subcrítica modelo ASE 150, Dionex (Dionex Corp., Sunnyvale, CA) 86
Figura A.2 Juguera marca Oster de 10 velocidades. 87

Figura B.1 Izquierda: orujo post fermentación. Derecha: el mismo orujo, prensado para desecho. 88
Figura D1.Proceso y Colores de extracción, 30 minutos. De izquierda a derecha respectivamente: 50°C, 100°C, 150°C, 200°C 192

RESUMEN

El orujo de uva es un residuo industrial de los países productores de vino, como Chile. Hoy en día hay muchos fenoles que quedan en los residuos de la vinificación. La literatura propone extraer este "desecho" con diferentes métodos (ultrasonido, etc.). Este estudio utiliza un sistema de extracción acelerada con alta presión, condiciones controladas de temperatura (HPTE) y agua como extractante. Las condiciones de extracción analizadas fueron 16: orujo fermentado y sin fermentar, 4 temperaturas de extracción: 50°-100°-150°-200°C y 2 tiempos de extracción: 5 y 30 minutos. La capacidad antioxidante de los extractos se analizó mediante ensayos de DPPH y FRAP, los resultados mostraron los resultados más altos, respecto de capacidad antioxidante, a 200°C desde orujo fermentado. Con la excepción de antocianinas, la fermentación aumentó la recuperación de compuestos como fenoles y taninos. Los extractos se caracterizaron mediante el ensayo modificado de Harbertson-Adams y el ensayo de Folin. Las clases de proantocianidinas existentes, se analizaron con la técnica MALDI-TOF, registrando hasta 6 grados de polimerización, para la condición de orujo fermentado extraído a 100° por 5 minutos. En general los resultados mostraron que la fermentación es un factor conveniente para la extracción subcrítica de fenoles desde el orujo de uva Cabernet Sauvignon.

Palabras Claves: Capacidad antioxidante, proantocianidinas, MALDI-TOF, extracción subcrítica (HPTE), Cabernet Sauvignon.

ABSTRACT

Grape marc is an industrial waste among wine producers countries, like Chile. Nowadays it is not being fully exploited, there are many phenols with antioxidant capacity remaining in the waste marc of vinification. Literature proposes to extract this "waste" with different methods (ultrasound, etc.). This study use an accelerated extraction system with high pressure and controlled temperature conditions (HPTE) and water as extractant. The analyzed extraction conditions were 16: fermented and not fermented marc, 4 different temperatures of extraction: 50°-100°-150°-200°C and 2 times of extraction: 5 and 30 minutes. Antioxidant capacity of the extracts was analyzed with DPPH and FRAP assays, results showed the higher antioxidant capacity results at 200°C, in the extraction of fermented marc. With the exception of anthocyanins, fermentation increased the recovery of compounds like phenols and tannins. The extracts were also characterized with the modified Harbertson-Adams and Folin assays, were fermentation appeared to be beneficial for the recovery of all kind of phenols. Proanthocyanidins existing classes were analyzed with MALDI –TOF technique which showed polymerization degree up to 6, for the fermented-100°-5 minutes condition. In general results showed fermentation as a convenient factor for the subcritical extraction of phenols from Cabernet Sauvignon marc.

Key Words: Antioxidant capacity, proanthocyanidins, MALDI-TOF, Subcritical extraction (HPTE), Cabernet Sauvignon.

I.-INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción general y motivación de esta investigación

En la primera sección de esta tesis se describen las tendencias de los procesos productivos, entre ellas la recuperación y agotamiento de desechos naturales. Posteriormente se mencionan los productos naturales y se muestra cómo el uso de ellos se ha convertido en una tendencia mundial en las industrias farmacéutica, cosmética, alimentos, etc. Así mismo se describen los polifenoles en forma general y particular. Se detallan las características de los polifenoles, en especial de los flavonoides, los principales grupos de taninos, los taninos condensados o proantocianidinas y sus componentes fundamentales como los flavan-3-oles y otros.

El aumento de la conciencia por cuidar nuestro medio ambiente, la tendencia a vivir sanamente, la importancia del reciclaje y los procesos ecológicos, son corrientes que están guiando la investigación científica y el desarrollo tecnológico. Por lo cual han surgido diversas iniciativas para procesar alimentos y otros productos de origen vegetal de forma menos dañina ambientalmente. Un ejemplo claro de esto es producir **generando menos químicos contaminantes** y liberar menos gases de efecto invernadero. Del mismo modo han surgido innovaciones en las formas de procesar la materia prima. Así, en el área de extracción de compuestos naturales se han desarrollado procesos más limpios como la extracción supercrítica, subcrítica, a vacío, con ultrasonido, extracciones asistidas con micro-ondas, etc. La mayoría de ellas permiten mejorar la recuperación de compuestos de alto valor minimizando el impacto ambiental.

Además, se han intensificado las aplicaciones industriales de productos naturales, como por ejemplo en el mercado de los alimentos (Servan-Schreiber, 2008). Esto ha fortalecido la industria de los productos naturales en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo (Ariyawardana, Govindasamy & Simon James, 2009). El mercado mundial de

los productos naturales, incluyendo todas sus aplicaciones industriales, está valorado en 65 mil millones de dólares estadounidenses por año y se espera que crezca a una tasa anual de 15-20% (Welford, 2008). Además, la industria de productos naturales ha contribuido considerablemente a la economía mundial a través de las exportaciones. Más aún, las estadísticas muestran que el mercado de los productos naturales tiene un alto potencial de creación de empleos (Ariyawardana *et al*., 2009) contribuyendo a la reducción de la pobreza, fundamentalmente en las zonas rurales de África, Asia y América, donde hay muchos desechos agroindustriales con valor agregado potencial, que no están siendo aprovechados.

Por ello, en Chile y en otras partes del mundo se han hecho esfuerzos por encontrar nuevos usos a desechos agroindustriales, tales como cáscaras, pieles de frutas y hojas. Particularmente, la uva es un cultivo muy extendido en Chile y el mundo (Casazza, Aliakbarian, Mantegna, Cravotto & Perego, 2010; USDA, 2011) siendo la uva de vino una de las más importantes en términos de volumen de producción y desechos generados. Se pronostica que el cultivo de uvas, a pesar de estar muy extendido, seguirá creciendo. La producción global de uva el 2010 fue de 68,3 millones de toneladas (FAO, 2012), representando la uva de vino un 65% del total (Carmona, Chaïb, Martínez-Zapater & Thomas, 2008). Específicamente en Chile, el 2010 se produjeron 2,75 millones de toneladas (FAO, 2012) de uva, de las cuales cerca de 800.000 toneladas corresponden a uva de mesa (ASOEX, 2011). En consecuencia, cerca del 70% corresponde a uvas destinadas a la producción de otros productos como pisco y vino.

El proceso de vinificación genera una gran cantidad de desechos sólidos, los cuales tienen un alto valor potencial ya que el **escobajo, la piel y las semillas** son ricos en polifenoles, los cuales son potentes antioxidantes naturales, además de tener otras propiedades importantes como biocidas y anticancerígenos (apéndice A). El orujo de uva, que incluye principalmente piel y semillas, incluso después de la fermentación vínica y el prensado, contiene altos niveles de compuestos polifenólicos. Esto se debe a que la fermentación vínica se lleva a cabo en condiciones de presión, pH y temperatura

moderadas, con el fin de preservar el delicado sabor y aroma característico del vino. Por ello, en el proceso de producción de vino no se extraen todos los compuestos de alto valor presentes en la uva.

En particular, estudios previos han mostrado que los orujos de desecho contiene muchos flavanoles (Makris, Boskou & Andrikopoulos, 2007; Monrad, Howard, King, Srinivas & Mauromoustakos, 2009), que provocan efectos indeseados en el ambiente (Spigno, Tramelli & De Faveri, 2007) ya que aumentan la demanda de oxígeno, afectando las propiedades pro-germinación de algunos fertilizantes (Negro, Tommasi & Miceli, 2003). Sin embargo, los extractos de orujo de uva también han mostrado tener propiedades bioactivas deseables (Iriti & Faoro, 2010). Por ejemplo, dado que estos extractos son ricos en antioxidantes naturales, pueden remplazar antioxidantes sintéticos que representan un riesgo para la salud (Nakatani, 1997) como el hidroxibutilanisol (BHA) y butil-hidroxitolueno (BHT). Estos extractos además contienen polifenoles que han mostrado propiedades preventivas de enfermedades como el cáncer y otras (Athar *et al*., 2007; González-Paramás, Esteban-Ruano, Santos-Buelga, de Pascual-Teresa & Rivas-Gonzalo, 2003; Stervbo, Vang & Bonnesen, 2007). Estos antecedentes hacen atractivo desarrollar diversos extractos de orujo de desecho, ricos en polifenoles, que puedan ser utilizados en forma segura en la industria de alimentos. Al mismo tiempo, se están desarrollando procesos más eficientes y novedosos para producir estos extractos a partir de desechos orgánicos de distintas fuentes vegetales. En definitiva, este estudio considera estas dos tendencias, con el objeto de obtener extractos de polifenoles a partir de residuos de orujo de uva generados en la producción de vino en Chile.

1.2 Polifenoles: descripción y clasificación general

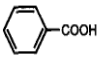
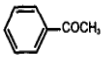
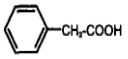
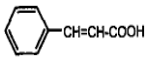
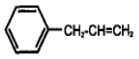
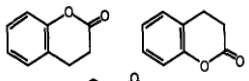
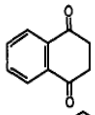
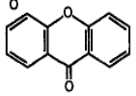
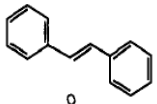
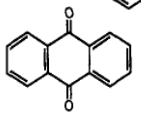
Muchos de los productos naturales, vegetales y frutales, son ricos en polifenoles, que son importantes compuestos bioactivos. La palabra “fenólicos” se refiere a **una estructura química formada por asociación de anillos bencénicos aromáticos e**

hidroxilos (-OH). Estos tienen propiedades oxido-reductivas que ayudan a prevenir cadenas de reacciones nocivas para los organismos causadas por los radicales libres.

En la literatura se han descrito más de 8000 polifenoles, los cuales provienen de dos vías principales: la vía acetato y la vía del shikimato. Estos van desde simples moléculas como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados como es el caso de algunos taninos. Los polifenoles se conjugan con una o más azúcares unidas a grupos hidroxilo, donde los azúcares pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos u oligosacáridos (Bravo, 1998). En la literatura se han propuesto diversas clasificaciones de polifenoles. En este trabajo se utilizó la clasificación universal propuesta por Bravo (1998) que agrupa a los **polifenoles en 16 clases,** dependiendo de su complejidad (**Tabla 1.1),** la cual aumenta principalmente en función del número de átomos de carbono y oxígenos, anillos bencénicos, dobles enlaces y grupos –OH.

Tabla 1.1: Principales clases de compuestos polifenólicos. Extraído de Bravo (1998).

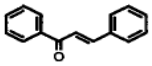
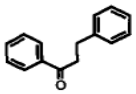
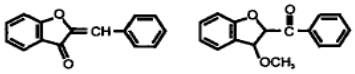
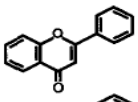
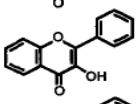
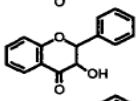
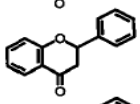
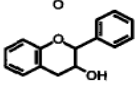
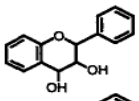
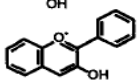
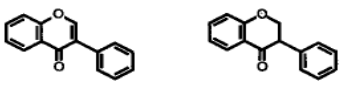
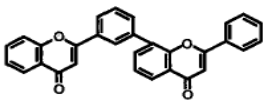
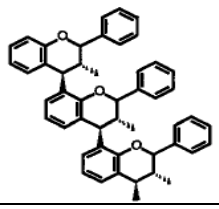
Table 1. Main Classes of Polyphenolic Compounds

Class	Basic Skeleton	Basic Structure
Simple phenols	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Phenolic acids	C_6-C_1	
Acetophenones	C_6-C_2	
Phenylacetic acids	C_6-C_2	
Hydroxycinnamic acids	C_6-C_3	
Phenylpropenes	C_6-C_3	
Coumarins, isocoumarins	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	
Naftoquinones	C_6-C_4	
Xanthones	C_6-C_1-C_6	
Stilbenes	C_6-C_2-C_6	
Anthraquinones	C_6-C_2-C_6	
Flavonoids	C_6-C_3-C_6	
Lignans, neolignans	$(C_6$-$C_3)_2$	
Lignins	$(C_6$-$C_3)_n$	

En particular, en este trabajo estamos interesados en los flavonoides, ya que son los polifenoles más comunes en los alimentos. La siguiente Tabla muestra las 13 clases de flavonoides presentes en los alimentos, donde se destacan los flavanoles y las proantocianidinas (o taninos condensados).

Tabla 1.2: Clasificación de flavonoides de alimentos. Extraído de Bravo, 1998

Table 2. Classification of Food Flavonoids

Flavonoid	Basic Structure
Chalcones	
Dihydrochalcones	
Aurones	
Flavones	
Flavonols	
Dihydroflavonol	
Flavanones	
Flavanol	
Flavandiol or leucoanthocyanidin	
Anthocyanidin	
Isoflavonoids	
Biflavonoids	
Proanthocyanidins or condensed tannins	

1.2 Polifenoles presentes en la uva.

Muchos trabajos en la literatura destacan las propiedades bioactivas positivas de los extractos de uva (Arvanitoyannis, Ladas & Mavromatis, 2006). En particular, la variedad Cabernet Sauvignon, una de las más plantadas en Chile, ha mostrado tener la mayor cantidad de polifenoles (Xu, Zhang, Cao & Lu, 2010), entre flavonoides y no flavonoides como el trans-resveratrol, que ha sido muy estudiado por sus propiedades preventivas de cáncer y otras enfermedades (Athar *et al*., 2007; González-Paramás *et al*., 2003; Stervbo *et al*., 2007). En la Tabla 1.3 se describen los principales compuestos flavonoides que se han encontrado en extractos de orujo de uva.

Tabla 1.3: Composición fenólica de la variedad Cabernet Sauvignon (Di Stefano, 2008; Yang & Chien, 2000)

Parte de la uva	Compuestos
Piel	flavan-3-oles
	ácido gálico
	flavonoles (kaempferol, quercetina, miricetina)
	dihidro-flavonoles
	ésteres hidroxi-cinámicos de ácido tartárico
	ácidos hidroxi-benzoicos
	hidroxi-estilbenos
	proantocianidinas (prodelfinidinas)
	antocianinas
Jugo	ésteres de ácido hidroxi-cinámico
	ácido cafeil-tartárico (ácido caftárico)
	antocianinas
Pulpa	proantocianidinas (menor proporción que en semilla y piel)
	ácidos hidroxibenzoicos
Semilla	catequinas unidas a galatos
	flavan-3-oles: (+)- catequina y (-)- epicatequina
	proantocianidinas (procianidinas)
	ácido gálico

Principales polifenoles no flavonoides en la uva

(a) Ácidos fenólicos

Poseen una estructura básica C6-C1. Son comunes en las plantas superiores, moras, chocolate, mango, helechos y en la orina humana. Algunos de estos ácidos tienen propiedades antimicóticas, anti-virales y conservantes. Tanto los fenoles simples como los ácidos fenólicos se encuentran normalmente ligados a polisacáridos de la pared celular o al núcleo de la lignina a través de enlaces covalentes. Por lo general son parte de los taninos hidrolizables. Un ejemplo importante de este grupo es el ácido gálico, cuya estructura se detalla en la Figura 1.1, junto con la de otros ácidos hidroxibenzoicos. El ácido gálico se encuentra libre y forma parte de los taninos de las moras, chocolate, uva y en la cáscara y hojas del mango por ejemplo. El ácido gálico se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica, también se utiliza como referencia para determinar el contenido de fenoles de los diferentes analitos en el ensayo de Folin-Ciocalteau, cuyo resultado se presenta en equivalentes de ácido gálico.

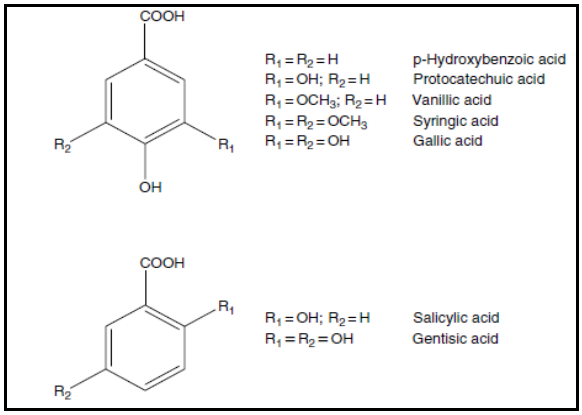


Figura 1.1 Ácidos hidroxibenzoicos en la uva. Extraído de di Stefano (2008)

(b) Ácidos hidroxicinámicos

Su estructura es del tipo C6-C3, ejemplo de ellos son los ácidos p-coumárico, cafeico, ferúlico y sináptico. Están presentes en la uva, vino, peras, albahaca, frutas cítricas, etc. Son los más importantes dentro del grupo de los fenilpropanoides. El ácido cafeico es un ejemplo importante de este grupo, cuya estructura se aprecia en la Figura 1.2. Este se encuentra en las uvas y en muchas plantas, ya que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales fuentes de biomasa. Se conocen por su actividad inmuno-moduladora y anti-inflamatoria. Su concentración en vino tinto es relativamente baja (5-13 mg/L). Este ácido se utiliza como una matriz de análisis de espectrometría de masas MALDI (Beavis, Chait & Fales, 1989).

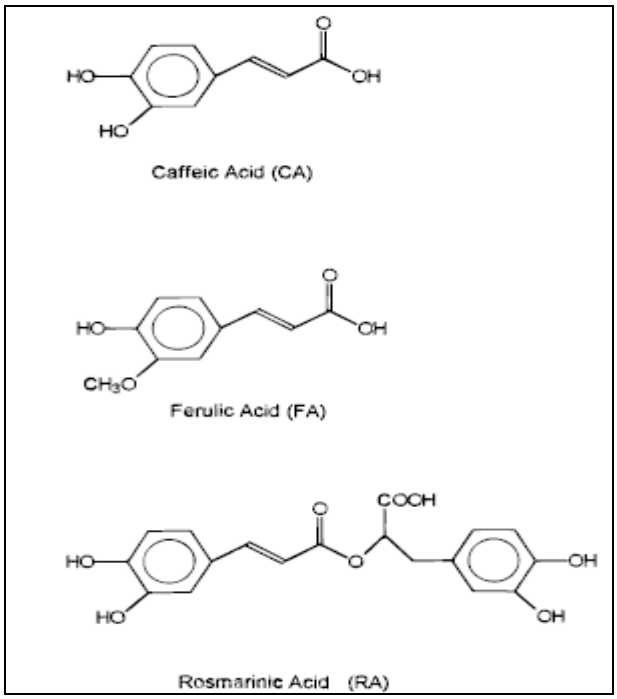


Figura 1.2 Ácidos hidroxicinámicos. Extraído desde (Chen & Ho, 1997)

(c) Estilbenoides

Su estructura se compone de un esqueleto (C6-C2-C6). Están presentes en el vino, troncos de madera, maní, etc. (Sobolev, Horn, Potter, Deyrup & Gloer, 2006). Contienen dos compuestos fenil conectados por un metileno de 2 carbonos, un ejemplo importante en el vino es el resveratrol (3,5,4 '-trihidroxi-trans-estilbeno), que es producido naturalmente por varias plantas al ser atacadas por patógenos tales como bacterias u hongos. En experimentos con ratones y ratas, se han visto efectos anticancerígenos, anti-inflamatorios, cardiovasculares y de reducción de azúcar en la sangre (Bishayee, 2009). Bertelli y colaboradores (1998) mostraron que el contenido de resveratrol se mantiene constante en la piel de las uvas y en el orujo después de la fermentación y luego de permanecer almacenado por un largo período. Otra fruta con alto contenido de resveratrol son los arándanos, aunque estos tienen menos del 10% del resveratrol de las uvas. La cocción o tratamiento térmico contribuye a su degradación.

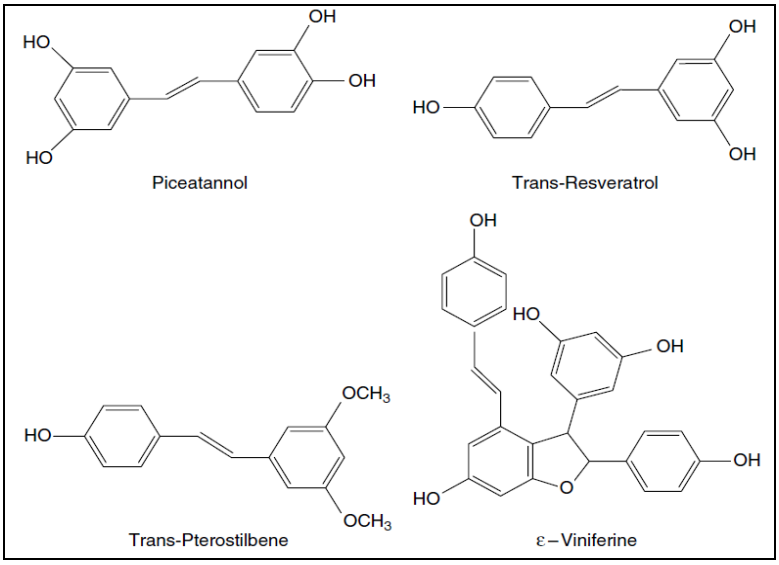


Figura 1.3 Estructura de hidroxiestilbenos de uva. Extraído desde (Di Stefano, 2008)

(d) Lignanos

Su estructura básica es (C6-C3)n, constituidos por alcoholes cinámicos, por ejemplo los alcoholes coniferil, siríngico y p-coumaril. Forman parte importante del material constitutivo vegetal. En el vino tinto su concentración varía entre 0,8 y 1,4 mg/L (Nurmi, Heinonen, Mazur, Deyama, Nishibe & Adlercreutz, 2003). Representan uno de los mayores grupos de polifenoles en el reino vegetal. Son una de las principales clases de fitoestrógenos (químicos similares a los estrógenos) que además actúan como antioxidantes. Los lignanos vegetales son sustancias polifenólicas derivadas de la fenilalanina a través de la dimerización de alcoholes cinámicos sustituidos. Algunos lignanos se metabolizan para formar enterodiol (1) y enterolactona (2) por las bacterias intestinales. Los lignanos pueden ser metabolizados para formar "lignanos mamíferos" como el pinoresinol. En la Figura 1.4 se muestran dos ejemplos:

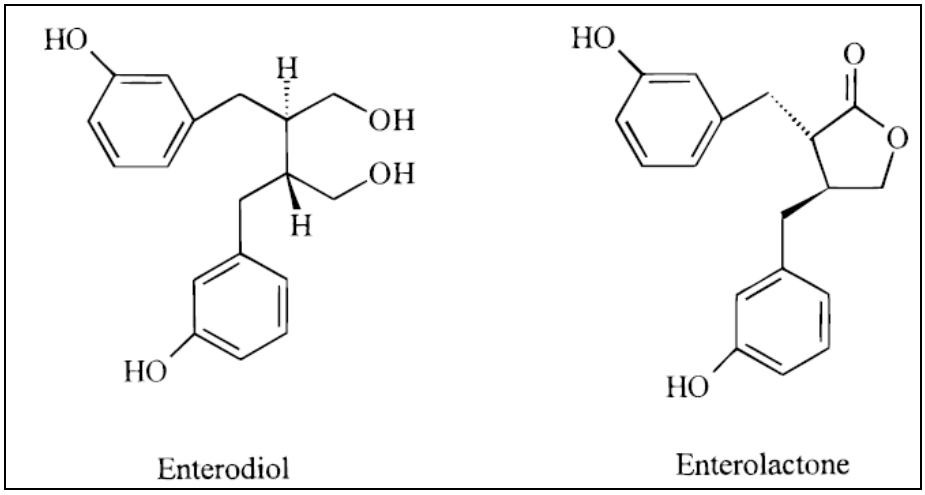


Figura 1.4 Lignanos enterodiol y enterolactona.

Extraído desde (Meagher, Beecher, Flanagan & Li, 1999)

Principales polifenoles flavonoides

Los flavonoides, que constituyen el grupo más importante de los polifenoles, se subdividen en distintas clases, con más de 5000 compuestos descritos en la literatura (Bravo, 1998) (Tabla 2). Su estructura común es la de difenilpropanos (C6-C3-C6) que consta de dos anillos aromáticos vinculados a través de tres carbonos que suelen formar un heterociclo oxigenado. Se caracterizan por ser solubles en agua y en ocasiones presentarse en la naturaleza como agliconas (contraparte no glicosilada de la unión glucosídica entre un azúcar y otra molécula "aglicona"). La Figura 1.5 representa la estructura básica y la numeración utilizada para su representación.

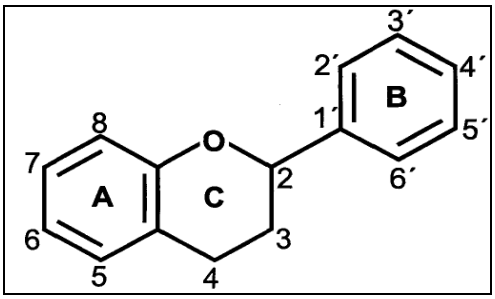


Figura 1.5 Sistema de numeración de flavonoides y estructura básica. Extraído de (Bravo, 1998)

(a) Flavonas

Su composición básica es $C_{15}H_{10}O_2$. El nombre otorgado para estas moléculas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es 2-fenil-1-benzopiran-4-ona. Las flavonas son responsables de dar un color blanco o amarillo donde se presentan (*flavus*=amarillo), como en flores, hojas y tejidos de plantas y frutas, como por ejemplo en la piel de las uvas verdes, donde otorgan un color parecido al amarillo en el caso del vino

blanco. Las agliconas presentes en algunas flavonas son tóxicas para las plantas y pueden ser separadas sólo desde la madera muerta. Aunque a veces atraen a los insectos polinizadores con su color, en otras temporadas del año sus propiedades tóxicas hacen que puedan actuar como repelentes de insectos que dañan las plantas. Ejemplos de flavonas son la apigenina, luteolina y diosmetina.

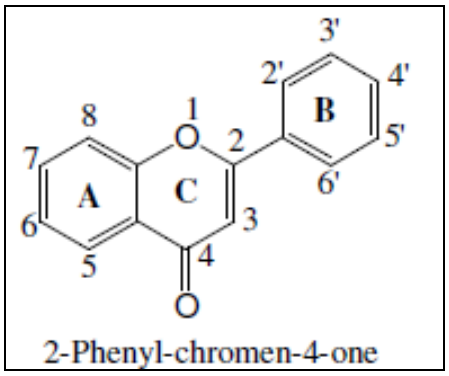


Figura 1.6 Estructura molecular de una flavona.

(b) Flavonoles

Se caracterizan por poseer la estructura básica 3-hidroxi-2-fenylcromen-4-ona (IUPAC), lo cual se aprecia en la figura 1.7, mostrándose el grupo cetona en el carbono 4. Existe una gran variedad de flavonoles, con cerca de 380 flavonol glucósidos, 200 quercetinas y kaempferoles (Bravo, 1998). Su diversidad deriva de las diferentes posiciones de los grupos -OH fenólicos. Los flavonoles están presentes en la uva, cítricos y brócoli. En la Figura 1.8 se muestra la aglicona de los flavonoles presentes en la uva. Por ejemplo la quercetina se encuentra en el té negro y verde, alcaparras, manzanas, cebolla, uvas rojas, cítricos, tomate, brócoli, en bayas, incluyendo frambuesas y arándanos. Aún cuando se ha reportado su eficacia contra una amplia variedad de enfermedades,

incluyendo cáncer, hasta la fecha no hay evidencia clínica confiable que lo avale (Nguyen, Tran, Nguyen, Do, Huynh & Huynh, 2004).

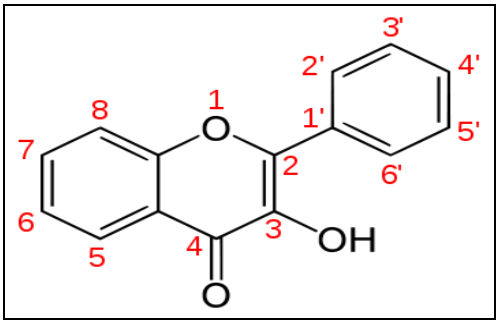


Figura 1.7: Estructura de Flavonoles

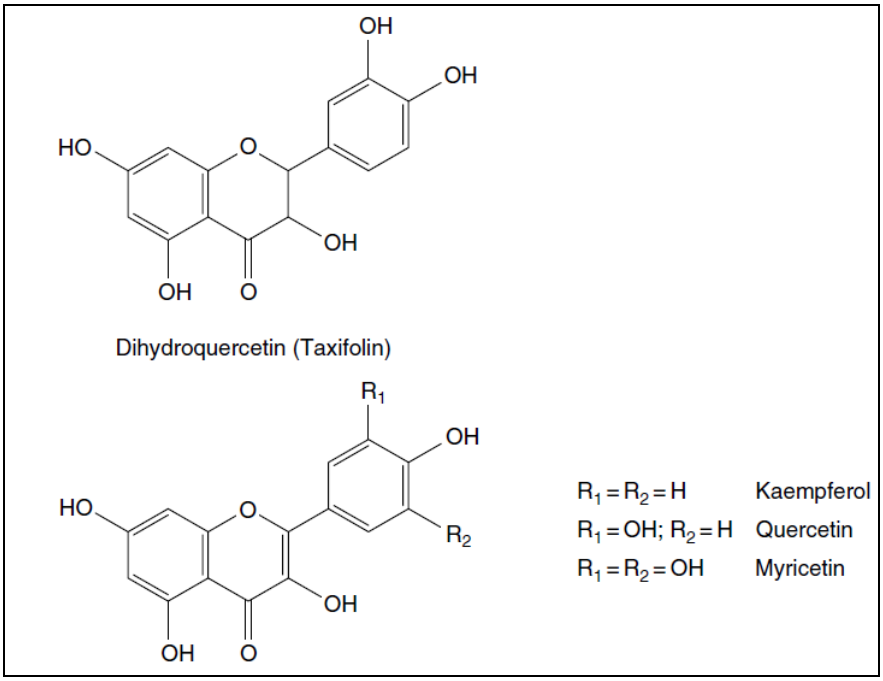


Figura 1.8: Aglicona de los Flavonoles. Extraído desde Stefano, Flamini, 2008

(c) Flavanoles

Los flavanoles también son conocidos como flavan-3-oles Su estructura básica es 2-fenil-3,4-dihidro-2H-cromen-3-ol, compuesta por $C_{15}H_{14}O_2$ y no tienen un grupo cetona como los flavonoles. Algunos ejemplos son la (+)-afzelequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epi afzelequina, (-)-epicatequina y la (-)- epigalocatequina. Se encuentran abundantemente en el vino tinto. La polimerización de estos compuestos origina las proantocianidinas o taninos condensados. En la Figura 1.9 se muestran algunos flavanoles presentes en la uva.

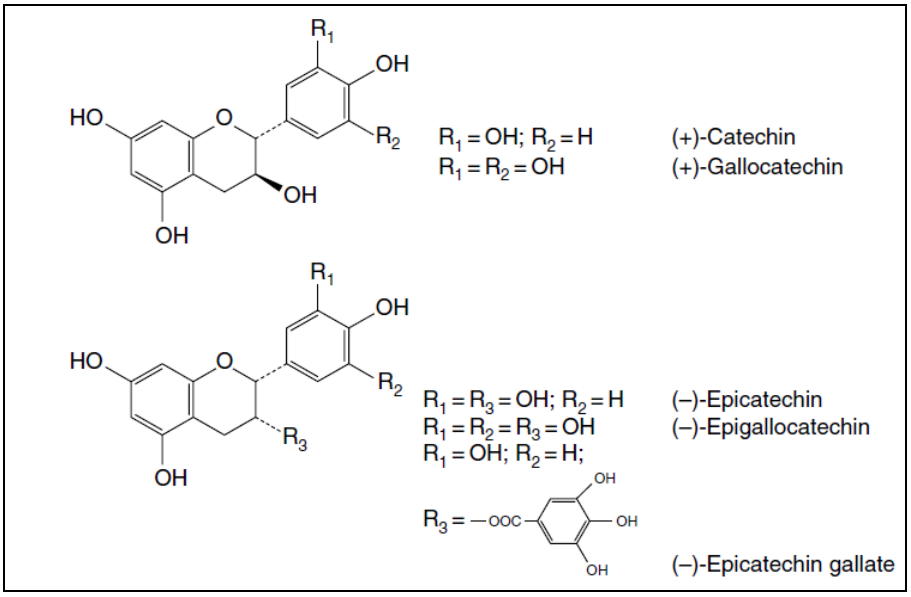


Figura 1.9 Estructura de los flavan-3-oles en uva. Extraído desde Di Stefano, 2008

(d) Antocianidinas

Su estructura está caracterizada por contener básicamente $C_{15}H_{11}O^+$. Son moléculas originadas por proantocianidinas hidrolizadas que contienen tres anillos, con 7 grupos que se sustituyen con distintas combinaciones de $-OCH_3$, -H y -OH. Son la contraparte no glicosilada de las antocianinas, que están constituidas por una molécula de antocianidina (que es la aglicona) a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. Los tipos más comunes son: cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvinidina, como se muestra en la Figura 1.10. Las antocianidinas son el grupo más importante de los pigmentos vegetales hidrosolubles, otorgando el color característico a muchos frutos, entre ellos los arándanos, uvas y moras. Estos flavonoides tienen efectos antimutagénicos, anti-inflamatorios y preventivos del daño por rayos UV (Ju & Howard, 2003).

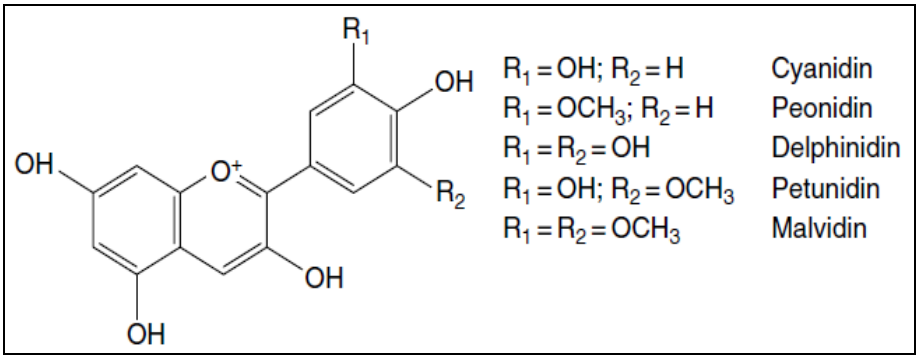


Figura 1.10 Antocianidinas de uva tinta, extraído desde (Di Stefano, 2008)

(e) Taninos

Son compuestos polifenólicos de alto peso molecular, que contienen hidroxilos y otros grupos (como carboxilos) y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Forman complejos con proteínas y otros compuestos orgánicos como aminoácidos y alcaloides, por lo que son moléculas astringentes y amargas. Quideau (2011) propone la siguiente clasificación de los taninos:

- **Florotaninos:** son oligómeros de floroglucinol. Se encuentran en las algas pardas rojas, específicamente en las paredes celulares (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus & Pouységu, 2011).
- **Galotaninos y elagitaninos** (taninos hidrolizables): contienen al menos una unidad de ácido gálico. Se encuentran en uvas moscatel y en menor proporción en la cepa Cabernet Sauvignon (Larrosa, García-Conesa, Espín & Tomás-Barberán, 2010).
- **Proantocianidinas o taninos condensados:** se producen por la polimerización de los flavan-3-oles presentes por ejemplo en plantas leñosas, semillas de uva, ciruelas, moras, arándanos, avellanas, nueces y canela. Están presentes en el jugo de uva, chocolate, etc. (Harbertson, Parpinello, Heymann & Downey, 2012; Rodrigues, Ricardo-Da-Silva, Lucas & Laureano, 2012; Xie & Dixon, 2005). Dada su importancia en los extractos de este estudio, se describirán con más detalle a continuación.

(f) Taninos condensados o proantocianidinas

Son oligómeros o polímeros polihidroxiflavanos cuyas unidades fundamentales son los **flavan-3-oles**, que juegan un papel clave en la caracterización de las proantocianidinas (Harbertson *et al.*, 2012) (ver apéndice A). Las proantocianidinas se forman como

subproductos de la biosíntesis de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles. Los oligómeros de los favan-3-oles contienen 2 a 10 unidades de monómeros (solubles en agua) y los polímeros pueden alcanzar un grado de polimerización de hasta 200 monómeros (insolubles en agua) (Sanoner, 1999), por lo que su peso molecular puede ser de hasta 30.000 Dalton. Las unidades fundamentales de las proantocianidinas se clasifican en tres grupos (Rodrigues *et al*., 2012):

(a) (+)-catequina y (-)-epicatequina
(b) (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina
(c) (+)-afzelequina y (-)-epiafzelequina.

Cada grupo difiere de los otros en el patrón de hidroxilación en los anillos. El patrón de vinculación de flavan-3-oles puede ser dividido en tipo A y tipo B. En el tipo A, la unidad flavan-3-ol está doblemente enlazada por un enlace éter adicional entre los carbonos C2→C7. En el tipo B, la vinculación entre flavan-3-oles está dada por los carbonos C-4→C-6 o C-4→C-8 (Ferreira, Marais & Slade, 2003). Ejemplos representativos de los tipos A y B se muestran en la Figura 1.11.

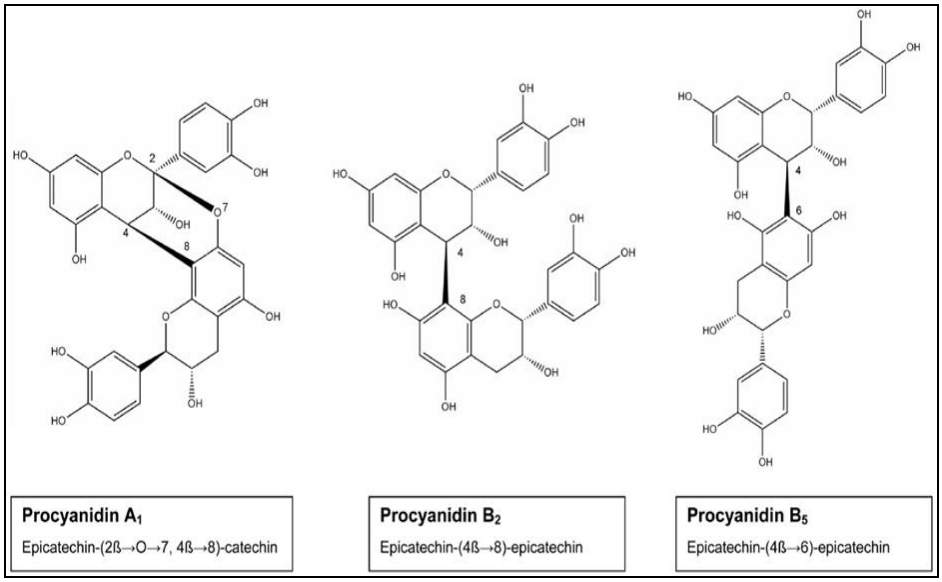


Figura 1.11 Dímeros comunes tipo A- y B- encontrados en proantocianidinas, extraído desde (Serrano, Puupponen-Pimiä, Dauer, Aura & Saura-Calixto, 2009)

La característica más importante que distingue a las proantocianidinas de los otros compuestos fenólicos es su alta capacidad para formar complejos con otras macromoléculas (Hagerman, 2011), lo cual es esencialmente un fenómeno de superficie, reforzado por la flexibilidad conformacional de la proantocianidina y el número de anillos aromáticos y grupos fenólicos de los taninos (Haslam, 1996). Los entrecruzamientos de los taninos con proteínas ricas en prolina (PRP) son un ejemplo de este fenómeno. La interacción de los taninos con PRP está estrictamente relacionada con la astringencia, una característica fundamental de muchas bebidas ricas en proantocianidinas, como vinos y tés. Las principales fuerzas implicadas en la formación de complejos de taninos con las proteínas son los efectos hidrofóbicos, los cuales definen la aversión de las moléculas por el agua. Por lo que el papel del agua y solubilidad en agua, son factores claves en la formación de complejos con taninos, desempeñando un papel fundamental en la inhibición de las enzimas relacionadas con las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas,

cáncer y diabetes (Quideau *et al*., 2011). En este sentido las proantocianidinas aportan efectos antiateroscleróticos, hipocolesterolémicos y efectos antioxidantes, demostrados en experimentos *in vivo* en ratas, que han sido alimentadas con dietas altas en colesterol (Tebib, Rouanet & Besançon, 1997; Yamakoshi, Kataoka, Koga & Ariga, 1999).

En resumen, las proantocianidinas presentan importantes propiedades bioactivas beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer, capacidad antioxidante, capacidad de secuestro de radicales libres, propiedades antibacterianas, propiedades antivirales e inhibidoras de enzimas (Monagas, Quintanilla-López, Gómez-Cordovés, Bartolomé & Lebrón-Aguilar, 2010). Lo cual es buscado por las industrias cosmética, farmacéutica y alimentaria.

Ejemplos de proantocianidinas, presentes en uvas son:

- **Procianidinas**: tipos de proantocianidinas más frecuentes en la naturaleza (junto a las prodelfinidinas). Están constituidas exclusivamente por (epi)catequina. En polímeros de 3 o más unidades se han reportado como preventivas de distintos cáncer y mostrando gran actividad antioxidante (Rossi *et al*., 2012). Se encuentran abundantemente en las uvas (Haslam, 2007).

- **Prodelfinidinas:** constituidas por catequinas, epicatequinas y al menos una unidad de (epi)galocatequina. Usualmente se presenta junto a las procianidinas. Se han identificado como preventivas de cáncer pancreático (Rossi *et al*., 2012).

- **Propelargonidinas:** constituidas por catequinas, epicatequinas y al menos una unidad de epiafzelequina. Estas son más escasas que las dos anteriores en el reino vegetal (pero se encuentran en la uva, Cabernet Sauvignon por ejemplo). Se han reportado efectos preventivos de enfermedades como el cáncer y la osteoporosis (Chang, Lee, Cho & Choi, 2003). Usualmente se

presenta junto a procianidinas, al igual que las prodelfinidinas (Rossi *et al.*, 2012).

En general las proantocianidinas pueden encontrarse en semillas de uva, ciruelas, moras, arándanos, avellanas, nueces, canela, jugo de uva, chocolate, etc. donde imparten astringencia, pero su función principal es proporcionar protección contra los microbios patógenos, plagas de insectos y grandes herbívoros.

1.4 Medición de capacidad antioxidante y análisis de proantocianidinas

A continuación se describe las bases químicas y las posibles interferencias de los métodos más usados para medir la capacidad antioxidante de un extracto natural. En particular, describiremos los métodos Folin, Harbertson-Adams, ORAC, DPPH y FRAP. Posteriormente se describe la técnica MALDI-TOF para identificar y cuantificar proantocianidinas.

Un antioxidante es una molécula capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones o hidrógenos a partir de una sustancia a un agente oxidante. Estas reacciones pueden producir radicales libres, los que a su vez pueden iniciar reacción(es) en cadena, que si ocurre(n) en una célula, podrían causar daños. Los antioxidantes detienen estas reacciones en cadena mediante la "desactivación" de radicales libres intermedios, e inhiben otras reacciones de oxidación, al oxidarse ellos mismos, por lo que los antioxidantes son a menudo agentes reductores, tales como tioles, ácido ascórbico u otros polifenoles (Sies, 1997).

Con respecto a los ensayos de medición de capacidad antioxidante, se deben conocer las reacciones involucradas para detectar posibles interferencias o errores de la medición. Se debe tener especial cuidado cuando las muestras son sometidas a altas temperaturas, ya que las reacciones de Maillard generan compuestos reductores con características similares a los

antioxidantes naturales (Plaza, Amigo-Benavent, del Castillo, Ibáñez & Herrero, 2010a; Plaza, Amigo-Benavent, del Castillo, Ibáñez & Herrero, 2010b).

Prior y colaboradores (2005) clasifican los antioxidantes naturales en 4 tipos conformacionales:

a) Enzimas (*e.g.* superoxidasa dimutasa, glutatión peroxidasa, catalasa)
b) Moléculas grandes (*e.g.* albuminas, ceruloplasmina, ferritina)
c) Moléculas pequeñas (*e.g.* ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferoles, carotenoides y otros polifenoles)
d) Hormonas (*e.g.* estrógenos, angiotensina, melatonina, etc.)

Por otro lado se debe tener en cuenta que hay múltiples fuentes de oxidación y de radicales libres: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), el radical libre hidroxilo (-OH) y el radical superóxido (O_2^{-}), O_2, HO^*, NO^*, $ONOO^-$, HOCl, etc. (Prior, Wu & Schaich, 2005). Los oxidantes y antioxidantes tienen características químicas y físicas distintas, que los hacen reaccionar diferente ante las diversas condiciones que pueden presentarse *in vitro* y sobretodo *in vivo*. Por ejemplo los carotenoides no son buenos neutralizando radicales peroxilos en comparación con los fenoles, aunque son excepcionalmente eficientes neutralizando los oxígenos libres que actúan como radicales (para lo cual los fenoles son ineficientes). Por esta razón se entiende que no hay un ensayo que pueda medir precisamente todas las fuentes radicalarias o la capacidad antioxidante de una muestra, ya que en general las muestras de extractos naturales son mezclas complejas de muchos compuestos, que reaccionan de forma diversa frente a cada tipo de ensayo.

Una solución para identificar la capacidad antioxidante, sería separar cada compuesto de la mezcla o muestra y realizar una prueba específica para un tipo de actividad antioxidante específica, pero obviamente esto sería demasiado largo, costoso y sesgado ya que químicamente no estarían las mismas condiciones, ya que los mecanismos químicos imperantes cambiarían al faltar algunos compuestos. Además no se estarían considerando los efectos sinérgicos entre antioxidantes (Prior *et al*., 2005; Saucier &

Waterhouse, 1999). Por lo tanto, es claro que no hay un análisis donde la actividad antioxidante pueda ser medida y cuantificada exactamente en todas sus dimensiones. De ahí la necesidad de hacer varios tipos de mediciones para corroborar alguna hipótesis sobre capacidad antioxidante (Huang, Ou & Prior, 2005). La clave para elegir un sistema de medición de actividad antioxidante, es unir la fuente radicalaria y las características químicas del sistema. Otros factores claves en la elección del método de medición son: abundancia de estudios comparables en la literatura (para esa materia prima con ese ensayo), aplicaciones potenciales de ese caso, utilización de una fuente radicalaria biológicamente relevante, simpleza, mecanismos químicos definidos, instrumentación disponible, reproducibilidad, adaptabilidad para uso en antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos, adaptabilidad para procesos industriales, entre otros (Prior *et al*., 2005). Muchos métodos están disponibles para determinar la actividad antioxidante total *in vitro*, aunque las opiniones acerca de la efectividad de cada método, varían mucho entre los distintos autores.

A continuación, para se clasificarán los ensayos de capacidad antioxidante. Para esto es necesario comprender que los antioxidantes pueden desactivar los radicales a través de dos mecanismos: transferencia de átomos de hidrógenos (**HAT,** *Hidrogen Atom Transfer*, de sus siglas en inglés) o transferencia de un electrón (**SET**, *Single Electron Transfer*, su traducción al inglés), donde la cinética y potencial de las reacciones acompañantes son distintos (Prior *et al*., 2005). La Tabla 1.4 resume los principales ensayos que se usan actualmente (Huang, 2005).

Tabla 1.4 Ensayos de Capacidad Antioxidante

Tipo de Ensayo:	Nombre
Transferencia de un átomo de hidrógeno **HAT**	**ORAC** (de sus siglas en inglés: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
	TRAP (de sus siglas en inglés: *Total Radical trapping Antioxidant Parameter*)
	CBA Ensayo de blanqueamiento con crocin (del inglés: *crocin Bleaching assay*)
	IOU (de sus siglas en inglés: *Inhibited Oxygen Uptake*)
	Inhibición de oxidación de ácido linoleico
Transferencia de electrón individual **SET**	**TEAC** (de sus siglas en inglés: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)
	FRAP (de sus siglas en inglés*: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter*)
	DPPH (de sus siglas en inglés: Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
	Capacidad reductora del Cobre (II)
	Fenoles totales con el reactivo **Folin-Ciocalteu**
Otros ensayos	**TOSC** (de sus siglas en inglés: *Total Oxidant Scavenging Capacity*)
	Inhibición de la reacción de oscilación Briggs-Rauscher
	Quemi-luminicencia
	Electro-Quemiluminicencia

Descripción específica de ensayos de capacidad antioxidante

A.-Tipo HAT: ORAC y TRAP

Los métodos **HAT** miden la capacidad de un antioxidante de desactivar los radicales libres presentes en una muestra mediante la donación de hidrógenos (reducción). La reactividad relativa del antioxidante, en los métodos HAT, es determinada por el BDE (de sus siglas en inglés: *Bond dissociation energy*) del grupo donador de hidrógeno (Wright, Johnson & DiLabio, 2001). Las Reacciones HAT son independientes del pH, del solvente y suelen ser bastante rápidas (cuestión de segundos a minutos). La presencia de agentes reductores, como los metales que muchas veces están presentes, son una complicación en los ensayos HAT y pueden conducir a supuestas reactividades altas, pero erróneas.

Uno de los métodos más reportados, para este tipo de medición, por donación de átomos de hidrógeno HAT, es el ensayo "*Oxygen Radical Absorbance Capacity*" **ORAC** (Prior *et al*., 2005). Donde la capacidad antioxidante es determinada indirectamente con la adición de 2,2´-azobis(2-amidinopropano) dihydrocloridrato (APPH), generador de un radical peroxil a una solución o muestra. Hay dos tipos de ORAC: el ensayo ORAC FL que centra su medición en la estequiometría de los antioxidantes, mientras que en ORAC PG se centra la medición en la reactividad del antioxidante. La química general del ensayo ORAC mide la inhibición de la oxidación producida, donde se transfiere un átomo de hidrógeno (Ou, Hampsch-Woodill & Prior, 2001). El ensayo ORAC tiene una fuente controlable de radicales peroxilo que modelan las reacciones de los antioxidantes de los lípidos en alimentos y los sistemas fisiológicos y puede ser adaptado para detectar antioxidantes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, mediante la alteración de la fuente de radicales y de disolvente (Prior *et al*., 2003). Frankel y Meyer (Frankel & Meyer, 2000) han criticado ORAC (lo mismo para TRAP) argumentando que se asume el mecanismo antioxidante que se produce en la reacción. En general el ensayo ORAC es más preciso en la medición de capacidad antioxidante en comparación con DPPH o FRAP, aunque es más

complejo de realizar (se necesitan sofisticados equipos) y no permite identificar las proantocianidinas presentes en la muestra, por lo cual no se adapta muy bien a los objetivos de este trabajo.

B.-Capacidad antioxidante basada en métodos que usan transferencia de un electrón (SET):

Los métodos SET detectan la habilidad de un antioxidante para transmitir un electrón, reduciendo algún compuesto (metales, carbonilos y otros radicales). Es necesario tener en cuenta que muchas veces las reacciones SET y HAT ocurren juntas (Prior *et al*., 2005).

El mecanismo dominante en una reacción de óxido/reducción está determinado en relación al balance de protones y estructuras químicas existentes. Las reacciones SET están sustentadas básicamente en la deprotonación y en el IP (potencial de ionización, del inglés "*Ionization Potencial*") del grupo funcional reactivo, por lo cual las reacciones SET son muy dependientes del pH. De modo que si sube el pH, baja el IP, aumentando la donación de electrones con deprotonación (Prior *et al*., 2005). Las reacciones SET suelen ser más lentas que las HAT. Los cálculos de capacidad antioxidante se basan en la disminución porcentual del compuesto a medir, en lugar de la cinética de la reacción. Cuando los compuestos con AH^{*+} protonados tienen una duración prolongada, las reacciones secundarias se convierten en una interferencia significativa en los ensayos, e incluso pueden llevar a la toxicidad o mutagenicidad *in vivo*. Elementos traza y contaminantes (especialmente metales) pueden interferir con los métodos establecidos y pueden explicar alta variabilidad y baja reproducibilidad de los resultados (Prior *et al*., 2005). En términos simples, este ensayo mide la capacidad de la molécula de reducir un agente oxidante en base al cambio de color (espectrofotometría, longitudes de onda específicas) que está directamente relacionado con los cambios de concentración de compuestos antioxidantes de la muestra, ejemplos de estos ensayos son FRAP, DPPH y Folin-Ciocalteau.

FRAP

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (Benzie & Strain, 1996) para medir el poder reductor en el plasma, pero el ensayo también ha sido adaptado y utilizado para el medir antioxidantes en productos vegetales (Ou, Huang, Hampsch-Woodill, Flanagan & Deemer, 2002). El ensayo ofrece un índice de la capacidad antioxidante o reductora de diferentes soluciones. La reacción **mide la reducción de hierro** 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie *et al*., 1996). El hierro en exceso es tóxico y a bajos valores de pH el complejo ion férrico-Tripiridiltriazina (Fe^{III}-TPTZ) es llevado a su forma reducida (Fe^{II}), generando un intenso color azul con un máximo de adsorción a 593 nm (Benzie *et al*., 1996). El hierro reacciona con peróxido y produce **radicales libres**; la reacción más importante es:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \quad (1)$$

Cuando el hierro se encuentra dentro de niveles normales, los mecanismos antioxidantes del organismo pueden controlar este proceso. La reacción del ensayo FRAP detecta compuestos con potenciales redox de <0,7 Volts, por lo que es un indicador razonable para la capacidad de mantener el estado redox en las células o tejidos (Prior *et al*., 2005). El poder reductor parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y la extensión de la conjugación de polifenoles (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000). Sin embargo, FRAP no puede detectar compuestos que actúan por medio de la reducción de radicales (transferencia de hidrógenos), particularmente tioles o proteínas (Ou *et al*., 2002), provocando una subestimación de la capacidad antioxidante del suero.

Por otro lado, la reacción a un pH bajo reduce el potencial de ionización que impulsa la transferencia de electrones y aumenta el potencial redox, causando un cambio en el mecanismo de reacción dominante (Simic Michael & Jovanovic Slobodan, 1994). Por esta razón en ocasiones, los valores de FRAP tienen una mala correlación con las

medidas de otros ensayos antioxidantes. En este sentido se discute que la capacidad de reducir del hierro tiene poca relación con los procesos de desactivación de radicales (transferencia de hidrógenos) efectuados por la mayoría de los antioxidantes. Sin embargo, la oxidación o reducción de los radicales a iones efectivamente detiene las cadenas radicalarias y por lo tanto reducir la potencia de estos radicales reflejaría entonces la capacidad de determinados compuestos de modular el tono redox en el plasma y tejidos.

El mecanismo de transferencia en el ensayo **FRAP es totalmente electrónico (reacciones tipo SET) en lugar de ser mixto (con reacciones tipo HAT),** por lo que en combinación con otros métodos puede ser muy útil para distinguir los mecanismos dominantes con diferentes antioxidantes. Además, se ha planteado que sería interesante evaluar si los altos valores FRAP se correlacionan con la tendencia de los polifenoles para convertirse en pro-oxidantes, bajo ciertas condiciones, porque los metales (hierro en FRAP) reducidos, son activos propagadores de las cadenas radicalarias a través de la reducción de hidroperóxidos a RO*. Esto se ha demostrado para algunas flavonas y flavanonas (Cao, Sofic & Prior, 1997) que también tienen un alto valor FRAP.

Ventajas / Desventajas de FRAP

El protocolo del ensayo FRAP indica que se debe dejar reaccionar el reactivo con la muestra por 4 a 6 minutos. Esto es genera un impacto en los resultados de FRAP, ya que estos pueden variar enormemente dependiendo de la escala de tiempo de análisis. Los fenoles, de reacción rápida, que se unen al hierro o se descomponen en compuestos con menor reactividad se analizan mejor con tiempos de reacción cercanos a los 4 min. Sin embargo, algunos polifenoles reaccionan más lentamente y requieren más tiempo de reacción para la detección, por ejemplo, 30 min. Pulido y colaboradores (Pulido *et al*., 2000) aseveran que el orden de reactividad de una serie de antioxidantes puede variar enormemente, e incluso invertirse, en función del tiempo de análisis, ellos examinaron el ensayo FRAP de los polifenoles en agua y metanol, donde la absorvancia (593 A) aumenta lentamente al igual que en el ácido cafeico, ácido tánico, ácido ferúlico, ácido ascórbico y

la quercetina, incluso después de varias horas de tiempo de reacción. Por lo tanto dejando la reacción por 4 o 6 minutos no es suficiente para considerarla completa para todos los tipos de polifenoles, ya que la absorvancia sigue variando incluso después de 3 horas de iniciada la reacción. Además el ensayo FRAP no mide antioxidantes tioles, como el glutatión. FRAP en realidad mide la capacidad de reducción del ion férrico. Sin embargo, a diferencia de otras pruebas de la capacidad antioxidante total, como ORAC, el ensayo FRAP es simple, rápido, barato y no requiere equipo especializado. El ensayo FRAP se puede realizar utilizando equipos semiautomáticos o métodos manuales.

DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Reacción de análisis caracterizada por la utilización de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH, sigla en inglés) como radical libre. El método de DPPH es muy conveniente para un rápido análisis de muchas muestras, independiente de la polaridad de las mismas (Koleva, van Beek, Linssen, Groot & Evstatieva, 2002). El radical DPPH es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico que es estable. Es de color morado intenso y su disponibilidad comercial es amplia, para usarlo no se tiene que hacer ensayos previos como el ABTS*+. Está basado en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes de la muestra contra el DPPH, esto puede ser medido por ESR ("*Electro Spin Resonance*") o por decrecimiento de la absorbancia. Esta decoloración fue reportada por primera vez por Brand-Williams y colaboradores (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995) donde se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 515 nm después de la reacción. El porcentaje de DPPH restante es calculado de la siguiente forma:

$$IC = \frac{A_{T=0} - A_{T=30}}{A_{T=0}} * 100 \quad (2)$$

La cuantificación más frecuente emplea el porcentaje de inhibición IC50 (concentración que causa la neutralización del 50% de la solución de DPPH) permitiendo

normalizar la capacidad antioxidante. IC50 requiere de varias diluciones para encontrar el volumen de 50% de inhibición. El porcentaje remanente de DPPH es proporcional a la concentración antioxidante. El DPPH es considerado principalmente un ensayo SET, ya que la donación de hidrógenos es un mecanismo marginal en este método (Huang *et al*., 2005).

Ventajas/Desventajas del ensayo DPPH:

Es rápido y no muy costoso, aunque menos preciso y menos sensible que, por ejemplo, el ensayo ORAC. Solo necesita un espectrofotómetro de UV-visible. Además ha sido muy reportado en la literatura de antioxidantes (Prior at al., 2005). Un defecto es que algunos compuestos sobrepasan los 515 nm, por ejemplo los carotenoides, lo cual sesga los resultados para algunas muestras (Nomura, Kikuchi, Kubodera & Kawakami, 1997). Otras desventajas son que el DPPH no genera una reacción competitiva ya que es reductor y oxidante a la vez, por lo que la decoloración puede ser causada vía reacción radical HAT o reducción SET como también con otras reacciones. La accesibilidad estérica es muy importante en la reacción, por lo que las muestras compuestas por pequeñas moléculas (que tienen mejor acceso al sitio del radical) muestran mayor capacidad antioxidante con este ensayo. DPPH es un radical de nitrógeno diferente a los radicales peroxilos (muy reactivos y transientes) de la peroxidación lipídica, por lo que algunos antioxidantes reaccionan más lento con DPPH o incluso podrían no reaccionar (inaccesibles estéricamente). Adicionalmente el DPPH también es decolorado por otros agentes reductores y por transferencia de hidrógeno, lo que puede distorsionar los resultados arrojando capacidades antioxidantes cuestionables.

1.5 Caracterización de fenoles y otros compuestos en los extractos

Reactivo Folin-Ciocalteau (*F-C)* o ensayo de fenoles totales:

Los métodos tradicionales para la determinación del contenido total de fenoles se basan en la medición directa de la absorción de radiación electromagnética ya sea en la región ultravioleta o en la región visible-infrarroja cercana. Entre estos últimos, el más común es el ensayo colorimétrico que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteau (Singlenton y Rossi, 1965). El método original (1927) usa reactivos para análisis de tirosina (Folin & Ciocalteu, 1927) donde la oxidación de fenoles por el reactivo molybdotungstato produce un producto coloreado con máxima absorbancia a los 745-750 nm. Este método es simple debido a su naturaleza espectrofotométrica, sin embargo se discute sobre que es lo que realmente detecta: solo fenoles o fenoles con agentes reductores como metales y/o los azúcares presentes, ya que estas últimas pueden intervenir en la óxido-reducción causando posibles imprecisiones en los resultados.

Singleton y Rossi (Singleton & Rossi, 1965) mejoraron el método con el reactivo "molibdo-tungsto-fosforique-tero-polianion" que cuantifica más específicamente los fenoles, la máxima absorbancia para este reactivo es 765 nm. También detallaron el protocolo para obtener resultados confiables: (1) volumen proporcionalmente apropiado de base alcalina y reactivo F-C; (2) tiempo y temperatura de reacción para óptimo desarrollo de color (3) usar el espectrofotómetro a 765 nm y (4) uso de ácido gálico como el estándar de referencia fenólico (Singleton *et al.*, 1965). Este método mejorado minimiza la variabilidad, lo que permite concluir que comparado con los métodos de oxidación de permanganato o de absorbancia ultravioleta, el método S-R produce resultados más acordes a la realidad en un amplio rango de fenoles presentes. Algunos autores han recomendado cambiar el estándar de fenoles a equivalentes de catequina o equivalentes de ácidos tánico, ferrúlico, clorogénico, cafeico o vainíllico. Esta falta de estandarización ha llevado a gran variabilidad en la literatura.

Ventajas/Desventajas del método F-C

El método es simple y de fácil aplicación, además en la mayoría de los estudios de caracterización de fenoles se aplica este método debido a la gran cantidad de información reportada con este método. Sin embargo posee la desventaja de que hay sustancias que reaccionan como fenoles sin serlo: azúcares, aminas aromáticas, dióxidos de sulfuro, ácido ascórbico y otros enedioles y reductonas, ácidos orgánicos y Fe(II). También adenina, adenosina, alanina, anilina, ácido aminobenzoico, benzaldehido, creatinina, cisteina, citidina, citosina, dimetilanilina, difenilamina, fructosa, guanina, guanosina, glicina, histamina, histidina, metilamina, ácido nitriloacetico, ácido oleico, feniltiourea, proteínas, piridoxina, sucrosa, ácido sulfanilico, tiourea, timina, timidina, trimetilamina, triptofano, uracilo, ácido urico y xantina (Prior *et al*., 2005), por lo cual debiera hacerse una corrección a los resultados obtenidos según las posibles interferencias en la medición. También algunas sustancias inorgánicas reaccionan aumentando el índice de fenoles, como hidrazina, hidroxiamonio clórico, sulfato de amonio férrico, sulfato de fierro, sulfato de manganesio, nitrito de potasio, cianidica sódica, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio, sulfito de sodio y estaño clórico (Box, 1983). La relación entre el método de Folin y ORAC FL es normalmente buena, aunque hay diferencias en la forma en que ciertos antioxidantes reaccionan.

Ensayo modificado de Harbertson-Adams (H-A) (UC Davis)

Este ensayo modificado consta de 4 pasos, determinando fenoles totales, taninos totales, proporción LPP/SPP, antocianinas, entre otros compuestos. K. Skogerson, M. Downey, M. Mazza y R. Boulton hicieron un modelo con los datos de fenoles generados por el método de taninos de Harbertson-Adams usando espectroscopia UV-visible, con el objetivo de simplificar la preparación de la muestra y reducir el tiempo de análisis de datos. Se obtuvieron **funciones de predicción** de las distintas clases de fenoles usando

métodos multivariados que son usados posteriormente para determinar los valores correspondientes de fenoles en distintas muestras. (Skogerson, Downey, Mazza & Boulton, 2007). En el caso de este estudio se trabajó de la misma forma, sometiendo los extractos a los distintos reactivos indicados para determinar los componentes de interés. El método H-A tiene el potencial de determinar rápidamente los componentes fenólicos de una muestra de extractos de orujos de fermentación vínica (Gawel, 1998). Estas funciones de predicción y el protocolo del ensayo están incorporados en la planilla Excel y el protocolo en archivo PDF que puede obtener de la página WEB de la Universidad de California: http://boulton.ucdavis.edu/uv-vis/adamsassay.htm.

Ventajas/Desventajas del método Harbertson-Adams (H-A) (UC Davis)

Este método es valorable debido a que puede distinguir entre taninos y pigmentos poliméricos. Requiere de una preparación mínima de las muestras, arrojando múltiples resultados. Otros métodos involucran muchos pasos o son muy dependientes de la muestra. Este método es clasificado como un método del tipo competitivo entre las reacciones SET y HAT, por lo que es un método mixto, lo cual es beneficioso en términos de la medición de los distintos tipos de polifenoles. Además entrega una proporción de pigmentos poliméricos largos versus los pigmentos poliméricos cortos (LPP/SPP), lo cual es de mucha relevancia para la caracterización detallada de cualquier muestra rica en proantocianidinas.

1.6 Método de medición e identificación de polifenoles poliméricos: proantocianidinas en los extractos, técnica MALDI-TOF.

Los extractos analizados en este estudio son abundantes en proantocianidinas. Con el objetivo de identificar acabadamente estos polifenoles poliméricos, se usó la técnica

MALDI-TOF. La presencia de proantocianidinas en los extractos es información proporcionada por estudios en HPLC acoplados a espectrómetros de masa ("electro spray mass spectrometry", ESI-MS) que sugieren que en extractos de uva se presentan catequinas y galocatequinas unidas (poliméricas) y en forma monomérica también (Fulcrand, Remy, Souquet, Cheynier & Moutounet, 1999). En este sentido MALDI-TOF tiene la capacidad de detectar compuestos de alto peso molecular y de detectar patrones de oligómeros con pequeñas diferencias de masas entre ellos. Además en la literatura reciente ha sido usada para identificar taninos (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez & Galán-Vidal, 2009; Monagas *et al*., 2010).

MALDI-TOF (MS) o "*Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight (mass spectrometry)*" hace referencia a la técnica usada para hacer espectrometría de masas en base a una suave ionización que provee un espectro de masas, compuesto por iones de moléculas completas. Esto se logra gracias a que múltiples disparos de un láser impactan la muestra con las moléculas a analizar, las cuales al ser ionizadas vuelan desde su lugar inicial hacia el detector "TOF". Las moléculas vuelan debido a la carga ganada al recibir el láser y a que se encuentran en un ambiente magnético que las fuerza a moverse, por estar ionizadas. Este tiempo de vuelo "time of flight" es medido y traducido a una masa por un programa computacional (Figura 1.12). MALDI-TOF es usado para identificar proantocianidinas y no otros polifenoles debido a que esta técnica se diseñó inicialmente para moléculas de pesos moleculares elevados, como péptidos y proteínas. Los polifenoles, de bajo peso molecular, en principio, están fuera del rango de masas para los que se utiliza MALDI-TOF.

En este sentido, las proantocianidinas, permiten ser medidas con esta técnica debido a su alto peso molecular (PM). Estrictamente, es aceptable la identificación por MALDI a partir de trímeros (masas en torno a 800 m/z), aunque también se acepta las identificación de dímeros (masas en torno a 500 m/z), lo cual se acerca al límite de error permitido en la medición. La razón anterior descarta la medición de la mayoría de los polifenoles, que tienen PM inferior a 500-600 m/z. Sin embargo, es cierto que algunas antocianinas

presentan PM de 500-600 m/z, pero la interferencia suele ser alta en esta magnitud, por lo cual atribuir masas identificadas a antocianinas sería poco confiable.

Distinto es el caso de las proantocianidinas, dado que estas se presentan en secuencias de dímeros-trímeros-tetrámeros, etc., por lo cual, si se identifican el trímero-tetrámero de una familia de proantocianidinas con suficiente intensidad, se puede dar también por buena la señal del dímero, ya que la familia de esa molécula ya ha sido detectada. En este sentido si sólo se tuviera la señal del dímero no se podría estar seguro que es exactamente la molécula que se cree. Por esto, tampoco se miden antocianinas (Mateos-Martín, Fuguet, Quero, Pérez-Jiménez & Torres, 2012). Complementando lo anterior Krueger y colaboradores explican que otras masas adicionales se pueden ver en los resultados MALDI-TOF y estas pueden representar otras substituciones de grupos de la base flavan-3-ol o en los grupos galol o pueden estar relacionadas a otros grupos hidroxilados de la base flavanol (Krueger, Dopke, Treichel, Folts & Reed, 2000).

Por lo anterior MALDI-TOF sirve para medir proantocianidinas, ya que tienen un PM superior al de la mayoría de los polifenoles y, además, el hecho de que no se presentan aisladamente en una muestra de extracto de orujo de uva, sino que se presentan en una secuencia de "*peaks*" correspondientes a la incorporación de una nueva unidad en la cadena, permitiendo obtener una serie de señales. Entre las limitaciones de MALDI-TOF se encuentran la baja reproducibilidad debido a la dificultad para controlar el proceso de cristalización y la producción de iones debido a la fuerte influencia del láser. También se debe notar que la resolución se puede ver afectada para la determinación de las masas, debido a que la energía de las biomoléculas se dispersa durante el proceso de desorción, así como, a la posible unión a la matriz y a la posible fragmentación de la biomolécula. Sin embargo, actualmente es considerada como una de las técnicas más recomendables de espectrometría de masas, especialmente para medir taninos con una heterogeneidad estructural apreciable (Reed, Krueger & Vestling, 2005). Esta información ha sido revisada ampliamente en la literatura, por ejemplo para los compuestos de uva o tomillo (Howell, Reed, Krueger, Winterbottom, Cunningham & Leahy, 2005; Mateos-Martín *et al*., 2012; Touriño, Fuguet, Jáuregui, Saura-Calixto, Cascante & Torres, 2008; Yang *et al*., 2000).

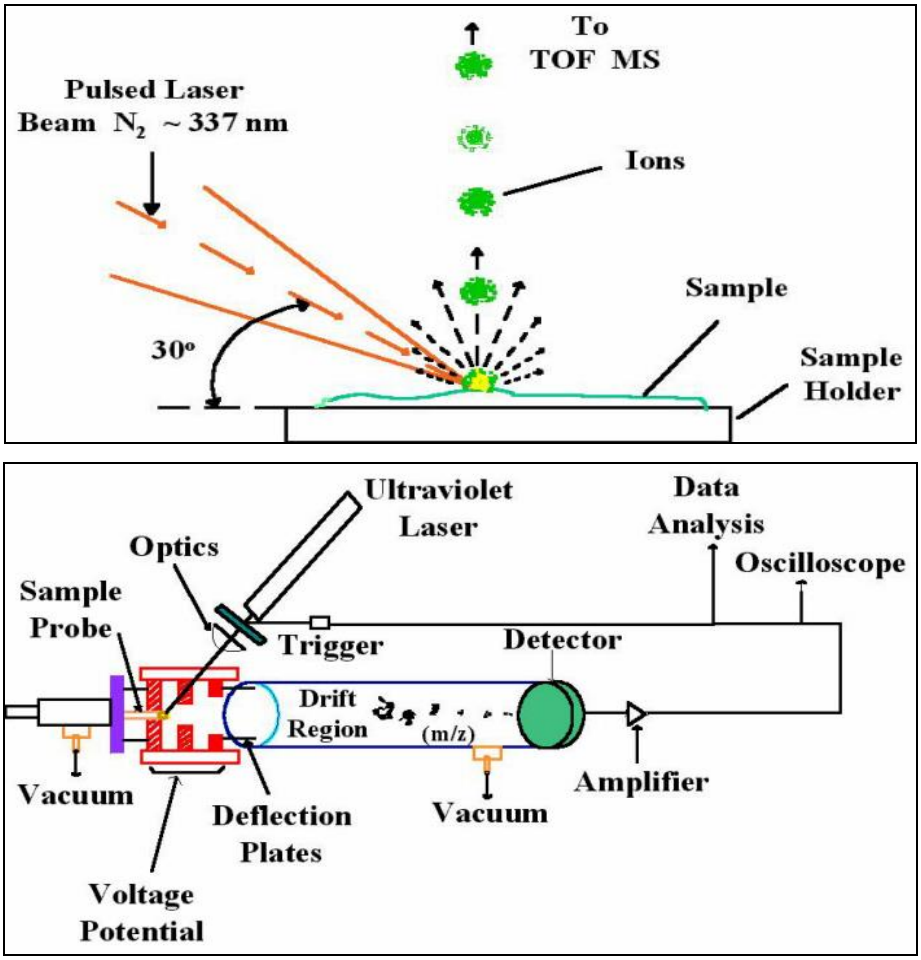


Figura 1.12 Arriba: Disparo láser, ionizante. Abajo: Diagrama simplificado TOF. (http://www.psrc.usm.edu/mauritz/maldi.html)

1.7 Obtención de extractos naturales

En la literatura se describen diferentes tecnologías que permiten aumentar el rendimiento y reducir los costos de la extracción (Spigno *et al*., 2007). Entre estas, la extracción con ayuda de microondas es una tecnología muy estudiada para extraer polifenoles de orujo de uvas, ya que permite recuperar grandes cantidades de fenoles, sin dañar su bioactividad.

Igualmente las técnicas que utilizan ultrasonido han resultado promisorias, sobretodo en cuanto a la conservación molecular de la muestra (porque no degradan mucho las moléculas naturales). Otro punto positivo de estas tecnologías es que además se pueden escalar a nivel industrial (Casazza *et al*., 2010; Cravotto, Boffa, Mantegna, Perego, Avogadro & Cintas, 2008). Distintos investigadores como Mustafa *et al*. (2011) y Casazza *et al*. (2010) han revisado diversas técnicas "limpias" de extracción, concluyendo que la extracción con agua caliente presurizada (HPTE, "*Hot-Pressure-Temperature Extraction*" de sus siglas en inglés) tiene muchas ventajas, en comparación con los métodos tradicionales como extracciones Soxhlet y las extracciones con solventes (Casazza *et al*., 2010). Este tipo de extracción también es conocida en la literatura como extracción con agua a alta temperatura, extracción con agua subcrítica y/o extracción con agua sobrecalentada. El uso de elevadas temperaturas y presiones durante la extracción, no sólo mejora el rendimiento, sino también reduce el tiempo de extracción y consumo de solvente (Mustafa & Turner, 2011). En este tipo de extracción, el agua, se encuentra a presiones suficientes para permanecer líquida a temperaturas que van desde los 100 hasta los 374°C, condición en que el agua presenta baja viscosidad, baja polaridad (baja constante dieléctrica), baja tensión superficial y alta constante de disociación. Estas características permiten solubilizar compuestos apolares, aumentar las tasas de difusión y mejorar la penetración del agua en la matriz sólida. Por estas razones en el método HPTE la presión, la temperatura y el tiempo de extracción son críticos (Ong, Cheong & Goh, 2006), pues por

una parte inciden en la eficiencia de la recuperación de los compuestos de interés y por otra aumentan la tasa de degradación de estos, como por ejemplo de antocianinas.

Como el método HPTE ha demostrado ser muy efectivo en el caso de las proantocianidinas y antocianinas (García-Marino, Rivas-Gonzalo, Ibáñez & García-Moreno, 2006b), es muy recomendable aplicarlo en la extracción de polifenoles, con el fin de conservar el poder anti-radical y antioxidante de los extractos finales, incluso siendo más eficaz para obtener extractos de alta capacidad antioxidante que el método de extracción con metanol u otros solventes o en comparación con la extracción asistida por microondas o ultra sonido. Por otra parte, las características del método HPTE, permiten aumentar la velocidad y eficiencia de extracción (Richter, Jones, Ezzell, Porter, Avdalovic & Pohl, 1996), provocando un mayor rendimiento global. Se ha demostrado que el método HPTE tiene la capacidad de remover los compuestos orgánicos polares y no polares de diferentes matrices (Miller & Hawthorne, 2000) posicionándola como una técnica muy versátil. Por lo anterior, en este estudio se utilizó esta tecnología que ya se ha aplicado con éxito en diversos casos (García-Marino, Rivas-Gonzalo, Ibáñez & García-Moreno, 2006a; Ju & Howard, 2005; Monrad *et al*., 2009).

El presente estudio busca entregar una descripción completa en todos los rangos variables de la extracción, ya que los estudios existentes en la literatura no abarcan todo el espectro crítico de las variables influyentes para la obtención de un extracto interesante en términos de beneficios para la salud. En la tabla del **apéndice E** se muestra una recopilación actualizada de la literatura con respecto a las extracciones hechas para el orujo de uva con esta técnica (HTPE). En efecto, es posible observar distintos diseños experimentales, los cuales deben ser analizados para escoger parámetros que abarquen un rango suficiente y así obtener una perspectiva general de cómo varían los extractos obtenidos según las condiciones de extracción. Al respecto, es posible observar que Delgado-Torre y colaboradores (2012) usan temperaturas demasiado altas en sus experimentos (hasta 240°C), aunque por otro lado realizan ensayos Folin y ORAC lo que proporciona información de la actividad antioxidante (aunque solo con 2 ensayos). También muestran un buen análisis de moléculas, aunque trabajan con uva no fermentada.

Garcia-Marino *et al*. (2006) trabajaron con orujo fermentado, lo que contribuye con el medioambiente, aunque los tiempos de extracción podrían haber más diversos (solo usaron 30 minutos). Monrad *et al*. (2010) aportan uno de los pocos estudios sobre las proantocianidinas y su grado de polimerización en los extractos, lamentablemente no trabajan con orujo fermentado ni distintos tiempos de extracción para analizar las diferencias entre estos parámetros variables en una extracción del tipo HPTE. A su vez el año 2009 Monrad et al. contribuyen a la literatura caracterizando de manera robusta los compuestos presentes en sus extractos mediante HPLC-MS, lo cual es interesante sobre todo por las proantocianidinas identificadas, lamentablemente solo trabajan con presiones bajas (67 atm.) lo cual es una extracción menos efectiva para la obtención de distintos componentes en los extractos.

Otro punto a considerar, sobre la calidad de los extractos de uva, es el grado de polimerización de los taninos condensados que se encuentran presentes. Ya que además de la actividad antioxidante, es importante la distribución presente en la muestra de polímeros polifenólicos con distintos grados de polimerización, ya que estos polímeros son beneficiosos por ejemplo para inhibir ciertas reacciones o posibles daños en el organismo (Pastene, 2009), por esta razón los investigadores han comenzado a utilizar técnicas como MALDI-TOF para describir las moléculas presentes. Al respecto Krueger y colaboradores (2000), usando la técnica MALDI-TOF, aportan el primer estudio que detalla los polímeros obtenidos de subproductos de uva, lamentablemente sus extractos son obtenidos mediante solventes y las condiciones de extracción analizadas no cubren un amplio rango de valores para los parámetros que se pueden variar como la temperatura, presión, tiempo, etc. Lo cual no permite tener una perspectiva general de cómo afectan estos parámetros en la obtención de determinadas distribuciones de moléculas en cada tipo de extracto. Yang *et al*. (2000) y Vivas *et al*. (2004) contribuyen a la descripción de proantocianidinas presentes en los extractos de orujo de uva no fermentada, lamentablemente trabajan con solventes y sin parámetros variables para la obtención de los extractos (temperatura, presión y tiempo). A su vez Hakimuddin y colaboradores (2004) usan la técnica MALDI-TOF para subproductos de uva, aunque no usan distintas condiciones de extracción y solo trabajan

con uva no fermentada. Del mismo modo Ping y colaboradores (2012) describen los taninos y su grado de polimerización mediante MALDI-TOF, lamentablemente en su investigación que no varían las condiciones de extracción, lo cual no permite determinar las condiciones que permiten obtener taninos de mayor grado de polimerización.

Dentro de este análisis, se puede observar que muchos autores utilizan subproductos de la uva para sus investigaciones, pero solo algunos (con una visión ecológica) utilizan orujo de uva fermentado de desecho del proceso de vinificación. Entre estos autores es posible encontrar a Luque Rodríguez y colaboradores (2007) que analizan rangos de temperatura, tiempo y presión adecuados, pero lamentablemente usan solventes y además no caracterizaron las moléculas en cuanto a su grado de polimerización en cada extracto, aunque tienen una robusta descripción de las moléculas mediante HPLC. Del mismo modo Aliakbarian y colaboradores (2012) hicieron un estudio donde usan distintas presiones (79, 114 y 148 atm.) y temperaturas de extracción (100, 120 y 140°C), utilizando orujo de desecho del proceso de vinificación (fermentado) lo cual es un punto de vista muy recomendable ya que apunta a reciclar un desecho, lamentablemente en este estudio se usan pocos tiempos de extracción, lo cual es claramente algo relevante. Además describen escasamente las moléculas obtenidas en las distintas condiciones (en cuanto al grado de polimerización y variedades de polifenoles). Casazza y colaboradores, usando el método de extracción acuosa subcrítica a 110°C, obtuvieron identificaron ácido gálico, hidroxitirosol, ácido para-hidroxibenzoico, ácido vainíllico, ácido siríngico y trans-resveratrol, mostrando que por 30 minutos de extracción arroja un mejor rendimiento que a 90 minutos de extracción (en términos de recuperación de compuestos fenólicos totales) (Casazza at al., 2010). A su vez Cacace y colaboradores (Cacace & Mazza, 2006; Monrad *et al*., 2009) aseveran que si esta técnica se utilizara en la industria, los costos por uso de solventes disminuirían importantemente, así como el consumo de energía. Adicionalmente, Casazza y colaboradores (2011), al comparar extracciones por ultrasonido, microondas y agua caliente presurizada concluyen que para recuperar mayor cantidad de polifenoles totales, o-difenoles y flavonoides, desde las semillas y las pieles de uva, es mejor el agua presurizada a alta temperatura.

En este sentido y con el objetivo de describir el contenido polifenólico, peso molecular (grado de polimerización) y actividad antioxidante en los extractos de orujo de uva es evidente que no hay un estudio que analice en forma completa un amplio espectro de condiciones de extracción para HPTE sin solventes (variando temperaturas, presiones, tiempos y tipo de orujo a extraer: fermentado versus no fermentado). Lo cual representa la forma de obtener una perspectiva suficiente para entender el proceso de extracción de componentes beneficiosos en este tipo de extractos. Precisamente es esto lo que se quiere aportar en este trabajo.

1.8 Hipótesis del trabajo

Los desechos de la industria vínica: semillas, piel, pulpa y escobajo de uva son en general una buena fuente de antioxidantes (Arvanitoyannis *et al*., 2006; González-Paramás *et al*., 2003; Negro *et al*., 2003). En la literatura reciente se destacan propiedades beneficiosas de los extractos de orujo de uva, como por ejemplo el grado de polimerización (largo) de los polímeros fenólicos (**proantocianidinas**) debido a sus propiedades defensivas del sistema digestivo (Pastene, Troncoso, Figueroa, Alarcón & Speisky, 2009) y también por sus propiedades preventivas del cáncer (Nomoto, Iigo, Hamada, Kojima & Tsuda, 2004; Pan, Lai, Wu & Ho, 2011). A su vez es beneficiosa la presencia de **antocianinas** por su rol preventivo del cáncer (Wang & Stoner, 2008).

Dentro de esta línea, también se busca obtener un extracto con alta capacidad antioxidante (índices FRAP y DPPH) debido al efecto preventivo contra el cáncer (Birt, Hendrich & Wang, 2001; Bishayee, 2009; Collins, 2005; Cooke, Steward, Gescher & Marczylo, 2005; Nguyen *et al*., 2004; Simic Michael *et al*., 1994; Wang *et al*., 2008; Zinov'eva & Spasov, 2011). Por otra parte el orujo de desecho podría no ser un desecho ya que la fermentación es un proceso que recibe el orujo que podría ayudar en la extracción de compuestos.

En consecuencia la hipótesis de este trabajo es que La temperatura, tiempo y el pretratamiento fermentativo del orujo son variables que permiten una extracción subcrítica más eficiente de polifenoles de uva en términos de recuperación de compuestos de interés.

1.9 Objetivos del trabajo

El objetivo general del estudio es describir la influencia de la fermentación en el perfil de polifenoles y capacidad antioxidante en los extractos de orujo de uva, obtenidos subcríticamente bajo distintas condiciones de temperatura y tiempo.

Para poder cumplir el objetivo general de este estudio se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Comparar la extracción subcrítica con la extracción convencional según identificación de proantocianidinas (**MALDI-TOF**).
- Determinar efectos temperatura-tiempo-fermentación en el perfil de proantocianidinas presentes en los extractos subcríticos (**MALDI-TOF**).
- Determinar efectos temperatura-tiempo-fermentación en:
    - Capacidad antioxidante del extracto (**FRAP y DPPH**).
    - Cantidad de Fenoles (**Folin**).
    - Cantidad de antocianinas (**H-A**).
    - Proporción de pigmentos polímeros de alto grado de polimerización versus los de pequeño (LPP/SPP, **H-A**).
    - Cantidad de Taninos (**H-A**).

II.-METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este estudio, se muestreó (en dos etapas) orujo Cabernet Sauvignon real, de la Viña Carmen, Región Metropolitana, Chile. Primero se muestreó el orujo del día inicial de la producción vínica (cuando el orujo es recién introducido a la cuba para su fermentación) y el segundo muestreo se efectuó cuando el orujo, después de realizada la fermentación y maceración, es prensado y estuvo listo para ser desechado. En cada muestra se tomaron aproximadamente 12 kg. de orujo, el cual fue reducido a un tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro, por una juguera corriente marca Oster® (ver punto 3 del apéndice A).

2.1 Extracciones

Las extracciones subcríticas del "fluido espeso" fueron efectuadas a 100 atm de presión, cuatro temperaturas (50°, 100°, 150° y 200° Celsius) y por tiempos de 5 y 30 minutos, en el equipo de extracción subcrítica modelo ASE 150, Dionex (Dionex Corp., Sunnyvale, CA), que se muestra en el apéndice A. En cada extracción subcrítica se introdujeron, en la celda de extracción subcrítica, 5 gr de orujo (peso seco) mezclado con arena inerte para evitar la formación de zonas muy aglomeradas de orujo que entorpecen la extracción (tapando la evacuación del extracto desde la celda).

Para comparar los extractos obtenidos con la técnica subcrítica, se realizaron extracciones convencionales con el siguiente protocolo de extracción convencional con solventes:

1. A 5 gr. de orujo (peso seco) se agregan 40 ml de hexano.
2. Se agita por 20 minutos.

3. Se filtra la muestra para separar el hexano y descartarlo. Posteriormente se repite 2 veces este procedimiento.
4. Se seca el orujo por 12 hrs en una campana para extraer los solventes volátiles (temperatura ambiente y oscura).
5. Se extrae con 4 ml de una mezcla acetona : agua : ácido acético (7 : 2,5 : 0,5 v:v:v) con agitación por 20 minutos. Se repite este procedimiento 3 veces, para luego filtrar y obtener el extracto.

El orden de las extracciones se realizó en forma aleatoria, se efectuaron réplicas para que los resultados fueran válidos estadísticamente (resultados en triplicado para cada condición). Posteriormente se sometió cada uno de los extractos a 5 análisis descritos en la literatura: DPPH, FRAP, Folin, H-Adams y MALDI-TOF.

2.2 Metodologías Estadísticas

Se trabajó con un diseño y análisis experimental hecho en el programa computacional Statgraphics Centurion XV. Lo cual consistió en un diseño factorial “4 por 2”, donde se aleatoriza el orden para llevar a cabo los experimentos, para proteger los resultados de variables ocultas. Cada condición de extracción se llevó a cabo en triplicado, lo cual es válido para orujo fermentado y no fermentado. Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre valores obtenidos se usó el análisis de varianza (ANOVA factorial) y la prueba de menor diferencia significativa (LSD) a un nivel de $p \leq 0.05$. Los datos son presentados como las medias de los triplicados junto con su desviación estándar (± DS). Los efectos entre las interacciones fueron analizados con el diagrama de Pareto, reflejando significancias entre interacciones y en qué sentido aportan o afectan un resultado específico. Por último se efectuaron los análisis de correlaciones, con un 95% de confianza entre los distintos ensayos.

2.3 Metodología analítica

2.3.1 Poder antioxidante o de reducción de hierro: FRAP

Procedimiento:

- Se prepara tampón acetato 300 mM pH3.6
- Se prepara una disolución 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCl
- Se prepara una disolución 20 mM de FeCl3*6 H2O
- Se combinan el tampón acetato y las disoluciones 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCl y 20 mM de FeCl3*6 H2O en proporción 10:1:1 (v/v) para obtener el reactivo FRAP.
- Se mide la absorbancia inicial del reactivo a 593 nm.
- Se agregan 3.0 mL del reactivo FRAP en un tubo de ensayo.
- Se adicionan 0.1 mL de la muestra que contiene el compuesto fenólico, previamente diluida en metanol (o en solvente en que se encuentra la muestra).
- Se realiza un blanco mediante el mismo procedimiento, reemplazando la muestra por agua.
- Se lee la absorbancia de las muestras luego de 30 min (4 minutos originalmente) a temperatura ambiente a 593 nm.

El poder antioxidante o de reducción de hierro de las muestras se determina interpolando el resultado en la curva patrón de absorbancia en función de la concentración del antioxidante de referencia, en este caso concentración de ácido ascórbico en mM (eje independiente) versus absorbancia a 593 nm (eje dependiente) (Benzie & Strain, 1996) y se obtiene la capacidad reductora en equivalentes a este antioxidante de referencia (EAA).

2.3.2 Determinación de capacidad antioxidante del extracto: DPPH.

Se toma como base el protocolo de análisis propuesto por von Gadow y col. (1997). Procedimiento:

- Se prepara una solución de DPPH (PM= 394,3) disolviendo 23,5 mg del reactivo en 100 ml de metanol. Esta es la solución base y se guarda a -4 ºC.
- La solución de DPPH a utilizar se prepara diluyendo la solución base en proporción 1:10 con metanol. Se mide su absorbancia a 516nm. (AT=0)
- Se agregan 50 µL de extracto de tomillo a 2 ml de solución de DPPH, se agita y se deja reaccionar por 30 minutos.
- Se mide la absorbancia a 516 nm. luego de los 30 minutos (AT=30) contra blanco de Metanol.
- El porcentaje de inhibición (PI) se calcula usando la ecuación (2):

Este procedimiento se realiza con distintas diluciones del extracto. Con los valores de PI obtenidos para cada dilución entre 30 y 70 %, mediante una regresión, se obtiene el valor de concentración del extracto necesaria para neutralizar en un 50 % los radicales libres (DPPH). El método requiere un tanteo inicial para hallar el rango de diluciones que dan valores de PI cercanos a 50%. La curva dada por la regresión se logra con un mínimo de 5 puntos.

2.3.3 Determinación de los fenoles totales por colorimetría Folin-Ciocalteau.

Para calcular el contenido total de fenoles se utilizan curvas de calibración obtenidas con la elección de un determinado compuesto fenólico como estándar. Los

resultados son expresados en términos de equivalentes molares del compuesto fenólico, idealmente éste debiera ser abundante en la muestra analizada (Shui & Leong, 2002) . El ácido gálico, o ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzóico ($C_7H_6O_5$), ha sido extensamente usado como estándar en la determinación de compuestos fenólicos de diversas muestras de origen vegetal. Con el objeto de facilitar la comparación del contenido de fenoles de distintos extractos de muestra se utilizará el ácido gálico como único estándar, por ser éste un compuesto monomérico abundantemente distribuido en el reino vegetal. Además esta elección se justifica por la elevada pureza, la satisfactoria solubilidad, la adecuada estabilidad y el bajo precio del ácido gálico (Kyoung Chun & Kim, 2004).

- Se agregan 3.75 ml de agua destilada en un tubo de ensayo.
- Se adicionan 0.5 ml de la muestra que contiene el compuesto fenólico (extracto o estándar).
- Se agregan 0.25 ml de reactivo Folin-Ciocalteau diluido con agua destilada en proporción 1/1 v/v (reactivo/agua).
- Se homogeniza y se adicionan 0.5 ml de una solución de carbonato de sodio al 10% p/v.
- Se espera 1 hora a temperatura ambiente
- Se realiza el blanco mediante el mismo procedimiento, reemplazando la muestra por el solvente, en este caso agua destilada.
- Se mide la absorbancia de las muestras a 765 nm.

Entonces la concentración de fenoles totales se hace interpolando el resultado en la curva patrón de absorbancia (eje dependiente, 765 nm) versus concentración de ácido gálico g/L como eje independiente, la interpolación arroja los equivalentes a ácido gálico contenidos en la muestra.

*2.3.4.Ensayo modificado de H-Adams para fenoles (***Modified Harbertson-Adams Assay Prepared by Mark Downey, Kirsten Skogerson & Marica Mazza , 2006*)*

Soluciones requeridas

Vino Modelo (*"model wine"):*

En una botella Schott de 1.0L disolver 5.0gr de bitartrato de potasio en 800mL de agua Deionizada (DI). Enfriar a temperatura ambiente y añadir 120mL de Etanol 96% , Vortex 5 minutos sin calentar, ajustar a pH=3.3 con ácido clorhídico (HCl) y llegar a un volumen 1.0L con agua destilada, manteniendo esto a temperatura ambiente.

Buffer de lavado (*"Washing buffer"*):

En una botella Schott de 1.0L disolver 9.86g de NaCl en 500mL agua deionizada, agregar 12mL ácido acético glacial y ajustar a pH=4.9 con NaOH. Llegar a un volumen 1.0L con agua deionizada, manteniendo esto a temperatura ambiente.

Buffer de resuspensión:

En un vaso precipitado de 1.0L, disolver 50g de SDS en 800mL de agua deionizada, agregar 50mL trietanolamina, revolver despacio para disolver el SDS. Cuando el pH sea estable, ajustarlo a 9.4 con HCl. Transferir a una botella Schott de 1.0L, lavar el vaso precipitado con 100mL de agua deionizada y añadir a la botella Schott Llegar a un volumen 1.0L con agua deionizada (DI), manteniendo esto a temperatura ambiente.

Buffer de Antocianinas:

In En una botella Schott de 1.0L disolver 23g de ácido maleico y 9.93g NaCl en 800mL de agua DI. Ajustarlo a pH=1.8 con NaOH y llegar hasta 1.0L con agua DI. Mantener a temperatura ambiente.

Reactivo de cloruro férrico:

En una botella Schott de 1.0L disolver 2.7g de cloruro férrico en 800mL de agua DI, agregar 800µL de HCl concentrado (12.1 N; 33-37%) y llegar hasta 1.0L con agua DI. Mantener a temperatura ambiente.

Solución de Blanqueo ("Bleach Solution"):

En un tubo Falcon de 50mL, disolver 2.0g de metabisulfito de potasio en 25mL de agua DI, preparar fresco según lo requerido. Descartar lo sobrante.

Preparación de solución de proteína para almacenaje:

En un vaso precipitado de 500mL, disolver 10g de BSA (*"Bovine Serum Albumin"*) en 250mL de agua DI hasta la concentración máxima posible en solución 40mg/mL. Almacenar a –80°C alícuotas de 1.0mL de concentrado (40mg/mL) de la solución de BSA en viales.

Preparación de solución de proteína para uso:

Transferir 1 vial de la solución de proteína (40mg/mL) congelada a -80 a un tubo falco de 50 ml, agregar 39mL de Buffer de lavado y mezclar bien. La concentración final es de 1mg/mL □□suficiente para 40 ensayos.

Lista de reactivos (empresa productora: Sigma S.A.):

SDS ("*sodium dodecyl sulphate*") 100g, Trietanolamina 500mL, FeCl3 100g, BSA ("*Albumin from Bovine Serum*") 10g, NaOH 5.0M, 150mL; ácido HCl(37% HCl) 2.5L; ácido acético glacial 500mL, NaCl 500g, ácido maleico.

Procedimiento

1.- Determinación de diluciones para los análisis de taninos y pigmentos poliméricos: Fenoles totales reactivos al hierro.

1.1 En una cubeta pipetear: 75 µL de muestra, 800 µL de buffer de resuspensión. Vortex e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

1.2 Medir Espectrofotométricamente el blanco con 875µL de buffer de resuspensión a 510nm

1.3 leer las muestras a 510nm (después de 10min de incubación, paso 1.2)

1.4 Agregar 125µL de solución de cloruro férrico a cada cubeta. Vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

1.5 Agregar 125ml de FeCl a la cubeta de blanco, medir espectrofotométricamente con 875µL de buffer de resuspensión + 125µL de solución de cloruro férrico a 510nm.

1.6 Leer las muestras a 510nm (después de 10minutos de incubación, paso1.4). Se descartan todas las cubetas asociadas a este análisis.

1.7 Digitar los valores en la planilla *"Total Iron-Reactive Phenolics worksheet (Wine_Assay.xls)"*

Basado en el valor calculado para fenoles totales reactivos al hierro, la planilla generará las diluciones para análisis de taninos y pigmentos poliméricos. Se usarán estas diluciones en los pasos 2 y 3 de este protocolo.

2. Pigmentos poliméricos, medidas "A" y "B"

Usando los volúmenes de muestra y de "muestra modelo generados en la planilla "*Total Iron-Reactive Phenolics worksheet (Wine_Assay.xls)"* en el paso 2.1.

2.1 en una cubeta agregar:

____µL muestra

____µL muestra modelo

1.0mL de Buffer de lavado.

2.2Vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

2.3 Medir Espectrofotométricamente con1.0mL de buffer de lavado a 520nm.

2.4 leer las muestras del paso 2.1 a 520nm= Medida "A" de la planilla.

2.5 A cada cubeta agregar 120 µL de reactive de lavado. Vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

2.6 Medir Espectrofotométricamente el blanco con1.0mL de buffer de lavado a 520nm.

2.7 Leer las muestras (paso 2.5) a 520nm = Medida "B" de la planilla

Se descartan todas las cubetas asociadas a este análisis.

2.8 Digitar las medidas de “A” y “B” en la planilla

3. Medida “C” Taninos y pigmentos poliméricos

Usando los volúmenes de muestra generados en la planilla “*Total Iron-Reactive Phenolics worksheet (Wine_Assay.xls)*” en el paso 3.1.

3.1 En un tubo Eppendorf de 1.5mL , pipetear:

____µL muestra

____µL muestra modelo

1.0mL de solución de proteína. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente con inversiones ocasionales.

3.2 Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos para formar un pellet.

Parte I

3.3 en una cubeta: 1.0mL de sobrenadante (del paso 3.2), 80µL de reactivo de blanqueo y Vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.4 Medir Espectrofotométricamente el blanco con 1.0mL de buffer de lavado a 520nm.

3.5 Leer absorvancias (paso 3.3) a 520nm= Medida “C”.

Se descartan todas las cubetas asociadas a este análisis.

3.6 Poner datos “C” en la planilla

Parte II

3.7 Cuidadosamente aspirar el sobrenadante resultante del pellet (paso 3.2).

3.8 Agregar 500µL de Buffer de lavado, cerrando el tubo e invertirlo.

3.9 Centrifugar a velocidad máxima por 5 minutos.

3.10 Cuidadosamente aspirar el sobrenadante.

3.11 Agregar 875µL Buffer de resuspensión al pellet (paso 3.9). Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente sin mezclar.

3.12 Después de 20 minutos, Vortex para resuspender el pellet.

3.13 Transferir los pellets resuspendidos pellets a la cubetas. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.14 Medir Espectrofotométricamente el blanco con 875µL de buffer de resuspensión a 510nm.

3.15 Leer muestras a 510nm (paso 3.13)= "*BACKGROUND TANNIN*" de la planilla

3.16 Agregar 125µL de solución de cloruro férrico a cada cubeta. Vortex e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.17 Medir Espectrofotométricamente el blanco con 875µL de buffer de resuspensión + 125µL de solución de cloruro férrico a 510nm.

3.18 Leer la absorbancia de las muestras a 510nm (paso 3.16)= en la planilla el valor de "*FINAL TANNIN*". Se descartan todas las cubetas asociadas a este análisis.

3.19 Se ingresan los valores para "*BACKGROUND TANNIN" y "FINAL TANNIN*" en la planilla

Antocianinas, medida "D"

4.1 Agregar en una cubeta:

400 <L solución de vino muestra modelo.

100 <L muestra

1.0mL Buffer de antocianinas. Vortex e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

4.2 Medir Espectrofotométricamente el blanco con buffer de antocianinas a 520 nm.

4.3 Leer muestras at 520nm (paso 4.1)= Medida "D"

Se descartan todas las cubetas asociadas a este análisis.

4.4 Ingresar datos para valores "D" en la planilla.

Después de todo este procedimiento se pueden obtener los valores para fenoles, taninos LPP/SPP y antocianinas para cada una de las muestras, de la plantilla del ensayo.

2.3.5 MALDI-TOF: identificación de proantocianidinas

En este trabajo el criterio usado para identificar los compuestos presentes en las muestras de extracto de orujo fue similar al usado por Reed en su trabajo (Reed *et al*., 2005), este criterio se usa para determinar que las moléculas que, con mayor probabilidad, se encuentran presentes en la muestra analizada. Esto se basa en un cálculo teórico de la masa de las proantocianidinas, que puede variar en un margen elegido (error experimental aceptable). En este caso se usó un criterio muy estricto con un margen de 3 Daltons (unidades m/z) de diferencia aceptable, aunque en la literatura hay autores que usan más de 4 Daltons.

Reactivos y materiales

El orujo a analizar fue provisto por la viña Carmen, de cultivos de Cabernet Sauvignon en la región central de Chile. Posteriormente se realizó la extracción y estos (los extractos) fueron liofilizados por 72 horas. La matriz MALDI se compone de ácido 2,5-dihidrobenzoico (99%) y cesio trifluoroacetato (6 M solución acuosa) de la marca Sigma Chemical (Saint Louis, MO, USA); cloruro de sodio de Reactivos Carlo Erba (Rodano, Italia).

Para la preparación de la muestra, el extracto liofilizado es disuelto en una solución acuosa 1% ácido trifluoroacético (TFA) (1mL). La solución matriz es preparada disolviendo ácido 2,5-dihidrobenzoico (10 mg) y cloruro de sodio o cesio trifluoroacetato (reactivo catiónizante) en agua 1% TFA (1mL). Alícuotas de muestra y matriz son

mescladas (1:1, v:v), agitadas y puestas en una platina objetivo (2µL). Una vez que el solvente se seca (temperatura ambiente) se analiza la espectrometría de masas con MALDI-TOF (AutoFLEX III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado con un pulsador láser de Nitrógeno (337nm) controlado por el software Flexcontrol 1.1, usado para obtener los datos de espectrometría de masas. El voltaje de aceleración usado fue de 20 kV y el voltaje "reflectron" de 21 kV. El espectro es la suma de 500 disparos con una frecuencia de 200 Hz. Se usó el modo reflectron positivo. Todo esto efectuado en el CSIC, Barcelona, España.

III.-RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de esta investigación, aportan antecedentes para establecer condiciones específicas para obtener un extracto con moléculas de interés *i.e.* moléculas con alta capacidad antioxidante y polímeros polifenólicos de alto grado de polimerización. En este sentido el análisis se enfoca en encontrar las condiciones que minimizan la generación de antioxidantes no naturales y el uso de DPPH (i.e. mayor poder antioxidante según este ensayo) y a la vez, maximizan los fenoles, taninos, antocianinas, LPP/SPP, proantocianidinas existentes y su grado de polimerización e índice de Folin. Las condiciones que se evalúan son: tiempo de extracción, temperatura de extracción y condición del material a extraer: orujo fermentado (F) y no fermentado (N). En cuanto a actividad antioxidante y perfil polifenólico en el orujo de uva, se espera que los extractos de orujo fermentado contengan menores cantidades de fenoles y actividad antioxidante, por la razón de que muchos de estos polifenoles fueron extraídos en la vinificación y por lo tanto quedan en el vino, abandonando el orujo (estos compuestos son responsables de algunas de las propiedades beneficiosas del vino).

En primer lugar se detalla el grado de polimerización y el número de distintas familias de moléculas de proantocianidinas (prodelfinidinas y procianidinas) en los distintos extractos. En segundo lugar se muestran los resultados de los distintos ensayos químicos: cantidad de fenoles, polifenoles, taninos, antocianinas y proporción de polímeros largos versus polímeros cortos (LPP/SPP) y capacidad antioxidante mediante los ensayos FRAP y DPPH. A continuación se presenta el análisis estadístico de las correlaciones e interacciones entre los efectos de temperatura, fermentación y tiempo de extracción. Por último se discuten y analizan estos resultados de una forma global.

3.1 Análisis de masa de proantocianidinas

Los tipos de **proantocianidinas** más frecuentes en la naturaleza y además muy abundantes en las uvas son las **procianidinas** y **prodelfinidinas** (Haslam, 2007). Todas las proantocianidinas se forman como subproductos de la biosíntesis de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles. En este estudio se identificaron proantocianidinas existentes en los diferentes extractos de orujo de uva mediante la técnica MALDI-TOF. Se muestran los análisis de las 16+2 condiciones del diseño experimental: 2 tiempos de extracción, dos tipos de orujos y 4 temperaturas. Además, se realizaron 2 extracciones convencionales de orujo F y NF, para comparar. La tabla 3.1.1 proporciona información sobre los tipos de proantocianidinas identificadas y las condiciones donde se obtuvieron cada una de estas proantocianidinas mencionadas. La tabla 3.1.2 resume estos resultados, indicando el grado de polimerización de las proantocianidinas para cada tipo de orujo y la cantidad de distintas moléculas identificadas (distintos tipos de proantocianidinas).

Tabla 3.1.1 Proantocianidinas en cada condición de extracción, MALDI-TOF.

	Proantocianidinas														
	Procianidinas Sólo EC Tipo B			Procianidinas Con 1 galato Tipo B				Prodelfinidinas 1 (epi)galocatequina Tipo B					Prodelfinidinas Con 1 galato T		
	PD 2	PD3	PD 4	PD 2	PD3	PD 4	PD 5	PD 2	PD3	PD 4	PD 5	PD 6	PD 2	PD3	PD 4
NF-50°-5′				x	x	x		x	x	x	x			x	x
NF-100°-5′				x	x	x		x	x	x	x			x	x
NF-150°-5′															
NF-200°-5′															
NF-50°-30′				x	x	x	x	x	x	x				x	x
NF-100°-30′				x	x	x			x	x	x				
NF-150°-30′															
NF-200°-30′															
NF-E.convencional		x		x	x	x		x	x	x					
F-50°-5′	x	x		x	x	x		x	x	x	x		x	x	x
F-100°-5′	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
F-150°-5′	x			x											
F-200°-5′															
F-50°-30′			x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
F-100°-30′			x	x	x				x	x					
F-150°-30′				x											
F-200°-30′															
F-E.convencional		x	x	x	x	x			x	x					

Tabla 3.1.2 Resumen MALDI-TOF: grado de polimerización y número de distintas proantocianidinas identificadas, bajo distintas condiciones de extracción

		50°C 5min	100°C 5min	150°C 5min	200°C 5min	50°C 30 min	100°C 30 min	150°C 30 min	200°C 30min	Extracción Convencional
NF	PD	5	5	0	0	5	5	0	0	4
	P	10	10	0	0	9	6	0	0	7
F	PD	5	**6**	2	0	**6**	4	2	0	4
	P	12	**14**	2	0	13	5	1	0	7

NF= Orujo No Fermentado. **F=** Orujo Fermentado. **PD**= Grado de polimerización de proantocianidinas. **P**=Número de distintas proantocianidinas encontradas y reconocidas.

De las tablas 3.1.1 y 3.1.2 se observa que a 100°C fueron identificados satisfactoriamente los polímeros de proantocianidinas de mayor grado de polimerización, especialmente con **5 minutos** de extracción. Con **30 minutos** de extracción el grado de polimerización baja, probablemente porque la hidrólisis es favorecida, al estar (los polímeros) más tiempo sometidos a 100°C en solución acuosa. Los polímeros de mayor grado de polimerización, se observaron en dos condiciones:

(i) Orujo fermentado, 100°C , 5 minutos de extracción

(ii) Orujo fermentado, 100°C , 30 minutos de extracción

Los polímeros observados de mayor grado de polimerización (PD) solo se encontraron para el caso de orujo fermentado: la prodelfinidina 1(epi) galocatequina B de grado de polimerización 6. Este es un hecho de importancia puesto que efectuando extracciones convencionales solo se encontraron polímeros de PD 4, tanto para orujo fermentado como no fermentado. A 200°C ninguna de las condiciones probadas registró resultados de ninguna clase conocida de proantocianidinas. Similarmente para 150°C solo fueron encontrados algunos dímeros, probablente la mayoría de los polímeros fueron hidrolizados

a esa temperatura. En general las proantocianidinas encontradas fueron de grado de polimerización parecido para orujo con y sin fermentar, aunque en más casos fue superior el grado de polimerización de extractos de orujo fermentado, probablemente debido a que debido a la fermentación hay una concentración mayor de enzimas pectolíticas que facilitan la extracción de estos compuestos de interés. Para la condición de orujo fermentado, extraído a **100°C** por **5min, se encuentra** el máximo grado de polimerización y la mayor variedad moléculas de proantocianidinas.

Adicionalmente, para cada una de las condiciones de extracción, se muestran en el Anexo C.1 los resultados de las masas de las moléculas identificadas considerando una diferencia o error aceptables, con respecto a las masas reportadas en la literatura para aquellas moléculas. Estos resultados fueron obtenidos de la técnica MALDI-TOF, donde se puede ver el grado de error aceptado para cada masa, la intensidad de la señal másica registrada, la masa observada (FW "obsd"), la masa teórica calculada de la muestra con el aducto (aducto Na "calcd") y la masa teórica de la proantocianidina sin aducto (MW). Posterior a cada tabla se presenta el gráfico que se obtiene al efectuar las mediciones MALDI-TOF. Para distinguir entre compuestos, se usan las tablas de resultados entregadas por el equipo MALD-TOF, ya que de ellas se puede verificar con seguridad la presencia de compuestos (debido al error e intensidad). Los presentes resultados apuntan solo a la presencia de determinadas moléculas, no a su cantidad o proporción en los extractos. Los gráficos presentados son solo una referencia visual de las tablas obtenidas. Ya que el software que los realiza, no grafica todas y cada una de las masas detectadas, sino solo una referencia.

3.2 Análisis Químico de los extractos

La Tabla 3.2.1 presenta los promedios y desviaciones estándar de los resultados para cada uno de los ensayos efectuados a los extractos (realizados en triplicado).

Tabla 3.2.1 Resultados general de ensayos químicos

Condición	Rendimiento Extracción	Frap	DPPH. Radical ip50	Folin	Fenoles totales (H-A)	Antocia-ninas (H-A)	LPP/SPP (H-A)	Taninos (H-A)
NF-5´-50°C	0,14±0,02	1,2±0,16	69,9±13,3	132,1±15,6	77,4±6,8	58,1±11,5	2,4±0,5	57,9±5,4
NF-5´-100°C	0,2±0,02	2±0,29	55,4±9,2	215,8±41,4	334,1±28,9	102,9±19,9	5,3±0,4	214,5±37,3
NF-5´-150°C	0,24±0,02	4±0,65	49,4±5,4	362,2±22,9	168,3±32,6	8,4±12,4	10,1±1,2	322±21,5
NF-5´-200°C	0,29±0,06	3,8±0,59	65±8,2	648±96,5	271,8±22	0±0	2±0,5	75,1±8,2
F-5´-50°C	0,12±0	1,3±0,05	37,6±4,4	151±29,4	79,5±7,7	46,4±9,2	3,5±0,7	151,9±31,1
F-5´-100°C	0,17±0,01	1,7±0,1	36±4	331,1±56,3	117,8±23	60,8±12,1	4,9±0,4	262,4±17,2
F-5´-150°C	0,22±0,04	3,8±0,73	26,9±3,9	667,5±95	675,1±58,1	0±0	13,7±1,9	533,7±55,5
F-5´-200°C	0,3±0,06	4,8±0,3	25,3±2,6	708,5±107,4	345,9±33,6	2,5±4,3	4,8±0,8	223,3±41,9
NF-30´-50°C	0,19±0,02	1,6±0,18	67,3±13,4	239,2±49,2	118,2±23,3	72±13,2	2,2±0,2	188,1±37,2
NF-30´-100°C	0,2±0,04	2,8±0,74	53,2±8,7	267,9±55,5	290,2±54,4	77,9±15,2	2,7±0,5	302,2±35,8
NF-30´-150°C	0,33±0,02	3,4±0,66	75,8±11,3	336,5±63,4	833,5±54	0±0	3,7±0,7	175,2±34,4
NF-30´-200°C	0,36±0,06	3,7±0,68	47,8±9,2	591±75	215,5±42,5	1,1±1,9	0,7±0,1	59±11,2
F-30´-50°C	0,14±0,02	1,2±0,13	52,1±7,4	171,6±33,6	85,4±8,3	32,7±5,3	4,7±0,9	156,1±30,6
F-30´-100°C	0,22±0,04	2,2±0,07	49,2±4,2	409,6±80,8	334,3±29,7	30,4±6	9±1,6	339,9±48,3
F-30´-150°C	0,29±0,06	3,5±0,26	47,5±8,1	584,1±111,3	671,2±48,7	0±0	4±0,5	129,7±25,9
F-30´-200°C	0,34±0,02	4,4±0,38	43,9±8,4	642,8±117,3	118,8±11,1	4,8±4,9	1±0,1	85,4±13,7

Caracterizacón de los extractos: Ensayos de H-Adams y Folin. Ensayos de capacidad antioxidante: DPPH y FRAP. Valores promedio ± desviacion standard.

Rendimiento extracción (gr extracto seco/gr orujo seco)
Frap (mg ácido ascóbico/ gr orujo seco)
DPPH. Radical ip50 (mg extracto seco/L de Dpph)
Folin (mg eq. Acido gálico/gr orujo seco)
Fenoles totales(H-A) (mg/L EC)
Antocianinas(H-A) (mg/L M3G)
LPP/SPP(H-A) (proporcion)
Taninos(H-A) (mg/L EC)

NF-5´=Orujo No Fermentado, extraido por 5 minutos.
F-30´=Orujo Fermentado, extraido por 30 minutos
EC= Equivalentes de catequina
M3G=Equivalentes de malvidin-3-O-glucosido
LPP= Pigmentos poliméricos largos (Large Polymeric Pigments)
Spp=Pigmentos poliméricos cortos (Short Polymeric Pigments)

De la tabla 3.2.1 y las tablas del apéndice C.2.5 se pueden analizar los resultados de los ensayos en las distintas condiciones de extracción (las condiciones variables de extracción son temperatura, tiempo y si el orujo es fermentado o no.

Con respecto a las mediciones de actividad antioxidante, en particular para **Frap**, se observa que las primeras 8 mayores actividades reductoras de fierro son encontradas en

las más altas temperaturas (200 y 150°C). Para la condición de tiempo de extracción se aprecia que los resultados están distribuidos equiparadamente, por lo que el mayor tiempo de extracción no es una variable con incidencia significativa en los resultados. La condición de fermentación del orujo tampoco es una condición con significancia estadística en este respecto, por lo cual es indiferente usar orujo natural o fermentado respecto de la medición del ensayo FRAP.

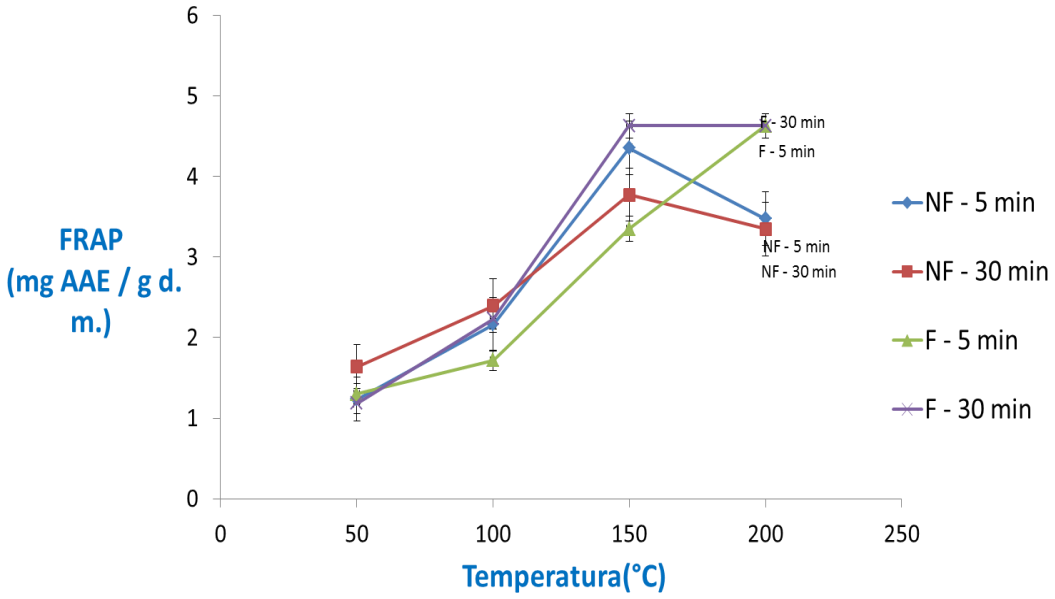


Figura 3.1 Actividad antioxidante: FRAP

Similarmente para la medición con **DPPH**, los extractos con mejores resultados en cuanto a su actividad antioxidante son los extractos procesados a mayores temperaturas, aunque esta tendencia es mucho menos marcada, ya que por ejemplo el tercer mejor resultado en términos de DPPH es para una extracción a 100°C. En cuanto al tiempo de extracción, se aprecia que al extraer por 5 minutos se obtienen, en su mayoría, extractos

más antioxidantes en términos de DPPH. Cabe destacar que para todas las condiciones, dentro del ensayo de DPPH, tienen mayor poder antioxidante los extractos de orujo fermentado.

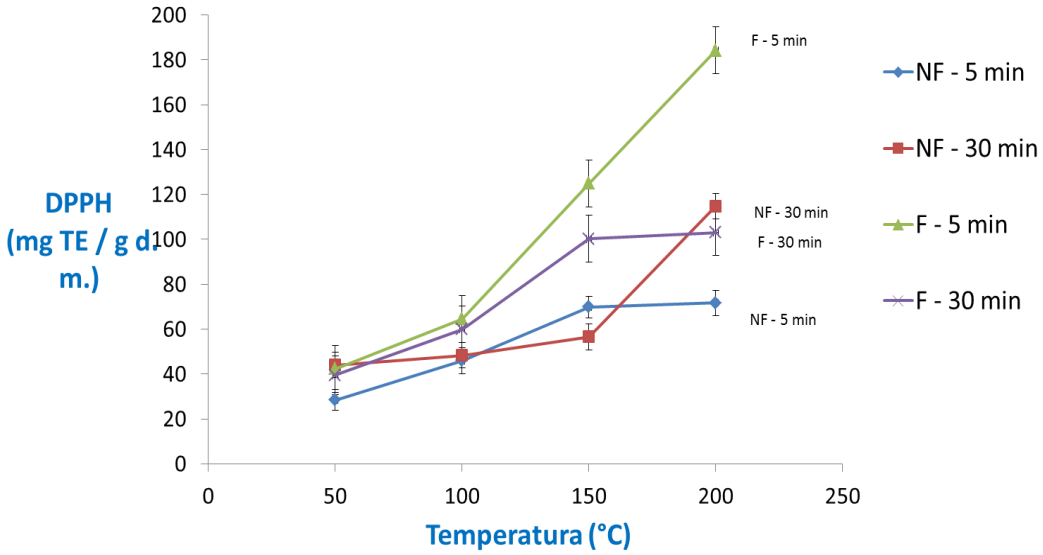


Figura 3.2 Actividad antioxidante: DPPH

Los ensayos de **Folin y Harbertson-Adams**, para la caracterización de **fenoles**, son consistentes con los ensayos ya mencionados, ya que detectan mayor cantidad de fenoles al hacer la extracción a altas temperaturas (150 y 200°C) y para ambas mediciones el orujo fermentado presenta mayor cantidad de fenoles. En particular para **Folin**, se observa que las primeras 6 mayores cantidades de fenoles son encontradas en las más altas temperaturas (200 y 150°C). Para la condición de tiempo de extracción, se aprecia que los primeros tres resultados son extracciones de 5 minutos, aunque desde el 4to al 16vo resultado se distribuyen equiparadamente entre 5 y 30 minutos, por lo que en términos del índice del ensayo de Folin la mayor duración de la extracción no representa una ventaja necesariamente. La condición de fermentación es favorable para los mejores dos resultados

y si consideramos los 16 resultados, es mejor para orujo fermentado que para no fermentado.

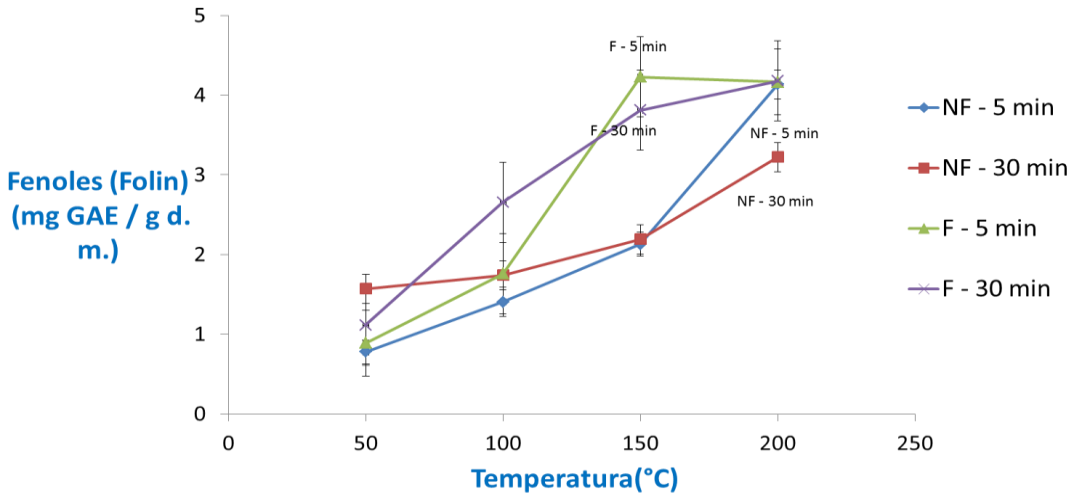


Figura 3.3 Medición de Fenoles

Para la medición de fenoles con el ensayo **H-A**, los 4 extractos con mejor rendimiento en cuanto a su cantidad de fenoles, son los extractos procesados a más altas temperaturas, aunque esta tendencia es menos marcada ya que los mayores resultados en términos de H-A se observan a 150°C y no a 200°C. En cuanto al tiempo de extracción, se aprecia que no es una variable estadísticamente significativa en términos de fenoles medidos por H-A. Cabe destacar que para las 5 primeras condiciones, 4 de ellas son de orujo fermentado.

Asi mismo en la tabla 3.2.1 y las tablas del apéndice C.2.5 se analiza los resultados de la cantidad de antocianinas, proporción de polímeros largos versus cortos (LPP/SPP) y Taninos, todos detectados por el ensayo H-A (Harbertson-Adams).

Para las antocianinas, se observa que las primeras 8 mayores cantidades recuperadas son encontradas en las más bajas temperaturas (50 y 100°C). Para la condición de tiempo de extracción, se aprecia que no tiene un efecto significativo en los resultados. La condición de fermentación es desfavorable para la obtención de las mayores cantidades de antocianinas, aunque las cantidades obtenidas con el orujo fermentado son considerables. En conclusión las **antocianinas** son más abundantes en el orujo no fermentado, aunque se aprecian cantidades significativas en el orujo fermentado de desecho. La temperatura de mayor extracción, respecto de la cantidad de antocianinas recuperadas, son los 100°C.

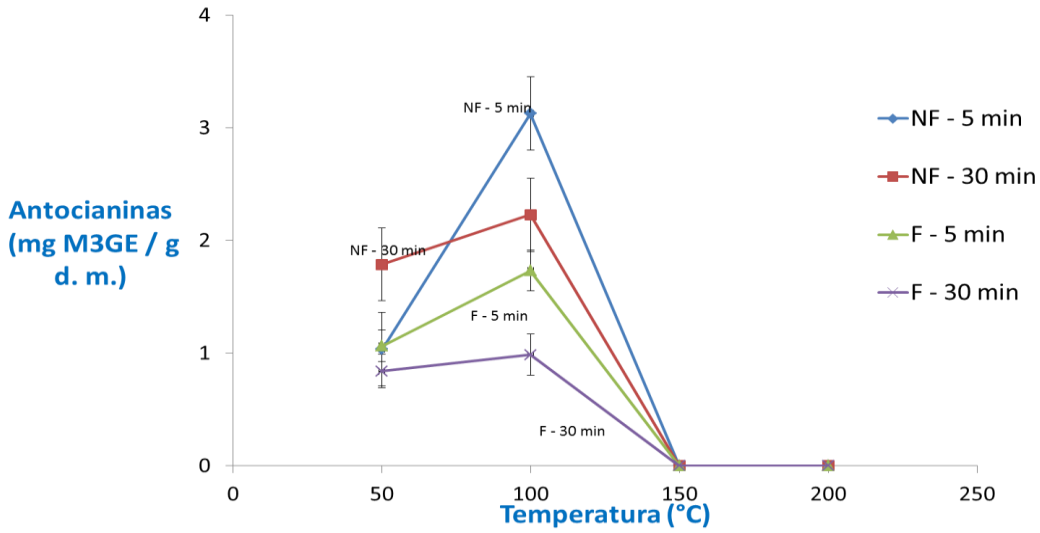


Figura 3.4 Medición de Antocianinas

Para la medición de **LPP/SPP,** con el ensayo H-A, los extractos con mayor proporción de polímeros largos, son los extractos de temperaturas intermedias (100-150°C). En cuanto al tiempo de extracción, se aprecia que es una variable determinante estadísticamente en términos de **LPP/SPP** H-A: es más conveniente extraer por periodos

cortos para obtener mayor proporción de polímeros largos. Cabe destacar que la fermentación influye positivamente en términos estadísticos.

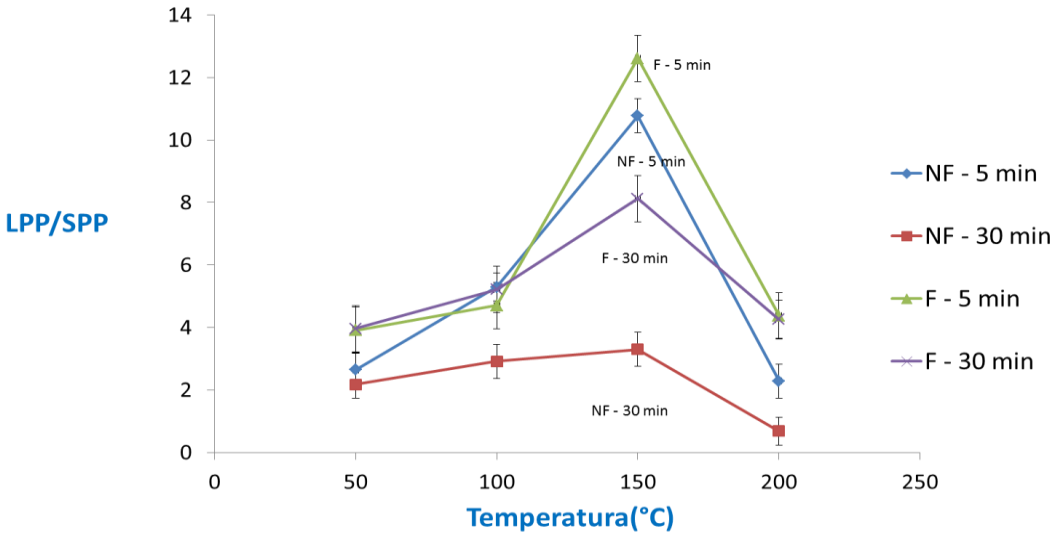


Figura 3.5 Medición de proporción LPP/SPP

En particular para **taninos**, se observa que las mayores cantidades de taninos son también encontradas en temperaturas intermedias (100 y 150°C).

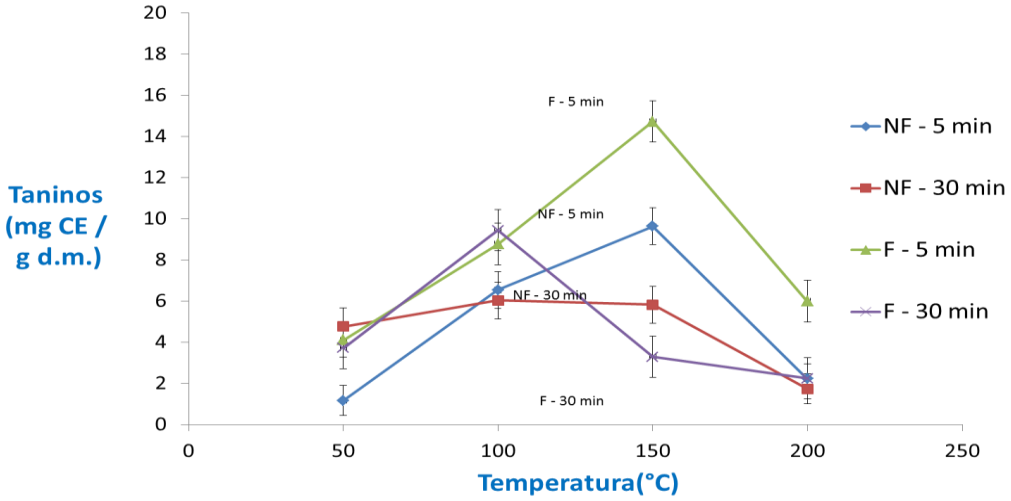


Figura 3.6 Medición de Taninos

3.3 Análisis estadístico de resultados.

Tabla 3.3.1 Resumen de Correlaciones entre los ensayos, con su respectiva significancia estadística.

	DPPH	Folin	Frap	LPP/SPP	Taninos H-A	Fenoles H-A
Antocianinas H-A	0,16	-0,69	-0,67	-0,15	0,05	-0,40
Significancia estad.	72%	100%	100%	68%	25%	99%
DPPH		-0,44	-0,31	-0,37	-0,43	0,01
Significancia estad.		100%	97%	99%	100%	6%
Folin			0,84	0,13	0,10	0,38
Significancia estad.			100%	61%	50%	99%
Frap				0,08	0,08	0,41
Significancia estad.				43%	42%	100%
LPP/SPP H-A					0,87	0,34
Significancia estad.					100%	98%
Taninos H-A						0,34
Significancia estad.						98%

La tabla 3.3.1 contiene las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables (de los 48 datos que se obtuvieron para cada uno de los ensayos). El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1 y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. El segundo número en cada bloque de la tabla es la significancia estadística de las correlaciones estimadas, obtenidas del valor-P. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

- Antocianinas (H-A) y Folin (valor-P=0, i.e. 100% de significancia estadística)
- Antocianinas (H-A) y Frap
- Antocianinas (H-A) y Fenoles (H-A)

- DPPH y Folin
- DPPH y Frap
- DPPH y LPP/SPP (H-A)
- DPPH y Taninos (H-A)
- Folin y Frap
- Folin y Fenoles (H-A)
- Frap y Fenoles (H-A)
- LPP/SPP (H-A) y Taninos (H-A)
- LPP/SPP (H-A) y Fenoles (H-A)
- Taninos (H-A) y Fenoles (H-A)

De la tabla 3.3.1 se aprecia que las antocianinas están muy correlacionadas (coeficiente de Pearson de aproximadamente 0.7) con FRAP y Folin (con significancia estadística de 100%). DPPH se correlaciona débilmente (coeficiente 0.4) con Taninos H-A, LPP/SPP y Folin (con significancia estadística de 100%). Folin se correlaciona fuertemente (coeficiente 0.85) con FRAP (con significancia estadística de 100%) y débilmente con Fenoles H-A. FRAP se correlaciona débilmente (coeficiente 0.4) con fenoles H-A (con significancia estadística de 100%). La proporción LPP/SPP se correlaciona fuertemente con los taninos H-A (coeficiente 0.87 y significancia estadística de 100%) y débilmente con Fenoles H-A. Por último los taninos H-A se correlacionan débilmente con los fenoles H-A (coeficiente 0.34 y significancia estadística de 98%).

Complementariamente al analizar los resultados por ensayo (Tabla C.2 del apéndice), es posible aseverar que para **Frap** el único efecto que siempre es significativo e influye positivamente es la temperatura, por lo cual a mayor temperatura mayor actividad reductora del fierro (FRAP). En el caso de **DPPH** el efecto más importante, en la obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante, es que el orujo sea fermentado, esto ocurre para todos los rangos de temperaturas. Por otro lado cuando el tiempo de extracción es de 30 minutos, la actividad antioxidante se ve afectada negativamente en el

rango de temperatura 100-150-200°C, esto podría deberse a que el reactivo de DPPH es menos sensible en las moléculas remanentes del proceso largo (30´).

En el ensayo de fenoles **Folin** se observa que la mayor temperatura y la fermentación siempre influyen positiva y significativamente. Por otra parte el mayor tiempo de extracción solo influye positivamente en el caso del rango de temperaturas de 50-100°C. La interacción de temperatura-fermentación influye positivamente en el rango de temperaturas de 50-150°C. El ensayo de **H-A de fenoles** coincide con el de Folin excepto en que la temperatura es un efecto negativo en el rango de 150-200°C y adicionalmente las interacciones de tiempo-temperatura y tiempo-fermentación son negativas en el rango de 150 y 200°C. Con respecto a la recuperación de **antocianinas** los únicos efectos que no influyen negativamente son la temperatura y el tiempo, lo cual solo es válido para el rango entre 50-100°C.

La proporción de polímeros largos versus cortos (**LPP/SPP**) se ve favorecida por la temperatura en el rango entre 50-100°C y la fermentación siempre influye positivamente en todas las temperaturas de extracción. El tiempo de extracción no representa un factor significativo para un rango amplio de temperaturas. Finalmente, para los **taninos** las temperaturas entre 150 y 200 afectan significativamente la recuperación. Además la fermentación aporta significativamente en la mayor recuperación de taninos en todas las temperaturas. Por último, la interacción de tiempo y fermentación siempre influye negativamente.

3.4 Análisis y discusión global de resultados

La técnica MALDI-TOF evidencia que al comparar las moléculas presentes en las extracciones subcríticas versus extracciones convencionales (acetona/ácido acético/agua), se obtienen en las subcríticas, más tipos de proantocianidinas y mayores grados de polimerización de las mismas (Figura 3.1). En particular los polímeros de mayor grado de polimerización (PD), se encontraron para el caso de la extracción subcrítica de orujo

fermentado, específicamente la prodelfinidina 1(epi) galocatequina B, de grado de polimerización 6. Por otro lado efectuando extracciones convencionales solo se encontraron polímeros de PD 4, tanto para orujo fermentado como no fermentado.

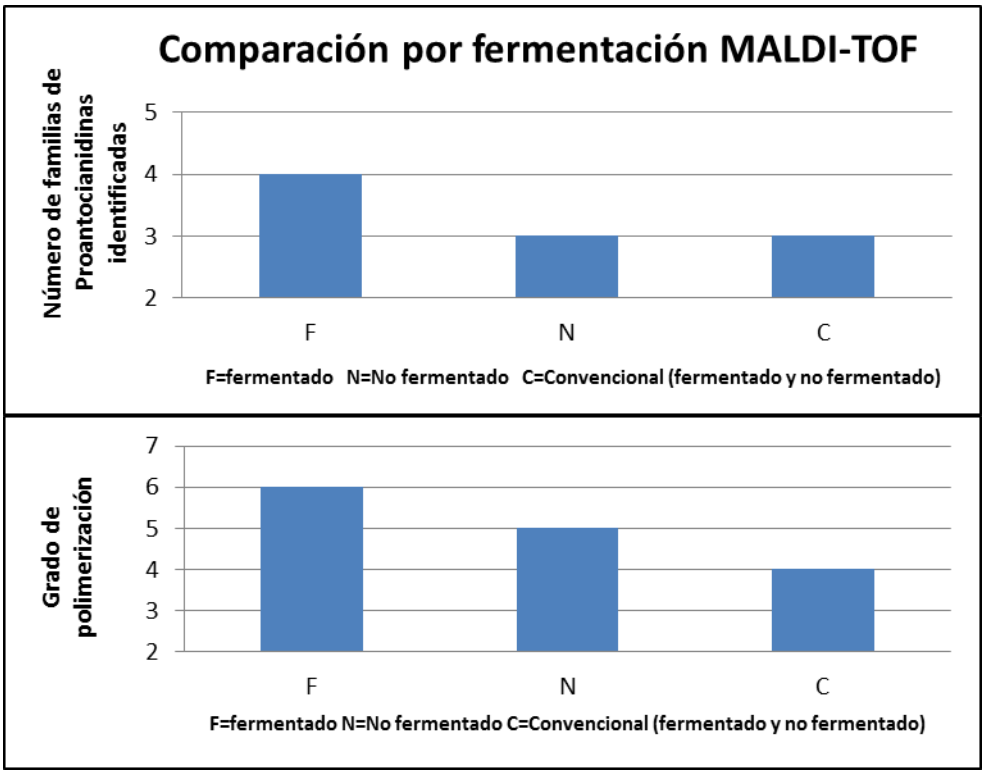


Figura 3.7.- Comparación MALDI-TOF por fermentación.

Desde el punto de vista de la temperatura de extracción, se observa una clara ventaja en el perfil polifenólico (específicamente de proantocianidinas) para 50 y 100°C (figura 3.2). A 200°C ninguna de las condiciones probadas registró resultados de ninguna clase conocida de proantocianidinas. Similarmente para 150°C solo fueron encontrados algunos dímeros pero la mayoría de los polímeros fueron hidrolizados a esa temperatura (sobre todo para orujo no fermentado). En general para los extractos de orujo con y sin fermentar, las proantocianidinas encontradas fueron de PD similar, aunque en más casos fue superior

el PD del orujo fermentado. Para la condición de extracción F-5´100°C, se encuentra el máximo PD y la mayor variedad de moléculas de proantocianidinas.

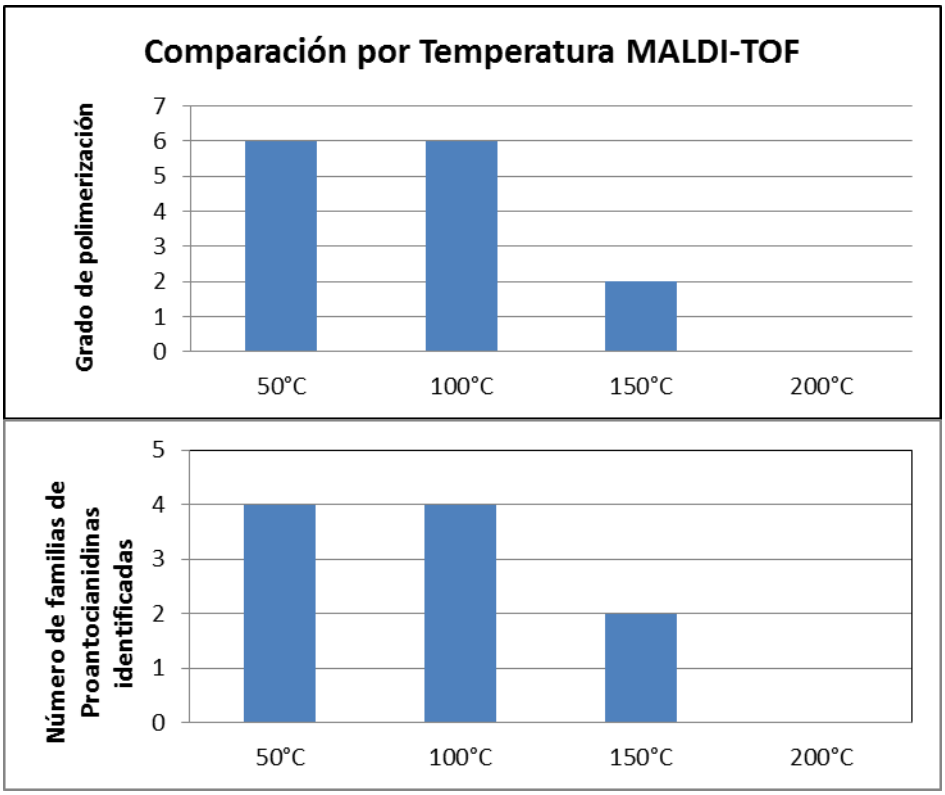


Figura 3.8.- Comparación MALDI-TOF por temperatura

Asimismo, de los resultados del ensayo de H-Adams, se distinguen las 8 mayores cantidades recuperadas de antocianinas a las más bajas temperaturas de extracción (50 y 100°C), por lo que se aprecia que las antocianinas se degradarían a temperaturas de 150°C o más grados Celsius (además esto es visible a simple vista ya que el extracto se torna color pardo). Con respecto al tiempo de extracción, se aprecia que no tiene un efecto determinante en los resultados desde el punto de vista de las antocianinas. Además se aprecia que el orujo no fermentado presenta mayores cantidades de antocianinas. Los resultados obtenidos por el orujo fermentado son menores pero muy considerables en

términos de antocianinas. De hecho, el promedio de antocianinas recuperadas para orujo fermentado es cercano al 50% de las antocianinas que contiene el vino del respectivo orujo, lo cual es muy considerable, ya que se trata de un desecho de la vinificación.

En la medición de LPP/SPP con el ensayo H-A, los extractos con mayor proporción de polímeros largos, son los extractos fermentados y procesados a temperaturas intermedias (100-150°C). En cuanto al tiempo de extracción, se aprecia que es una variable muy determinante estadísticamente en términos de LPP/SPP: es más conveniente extraer por 5 minutos. Para taninos, se observa que las mayores cantidades de taninos son encontradas para extractos de orujo fermentado en temperaturas intermedias (100 y 150°C). Para la condición de tiempo de extracción, se aprecia que es más favorable, en términos de taninos, extraer por tiempos cortos.

Desde el punto de vista de los objetivos planteados para este trabajo, es interesante comparar orujo fermentado y orujo no fermentado, 100°C, extraído por 5 minutos. En este caso y en general los resultados obtenidos mostraron una tendencia inesperada: los extractos de orujo fermentado reportaron igual o mayor cantidad de fenoles, perfil de proantocianidinas y actividad antioxidante. Esto se contradice con lo que se habría esperado, debido a que la vinificación extrae fenoles del orujo, por lo que se esperaban menores índices en todos los ensayos para los extractos orujo fermentado. Se postula que este fenómeno ocurriría debido a que en la fermentación se "prepara" de mejor manera el orujo, para extraerlo subcríticamente. Se postula que esto podría deberse a que en este proceso (vinificación) las enzimas pectolíticas presentes podrían "liberar" (de la matriz de orujo) compuestos, que sin fermentación, no habrían podido extraerse, como por ejemplo proantocianidinas de grado de polimerización 6.

En esta misma línea de análisis se observa que a mayores temperaturas los taninos y fenoles son más abundantes al igual que la actividad antioxidante (FRAP y DPPH), lo cual es coherente con la literatura. Además esto se podría explicar debido a la posible hidrólisis por temperatura de los polímeros de taninos, ya que estos antioxidantes al dividirse en moléculas más pequeñas “ganan” más sitios activos para ejercer su actividad antioxidante.

IV.-CONCLUSIONES

El mayor grado de polimerización es un característica de interés en términos de prevención de algunos tipos de cáncer (Rossi *et al*., 2012), protección del sistema digestivo (Pastene *et al*., 2009), entre otros beneficios reportados. Al analizar los resultados de las moléculas identificadas mediante la técnica MALDI-TOF se aprecia que la forma de procesar el orujo influye significativamente para obtener mayor cantidad y variedad de compuestos, lo cual va en la misma línea de las conclusiones obtenidas en otros estudios (Casazza *et al*., 2010; Shrikhande, 2000; Xu *et al*., 2010) . Además es posible aseverar que el orujo, al estar fermentado, permite que la extracción subcrítica potencie la extracción de compuestos de interés como las proantocianidinas (taninos condensados) y fenoles varios. Lo anterior se sustenta en los resultados obtenidos por métodos de distinta naturaleza, como los métodos químicos (ensayo de Folin, DPPH, FRAP y Harbertson-Adams) y el método de espectrometría de masas MALDI-TOF. Específicamente las proantocianidinas de mayor grado de polimerización se obtienen en condiciones de extracción de 5 minutos de orujo fermentado, a 100°C. En el caso de las antocianinas, son más abundantes en el orujo no fermentado, aunque se aprecian en cantidades considerables en el orujo fermentado de desecho. A su vez, la temperatura, representa un factor significativo para la extracción de antocianinas, dentro de las temperaturas estudiadas en este trabajo, siempre se obtuvieron mayor cantidad de estas moléculas con 100°C de temperatura en la extracción.

Por otra parte a medida se aumenta la temperatura de extracción se aprecia un efecto significativo de mayor actividad antioxidante (FRAP y DPPH). Esta tendencia es evidente al analizar las distintas correlaciones encontradas para los resultados como por ejemplo FRAP–Folin, FRAP-Fenoles (H-A). Plaza y colaboradores explican esta tendencia por la formación de neo-antioxidantes producto de altas temperaturas (Plaza *et al*., 2010b). Monrad y colaboradores también explican este fenómeno argumentado la formación de

productos de la reacción Maillard (Monrad *et al*., 2009), lo cual se condice con los presentes resultados.

Por otro lado se concluye que los métodos DPPH y FRAP, fenoles H-A y Folin son coherentes en cuanto a que las mayores temperaturas permiten extractos más antioxidantes, pero se concluye que estos no son métodos recomendables para caracterizar el perfil polifenólico existente en los extractos, ya que no dan información específica en cuanto a que tipo de molécula está presente ni su grado de polimerización. Por otro lado esto si es caracterizado de buena manera por el método de H-Adams (LPP/SPP) y aun mejor por la técnica MALDI-TOF. Además estas últimas dos técnicas entregan resultados coherentes entre si, a pesar de tener procedimientos muy distintos.

En términos generales, se aprecia que la condición subcrítica y la fermentación del orujo favorecen la extracción en términos de actividad antioxidante y de mayor variedad y polimerización del perfil polifenólico de los extractos. A su vez se observa que menores tiempos de extracción (5 minutos) favorecen la obtención de extractos con proantocianidinas más variadas y polimerizadas. En estudios posteriores sería interesante hacer un análisis de toxicidad de los posibles "neo-antioxidantes" producidos por reacciones las Maillard producto de altas temperaturas (150 y 200°C). Esto para asegurar inocuidad y/o aparición de posibles productos no beneficiosos (por ejemplo HMF, por oxidación de azúcares), ya que los extractos sometidos a estas temperaturas presentan alteraciones cuantitativas en la variedad de moléculas naturales (menor cantidad de proantocianidinas detectadas) y cualitativas, en cuanto a cambios de color y odoración.

REFERENCIAS

Ariyawardana, A., Govindasamy, R., & Simon James, E. (2009). The Natural Products Industry: A Global and African Economic Perspective. *African Natural Plant Products: New Discoveries and Challenges in Chemistry and Quality*, vol. 1021 (pp. 7-28): American Chemical Society.

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

ASOEX, C. (2011). EXPORTACION DE FRUTA FRESCA SEGÚN REGION DESTINO, TEMPORADA 2010-2011.

Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology, 224*(3), 274-283.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry, 239*(1), 70-76.

Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, *90*(2-3), 157-177.

Bishayee, A. (2009). Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prevention Research*, *2*(5), 409-418.

Box, J. D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*, *17*(5), 511-525.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*(56), 317–333.

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2006). Pressurized Low Polarity Water Extraction of Biologically Active Compounds from Plant Products. *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 135-155): CRC Press.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(5), 749-760.

Carmona, M. J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J. M., & Thomas, M. R. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, *59*(10), 2579-2596.

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, *100*(1), 50-55.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*(4), 859-871.

Collins, A. R. (2005). Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer*, *41*(13), 1923-1930.

Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Marczylo, T. (2005). Anthocyans from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer*, *41*(13), 1931-1940.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., & Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*(5), 898-902.

Chang, E., Lee, W., Cho, S., & Choi, S. (2003). Proliferative effects of flavan-3-ols and propelargonidins from rhizomes of <i>Drynaria fortunei</i> on MCF-7 and osteoblastic cells. *Archives of Pharmacal Research*, *26*(8), 620-630.

Chen, J. H., & Ho, C.-T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(7), 2374-2378.

Di Stefano, R. F. R. (2008). High performance liquid Chromatography Analysis of grape and wine polyphenols. *Hyphenated techniques in Grape and Wine Chemistry*

FAO (2012). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTAT, data 2010*.

Ferreira, D., Marais, J. P. J., & Slade, D. (2003). Phytochemistry of the mopane, Colophospermum mopane. *Phytochemistry*, *64*(1), 31-51.

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, *73*(2), 627-650.

Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(13), 1925-1941.

Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Study of Wine Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(3), 1023-1028.

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006a). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 44-50.

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006b). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1–2), 44-50.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *4*(2), 74-95.

González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2003). Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(2), 234-238.

Hagerman, A. E. (2011). The Tannin Handbook.

Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., & Downey, M. O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, *131*(3), 999-1008.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, *59*(2), 205-215.

Haslam, E. (2007). Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, *68*(22-24), 2713-2721.

Howell, A. B., Reed, J. D., Krueger, C. G., Winterbottom, R., Cunningham, D. G., & Leahy, M. (2005). A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*, *66*(18), 2281-2291.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841-1856.

Iriti, M., & Faoro, F. (2010). Bioactive Chemicals and Health Benefits of Grapevine Products. In: W. Ronald Ross, & R. P. Victor, *Bioactive Foods in Promoting Health* (pp. 581-620). San Diego: Academic Press.

Ju, Z., & Howard, L. R. (2005). Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Food Science*, *70*(4), S270-S276.

Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5207-5213.

Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A. d., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, *13*(1), 8-17.

Krueger, C. G., Dopke, N. C., Treichel, P. M., Folts, J., & Reed, J. D. (2000). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Polygalloyl Polyflavan-3-ols in Grape Seed Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(5), 1663-1667.

Kyoung Chun, O., & Kim, D.-O. (2004). Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. *Food Research International*, *37*(4), 337-342.

Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 513-539.

Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*(2), 125-132.

Mateos-Martín, M., Fuguet, E., Quero, C., Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. (2012). New identification of proanthocyanidins in cinnamon (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(3), 1327-1336.

Meagher, L. P., Beecher, G. R., Flanagan, V. P., & Li, B. W. (1999). Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinoresinol, in Flaxseed Meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(8), 3173-3180.

Miller, D. J., & Hawthorne, S. B. (2000). Solubility of Liquid Organic Flavor and Fragrance Compounds in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *45*(2), 315-318.

Monagas, M., Quintanilla-López, J. E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., & Lebrón-Aguilar, R. (2010). MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 358-372.

Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K., & Mauromoustakos, A. (2009). Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4014-4021.

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, *703*(1), 8-18.

Nakatani, N. (1997). Antioxidants from spices and herbs *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications . By Fereidoon Shahidi*.

Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). *Bioresour. Technol.*, *87*(null), 41.

Nguyen, T. T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T., Huynh, T. H., & Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*, *25*(5), 647-659.

Nomoto, H., Iigo, M., Hamada, H., Kojima, S., & Tsuda, H. (2004). Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutrition and Cancer*, *49*(1), 81-88.

Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., & Kawakami, Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). *IUBMB Life*, *42*(2), 361-370.

Nurmi, T., Heinonen, S., Mazur, W., Deyama, T., Nishibe, S., & Adlercreutz, H. (2003). Lignans in selected wines. *Food Chemistry*, *83*(2), 303-309.

Ong, E. S., Cheong, J. S. H., & Goh, D. (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, *1112*(1–2), 92-102.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619-4626.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(11), 3122-3128.

Pan, M. S., Lai, C. S., Wu, J. C., & Ho, C. T. (2011). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Molecular Nutrition and Food Research, 55*(1), 32-45.

Pastene, E., Troncoso, M., Figueroa, G., Alarcón, J., & Speisky, H. n. (2009). Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of Helicobacter pylori Urease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(2), 416-424.

Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010a). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International, 43*(10), 2341-2348.

Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010b). Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International, 43*(4), 1123-1129.

Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(11), 3273-3279.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 4290-4302.

Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3396-3402.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition, 50*(3), 586-621.

Reed, J. D., Krueger, C. G., & Vestling, M. M. (2005). MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry, 66*(18), 2248-2263.

Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, *68*(6), 1033-1039.

Rodrigues, A., Ricardo-Da-Silva, J. M., Lucas, C., & Laureano, O. (2012). Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chemistry, 131*(3), 907-914.

Rossi, M., Lugo, A., Lagiou, P., Zucchetto, A., Polesel, J., Serraino, D., Negri, E., Trichopoulos, D., & La vecchia, C. (2012). Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: A case-control study in Italy. *Annals of Oncology, 23*(6), 1488-1493.

Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., & Drilleau, J. P. (1999). Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties (Malus domestica sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(12), 4847-4853.

Saucier, C. T., & Waterhouse, A. L. (1999). Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47*(11), 4491-4494.

Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research, 53*(SUPPL. 2), 310-329.

Servan-Schreiber, D. (2008). Anticancer : a new way of life. *Carlton North, Vic. : Scribe Publications, 2008*.

Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International, 33*(6), 469-474.

Shui, G., & Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, 977*(1), 89-96.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology, 82*(2), 291-295.

Simic Michael, G., & Jovanovic Slobodan, V. (1994). Inactivation of Oxygen Radicals by Dietary Phenolic Compounds in Anticarcinogenesis. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*, vol. 547 (pp. 20-32): American Chemical Society.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture, 16*(3), 144-158.

Skogerson, K., Downey, M., Mazza, M., & Boulton, R. (2007). Rapid Determination of Phenolic Components in Red Wines from UV-Visible Spectra and the Method of Partial Least Squares. *American Journal of Enology and Viticulture, 58*(3), 318-325.

Sobolev, V. S., Horn, B. W., Potter, T. L., Deyrup, S. T., & Gloer, J. B. (2006). Production of Stilbenoids and Phenolic Acids by the Peanut Plant at Early Stages of Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(10), 3505-3511.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, *81*(1), 200-208.

Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, *101*(2), 449-457.

Tebib, K., Rouanet, J. M., & Besançon, P. (1997). Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet. *Food Chemistry*, *59*(1), 135-141.

Touriño, S., Fuguet, E., Jáuregui, O., Saura-Calixto, F., Cascante, M., & Torres, J. L. (2008). High-resolution liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify polyphenols from grape antioxidant dietary fiber. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *22*(22), 3489-3500.

USDA (2011). Fresh Deciduous Fruit (Apples, Grapes, & Pears): World Markets and Trade. *United States Department of Agriculture*.

Wang, L.-S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, *269*(2), 281-290.

Welford, L., & Breton, G. E. (2008). Bridging the GAP : Phytotrade Africa's Experience of the Certification of Natural Products. *Diversity*, *18*, 69-79.

Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(6), 1173-1183.

Xie, D. Y., & Dixon, R. A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis - Still more questions than answers? *Phytochemistry*, *66*(18 SPEC. ISS.), 2127-2144.

Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, *119*(4), 1557-1565.

Yamakoshi, J., Kataoka, S., Koga, T., & Ariga, T. (1999). Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis, 142*(1), 139-149.

Yang, Y., & Chien, M. (2000). Characterization of Grape Procyanidins Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(9), 3990-3996.

Zinov'eva, V., & Spasov, A. (2011). Mechanisms of the anticancer effects of plant polyphenols. I. Blockade of initiation of carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*, *5*(2), 113-123.

A P E N D I C E S

APENDICE A: PROFUNDIZACION DE ALGUNOS PUNTOS

1. Los taninos provienen de los fenilpropanoides que son una amplia familia de compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas desde el aminoácido fenilalanina. Su nombre deriva de los seis átomos de carbono, fenil aromáticas y la cola de propeno de tres carbonos del ácido cinámico, que se sintetiza a partir de fenilalanina en el primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides. Los fenilpropanoides se encuentran en todo el reino vegetal, donde sirven como componentes esenciales de una serie de polímeros estructurales. Proporcionan protección contra la luz ultravioleta, la defensa contra herbívoros y patógenos, y median en las interacciones planta-polinizador como pigmentos y compuestos de aroma floral.

2. Las proantocianidinas cuando se ven expuestas a ácidos fuertes dan lugar a antocianidinas (generalmente cianidinas y delfinidinas).

3. Con esta molienda se obtuvo un “fluido espeso” del que se tomó 6 muestras, midiendo los pesos secos respectivos. Posteriormente se obtuvo el peso seco promedio para el “fluido espeso”. Con este valor se calcularon cuantos gramos húmedos del “fluido espeso” son necesarios para extraer equivalentemente a 5 gr de peso seco en cada extracción subcrítica realizada.

APÉNDICE A: EQUIPAMENTO

Figura A.1 Extracción Subcrítica modelo ASE 150, Dionex (Dionex Corp., Sunnyvale, CA)

Figura A.2 Juguera marca Oster de 10 velocidades.

APÉNDICE B: METODOLOGÍA

En la Figura B.1 se muestra el desecho industrial de orujo de uva.

Figura B.1 Izquierda: orujo post fermentación. Derecha: el mismo orujo, prensado para desecho.

APÉNDICE C: RESULTADOS

C.1: RESULTADOS MALDI-TOF (DE CADA CONDICIÓN)

La tabla C.1 muestra en detalle los resultados de la técnica MALDI-TOF. Se observa el grado de error aceptado para cada masa, la intensidad de la señal másica registrada, la masa observada (FW "obsd"), la masa teórica calculada de la muestra con el aducto (aducto Na "calcd") y la masa teórica de la proantocianidina sin aducto (MW).

Tabla C.1 Tipos de proantocianidinas encontradas en los extractos

Proantocianidina identificada:	PD	FW (obsd)	Aducto Na (calcd)	MW (calcd)	También reportada en:
Procianidina Sólo EC Tipo B	2	600,99	601,04	578,05	Yang et al., 2000
Procianidina Sólo EC Tipo B	3	889,18	889,10	866,11	Yang et al., 2000
Procianidina Sólo EC Tipo B	4	1177,35	1177,16	1154,17	Yang et al., 2000
Procianidina Con 1 galato Tipo B	2	753,14	753,05	730,06	Yang et al., 2000
Procianidina Con 1 galato Tipo B	3	1041,19	1041,11	1018,12	Yang et al., 2000
Procianidina Con 1 galato Tipo B	4	1329,23	1329,17	1306,18	Yang et al., 2000
Procianidina Con 1 galato Tipo B	5	1617,26	1617,23	1594,24	Yang et al., 2000
Prodelfinidina 1 (epi)galocatequina Tipo B	2	617,09	617,03	594,04	Perret et al, 2003
Prodelfinidina 1 (epi)galocatequina Tipo B	3	905,23	905,09	882,10	Perret et al, 2003
Prodelfinidina 1 (epi)galocatequina Tipo B	4	1193,30	1193,15	1170,16	Perret et al, 2003
Prodelfinidina 1 (epi)galocatequina Tipo B	5	1481,36	1481,21	1458,22	Perret et al, 2003
Prodelfinidina 1 (epi)galocatequina Tipo B	6	1769,41	1769,27	1746,28	Perret et al, 2003
Prodelfinidina Con 1 galato Tipo B	2	769,19	769,04	746,05	Perret et al, 2003
Prodelfinidina Con 1 galato Tipo B	3	1057,25	1057,10	1034,11	Perret et al, 2003
Prodelfinidina Con 1 galato Tipo B	4	1345,32	1345,16	1322,17	Perret et al, 2003
Prodelfinidina Con 1 galato Tipo B	5	1633,37	1633,22	1610,23	Perret et al, 2003

EC= Epicatequina PD=Grado de polimerización ("Polimerization degree").

EC= Epicatequina PD=Grado de polimerización ("Polimerization degree").

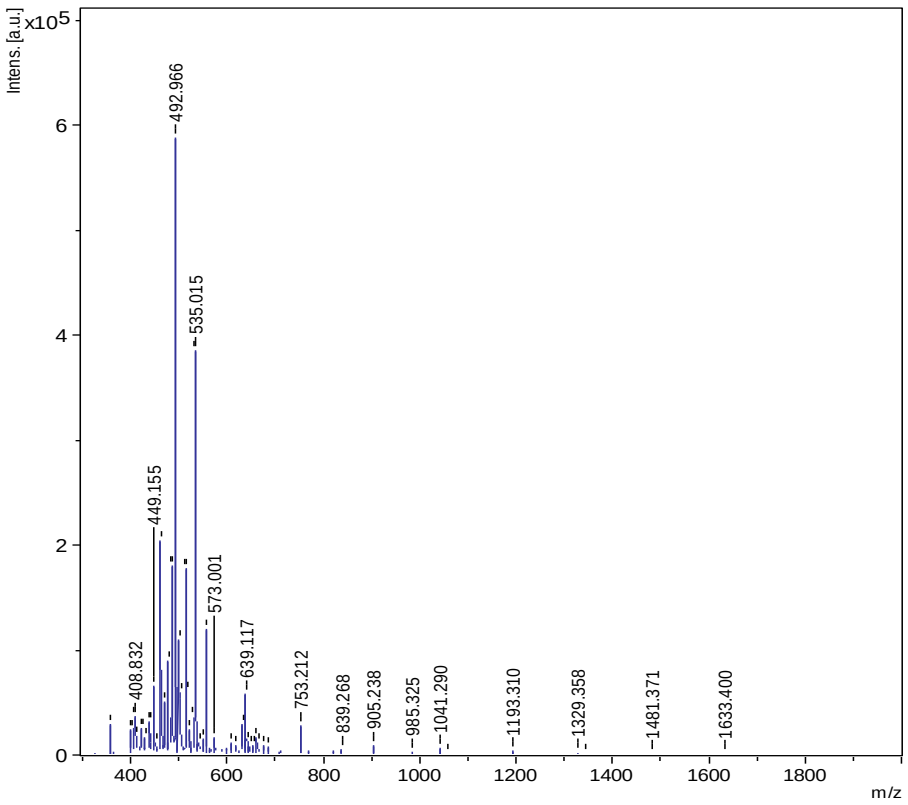
Resultado MALDI-TOF (de cada condición):

Orujo No Fermentado:

Condición 50°C y 5´de extracción

Condición 50°-5´

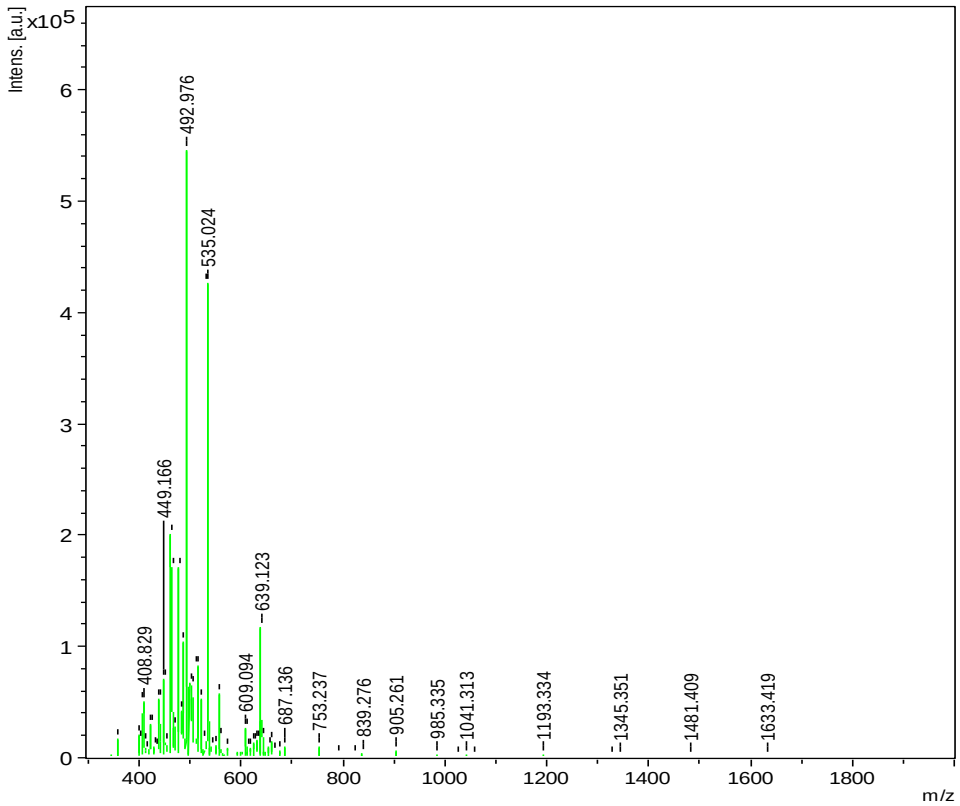
Error	IntensidA d	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	clase de Proantocianidina
0,16	26084	753,2122536	753,0499	730,06	ProciA nidinA tipo 1B con gA lA to, GrA do de polimerizA ción: 2
0,18	5993	1041,289847	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,19	1689	1329,358474	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,03	7498	617,0641131	617,0299	594,04	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,15	8698	905,2382407	905,09	882,10	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,16	2835	1193,309891	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,16	1083	1481,37076	1481,2099	1458,22	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,17	1589	1057,267778	1057,0999	1034,11	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,17	936	1345,330009	1345,1599	1322,17	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,18	489	1633,400046	1633,2199	1610,23	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
0,07	27279	633,0852347	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,18	8698	905,2382407	905,0599	882,07	Procianidina con 2 tipo B galatos, Grado de polimerización: 2



Condición 100°C y 5´de extracción

Condición 100°-5´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,19	9312	753,2367578	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,20	2356	1041,312758	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,21	726	1329,382373	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,04	7054	617,0699813	617,0299	594,04	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,17	5805	905,261484	905,0899	882,1	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,18	1983	1193,333845	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,20	794	1481,408906	1481,2099	1458,22	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,19	1201	1057,289611	1057,0999	1034,11	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,19	751	1345,351214	1345,1599	1322,17	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,20	469	1633,418881	1633,2199	1610,23	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
0,06	4794	615,0657022	615,0099	592,02	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo A, Grado de polimerización: 2
0,09	5828	631,0923089	630,9999	608,01	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización:2
0,08	13593	633,1015498	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2

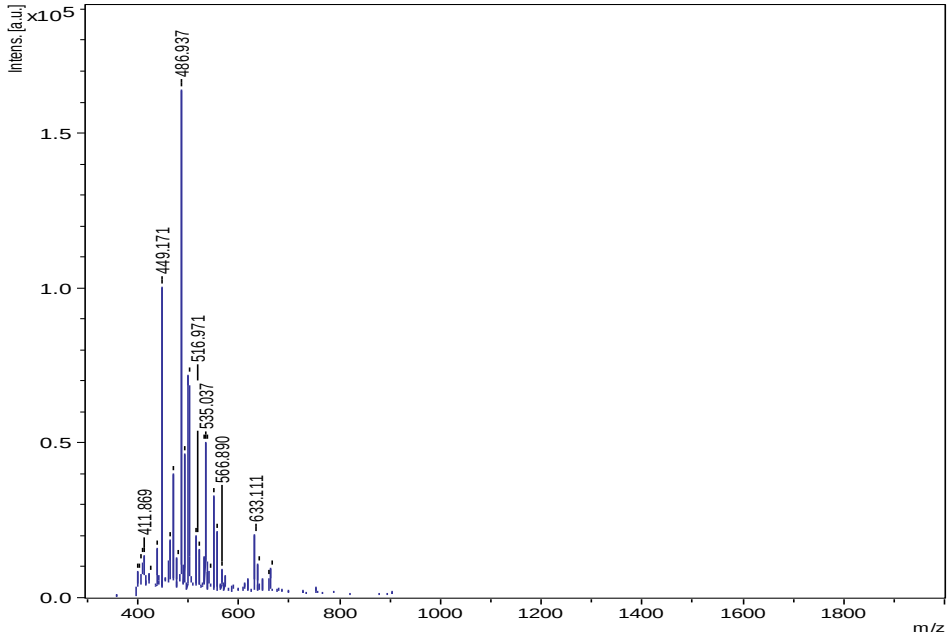


Condición 150°C y 5´de extracción

Condición

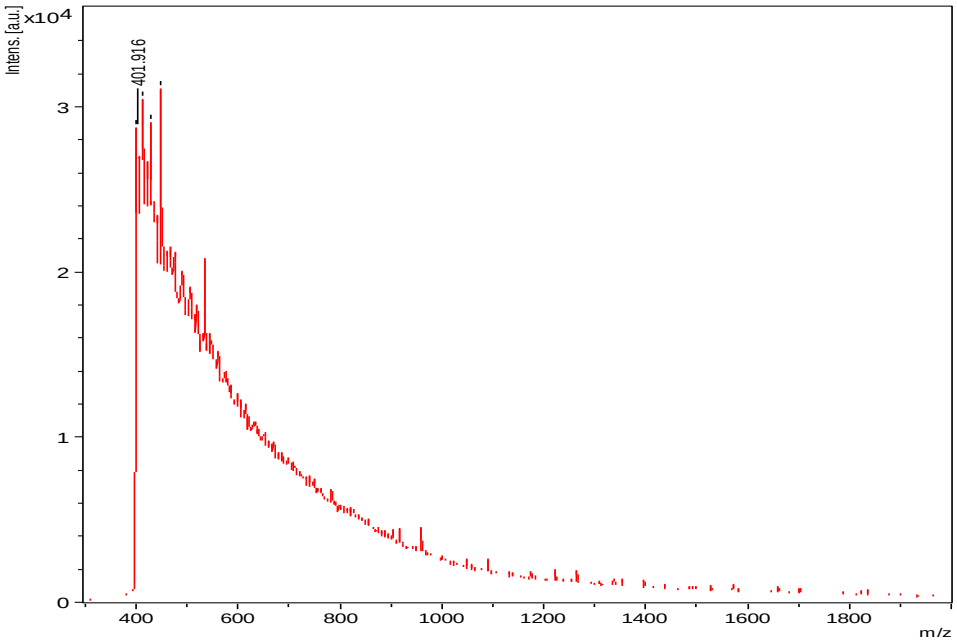
150°-5´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
-0,13	7311	566,8897773	567,0199	544,03	Propelargonidina 2 (epi) afzelequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2
0,09	19341	633,111463	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2



Condición 200°C y 5´de extracción

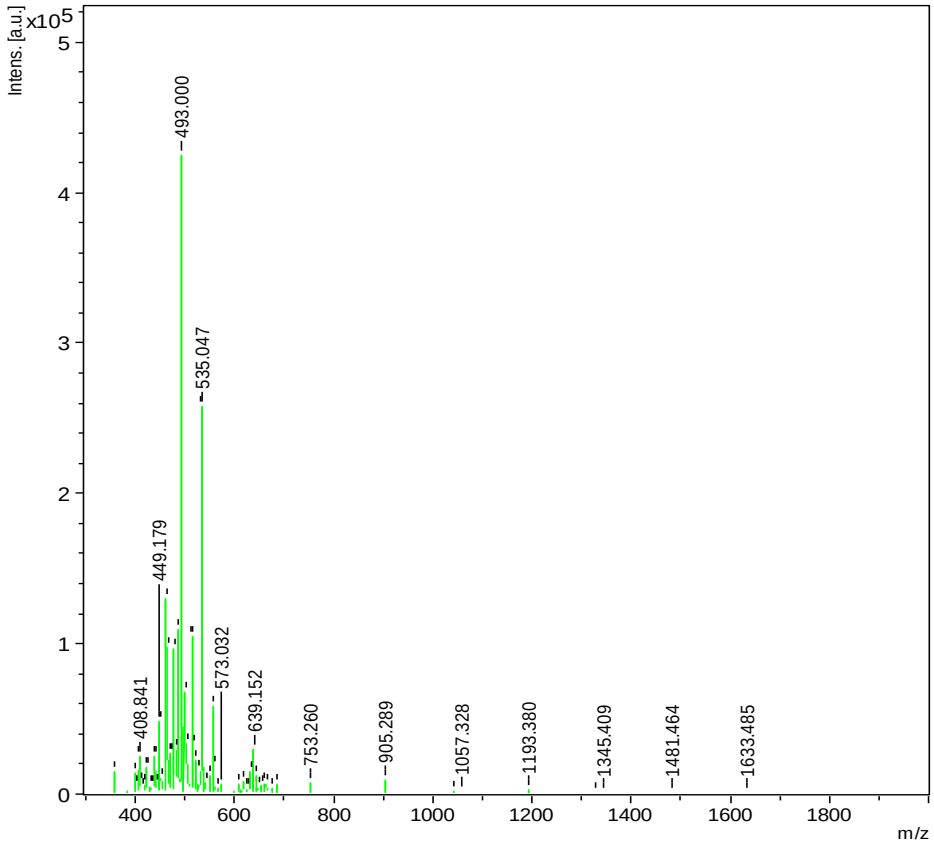
Condición 200°-5´	Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina



Condición 50°C y 30´de extracción

Condición 50°-30´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,21	6839	753,2601489	753,05	730,0601	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,25	1672	1041,355943	1041,11	1018,1201	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,26	514	1329,42641	1329,17	1306,1801	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,06	6979	617,0857972	617,03	594,0401	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,20	8760	905,2887168	905,09	882,1001	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,23	2394	1193,379551	1193,15	1170,1601	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,25	753	1481,463796	1481,21	1458,2201	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,23	1677	1057,328311	1057,1	1034,1101	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,25	1049	1345,40939	1345,16	1322,1701	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,26	495	1633,484631	1633,22	1610,2301	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
-0,10	3561	566,9179993	567,02	544,0301	Propelargonidina 2 (epi) afzelequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2
0,11	13107	633,1261144	633,02	610,0301	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,28	753	1481,463128	1481,18	1458,1901	Procianidina con 2 galatos tipo B, Grado de polimerización: 4

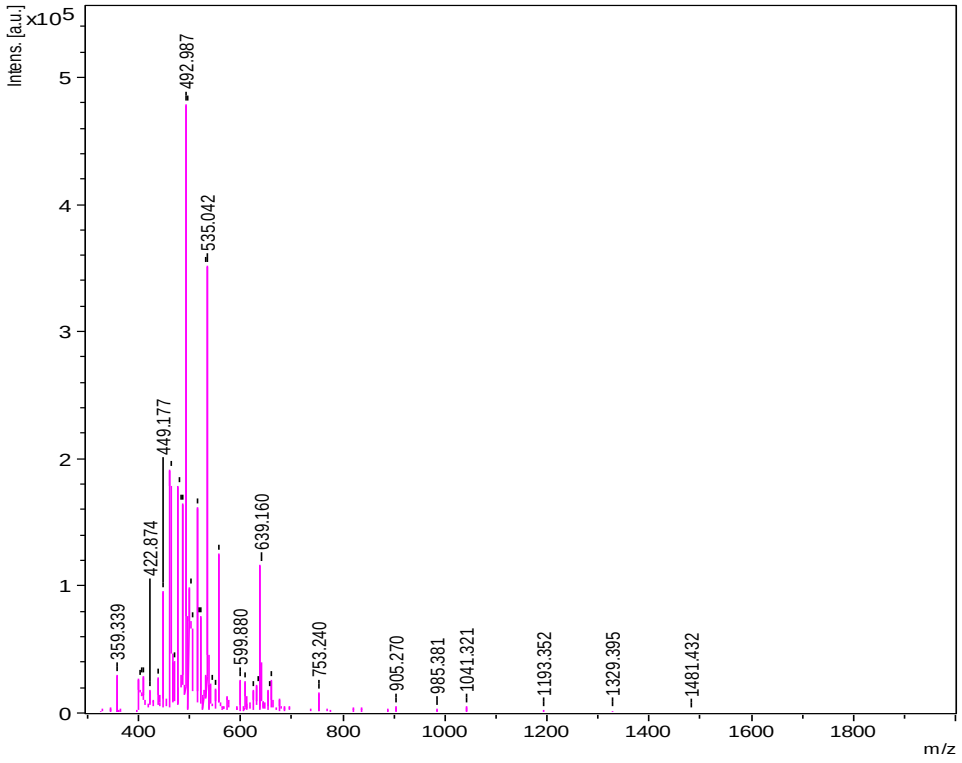


Condición 100°C y 30´de extracción

Condición

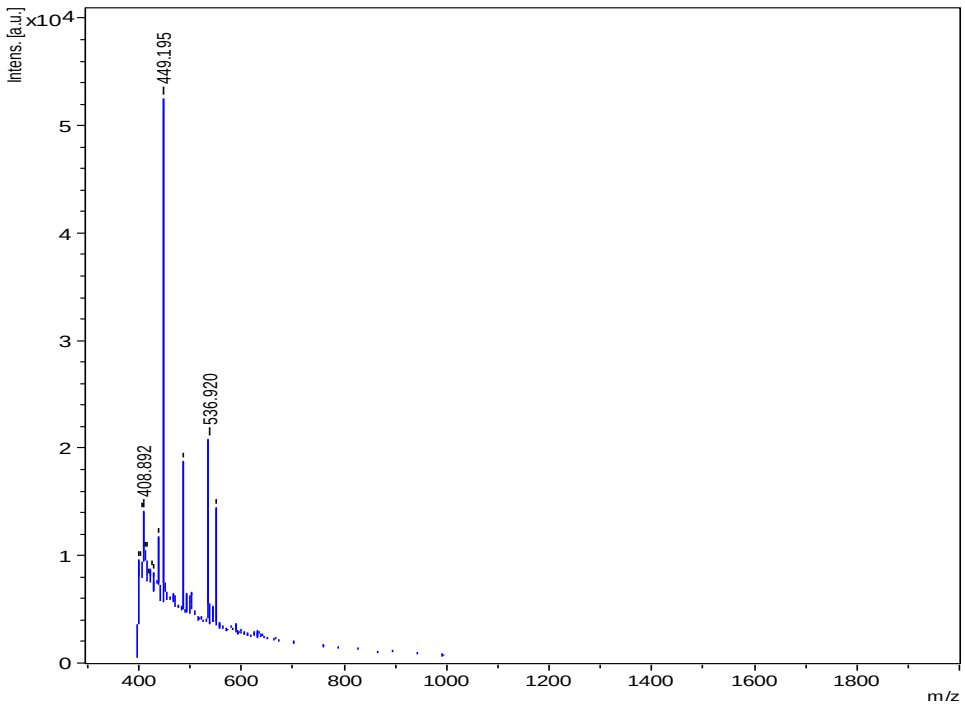
100°-30´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,19	15362	753,239695	753,05	730,0601	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,21	4522	1041,320597	1041,11	1018,1201	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,23	1480	1329,395295	1329,17	1306,1801	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,18	4426	905,270367	905,09	882,1001	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,20	1640	1193,352205	1193,15	1170,1601	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,22	768	1481,431672	1481,21	1458,2201	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,10	20235	633,1211546	633,02	610,0301	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2



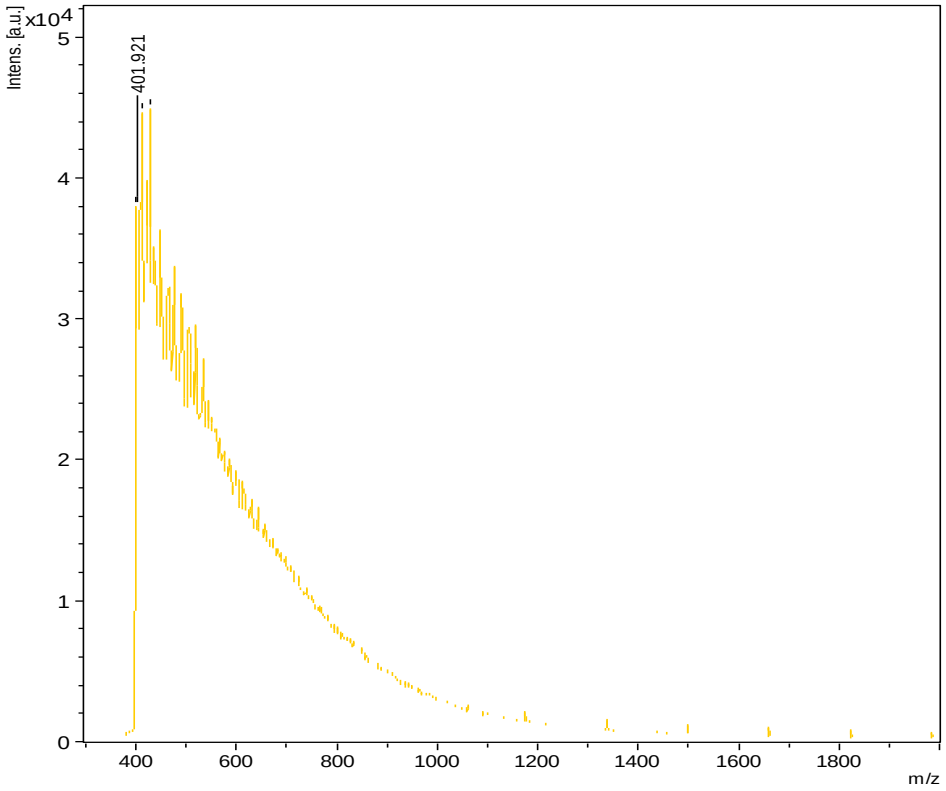
Condición 150°C y 30´de extracción

Condición 150°-30´	Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina



Condición 200°C y 30´de extracción

Condición 200°-30´	Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina

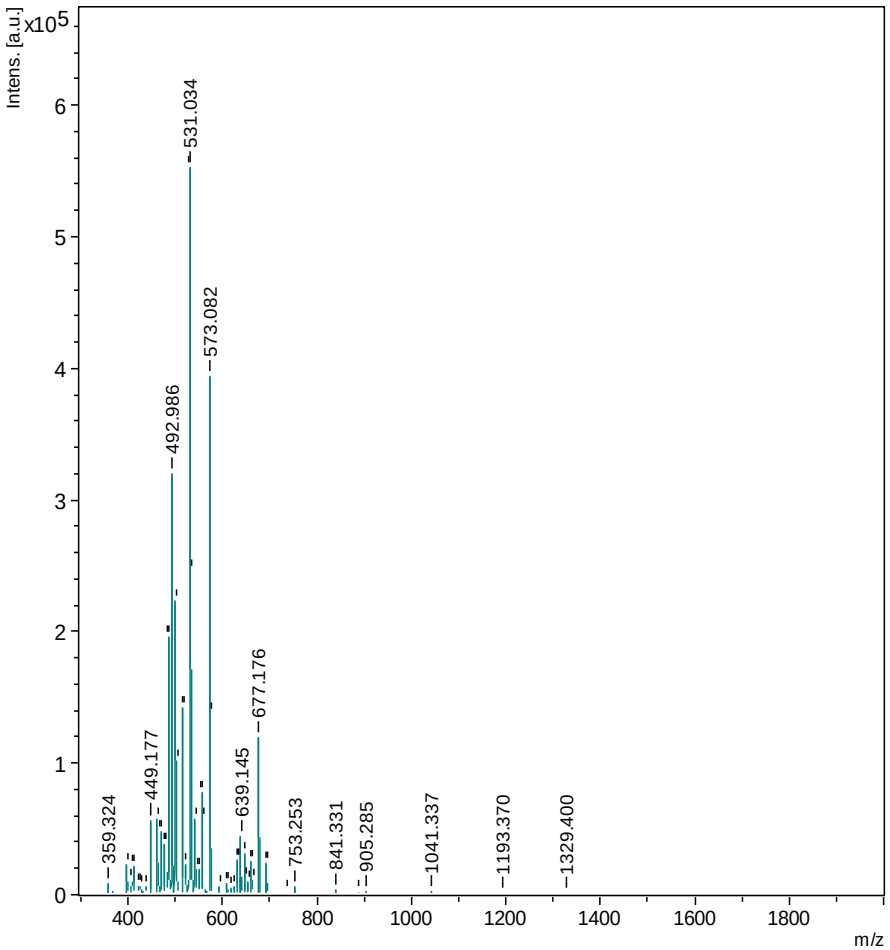


Condición Temperatura ambiente, extracción convencional con solvente:

Condición

E.convencional

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (calcd)	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,21	1613	889,3093617	889,1	866,1101	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,20	6115	753,252664	753,05	730,0601	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,23	2201	1041,336689	1041,11	1018,1201	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,23	671	1329,399715	1329,17	1306,1801	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,08	4357	617,1081361	617,03	594,0401	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,20	2074	905,2852299	905,09	882,1001	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,22	709	1193,370263	1193,15	1170,1601	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,24	2469	737,2921691	737,05	714,0601	Propelargonidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,12	5649	631,1201599	631	608,0101	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2
0,10	24232	633,122128	633,02	610,0301	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2

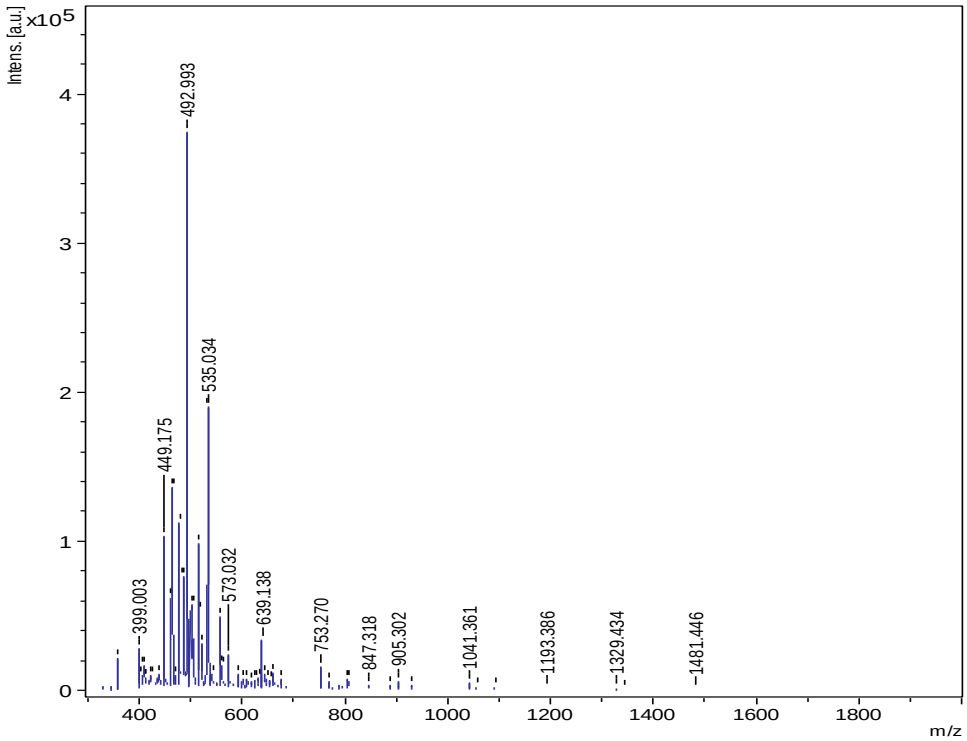


Orujo Fermentado

Condición 50°C y 5´de extracción

Condición 50°-5´

Error	IntensidA d	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	clase de Proantocianidina
0,04	5048	601,075752	601,0399	578,05	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 2
0,23	2629	889,326021	889,0999	866,11	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,22	14386	753,270153	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,25	4142	1041,36124	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,26	1038	1329,4341	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,06	4739	617,086538	617,0299	594,04	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,21	4752	905,301701	905,09	882,1001	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,24	1444	1193,38566	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,24	617	1481,44609	1481,2099	1458,22	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,21	4758	769,25195	769,0399	746,05	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,24	2157	1057,33705	1057,0999	1034,11	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,26	716	1345,4175	1345,1599	1322,17	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,09	6216	633,114802	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2
0,24	4752	905,301701	905,0599	882,07	Procianidina con 2 tipo B galatos, Grado de polimerización: 2

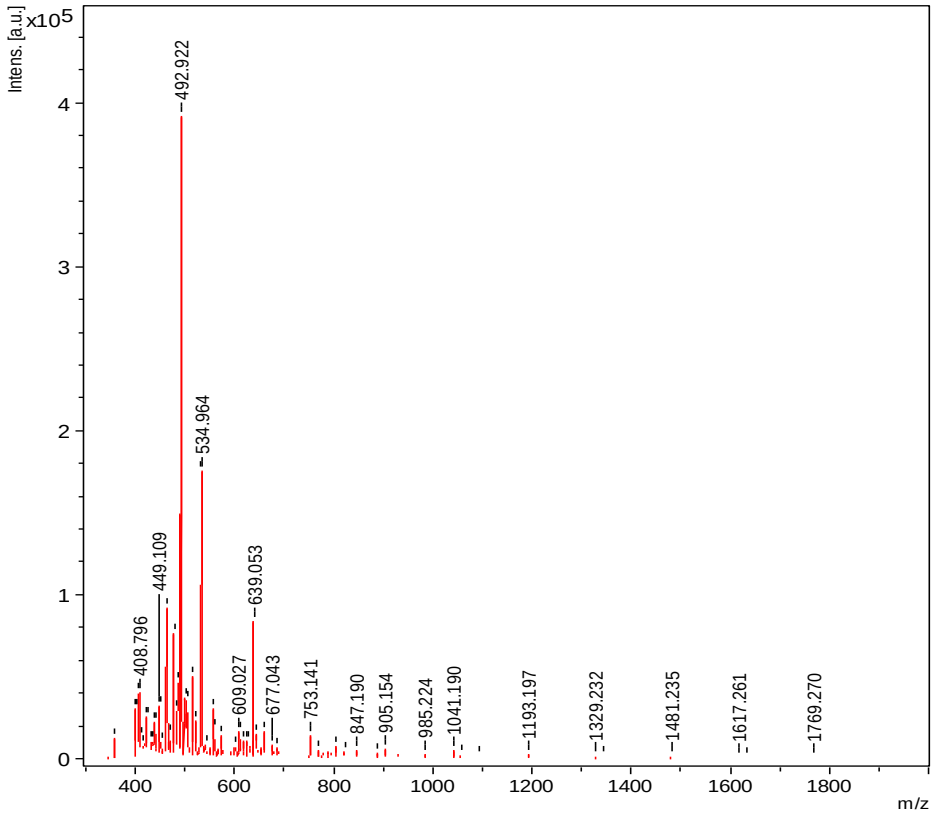


Condición 100°C y 5´de extracción

Condición

100°-5´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
-0,05	6284	600,992209	601,0399	578,05	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 2
0,09	2860	889,184973	889,0999	866,11	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,09	13156	753,141005	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,08	4187	1041,18983	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,06	1519	1329,23212	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,03	754	1617,26055	1617,2299	1594,24	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
0,06	4715	905,154238	905,0899	882,1	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,05	1885	1193,19677	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,02	996	1481,23463	1481,2099	1458,22	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,00	568	1769,26988	1769,2699	1746,28	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 6
0,08	4086	769,117873	769,0399	746,05	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,07	1852	1057,16697	1057,0999	1034,11	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,05	1221	1345,20733	1345,1599	1322,17	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,01	653	1633,23388	1633,2199	1610,23	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5

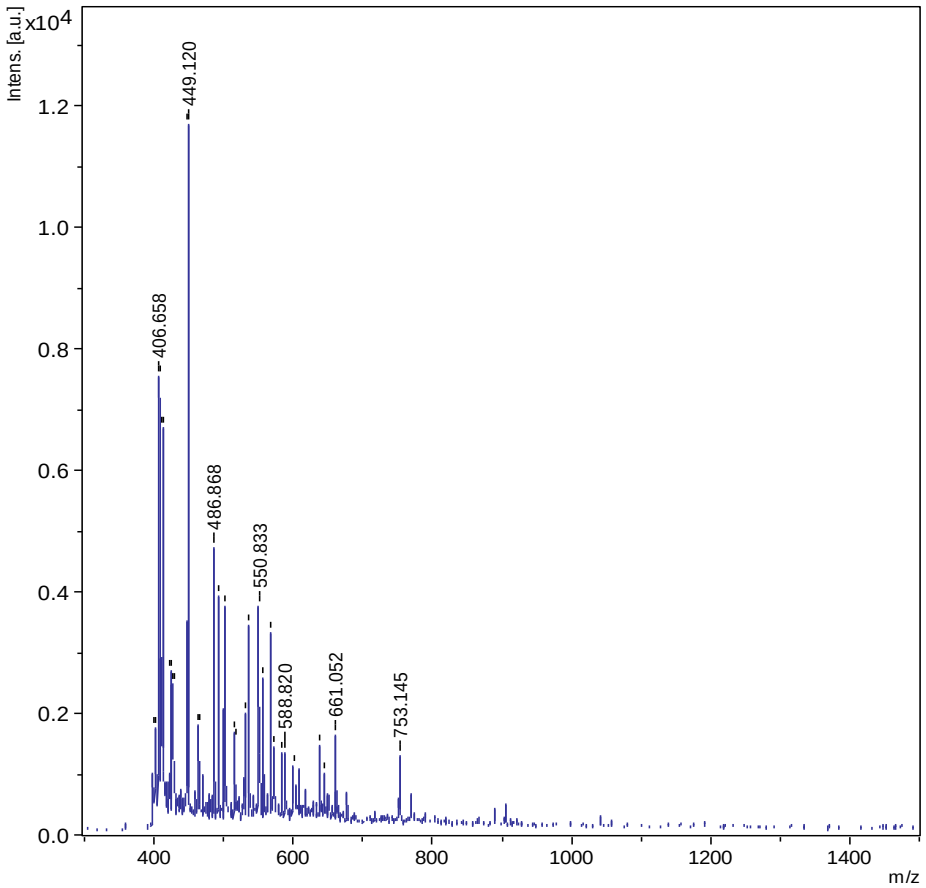


Condición 150°C y 5´de extracción

Condición

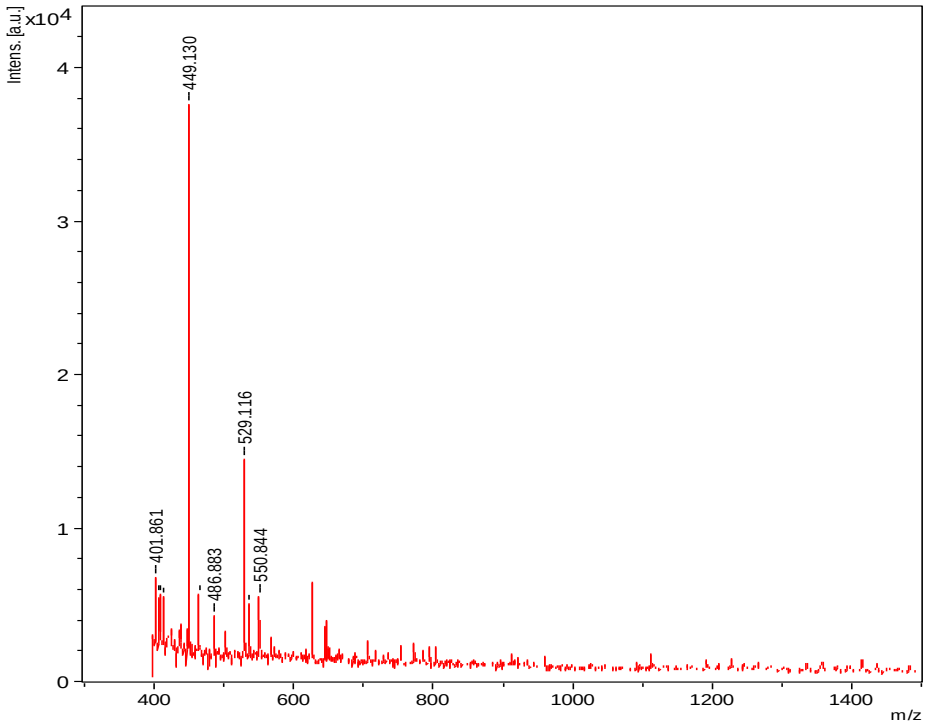
150°-5´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
-0,04	862	600,995416	601,0399	578,05	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 2
0,10	1094	753,145108	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
-0,20	3199	566,819692	567,0199	544,03	Propelargonidina 2 (epi) afzelequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2
-0,22	1164	582,797677	583,0199	560,03	Propelargonidina 1 (epi) afzelequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2



Condición 200°C y 5´de extracción

Condición 200°-5´	Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina

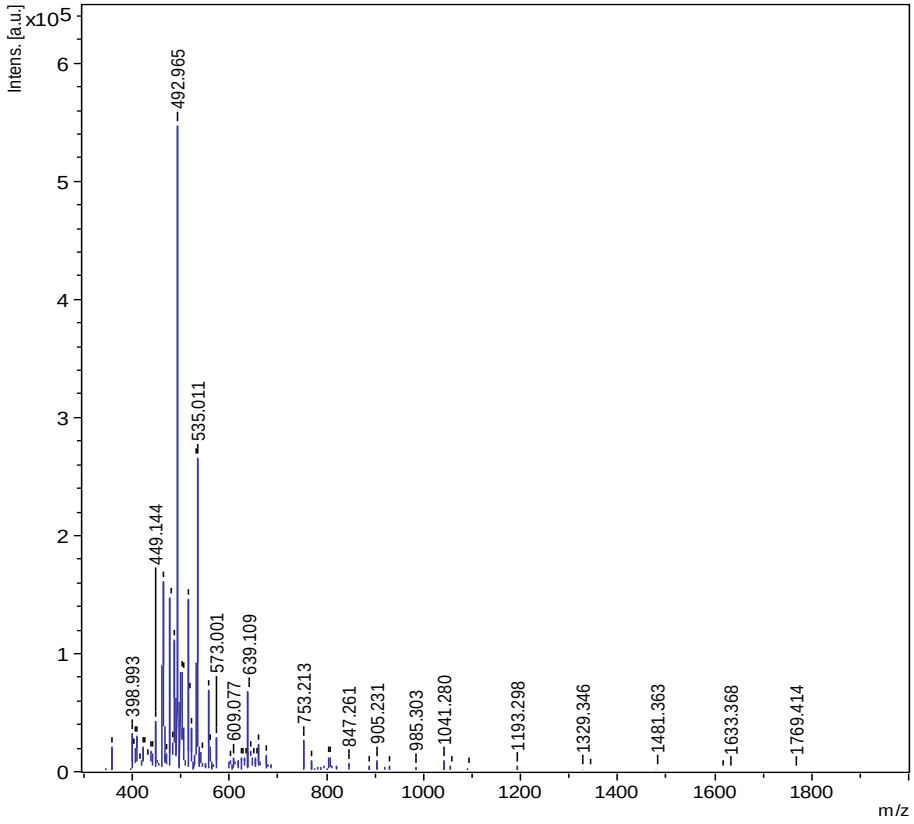


Condición 50°C y 30´de extracción

Condición

50°-30´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,16	3336	889,258299	889,0999	866,11	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,16	24203	753,213227	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,17	7747	1041,28009	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,18	2216	1329,34643	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,17	865	1617,39897	1617,2299	1594,24	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
0,14	8358	905,230757	905,0899	882,1	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,15	3611	1193,29786	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,15	1670	1481,36346	1481,2099	1458,22	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 5
0,14	716	1769,41387	1769,2699	1746,28	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 6
0,15	7092	769,190541	769,0399	746,05	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,15	3406	1057,25442	1057,0999	1034,11	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,16	1765	1345,32164	1345,1599	1322,17	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,15	955	1633,36756	1633,2199	1610,23	Prodelfinidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 5
0,06	8986	633,077239	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2

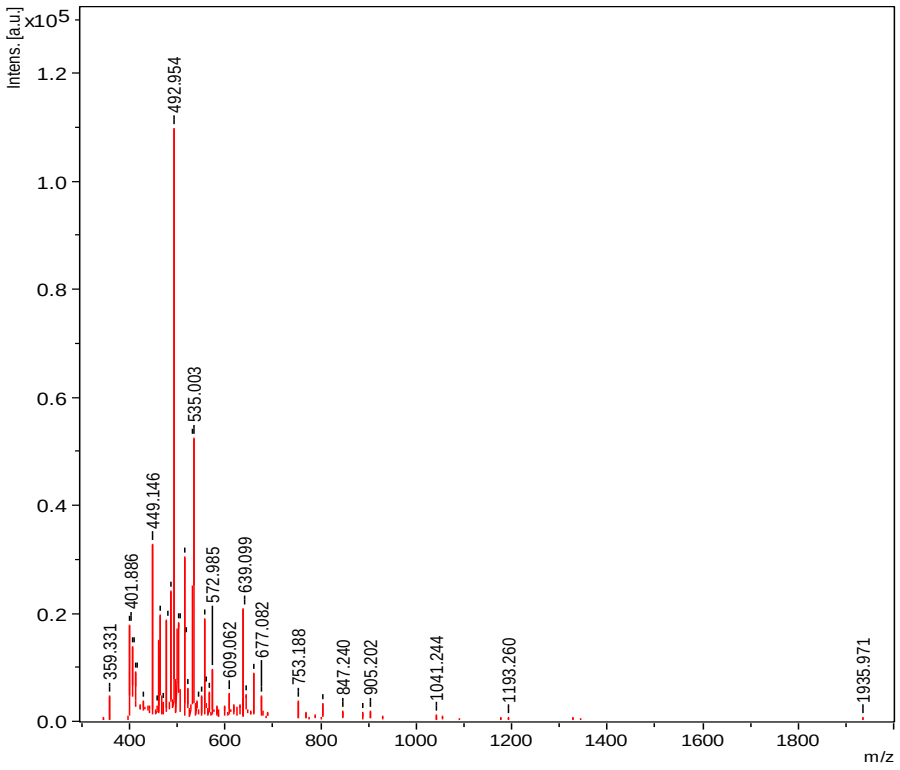


Condición 100°C y 30´de extracción

Condición

100°-30´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,14	1225	889,236674	889,0999	866,11	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,14	3190	753,187697	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,13	826	1041,24361	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,11	1433	905,201605	905,0899	882,1	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,11	601	1193,2598	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
-0,17	4500	566,849767	567,0199	544,03	Propelargonidina 2 (epi) afzelequina tipo A (1 enlace) , Grado de polimerización: 2

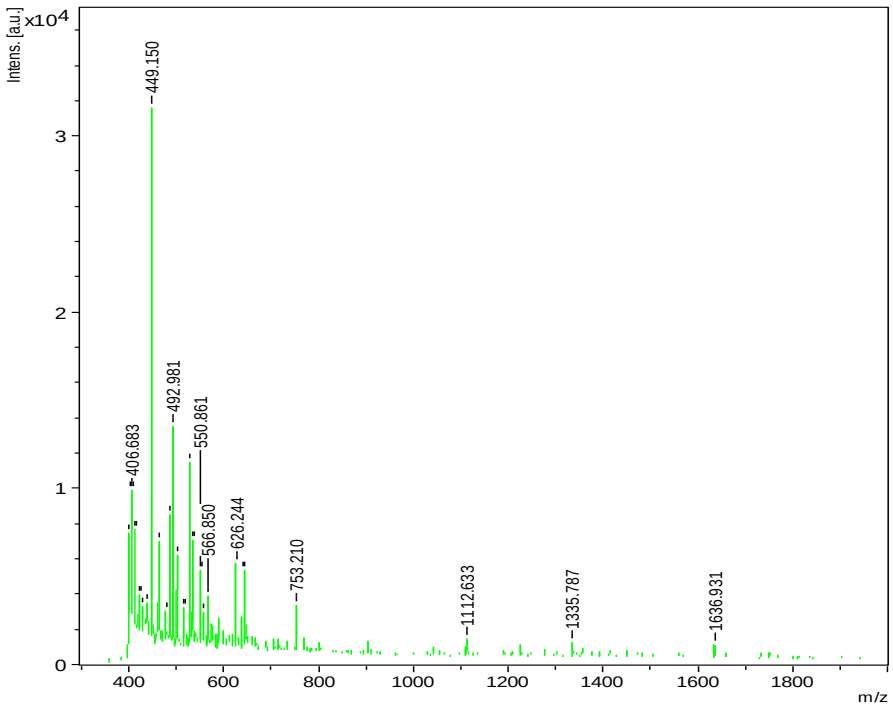


Condición 150°C y 30´de extracción

Condición

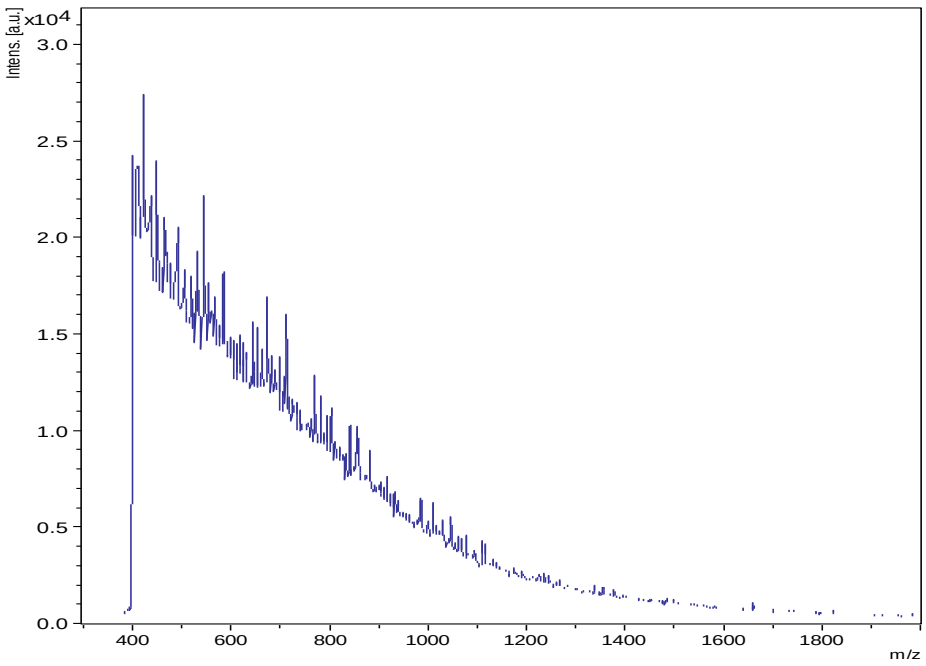
150°-30´

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,16	2576	753,210222	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2



Condición 200°C y 30´de extracción

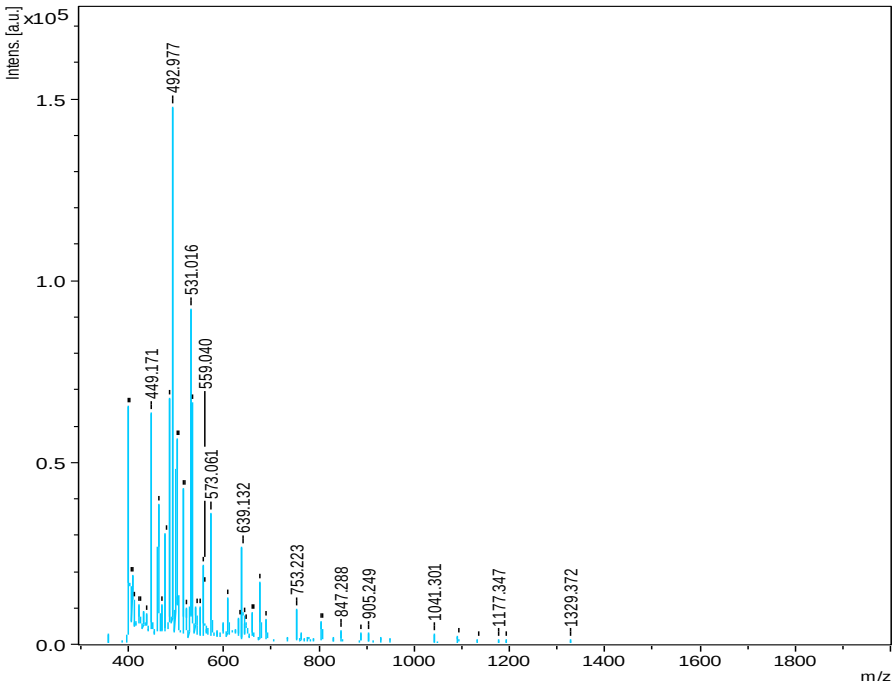
Condición 200°-30´	Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina



Condición Temperatura ambiente, extracción convencional con solvente:

Condición
E.convencional

Error	Intensidad	FW (obsd)	AdductoNa (c	MW (calcd)	Clase de Proantocianidina
0,18	2708	889,28248	889,0999	866,11	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 3
0,19	935	1177,34686	1177,1599	1154,17	Procianidina solo EC, tipo B, Grado de polimerización: 4
0,17	8742	753,222798	753,0499	730,06	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 2
0,19	2365	1041,30098	1041,1099	1018,12	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 3
0,20	875	1329,37156	1329,1699	1306,18	Procianidina tipo 1B con galato, Grado de polimerización: 4
0,16	2576	905,249066	905,0899	882,1	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 3
0,18	931	1193,32839	1193,1499	1170,16	Prodelfinidina 1 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 4
0,07	5583	633,09476	633,0199	610,03	Prodelfinidinas 2 (epi) galocatequina tipo B, Grado de polimerización: 2



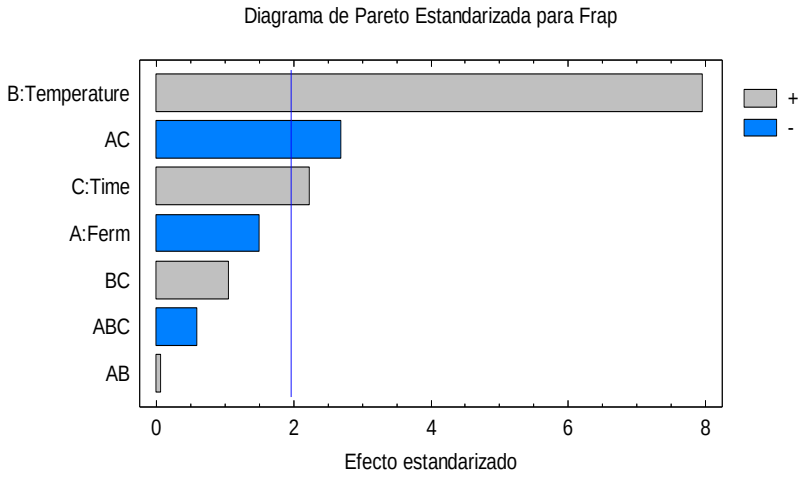
C.2- Resultados estadísticos de análisis químicos: efectos, interacciones (Pareto) y correlaciones.

Análisis estadístico avanzado:

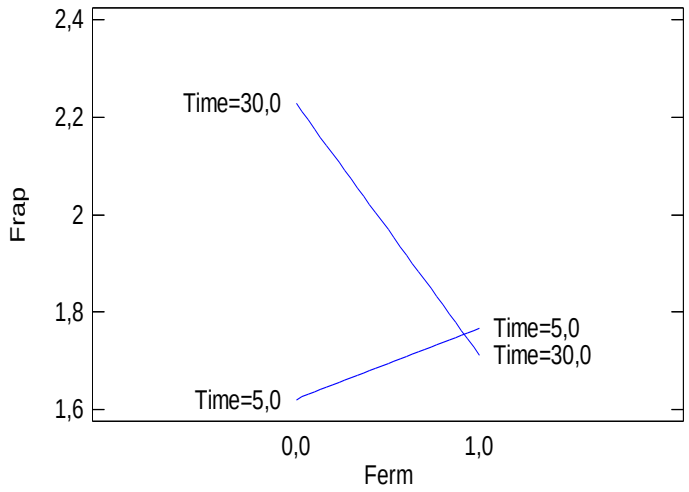
2.1-FRAP (capacidad reductora de hierro)

Condición de análisis estadístico, entre: 50°C y 100°C

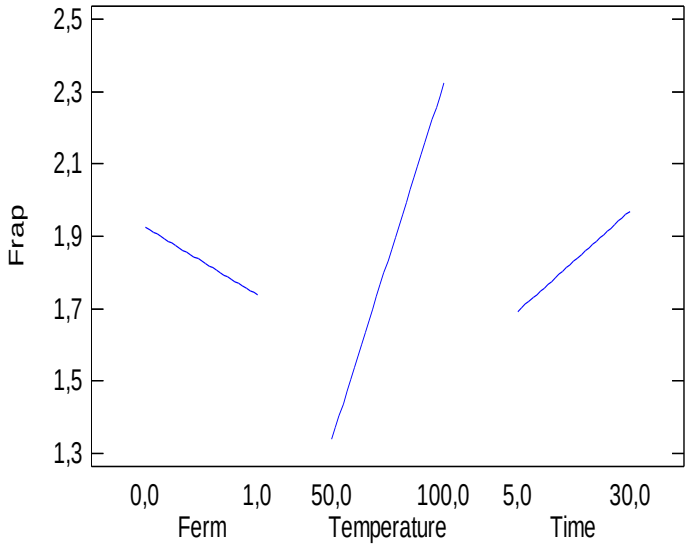
Tres efectos significativos: Temperatura, Fermentación-tiempo y tiempo. La fermentación por sí sola no es un efecto significativo, pero genera sinergias con el tiempo de extracción, para el caso de 5 minutos de orujo fermentado, esta interacción aumenta el FRAP, por el contrario a 30 min esta interacción disminuye el FRAP.

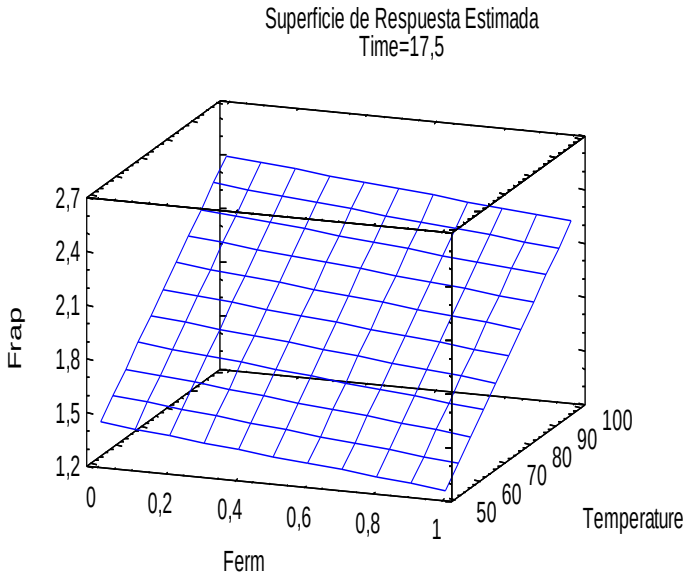


Gráfica de Interacción para Frap



Gráfica de Efectos Principales para Frap





Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Fermentación	0,0	1,0	0,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

Condición de análisis estadístico, entre: 100°C y 150°C

Efectos significativos la temperatura y la interacción temperatura tiempo, en este sentido la fermentación no es significativa.

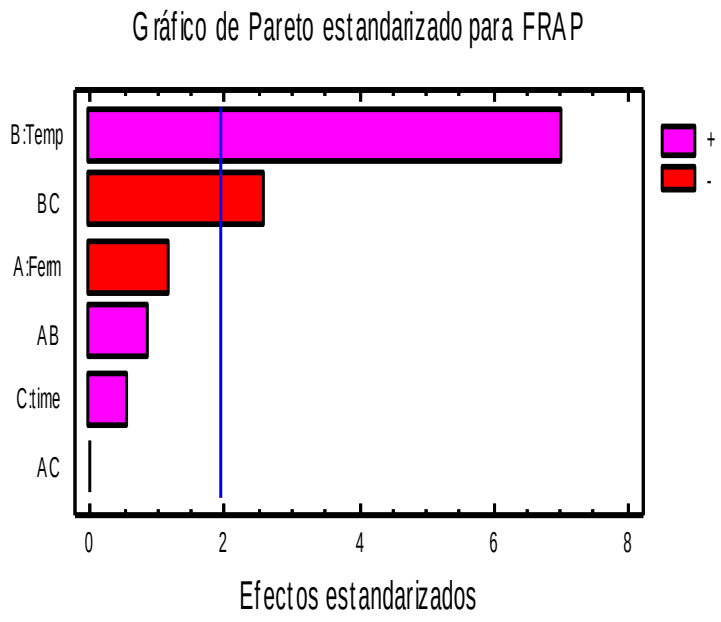


Gráfico de Efectos principales para FRAP

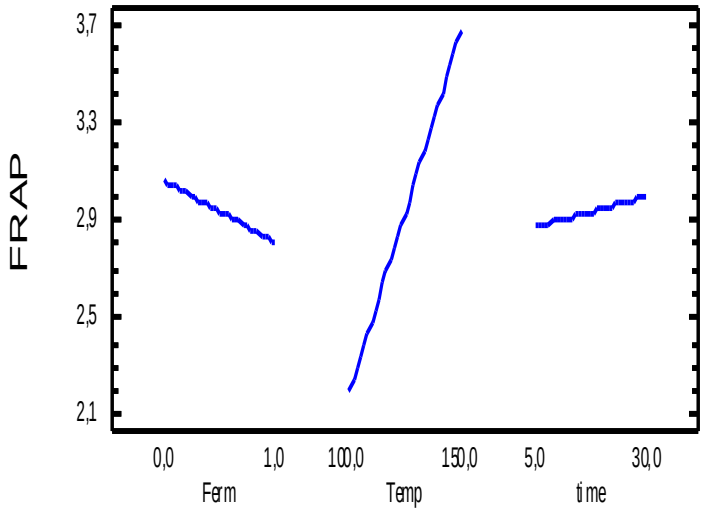
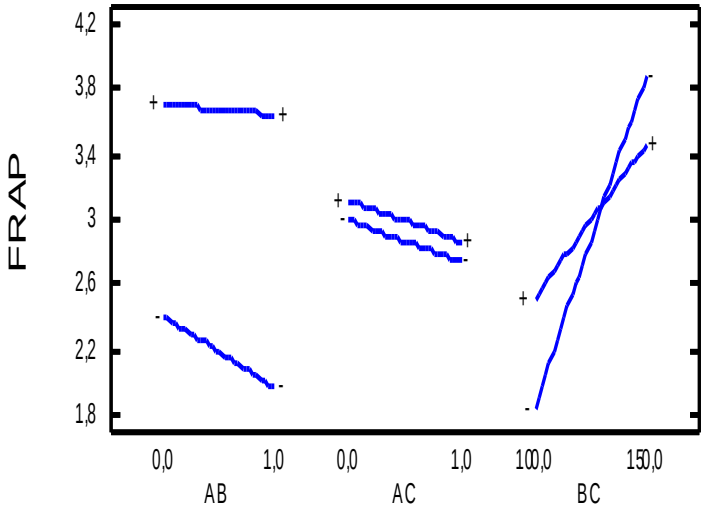
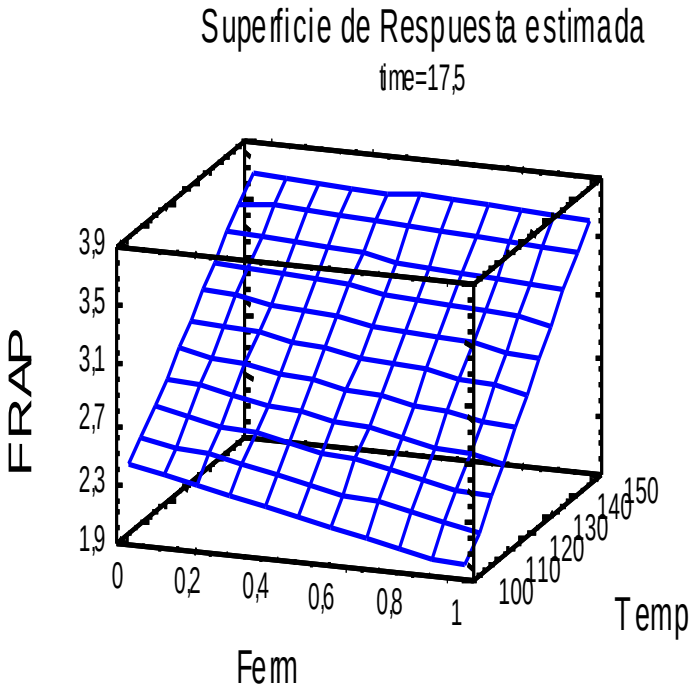


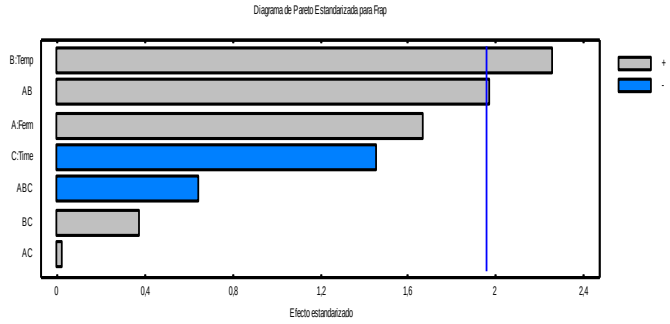
Gráfico de la interacción para FRAP

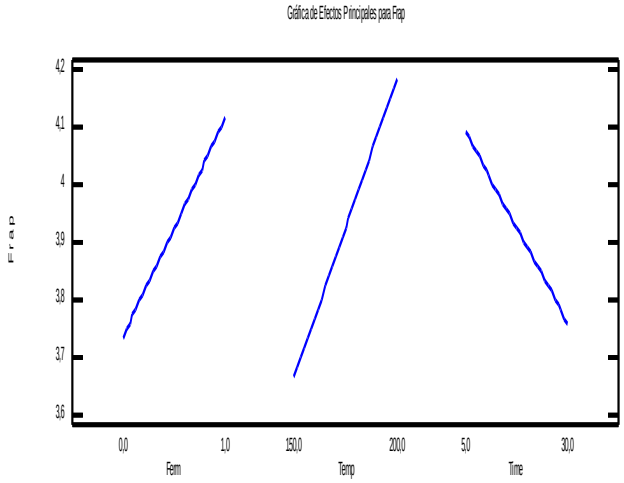


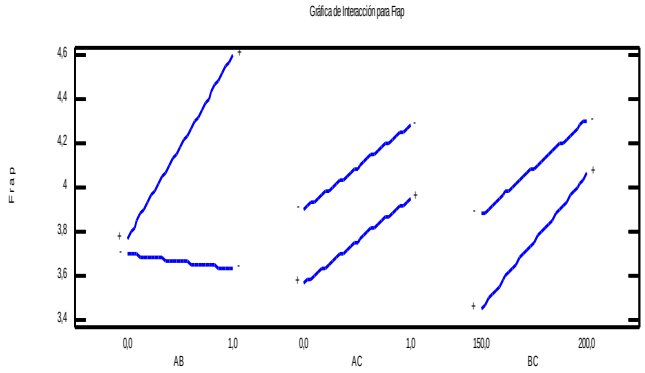


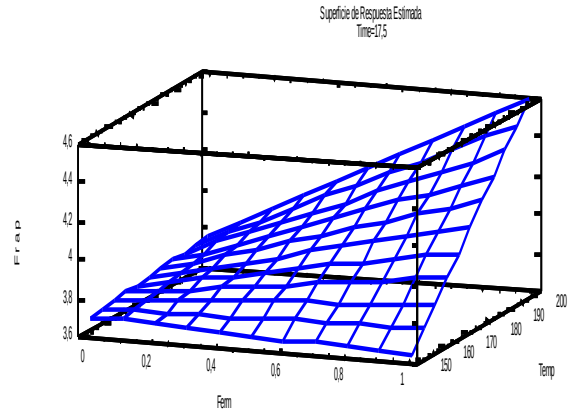
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar FRAP			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C y 200°C







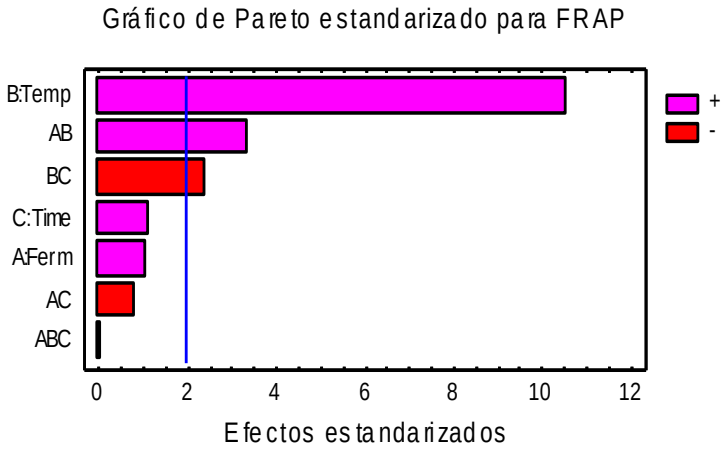


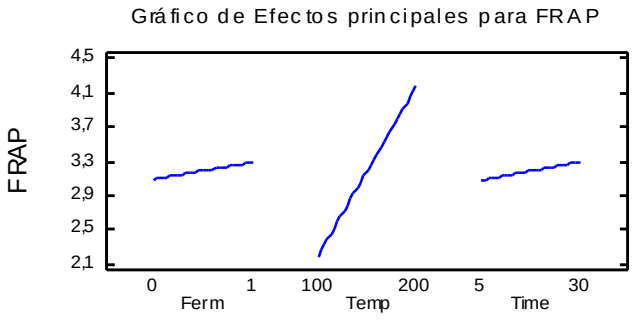
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Frap

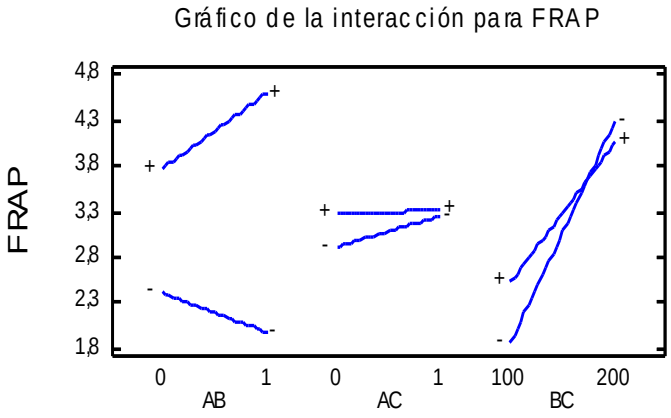
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	200,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

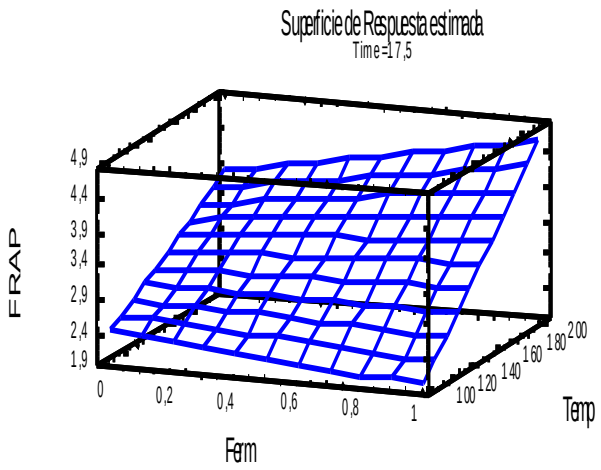
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

Se encontró que el efecto de la temperatura y las interacciones de fermentación-temperatura y temperatura –tiempo, son significativas al 95 % de confianza en este sentido tanto la temperatura como la interacción Fermentación-Tiempo aumentan el Frap, en cambio la interacción temperatura-tiempo lo disminuye. La Fermentación, no es significativa por sí sola, pero si en la interacción con la temperatura, aumentando el Frap







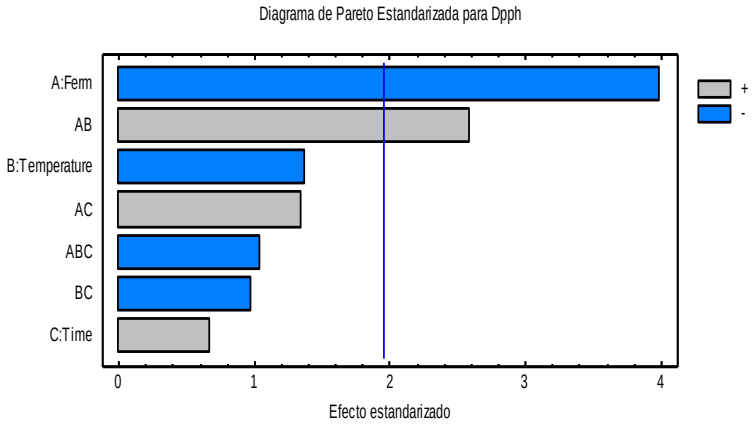


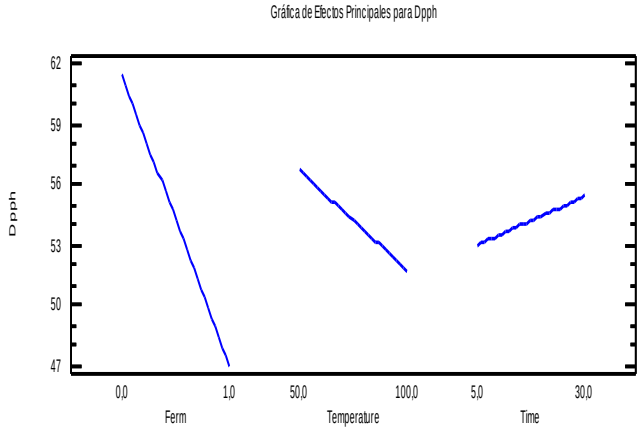
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar FRAP			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	200,0	200,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

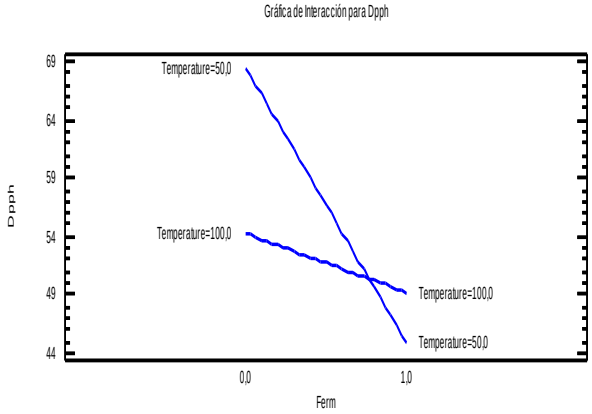
2.2-DPPH (capacidad antioxidante)

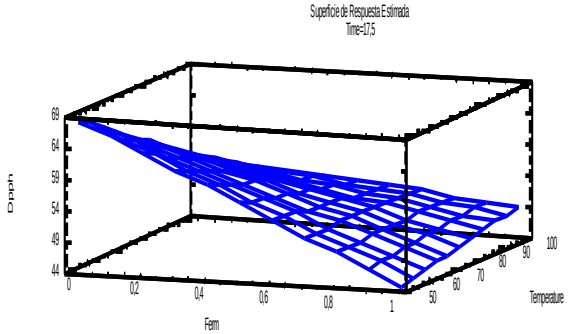
Condición de análisis estadístico, entre: 50°C-100°C

2 efectos significativos: Fermentación y Fermentado-temperatura.







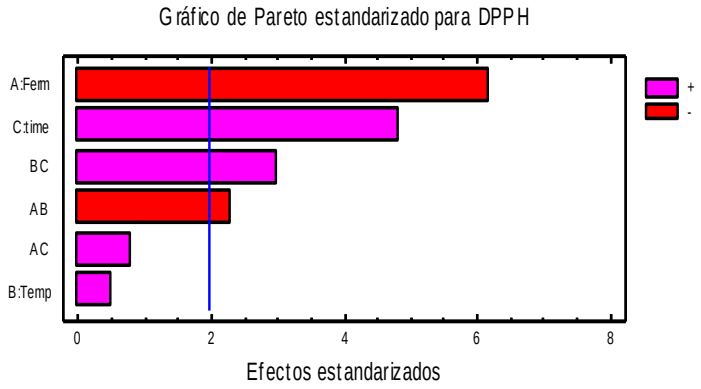


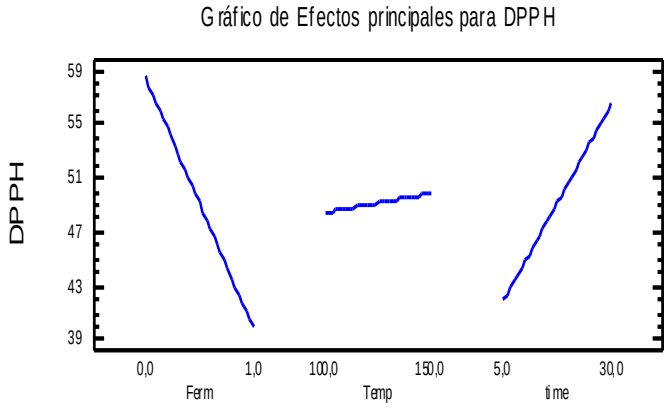
Meta: minimizar DPPH

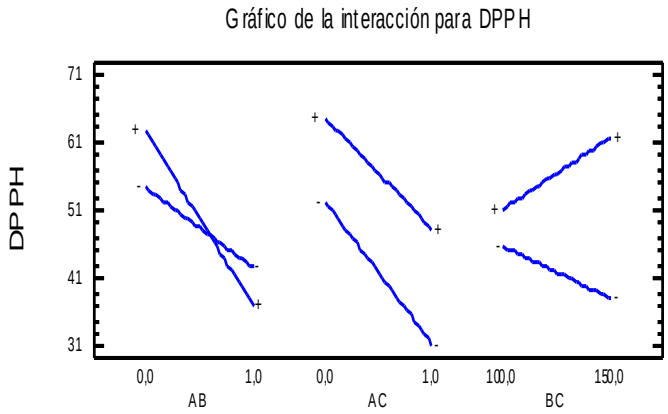
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temperatura	50,0	100,0	50,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C

Efectos Significativos la fermentación el tiempo y las interacciones de temperatura tiempo y fermentación temperatura. En este sentido la fermentación es el efecto con mayor magnitud de todos y se presenta por sí sola, sin interacción ninguna.

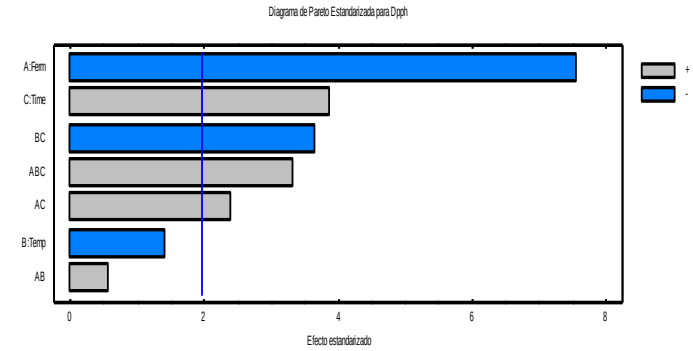


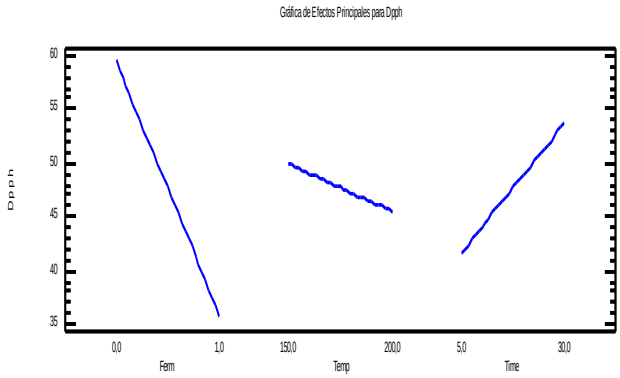


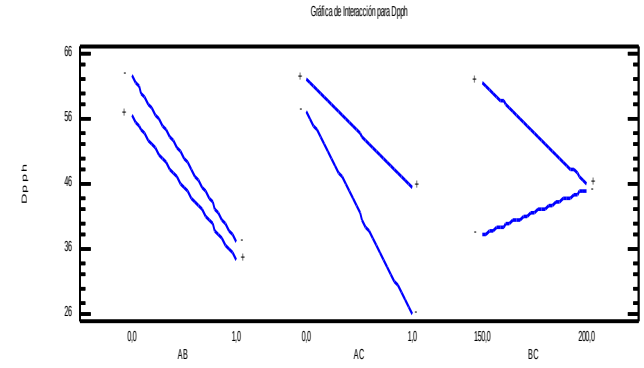


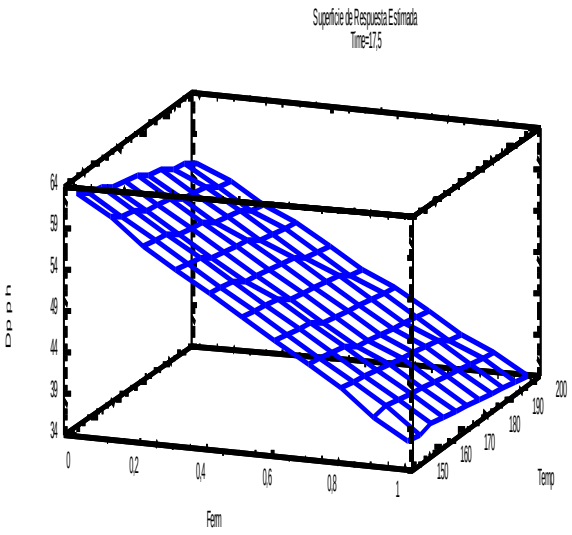
Respuesta Optimizada			
Meta: minimizar DPPH			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C









Optimizar Respuesta
Meta: minimizar DPPH

Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

Para este rango de temperatura son significativos los efectos de la fermentación y la interacción fermentación-tiempo, en este sentido la fermentación disminuye en DPPH y la interacción la aumenta. La fermentación en este sentido influye por si sola en la disminución del DPPH, disminuyéndolo, pero en la interacción con el tiempo de extracción se aumenta. De todas maneras por magnitud la fermentación disminuye más de lo que aumenta con la interacción, produciéndose un resultado neto de disminución del DPPH

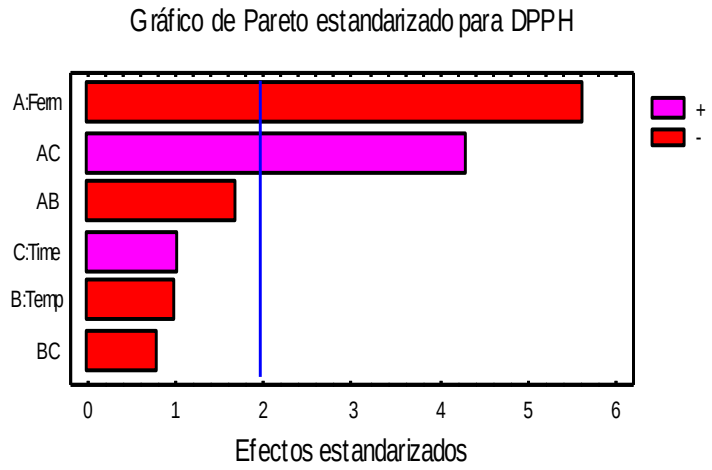


Gráfico de Efectos principales para DPPH

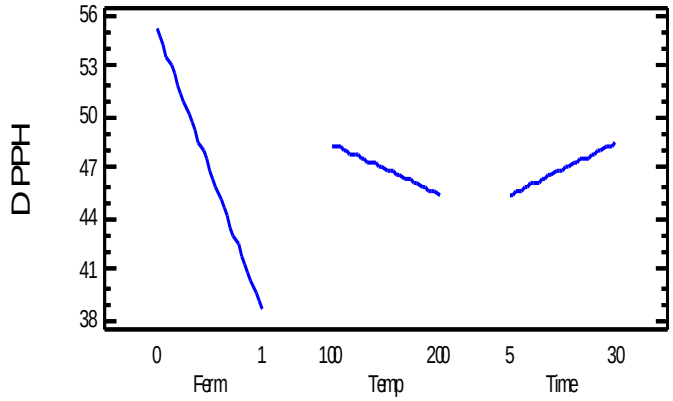
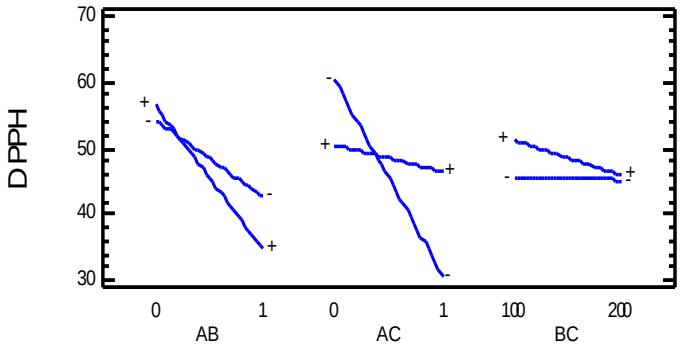
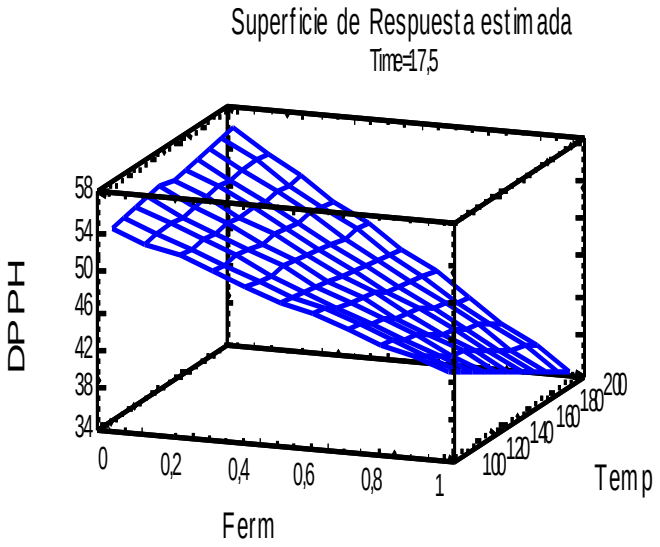


Gráfico de la interacción para DPPH

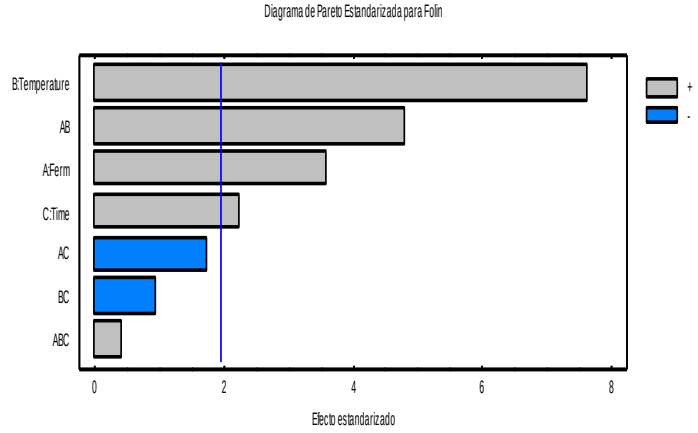


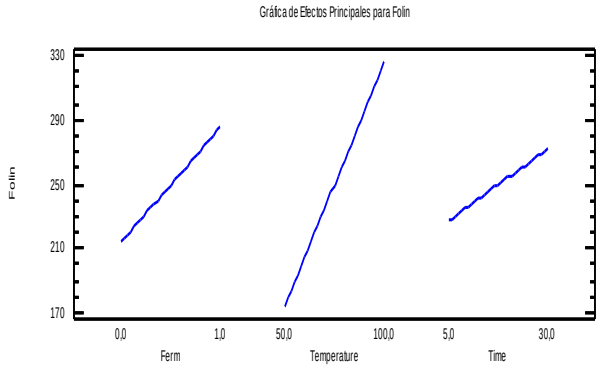


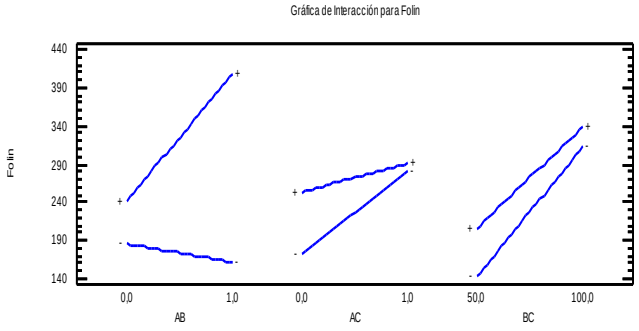
Respuesta Optimizada			
Meta: minimizar DPPH			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	200,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

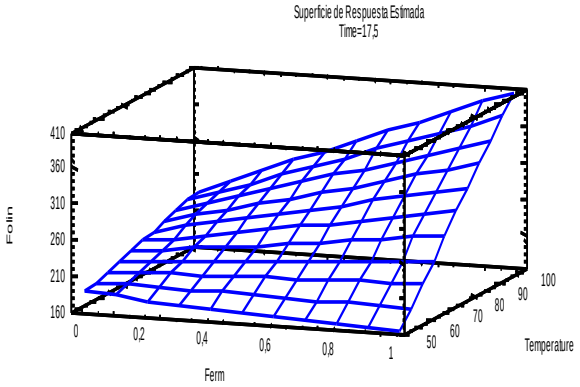
2.3-Fenoles (Folin)

Condición de análisis estadístico, entre: 50-100°c







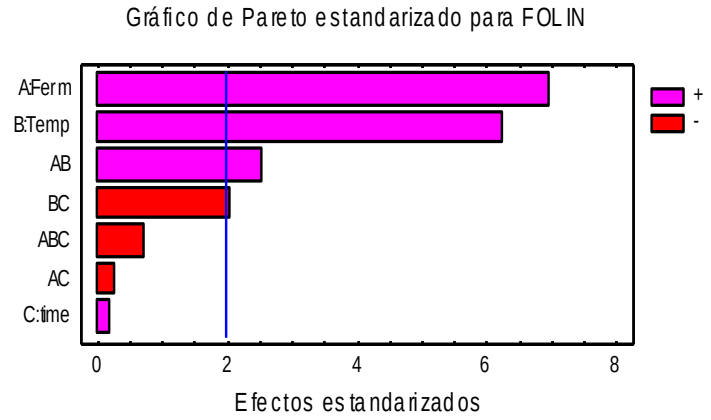


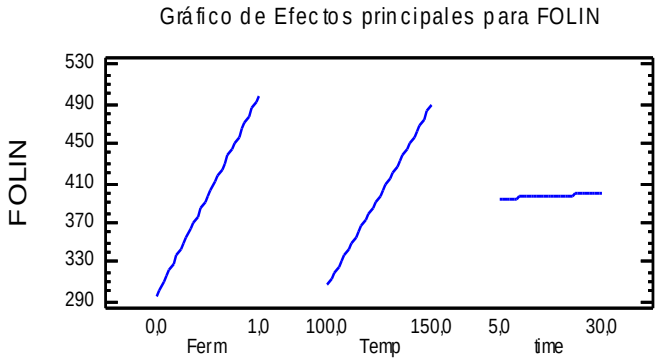
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Folin

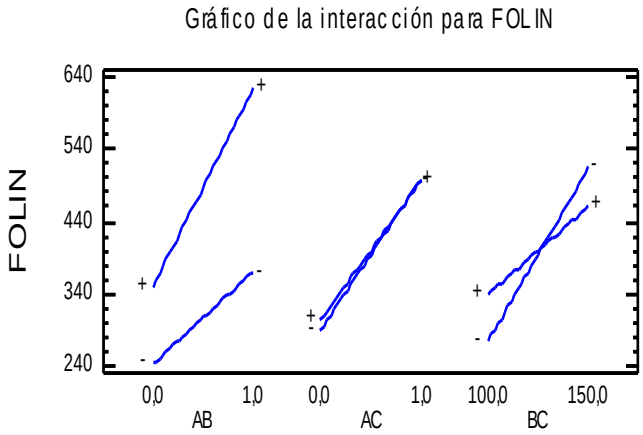
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

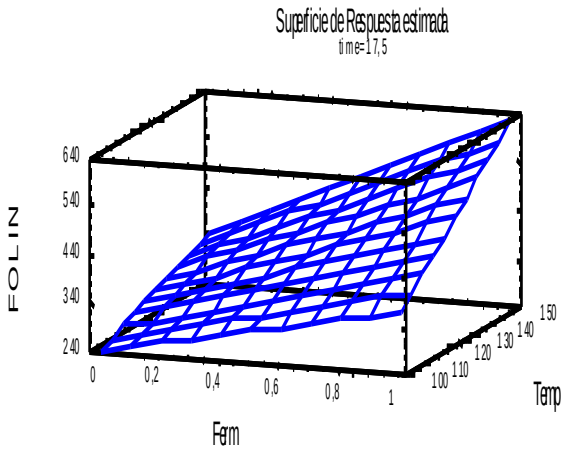
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C

Efectos significativos son la fermentación, la temperatura y la interacción de fermentación-temperatura, a su vez la interacción-tiempo fermentación. La fermentación en este caso posee la mayor magnitud en los efectos.



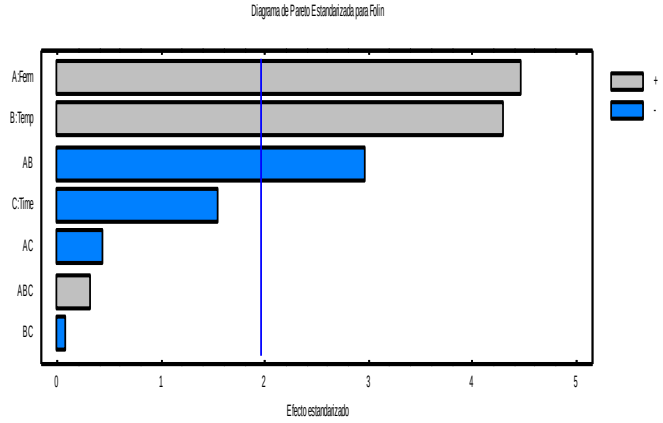


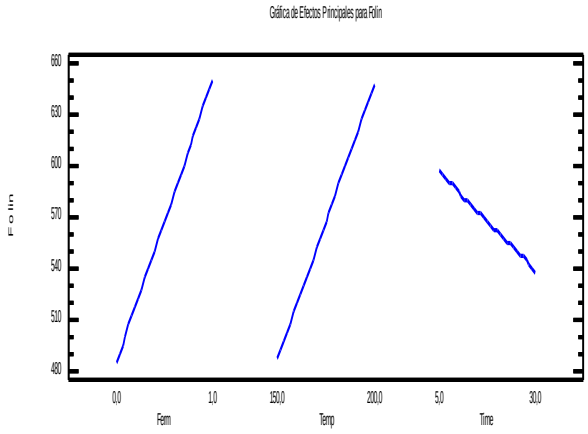


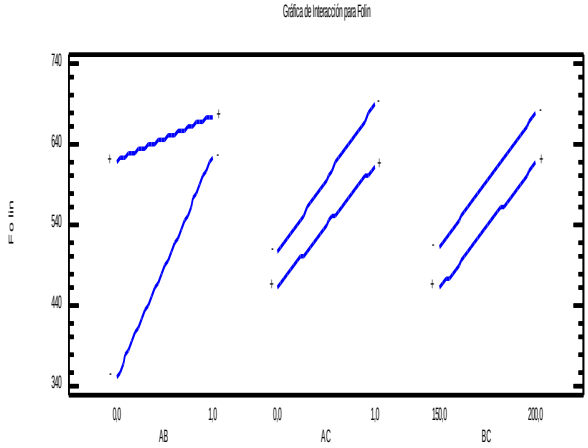


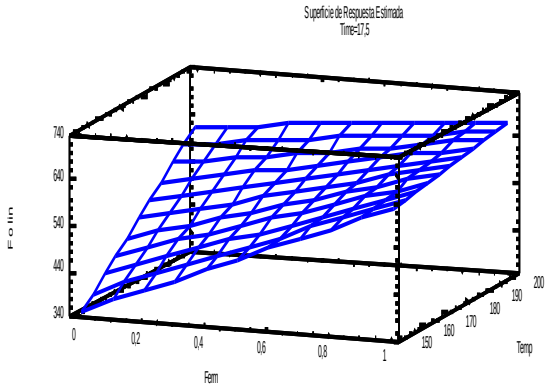
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar FOLIN			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C







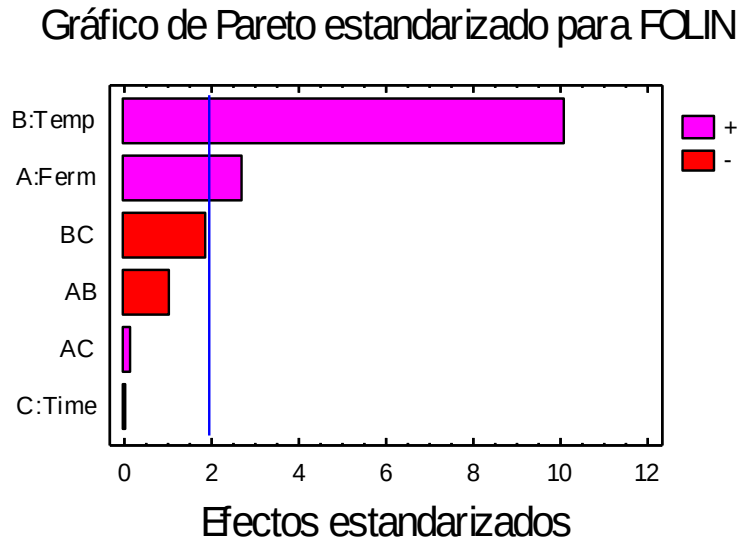


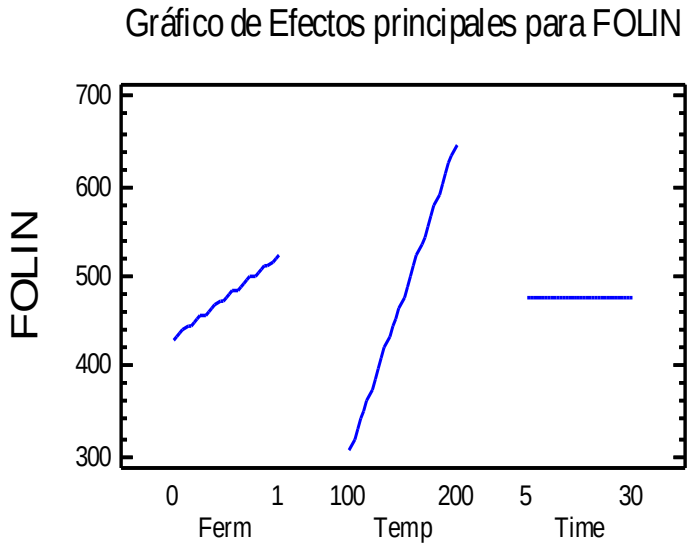
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Folin

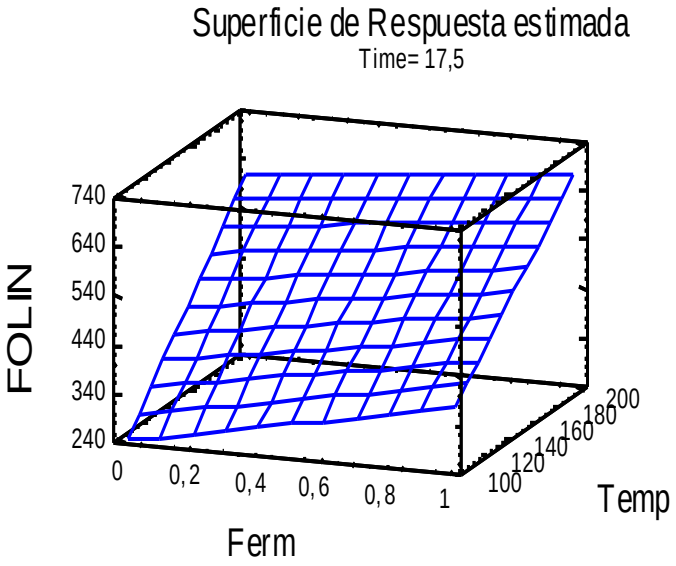
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	200,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

Las interacciones en este rango: Significativa la temperatura y la fermentación por si solas, no existen interacciones significativas tanto la temperatura como la fermentación aumentan el Folin. La fermentación por si sola posee un efecto significativo en el Folin aumentándolo.



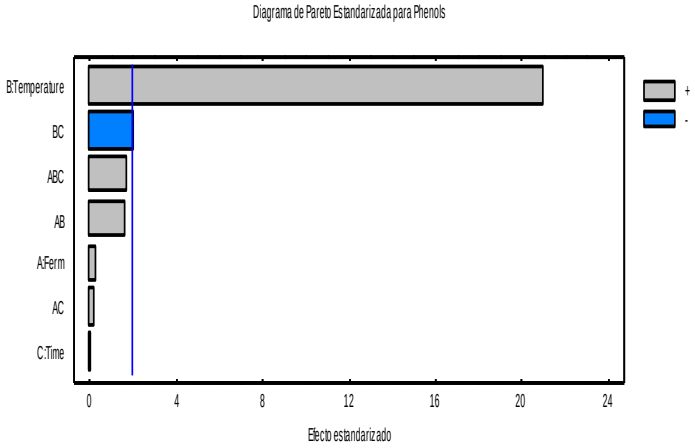


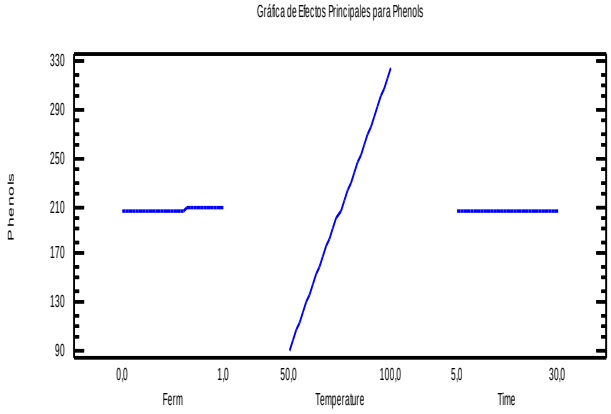


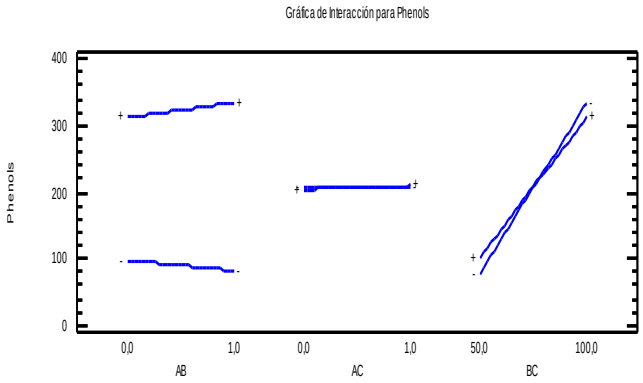
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar FOLIN			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	200,0	200,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

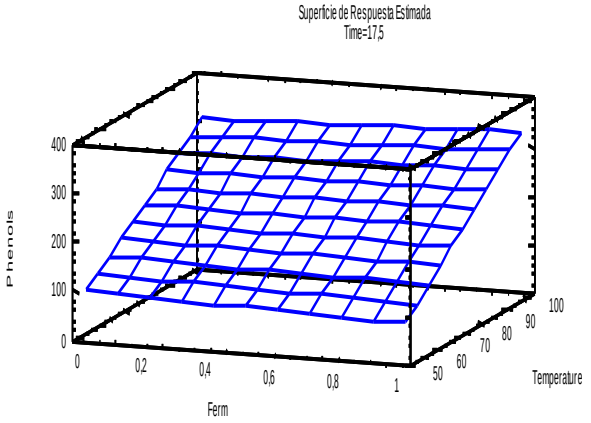
2.4-Fenoles (método de H-Adams)

Condición de análisis estadístico, entre: 50°C-100°C







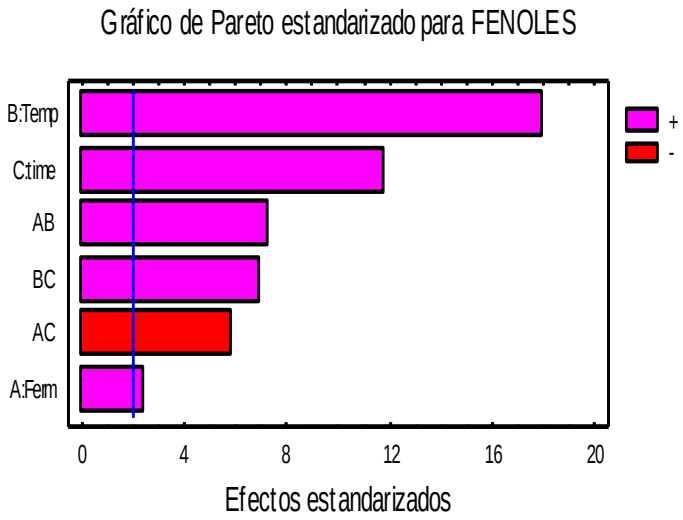


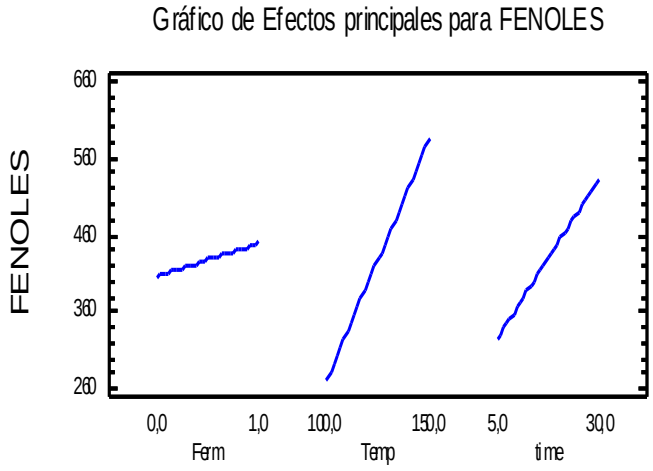
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar fenoles

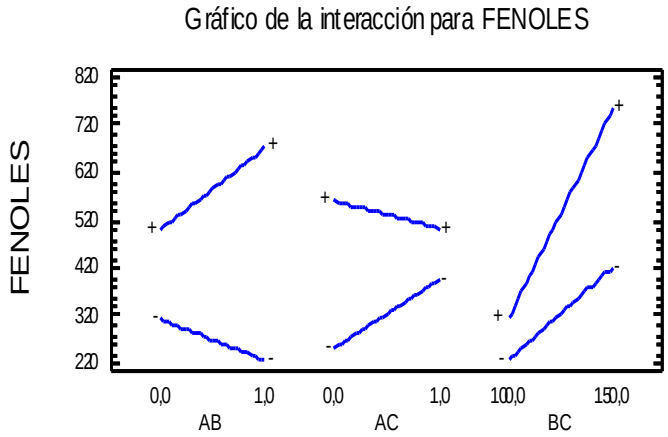
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

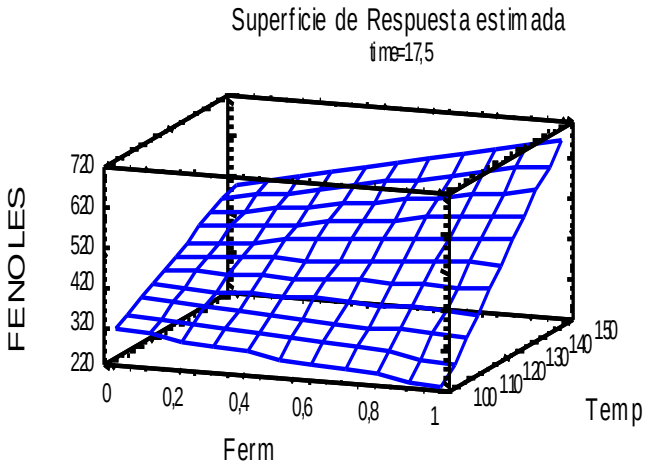
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C

Todos los efectos son significativamente influyentes en los fenoles, el factor de mayor magnitud en el efecto es la temperatura, y en último lugar la fermentación.



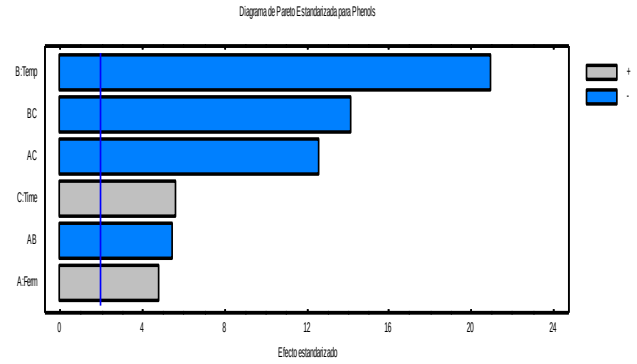


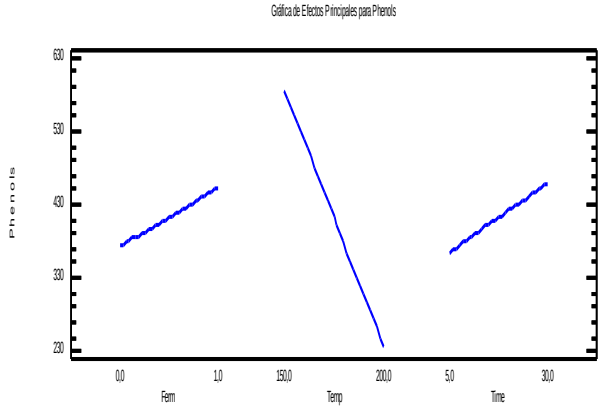


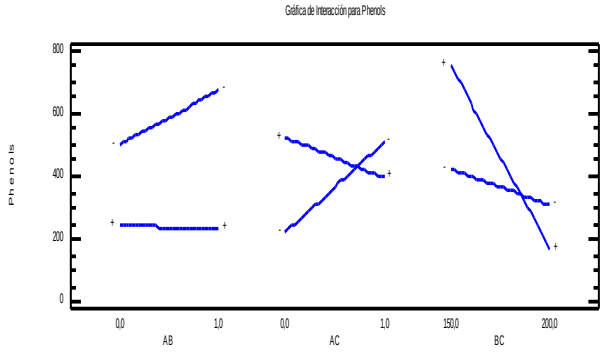


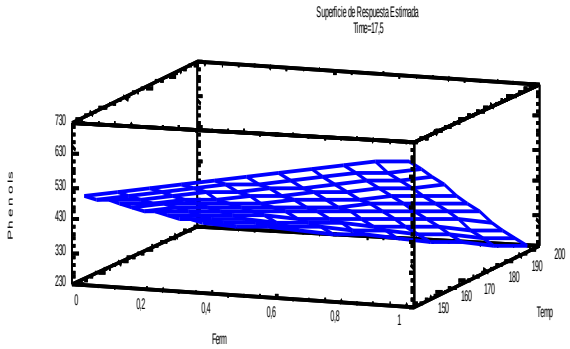
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar FENOLES			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C







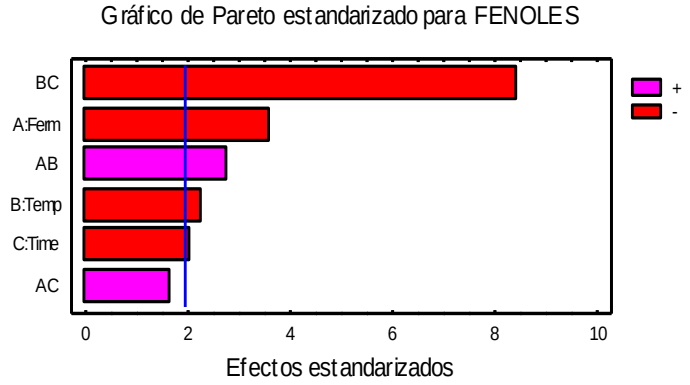


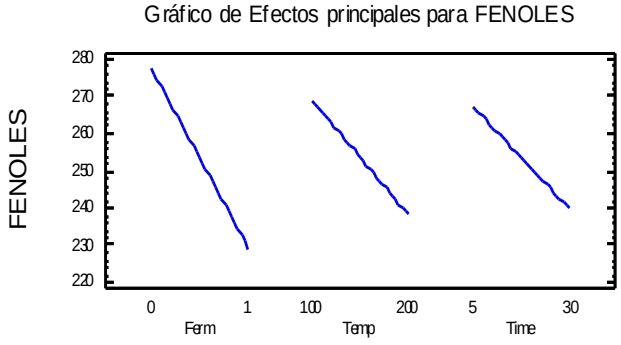
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Fenoles

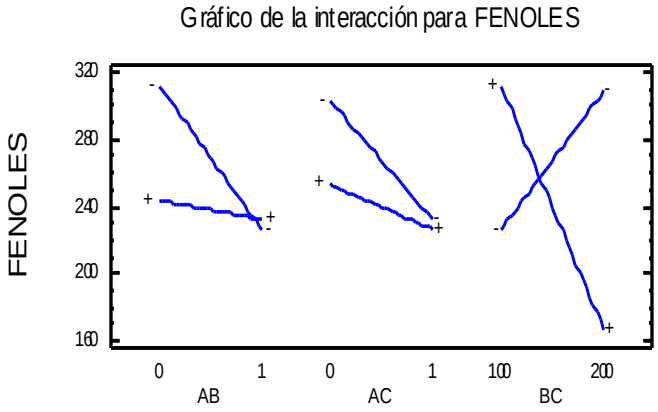
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temp	150,0	200,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

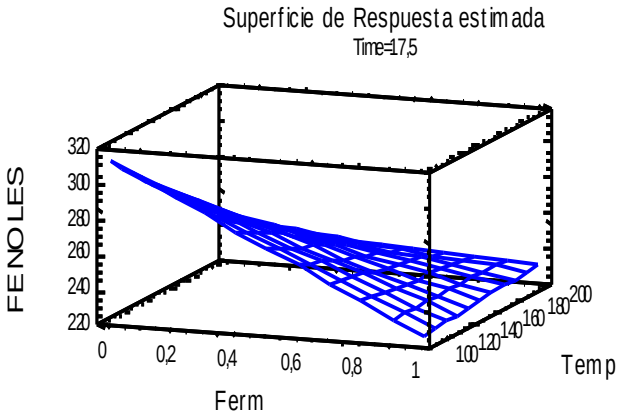
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

Son significativos los efectos de Fermentación y Temperatura, tiempo e Interacciones fermentación-temperatura y la interacción más significativa temperatura-tiempo disminuyendo la cantidad de fenoles. La fermentación por si sola genera un efecto sobre la cantidad de fenoles presentes.





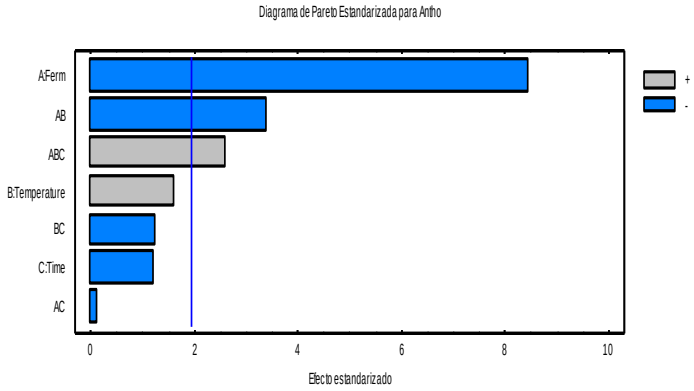


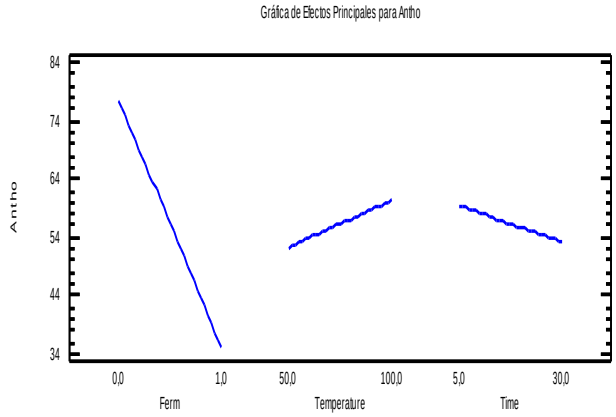


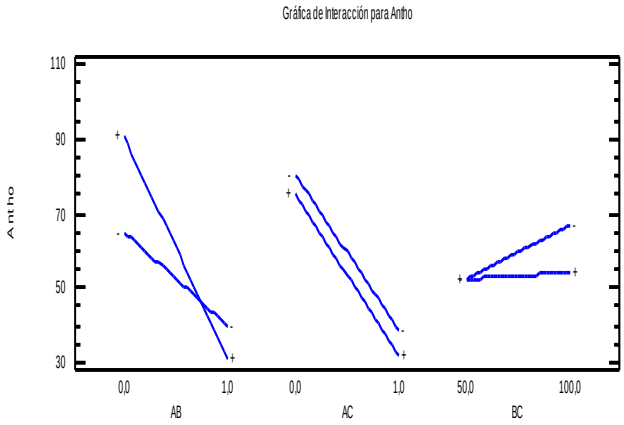
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar Fenoles			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temp	100,0	200,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

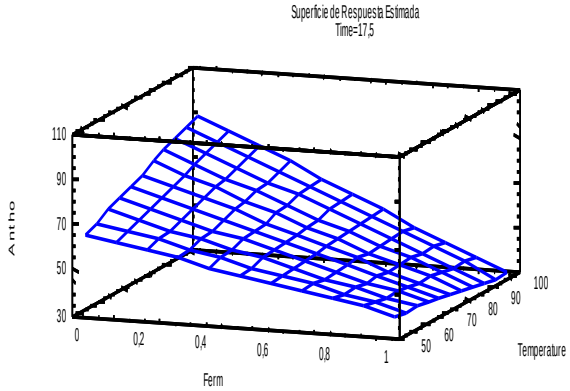
2.5-Antocianinas (método de H-Adams)

Condición de análisis estadístico, entre: 50°C-100°C





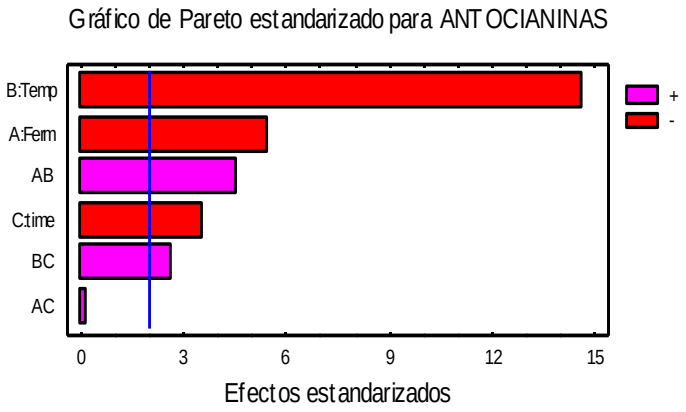


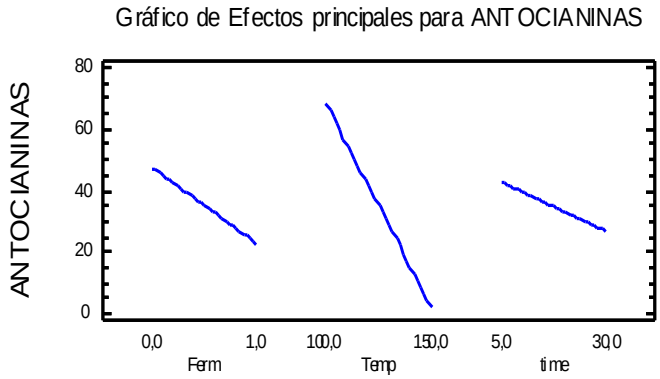


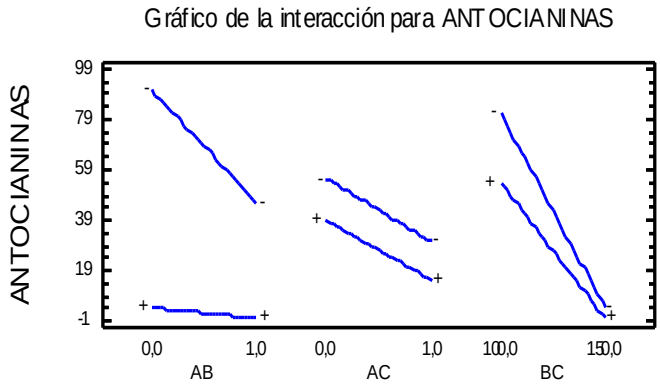
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Antocianinas

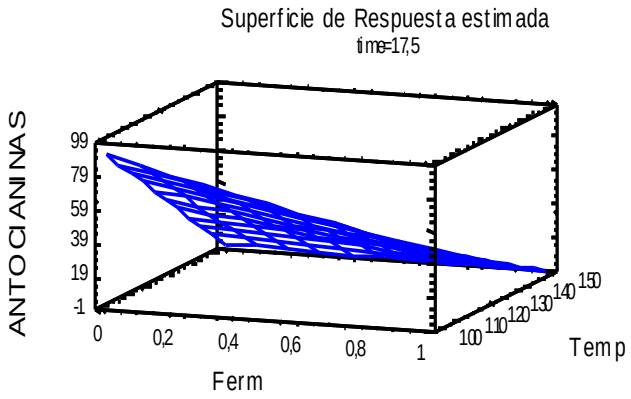
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C



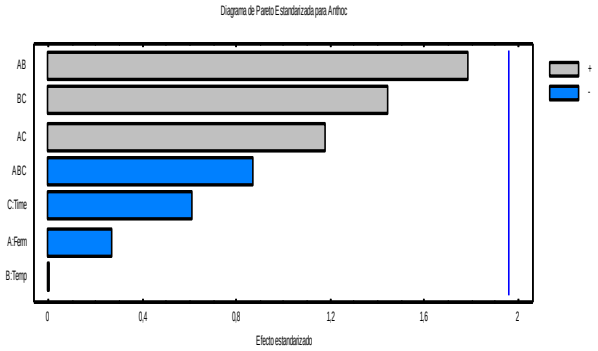






Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar ANTOCIANINAS			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temp	100,0	150,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

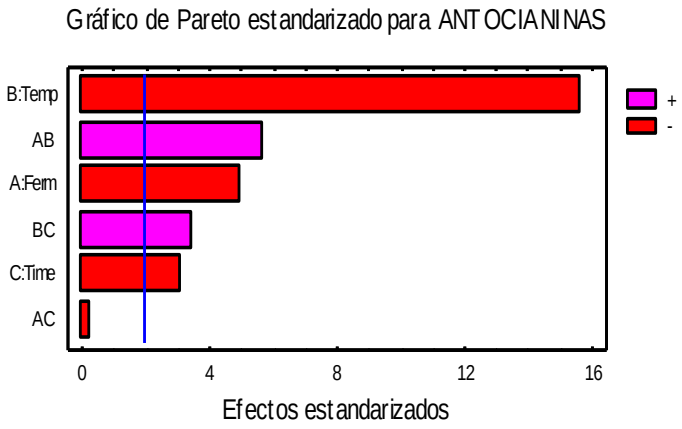
Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C

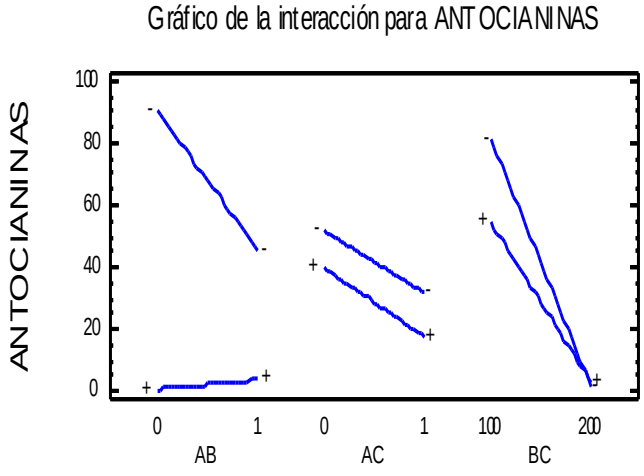


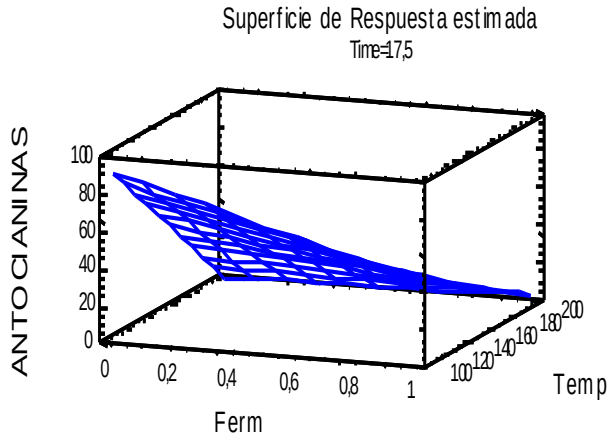
No hay antocianinas, por lo cual los efectos no son significativos.

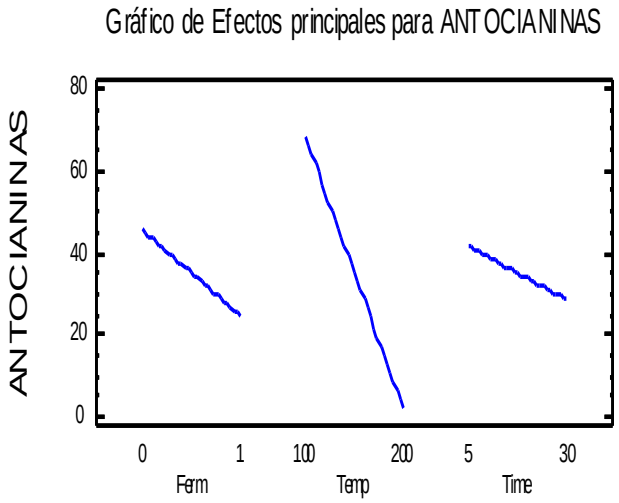
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

Significativos son la temperatura (altamente significativa, y la fermentación por si solas junto con el tiempo, las interacciones son entre la fermentación-temperatura y temperatura tiempo. En este sentido la fermentación influye tanto por si sola como por una interacción, cabe señalar que cuando esta sola disminuye la cantidad de Antocianinas y cuando interacciona la aumenta.





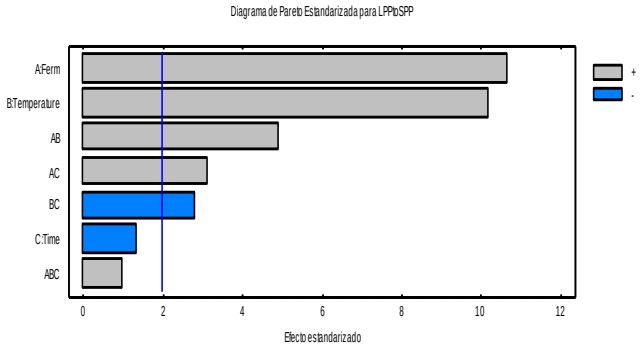


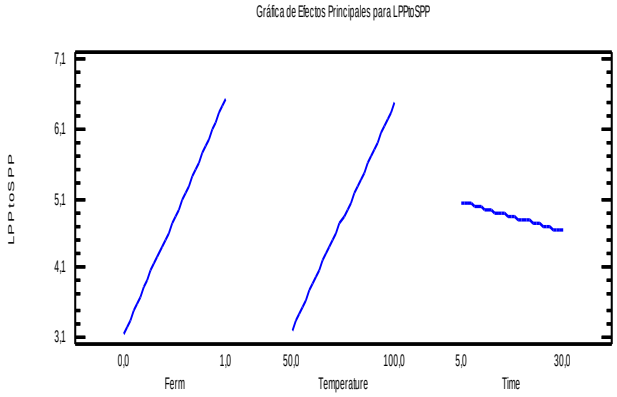


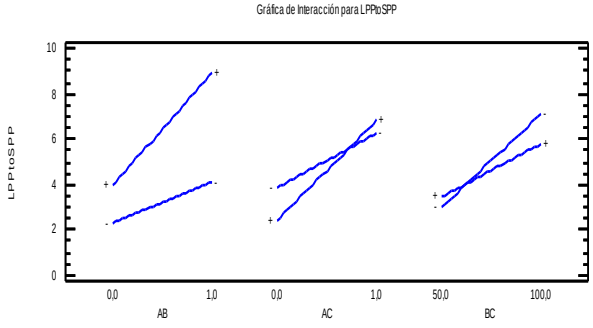
Respuesta Optimizada, Meta: maximizar ANTOCIANINAS			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	0,0
Temp	100,0	200,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

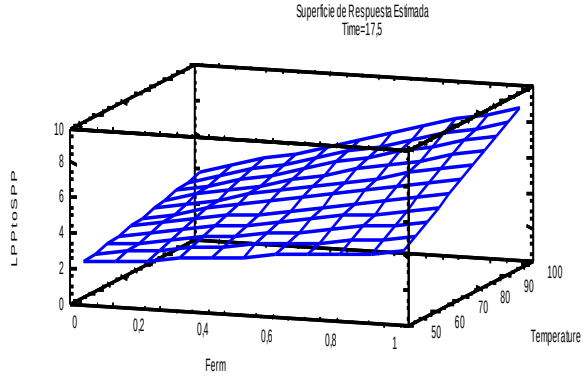
2.6- LPP/SPP (método de H-Adams)

Condición de análisis estadístico, entre: 50°C-100°C







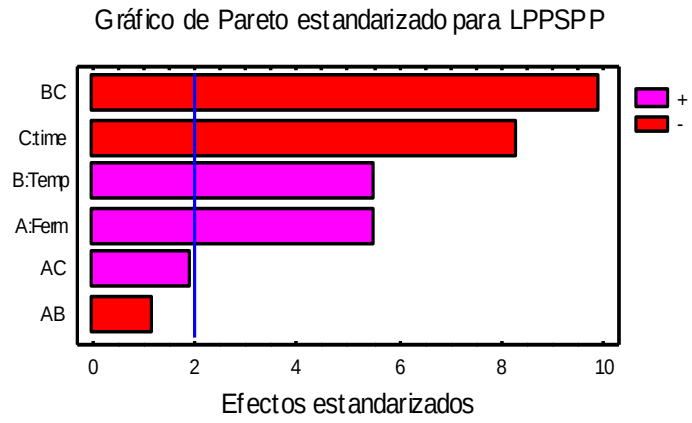


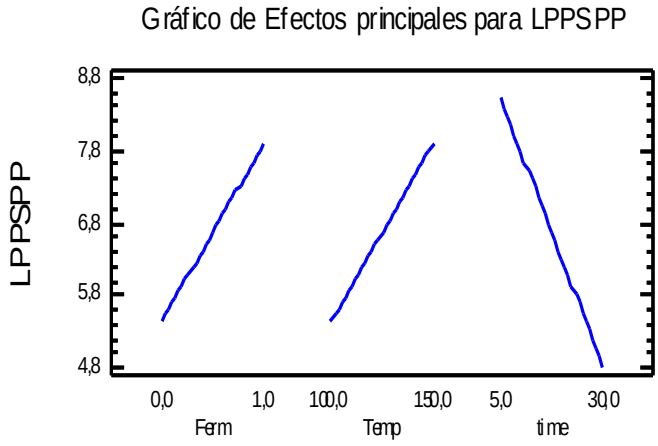
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar LPP/SPP

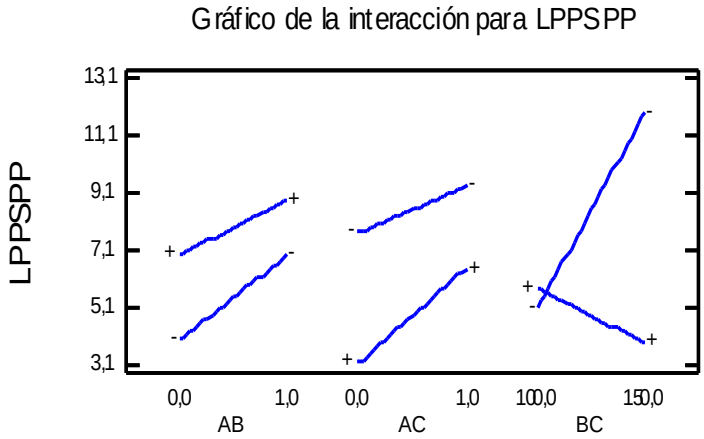
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

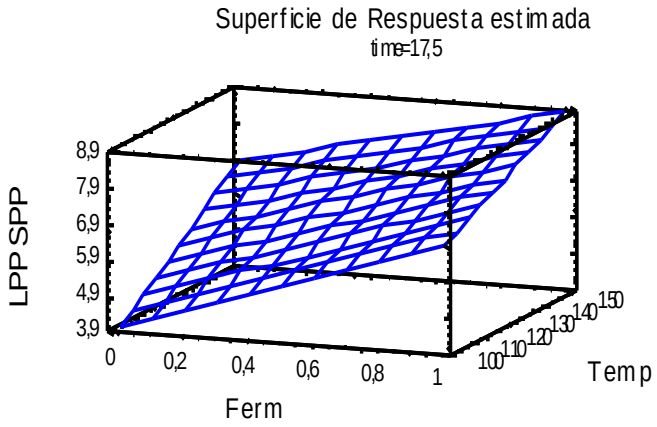
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C

Significativos: el tiempo, la temperatura y la fermentación por si solos, pero la mayor contribución vienen dada por la interacción temperatura tiempo. La fermentación si influye por si sola significativamente



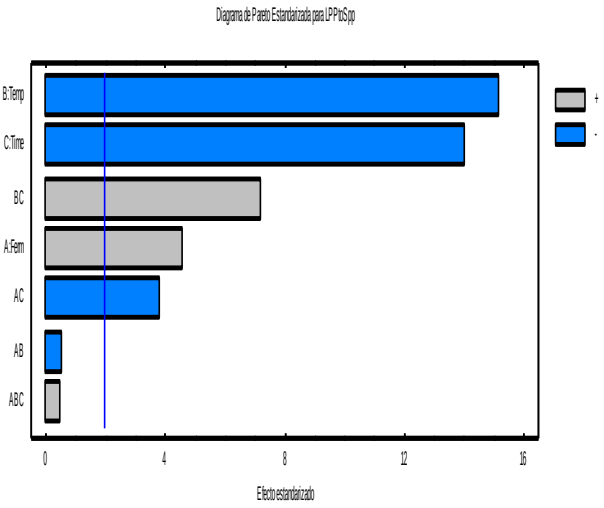


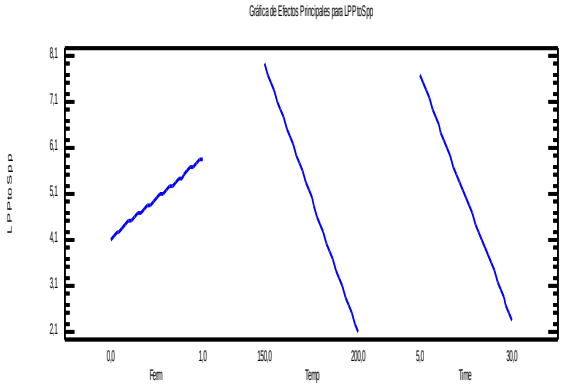


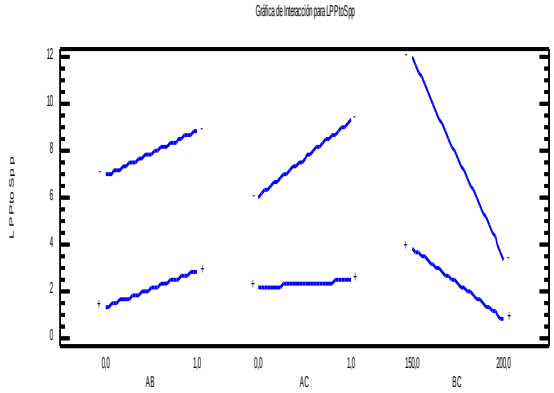


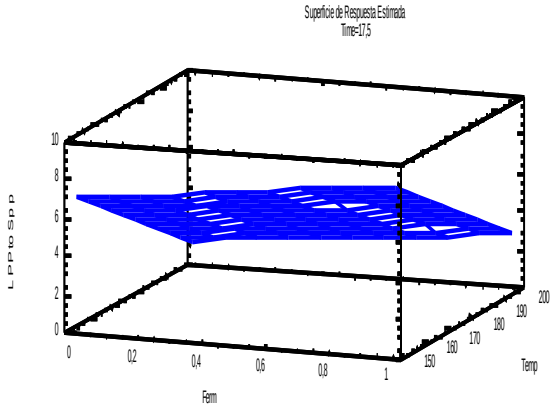
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar LPPSPP			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C







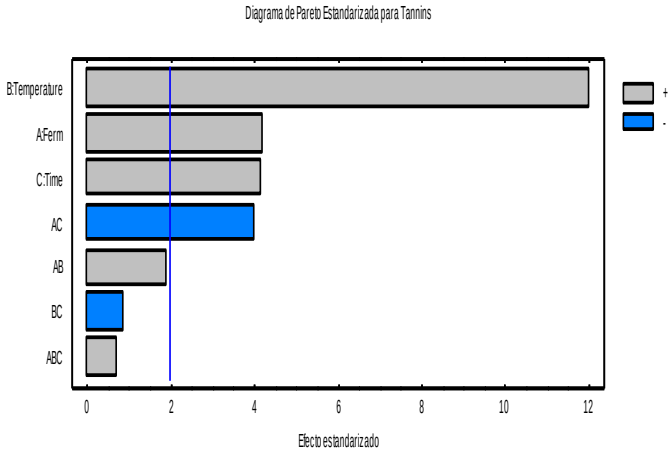


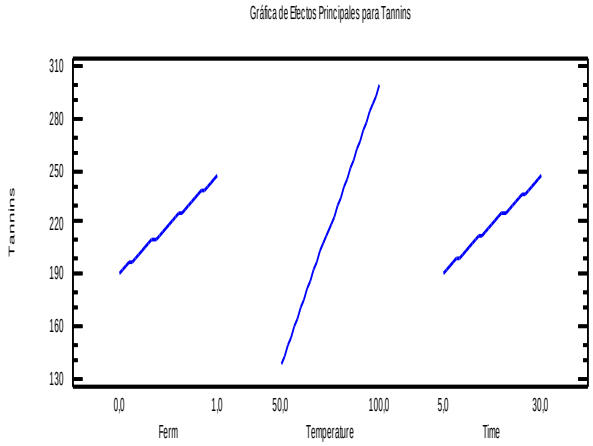
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar LPP/Spp

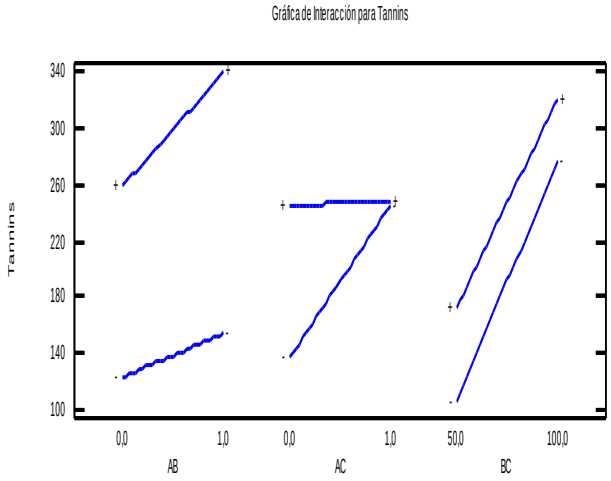
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

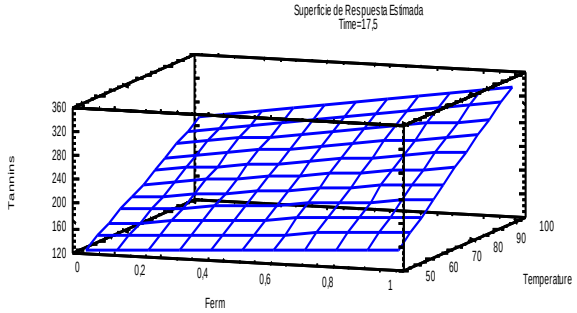
2.7-TANINOS (método de H-Adams)

Condición de análisis estadístico, entre: 50°C-100°C







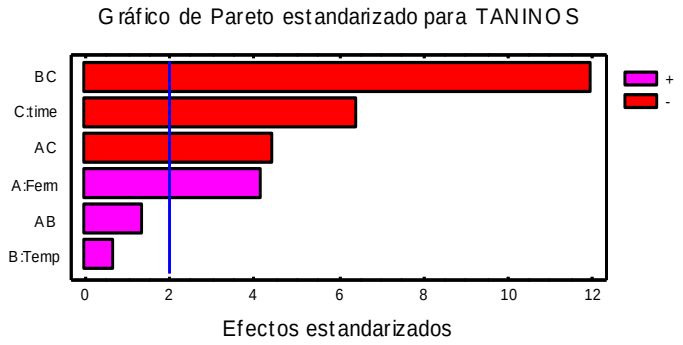


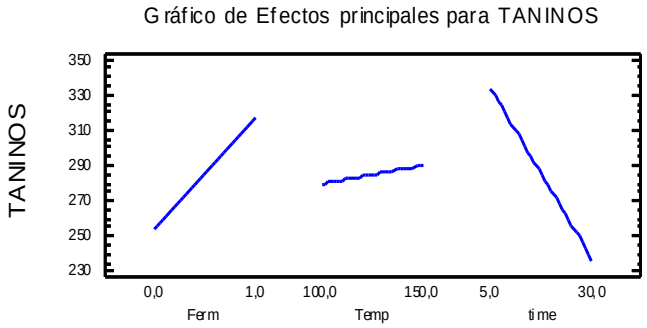
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Taninos

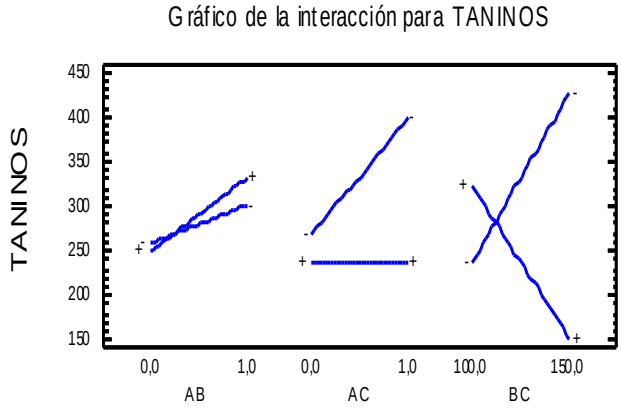
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temperatura	50,0	100,0	100,0
Tiempo	5,0	30,0	30,0

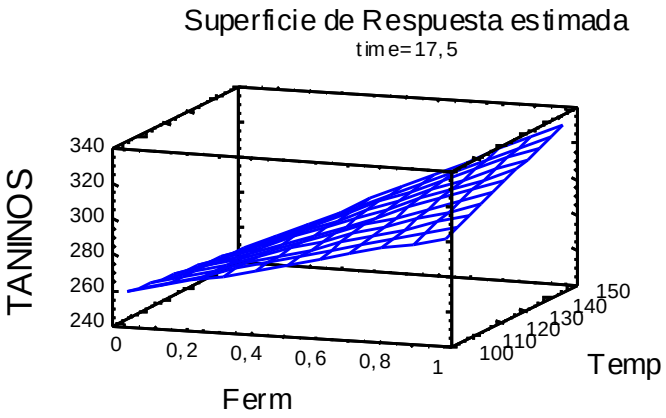
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-150°C

Significativos la fermentación y el tiempo por si solos, a su vez son significativas la interacción temperatura-tiempo y la fermentación tiempo. La fermentación aunque esta sola y es significativa es de una magnitud menor que los demás efectos.



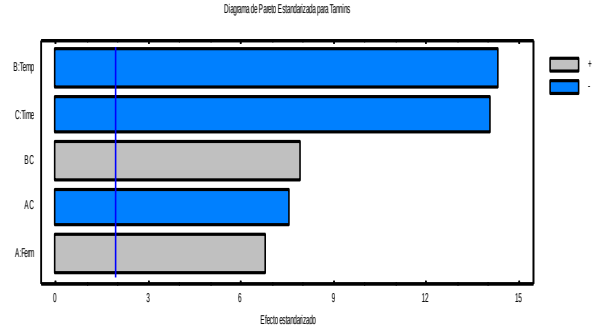


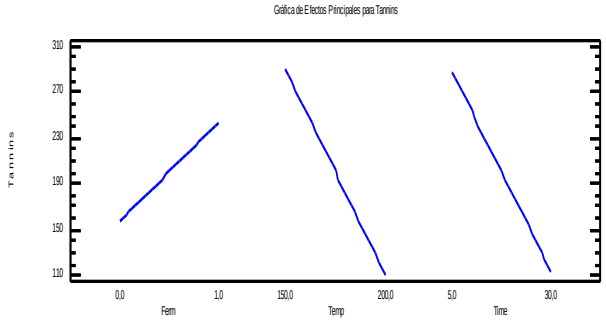


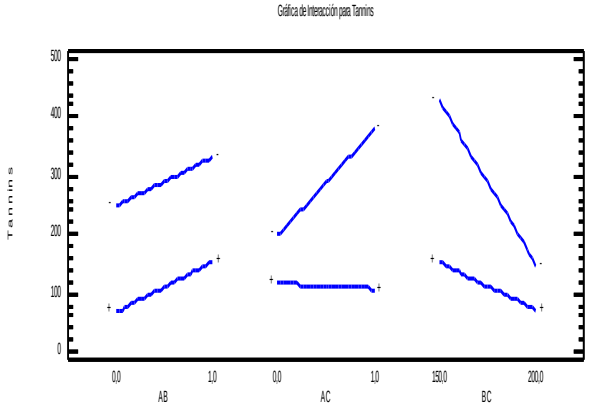


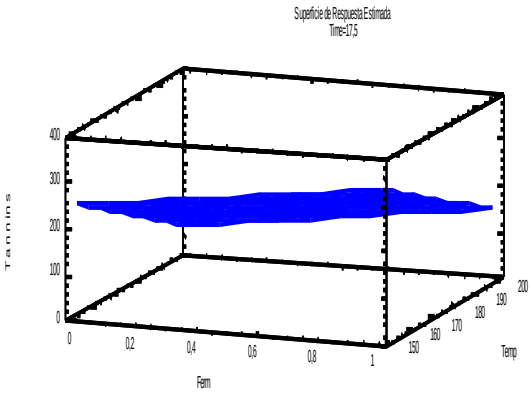
Respuesta Optimizada			
Meta: maximizar LPPSPP			
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	100,0	150,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Condición de análisis estadístico, entre: 150°C-200°C







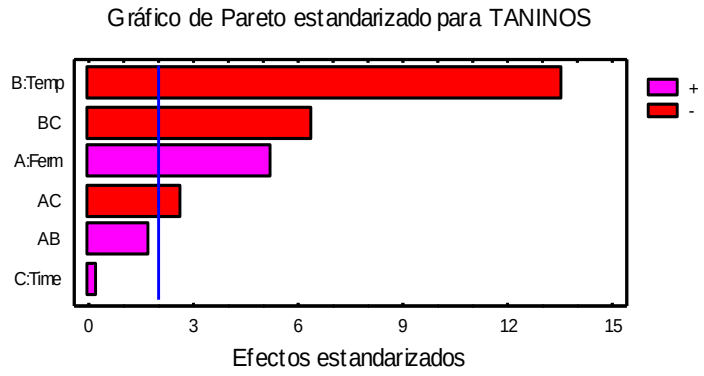


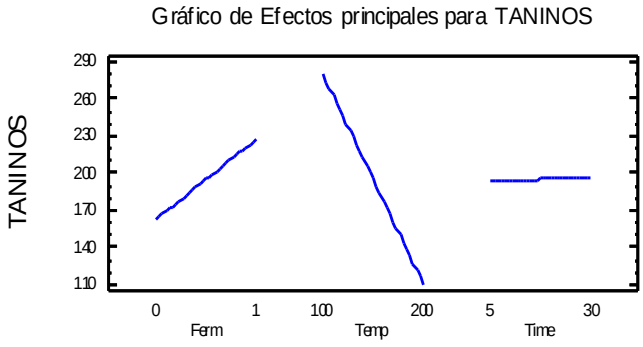
Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Taninos

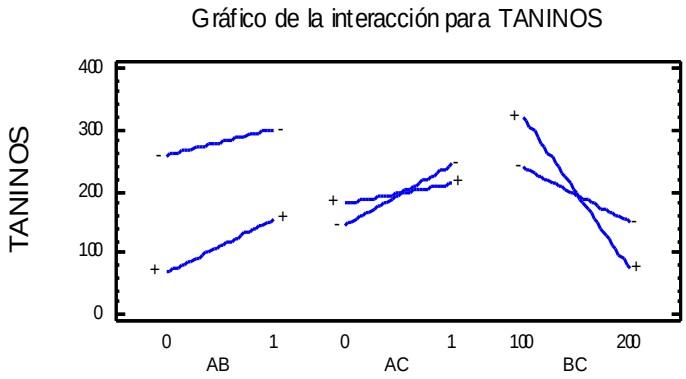
Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

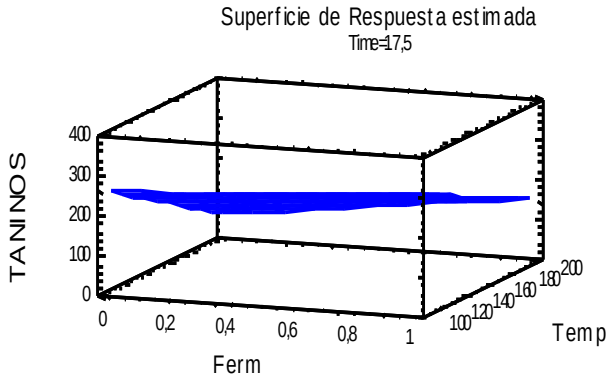
Condición de análisis estadístico, entre: 100°C-200°C

En este rango, son significativos los efectos de la temperatura, la fermentación y las interacciones de la temperatura y el tiempo junto con la interacción de la fermentación, en este sentido la fermentación genera un efecto de aumentar los taninos presentes en el orujo, pero los disminuye al interactuar con el tiempo de extracción.









Optimizar Respuesta
Meta: maximizar Taninos

Factor	*Bajo*	*Alto*	*Óptimo*
Ferm	0,0	1,0	1,0
Temp	150,0	200,0	150,0
Tiempo	5,0	30,0	5,0

Anexo C Correlaciones

C.2.1 Correlaciones agrupadas por grupos de dos temperaturas

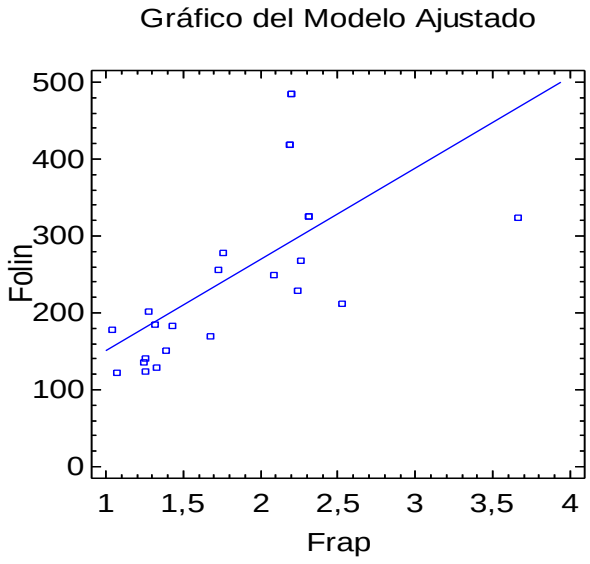
C. 2.1.1 Frap

Condición de análisis estadístico, entre: 50 y 100°C

Taninos (Folin y fenoles) con Frap

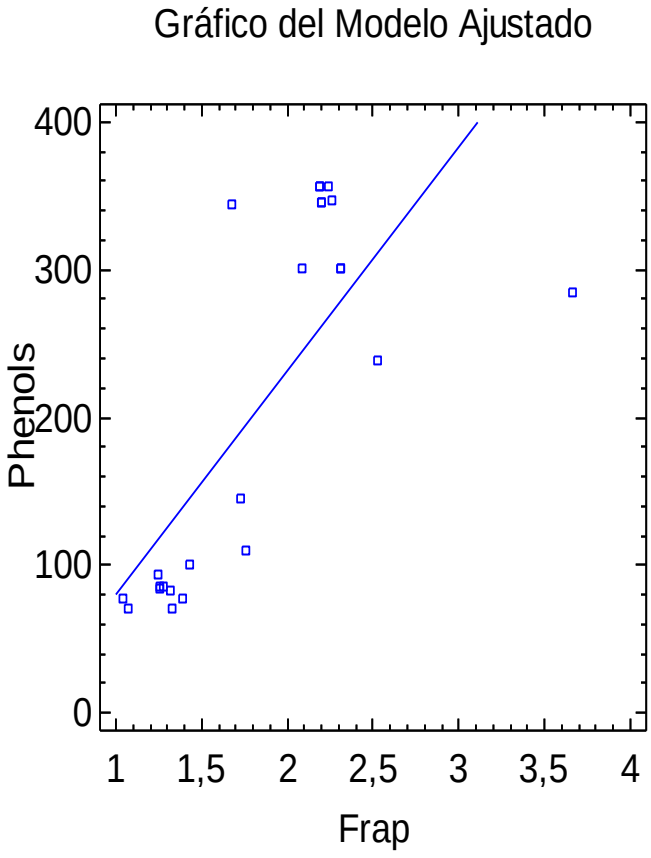
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	122958,	1	122958,	15,98	0,0006
Residuo	169233,	22	7692,41		
Total (Corr.)	292191,	23			



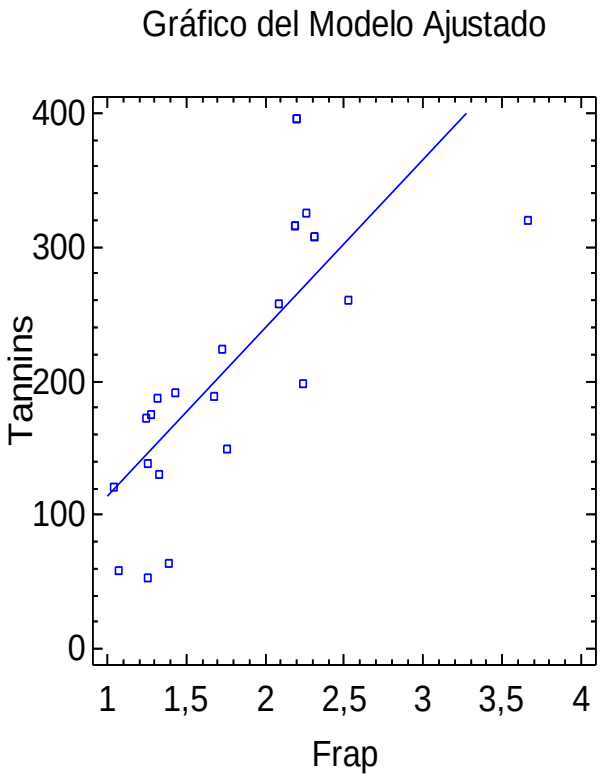
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	199529,	1	199529,	29,95	0,0000
Residuo	146566,	22	6662,07		
Total (Corr.)	346095,	23			



Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	137435,	1	137435,	30,69	0,0000
Residuo	98527,7	22	4478,53		
Total (Corr.)	235963,	23			

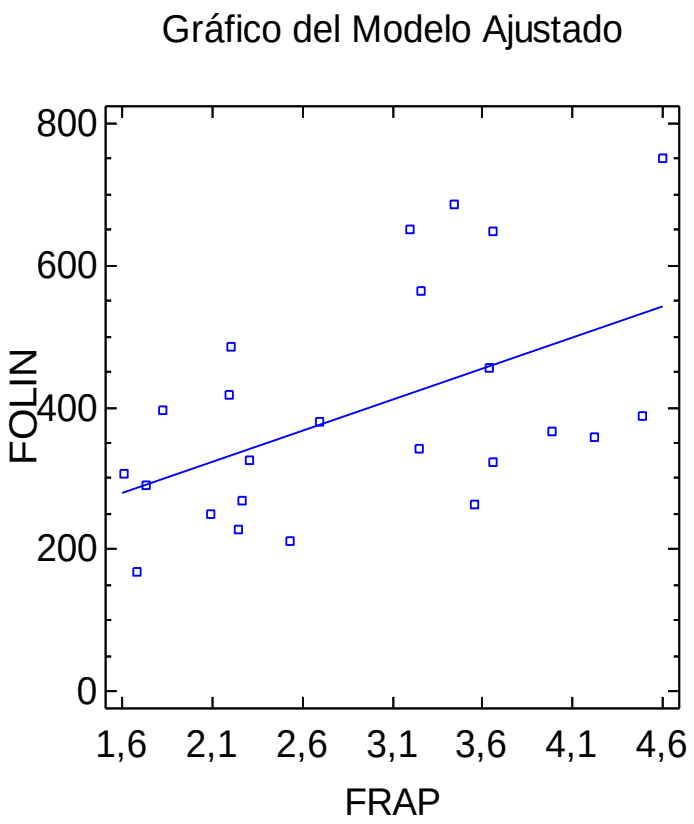


Condiciones de análisis: 100-150°C

Fenoles (Folin) y Antocianinas

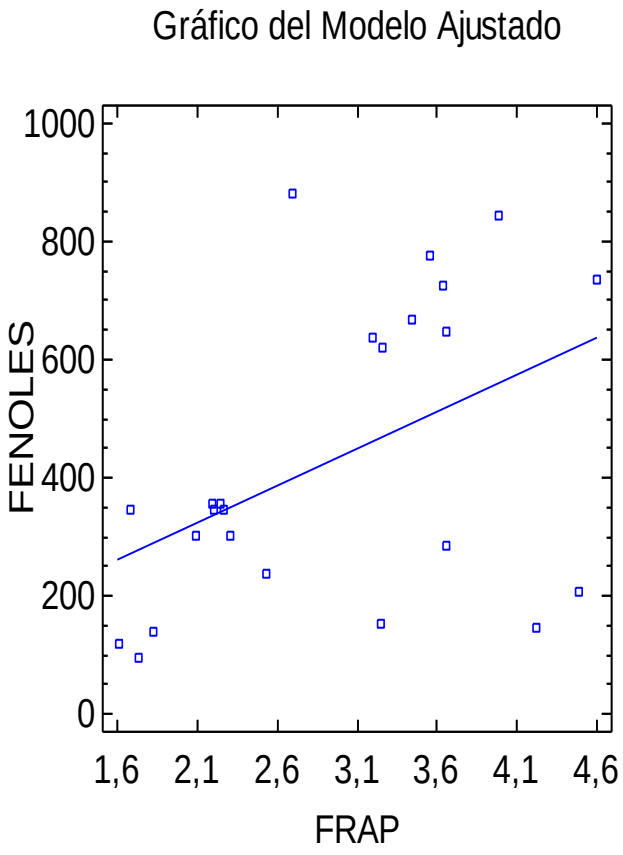
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	151776,	1	151776,	7,76	0,0108
Residuo	430335,	22	19560,7		
Total (Corr.)	582111,	23			



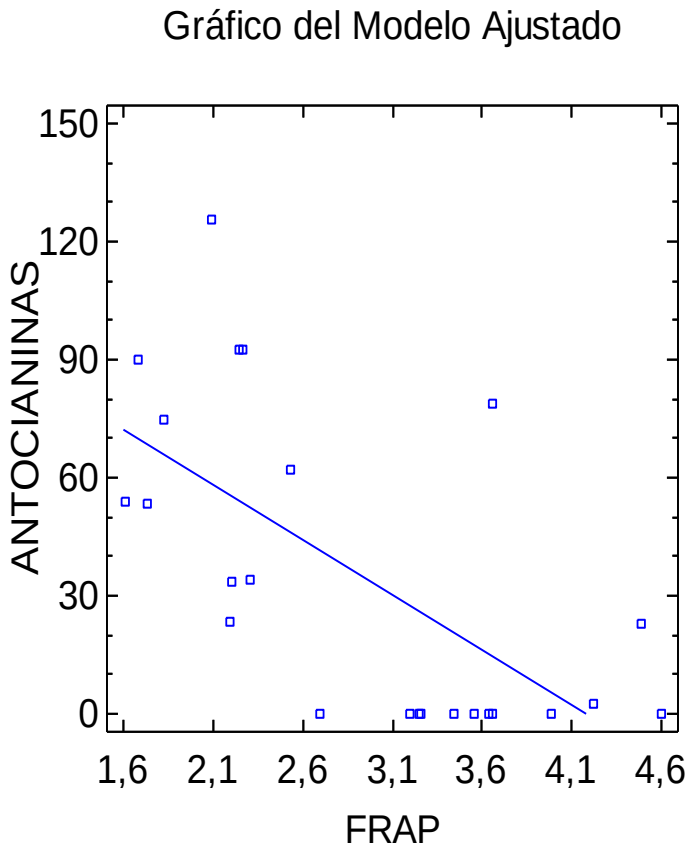
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	313793,	1	313793,	5,90	0,0238
Residuo	1,17069E6	22	53213,0		
Total (Corr.)	1,48448E6	23			



Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	15542,5	1	15542,5	16,33	0,0005
Residuo	20935,7	22	951,621		
Total (Corr.)	36478,2	23			

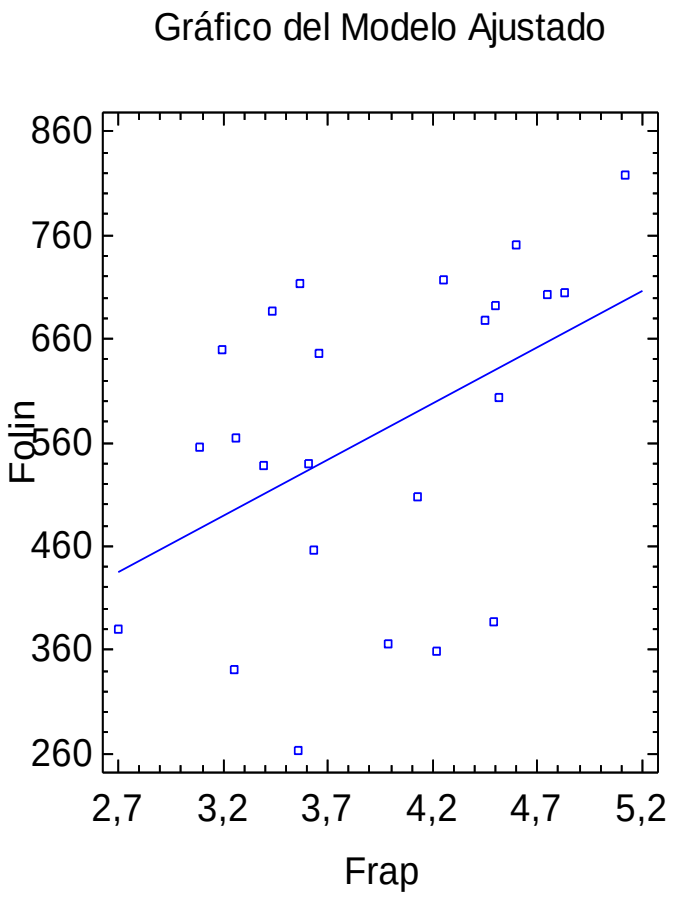


Condiciones de análisis:150 y 200°C

Folin

Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	113308,	1	113308,	5,74	0,0255
Residuo	434143,	22	19733,8		
Total (Corr.)	547450,	23			



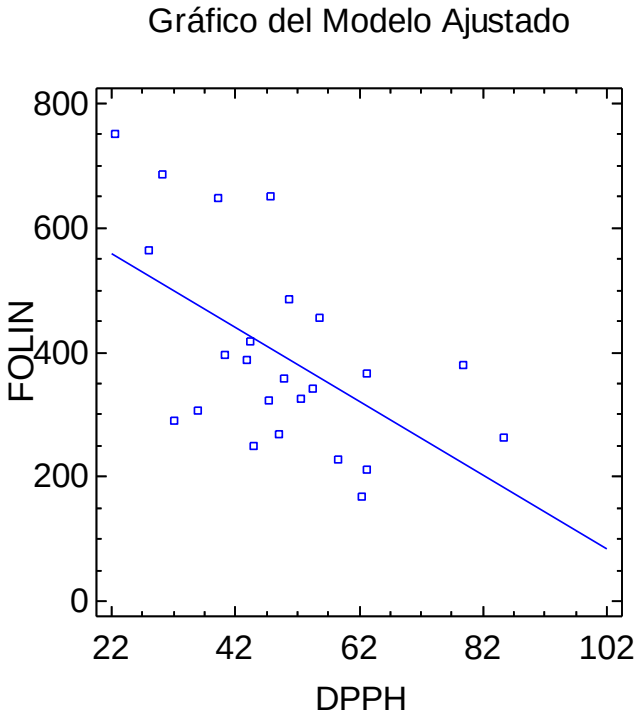
C.2.1.2 DPPH

Condiciónes de análisis: 50 y 100°C: no hay correlaciones

Condiciónes de análisis:100 y 150 °C Folin LPP taninos

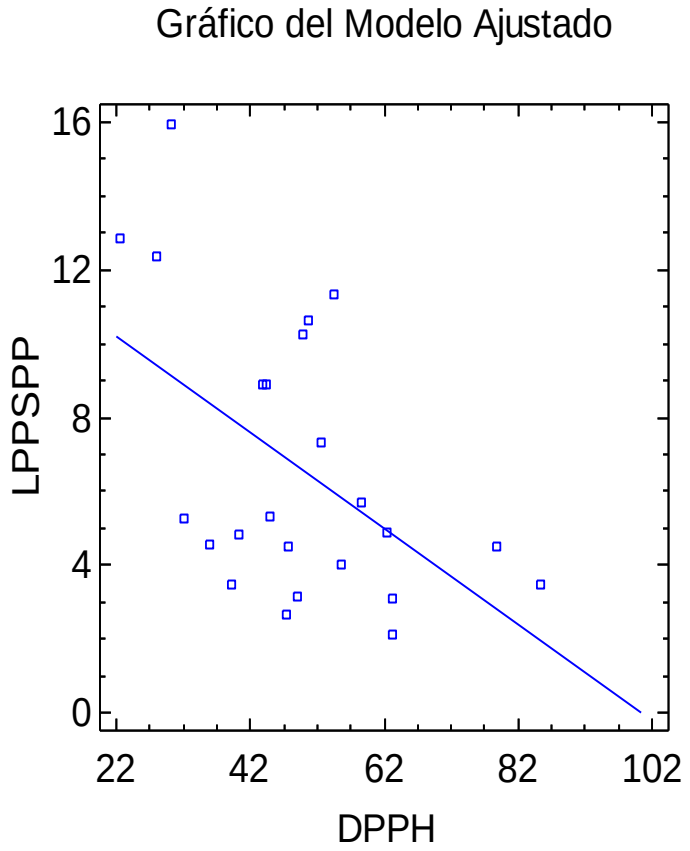
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	181750,	1	181750,	9,99	0,0045
Residuo	400361,	22	18198,2		
Total (Corr.)	582111,	23			



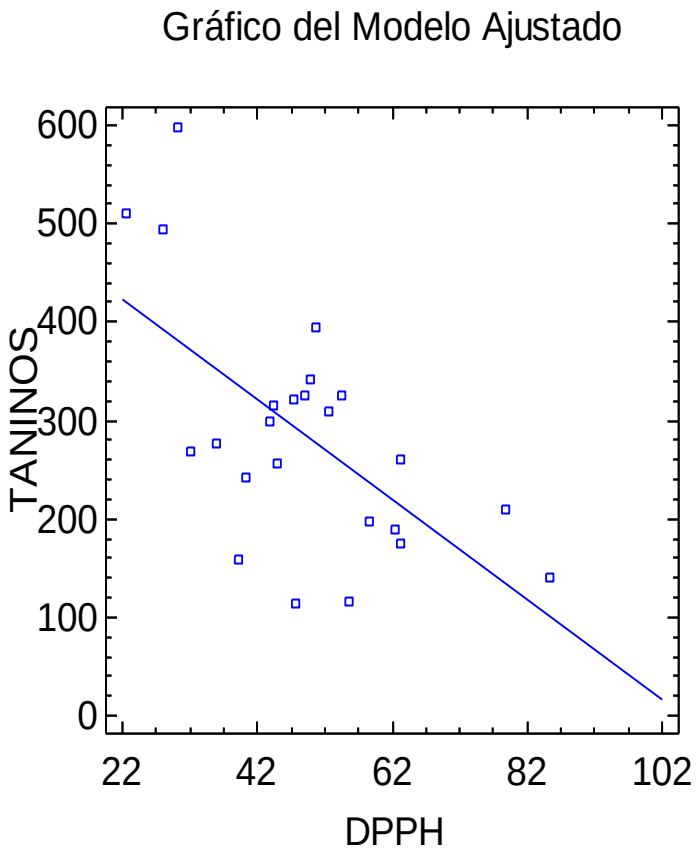
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	88,0831	1	88,0831	7,98	0,0099
Residuo	242,876	22	11,0398		
Total (Corr.)	330,959	23			



Análisis de Varianza

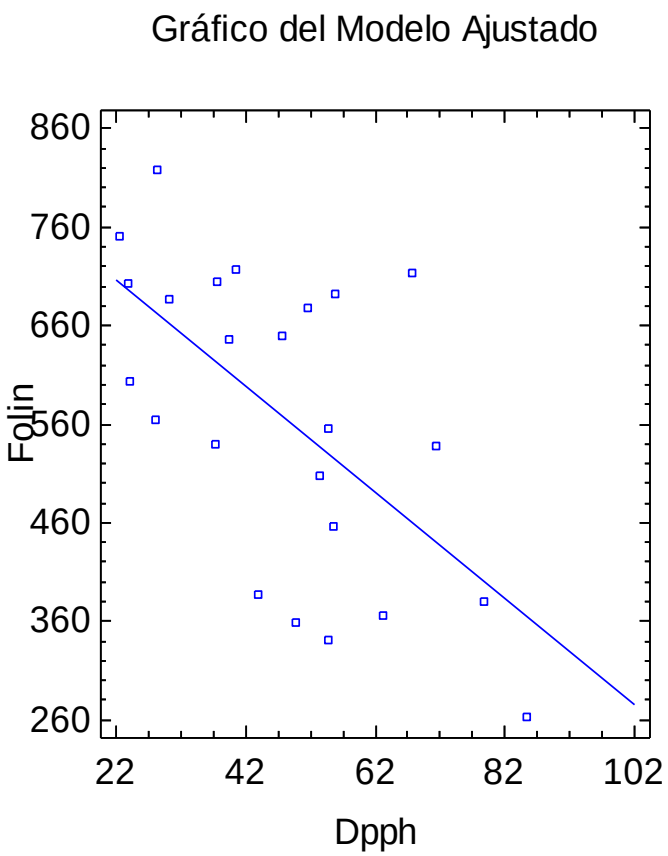
Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	133511,	1	133511,	13,82	0,0012
Residuo	212460,	22	9657,28		
Total (Corr.)	345971,	23			



Condiciones de análisis:150-200
Folin y taninos

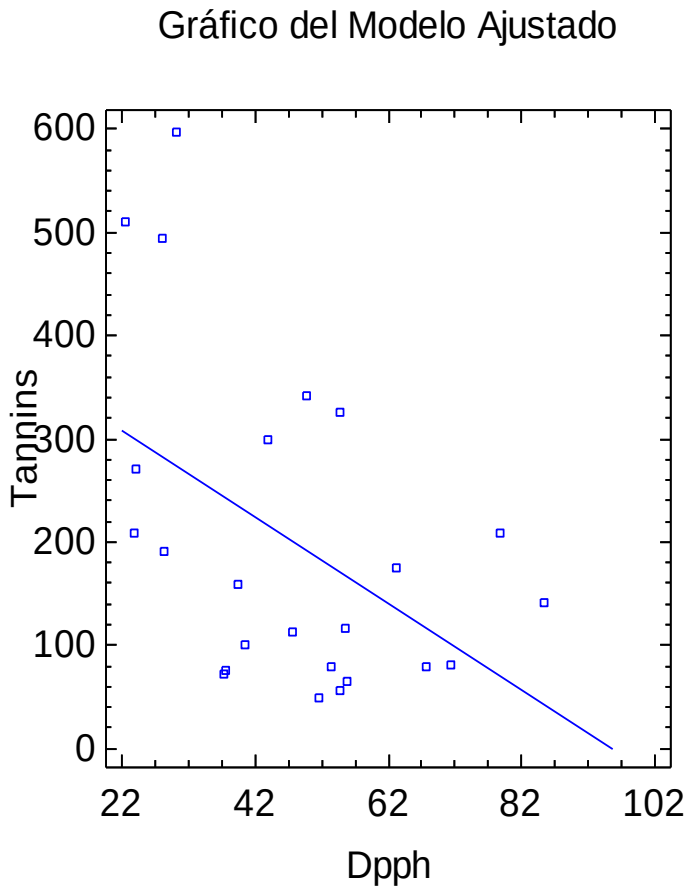
Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	203402,	1	203402,	13,01	0,0016
Residuo	344048,	22	15638,5		
Total (Corr.)	547450,	23			



Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	122738,	1	122738,	6,21	0,0208
Residuo	435151,	22	19779,6		
Total (Corr.)	557890,	23			



C.2.1.3 Frap y DPPH

Condiciones de análisis sin correlaciones:50-100°C , 100 -150°C y 150-200°C.

C.2.2 Correlaciones por temperaturas individuales

C.2.2.1 Análisis de correlaciones para extractos de orujo Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 50°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
Antocianinas		-0,40 -6,00 0,43	-0,62 -6,00 0,19	0,08 -6,00 0,88	0,46 -6,00 0,36	-0,13 -6,00 0,81	-0,13 -6,00 0,80
DPPH	-0,40 -6,00 0,43		-0,17 -6,00 0,74	0,52 -6,00 0,29	-0,31 -6,00 0,54	0,70 -6,00 0,12	0,05 -6,00 0,92
Fenoles Folin	-0,62 -6,00 0,19	-0,17 -6,00 0,74		0,04 -6,00 0,93	-0,20 -6,00 0,71	0,15 -6,00 0,77	0,41 -6,00 0,42
Fenoles H_A	0,08 -6,00 0,88	0,52 -6,00 0,29	0,04 -6,00 0,93		0,04 -6,00 0,94	0,93 -6,00 0,01	0,62 -6,00 0,19
Frap	0,46 -6,00 0,36	-0,31 -6,00 0,54	-0,20 -6,00 0,71	0,04 -6,00 0,94		-0,05 -6,00 0,92	0,54 -6,00 0,27
LPP_SPP	-0,13 -6,00 0,81	0,70 -6,00 0,12	0,15 -6,00 0,77	0,93 -6,00 0,01	-0,05 -6,00 0,92		0,54 -6,00 0,27
Taninos	-0,13 -6,00 0,80	0,05 -6,00 0,92	0,41 -6,00 0,42	0,62 -6,00 0,19	0,54 -6,00 0,27	0,54 -6,00 0,27	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de

la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%. Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

Fenoles H_A y LPP_SPP

C.2.2.2 Análisis de correlaciones para extractos de orujo Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 100°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
Antocianinas		-0,61 -6,00 0,20	-0,33 -6,00 0,52	-0,85 -6,00 0,03	-0,76 -6,00 0,08	-0,80 -6,00 0,05	-0,74 -6,00 0,10
DPPH	-0,61 -6,00 0,20		0,57 -6,00 0,24	0,87 -6,00 0,02	0,93 -6,00 0,01	0,76 -6,00 0,08	0,70 -6,00 0,13
Fenoles Folin	-0,33 -6,00 0,52	0,57 -6,00 0,24		0,70 -6,00 0,12	0,54 -6,00 0,27	0,78 -6,00 0,06	0,69 -6,00 0,13
Fenoles H_A	-0,85 -6,00 0,03	0,87 -6,00 0,02	0,70 -6,00 0,12		0,93 -6,00 0,01	0,93 -6,00 0,01	0,80 -6,00 0,06
Frap	-0,76 -6,00 0,08	0,93 -6,00 0,01	0,54 -6,00 0,27	0,93 -6,00 0,01		0,83 -6,00 0,04	0,68 -6,00 0,14
LPP_SPP	-0,80 -6,00 0,05	0,76 -6,00 0,08	0,78 -6,00 0,06	0,93 -6,00 0,01	0,83 -6,00 0,04		0,93 -6,00 0,01
Taninos	-0,74 -6,00 0,10	0,70 -6,00 0,13	0,69 -6,00 0,13	0,80 -6,00 0,06	0,68 -6,00 0,14	0,93 -6,00 0,01	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

Antocianinas y Fenoles H_A

DPPH y Fenoles H_A

DPPH y Frap

Fenoles H_A y Frap

Fenoles H_A y LPP_SPP

Frap y LPP_SPP

LPP_SPP y Taninos

C.2.2.3 Análisis de correlaciones para extractos de orujo Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 150°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
		0,08	0,10	-0,26	0,03	-0,48	-0,38
Antocianinas		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
		0,88	0,85	0,62	0,96	0,33	0,46
	0,08		-0,70	0,06	-0,42	-0,83	-0,89
DPPH	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,88		0,12	0,91	0,40	0,04	0,02
	0,10	-0,70		0,01	0,46	0,47	0,49
Fenoles Folin	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,85	0,12		0,98	0,36	0,35	0,33
	-0,26	0,06	0,01		0,79	0,05	0,03
Fenoles H_A	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00
	0,62	0,91	0,98		0,06	0,93	0,95
	0,03	-0,42	0,46	0,79		0,21	0,26
Frap	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00
	0,96	0,40	0,36	0,06		0,69	0,62
	-0,48	-0,83	0,47	0,05	0,21		0,99
LPP_SPP	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00
	0,33	0,04	0,35	0,93	0,69		0,00
	-0,38	-0,89	0,49	0,03	0,26	0,99	
Taninos	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	
	0,46	0,02	0,33	0,95	0,62	0,00	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

DPPH y LPP_SPP

DPPH y Taninos

LPP_SPP y Taninos

C.2.2.4 Análisis de correlaciones para extractos de orujo Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 200°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
Antocianinas		-0,09 -6,00 0,87	-0,02 -6,00 0,96	-0,19 -6,00 0,73	0,01 -6,00 0,99	-0,41 -6,00 0,42	-0,09 -6,00 0,86
DPPH	-0,09 -6,00 0,87		-0,53 -6,00 0,28	-0,90 -6,00 0,01	-0,66 -6,00 0,16	-0,85 -6,00 0,03	-0,86 -6,00 0,03
Fenoles Folin	-0,02 -6,00 0,96	-0,53 -6,00 0,28		0,26 -6,00 0,62	0,78 -6,00 0,07	0,31 -6,00 0,54	0,15 -6,00 0,78
Fenoles H_A	-0,19 -6,00 0,73	-0,90 -6,00 0,01	0,26 -6,00 0,62		0,48 -6,00 0,34	0,95 -6,00 0,00	0,98 -6,00 0,00
Frap	0,01 -6,00 0,99	-0,66 -6,00 0,16	0,78 -6,00 0,07	0,48 -6,00 0,34		0,54 -6,00 0,27	0,35 -6,00 0,50
LPP_SPP	-0,41 -6,00 0,42	-0,85 -6,00 0,03	0,31 -6,00 0,54	0,95 -6,00 0,00	0,54 -6,00 0,27		0,88 -6,00 0,02
Taninos	-0,09 -6,00 0,86	-0,86 -6,00 0,03	0,15 -6,00 0,78	0,98 -6,00 0,00	0,35 -6,00 0,50	0,88 -6,00 0,02	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

DPPH y Fenoles H_A

DPPH y LPP_SPP

DPPH y Taninos

Fenoles H_A y LPP_SPP

Fenoles H_A y Taninos

LPP_SPP y Taninos

C.2.2.5 Análisis de correlaciones para extractos de orujo no Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 50°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
Antocianinas		-0,45 -6,00 0,37	0,77 -6,00 0,07	0,35 -6,00 0,49	0,79 -6,00 0,06	0,46 -6,00 0,36	0,38 -6,00 0,45
DPPH	-0,45 -6,00 0,37		-0,47 -6,00 0,35	-0,50 -6,00 0,32	-0,64 -6,00 0,17	-0,12 -6,00 0,82	-0,18 -6,00 0,73
Fenoles Folin	0,77 -6,00 0,07	-0,47 -6,00 0,35		0,84 -6,00 0,04	0,96 -6,00 0,00	-0,10 -6,00 0,85	0,79 -6,00 0,06
Fenoles H_A	0,35 -6,00 0,49	-0,50 -6,00 0,32	0,84 -6,00 0,04		0,84 -6,00 0,04	-0,48 -6,00 0,33	0,90 -6,00 0,02
Frap	0,79 -6,00 0,06	-0,64 -6,00 0,17	0,96 -6,00 0,00	0,84 -6,00 0,04		-0,09 -6,00 0,86	0,76 -6,00 0,08
LPP_SPP	0,46 -6,00 0,36	-0,12 -6,00 0,82	-0,10 -6,00 0,85	-0,48 -6,00 0,33	-0,09 -6,00 0,86		-0,40 -6,00 0,43
Taninos	0,38 -6,00 0,45	-0,18 -6,00 0,73	0,79 -6,00 0,06	0,90 -6,00 0,02	0,76 -6,00 0,08	-0,40 -6,00 0,43	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

Fenoles Folin y Fenoles H_A

Fenoles Folin y Frap

Fenoles H_A y Frap

Fenoles H_A y Taninos

C.2.2.6 Análisis de correlaciones para extractos de orujo no Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 100°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
		-0,59	0,04	0,45	-0,42	0,74	-0,13
Antocianinas		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
		0,21	0,94	0,37	0,41	0,10	0,80
	-0,59		-0,80	-0,05	-0,39	-0,01	-0,67
DPPH	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,21		0,06	0,93	0,44	0,99	0,14
	0,04	-0,80		-0,18	0,84	-0,38	0,83
Fenoles Folin	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,94	0,06		0,74	0,04	0,45	0,04
	0,45	-0,05	-0,18		-0,49	0,68	-0,34
Fenoles H_A	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00
	0,37	0,93	0,74		0,32	0,14	0,51
	-0,42	-0,39	0,84	-0,49		-0,62	0,67
Frap	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00
	0,41	0,44	0,04	0,32		0,19	0,15
	0,74	-0,01	-0,38	0,68	-0,62		-0,71
LPP_SPP	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00
	0,10	0,99	0,45	0,14	0,19		0,12
	-0,13	-0,67	0,83	-0,34	0,67	-0,71	
Taninos	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	
	0,80	0,14	0,04	0,51	0,15	0,12	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

Fenoles Folin y Frap

Fenoles Folin y Taninos

C.2.2.7 Análisis de correlaciones para extractos de orujo no Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 150°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
		-0,61	0,43	-0,46	0,63	0,32	0,36
Antocianinas		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
		0,20	0,40	0,36	0,18	0,54	0,49
	-0,61		-0,59	0,84	-0,68	-0,78	-0,85
DPPH	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,20		0,22	0,03	0,14	0,07	0,03
	0,43	-0,59		-0,21	0,17	0,27	0,47
Fenoles Folin	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00	-6,00
	0,40	0,22		0,68	0,75	0,60	0,35
	-0,46	0,84	-0,21		-0,48	-0,97	-0,93
Fenoles H_A	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00	-6,00
	0,36	0,03	0,68		0,34	0,00	0,01
	0,63	-0,68	0,17	-0,48		0,26	0,31
Frap	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00	-6,00
	0,18	0,14	0,75	0,34		0,62	0,55
	0,32	-0,78	0,27	-0,97	0,26		0,97
LPP_SPP	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00		-6,00
	0,54	0,07	0,60	0,00	0,62		0,00
	0,36	-0,85	0,47	-0,93	0,31	0,97	
Taninos	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	-6,00	
	0,49	0,03	0,35	0,01	0,55	0,00	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P

abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

DPPH y Fenoles H_A

DPPH y Taninos

Fenoles H_A y LPP_SPP

Fenoles H_A y Taninos

LPP_SPP y Taninos

C.2.2.8 Análisis de correlaciones para extractos de orujo no Fermentado. Condiciones de 5 y 30 min a 200°C

Correlaciones							
	Antocianinas	DPPH	Fenoles Folin	Fenoles H_A	Frap	LPP_SPP	Taninos
Antocianinas		-0,76 -6,00 0,08	-0,47 -6,00 0,35	0,24 -6,00 0,65	-0,13 -6,00 0,80	-0,32 -6,00 0,54	0,17 -6,00 0,75
DPPH	-0,76 -6,00 0,08		0,22 -6,00 0,68	0,37 -6,00 0,47	-0,22 -6,00 0,68	0,82 -6,00 0,05	0,48 -6,00 0,34
Fenoles Folin	-0,47 -6,00 0,35	0,22 -6,00 0,68		0,03 -6,00 0,95	0,67 -6,00 0,15	0,21 -6,00 0,69	-0,12 -6,00 0,81
Fenoles H_A	0,24 -6,00 0,65	0,37 -6,00 0,47	0,03 -6,00 0,95		-0,19 -6,00 0,72	0,84 -6,00 0,04	0,97 -6,00 0,00
Frap	-0,13 -6,00 0,80	-0,22 -6,00 0,68	0,67 -6,00 0,15	-0,19 -6,00 0,72		-0,16 -6,00 0,76	-0,37 -6,00 0,47
LPP_SPP	-0,32 -6,00 0,54	0,82 -6,00 0,05	0,21 -6,00 0,69	0,84 -6,00 0,04	-0,16 -6,00 0,76		0,86 -6,00 0,03
Taninos	0,17 -6,00 0,75	0,48 -6,00 0,34	-0,12 -6,00 0,81	0,97 -6,00 0,00	-0,37 -6,00 0,47	0,86 -6,00 0,03	

Esta tabla muestra las correlaciones (producto de Pearson) entre cada par de variables. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables. También se muestra, el número de pares de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada bloque de la tabla es un valor-P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Valores-P abajo de 0,05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los siguientes pares de variables tienen valores-P por debajo de 0,05:

DPPH y LPP_SPP

Fenoles H_A y LPP_SPP

Fenoles H_A y Taninos

LPP_SPP y Taninos

C.2.3 Correlaciones por grupo: sin diferenciar fermentación. Todas las temperaturas y tiempos

Temperatura	BLOQUE	Ferm	Tiempo	Frap	Dpph	Folin	Fenoles	Antoc.	LPP/SPP	Taninos
50		1 no fermentado	5,0	1,1	84,0	122,4	70,7	52,3	2,4	57,6
50		2 no fermentado	5,0	1,3	68,2	123,8	84,3	50,7	1,9	52,7
50		3 no fermentado	5,0	1,4	57,6	150,1	77,3	71,4	2,8	63,4
50		1 no fermentado	30,0	1,4	81,9	183,8	100,6	64,0	2,1	191,8
50		2 no fermentado	30,0	1,8	64,4	277,9	109,3	87,3	2,4	149,1
50		3 no fermentado	30,0	1,7	55,5	255,9	144,7	64,7	2,0	223,3
100		1 no fermentado	5,0	1,7	62,5	169,4	344,8	90,2	4,9	188,3
100		2 no fermentado	5,0	2,2	58,6	228,9	356,1	92,6	5,7	198,0
100		3 no fermentado	5,0	2,1	45,0	249,0	301,4		5,3	257,1
100		1 no fermentado	30,0	2,5	63,1	212,1	238,7	62,3	2,1	261,0
100		2 no fermentado	30,0	3,7	47,3	323,2	284,9	79,0	2,7	320,4
100		3 no fermentado	30,0	2,3	49,0	268,4	347,1	92,5	3,2	325,2
150		1 no fermentado	5,0	4,2	49,8	358,5	145,4	2,5	10,2	341,2
150		2 no fermentado	5,0	4,5	43,9	386,6	205,7	22,7	8,9	298,7
150		3 no fermentado	5,0	3,3	54,6	341,3	153,9	0,0	11,3	326,0
150		1 no fermentado	30,0	3,6	85,3	263,7	774,9	0,0	3,5	140,5
150		2 no fermentado	30,0	4,0	63,3	366,4	844,5	0,0	3,1	175,9
150		3 no fermentado	30,0	2,7	78,9	379,4	881,1	0,0	4,5	209,3
200		1 no fermentado	5,0	3,6	67,7		291,0	0,0	2,3	79,4
200		2 no fermentado	5,0	3,4	71,5	537,2	276,7	0,0	2,3	80,2
200		3 no fermentado	5,0	4,5	55,7	692,5	247,8	0,0	1,5	65,7
200		1 no fermentado	30,0	3,6	37,4	540,4	264,5	3,2	0,8	71,4
200		2 no fermentado	30,0	3,1	54,7	555,5	192,1	0,0	0,6	55,9
200		3 no fermentado	30,0	4,4	51,4	677,2	189,8	0,0	0,6	49,6
50		1 fermentado	5,0	1,3	41,5	128,6	70,7	43,0	2,8	130,0
50		2 fermentado	5,0	1,2	38,5	140,0	85,3	56,8	4,2	138,2
50		3 fermentado	5,0	1,3	32,8	184,3	82,5	39,3	3,6	187,5
50		1 fermentado	30,0	1,2	60,6	135,1	93,8	38,4	5,4	171,9
50		2 fermentado	30,0	1,0	47,0	178,5	77,1	27,8	3,6	120,9
50		3 fermentado	30,0	1,3	48,6	201,2	85,4	31,9	5,0	175,6
100		1 fermentado	5,0	2,3	52,6	324,6	300,5	34,2	7,3	308,3
100		2 fermentado	5,0	2,2	44,5	418,6	356,3	23,4	8,9	316,0
100		3 fermentado	5,0	2,2	50,5	485,5	346,0	33,6	10,6	395,5
100		1 fermentado	30,0	2,3	52,6	324,6	300,5	34,2	7,3	308,3
100		2 fermentado	30,0	2,2	44,5	418,6	356,3	23,4	8,9	316,0
100		3 fermentado	30,0	2,2	50,5	485,5	346,0	33,6	10,6	395,5
150		1 fermentado	5,0	3,4	30,1	687,2	667,9	0,0	15,9	597,1
150		2 fermentado	5,0	3,3	28,0	564,2	621,0	0,0	12,3	493,8
150		3 fermentado	5,0	4,6	22,6	751,1	736,5	0,0	12,9	510,1
150		1 fermentado	30,0	3,6	55,6	455,6	727,1	0,0	4,0	115,8
150		2 fermentado	30,0	3,2	47,5	650,0	638,7	0,0	4,5	113,7
150		3 fermentado	30,0	3,7	39,3	646,8	647,6	0,0	3,5	159,5
200		1 fermentado	5,0	4,5	24,0	604,3	379,6	7,4	4,2	270,4
200		2 fermentado	5,0	4,7	23,7	702,3	345,6	0,0	5,7	209,0
200		3 fermentado	5,0	5,1	28,3	818,8	312,5	0,0	4,5	190,4
200		1 fermentado	30,0	4,1	53,4	507,6	108,4	0,0	1,1	79,6
200		2 fermentado	30,0	4,2	40,6	716,1	130,5	4,6	0,9	101,0
200		3 fermentado	30,0	4,8	37,6	704,8	117,6	9,9	0,9	75,6

Correlaciones entre ensayos de extractos F + NF

Frap-Dpph	Folin-Fenoles	Folin-Anto	Folin-LPP/SPP	Folin-Taninos	Fenol-Antoc.	Fenol-LPP/SPP	Fenol-Taninos	Anto-LPP/SPP	Anto-Taninos	LPP/SPP-Taninos
-0,38	0,38	-0,71	0,16	0,37	-0,41	0,35	0,37	-0,17	0,00	0,89

		Folin	Phenols	Antho	LPPtoSPP	Tannins
FRAP	Coef corr.	0,83	0,37	-0,67	0,04	0,072
	R2	0,7	0,14	0,45	0,002	0,005
DPPH	Coef corr.	-0,53	-0,03	0,27	-0,36	-0,4
	R2	0,49	0,001	0,07	0,13	0,16

C.2.4 Análisis estadístico de las interacciones entre los efectos de temperatura, fermentación y tiempo de extracción.

Tabla C.2 Interacciones entre efectos

Efecto por sí solo, entre temperaturas		**Frap**	**DPPH**	**Folin-fenoles**	**H-A fenoles**	**Antociani - nas**	**LPP/ SPP**	**Tani-nos**
Temperatura (T)	50-100°C	+	.	+	+	.	+	+
Temperatura (T)	100-150°C	+	.	+	+	-	+	.
Temperatura (T)	150-200°C	+	.	+	-	.	.	-
Fermentación (F)	50-100°C	.	+	+	.	-	+	+
Fermentación (F)	100-150°C	.	+	+	+	-	+	+
Fermentación (F)	150-200°C	.	+	+	+	.	+	+
Tiempo (*t*)	50-100°C	+	.	+	.	.	.	+
Tiempo (*t*)	100-150°C	.	-	.	+	-	-	-
Tiempo (*t*)	150-200°C	.	-	.	+	.	.	-
Interacción de efectos, entre temperaturas		**Frap**	**DPPH**	**Folin-fenoles**	**H-A fenoles**	**Antociani - nas**	**LPP/ SPP**	**Tani-nos**
T-F	50-100°C	-	-	+	.	-	+	.
T-F	100-150°C	.	+	+	+	+	.	.
T-F	150-200°C	+	.	-	-	.	.	.
T- *t*	50-100°C	.	.	.	.	.	-	.
T- *t*	100-150°C	-	-	-	+	+	-	-
T- *t*	150-200°C	.	+	.	-	.	+	+
F- *t*	50-100°C	.	.	.	.	.	+	-
F- *t*	100-150°C	.	.	.	-	.	.	-
F- *t*	150-200°C	.	-	.	-	.	.	-

+=Existe efecto o interacción de efectos significativo(a) positivo(a) con un 95% de confianza.
- = Existe efecto o interacción de efectos significativo(a) negativo(a) con un 95% de confianza.
. = No existe efecto o interacción de efectos significativos(as) con un 95% de confianza.
Nota: para el rango de temperatura de 150-200°C no hay antocianinas presentes.

C.2.5 Resumen de resultados de análisis químicos.

Tabla C.2.5.1 Síntesis de resultados químicos: FRAP y DPPH.

Resultado	Ensayo: Frap	Ensayo: DPPH. Radical ip50
1er resultado	F-5´200°C	F-5´200°C
2do resultado	F-30´200°C	F-5´150°C
3er resultado	NF-5´150°C	F-5´100°C
4to resultado	NF-5´200°C	F-5´50°C
5to resultado	F-5´150°C	F-30´200°C
6to resultado	NF-30´200°C	F-30´150°C
7mo resultado	F-30´150°C	NF-30´200°C
8vo resultado	NF-30´150°C	F-30´100°C
9no resultado	NF-30´100°C	NF-5´150°C
10mo resultado	F-30´100°C	F-30´50°C
11vo resultado	NF-5´100°C	NF-30´100°C
12vo resultado	F-5´100°C	NF-5´100°C
13vo resultado	NF-30´50°C	NF-5´200°C
14vo resultado	F-5´50°C	NF-30´50°C
15vo resultado	NF-5´50°C	NF-5´50°C
16vo resultado	F-30´50°C	NF-30´150°C

Ferm=Orujo Fermentado. NF= Orujo No Fermentado. H-A= ensayo químico de Harbertson-Adams

Tabla C.2.5.2 Síntesis de resultados químicos: Folin y Fenoles H-A.

Resultado	Folin	Fenoles H-A
1er resultado	F-5´200°C	NF-30´150°C
2do resultado	F-5´150°C	F-5´150°C
3er resultado	NF-5´200°C	F-30´150°C
4to resultado	F-30´200°C	F-5´200°C
5to resultado	NF-30´200°C	F-30´100°C
6to resultado	F-30´150°C	NF-5´100°C
7mo resultado	F-30´100°C	NF-30´100°C
8vo resultado	NF-5´150°C	NF-5´200°C
9no resultado	NF-30´150°C	NF-30´200°C
10mo resultado	F-5´100°C	NF-5´150°C
11vo resultado	NF-30´100°C	F-30´200°C
12vo resultado	NF-30´50°C	NF-30´50°C
13vo resultado	NF-5´100°C	F-5´100°C
14vo resultado	F-30´50°C	F-30´50°C
15vo resultado	F-5´50°C	F-5´50°C
16vo resultado	NF-5´50°C	NF-5´50°C

Tabla C.2.5.3 Síntesis de resultados: Antocianinas, LPP/SPP y Taninos H-A.

Resultado	Antocianinas	LPP/SPP	Taninos H-A
1er resultado	NF-5´100°C	F-5´150°C	F-5´150°C
2do resultado	NF-30´100°C	NF-5´150°C	F-30´100°C
3er resultado	NF-30´50°C	F-30´100°C	NF-5´150°C
4to resultado	F-5´100°C	NF-5´100°C	NF-30´100°C
5to resultado	NF-5´50°C	F-5´100°C	F-5´100°C
6to resultado	F-5´50°C	F-5´200°C	F-5´200°C
7mo resultado	F-30´50°C	F-30´50°C	NF-5´100°C
8vo resultado	F-30´100°C	F-30´150°C	NF-30´50°C
9no resultado	NF-5´150°C	NF-30´150°C	NF-30´150°C
10mo resultado	F-30´200°C	F-5´50°C	F-30´50°C
11vo resultado	F-5´200°C	NF-30´100°C	F-5´50°C
12vo resultado	NF-30´200°C	NF-5´50°C	F-30´150°C
13vo resultado	NF-30´150°C	NF-30´50°C	F-30´200°C
14vo resultado	F-5´150°C	NF-5´200°C	NF-5´200°C
15vo resultado	F-30´150°C	F-30´200°C	NF-30´200°C
16vo resultado	NF-5´200°C	NF-30´200°C	NF-5´50°C

APÉNDICE D: PROCESO DE EXTRACCIÓN Y COLOR DE EXTRACTOS

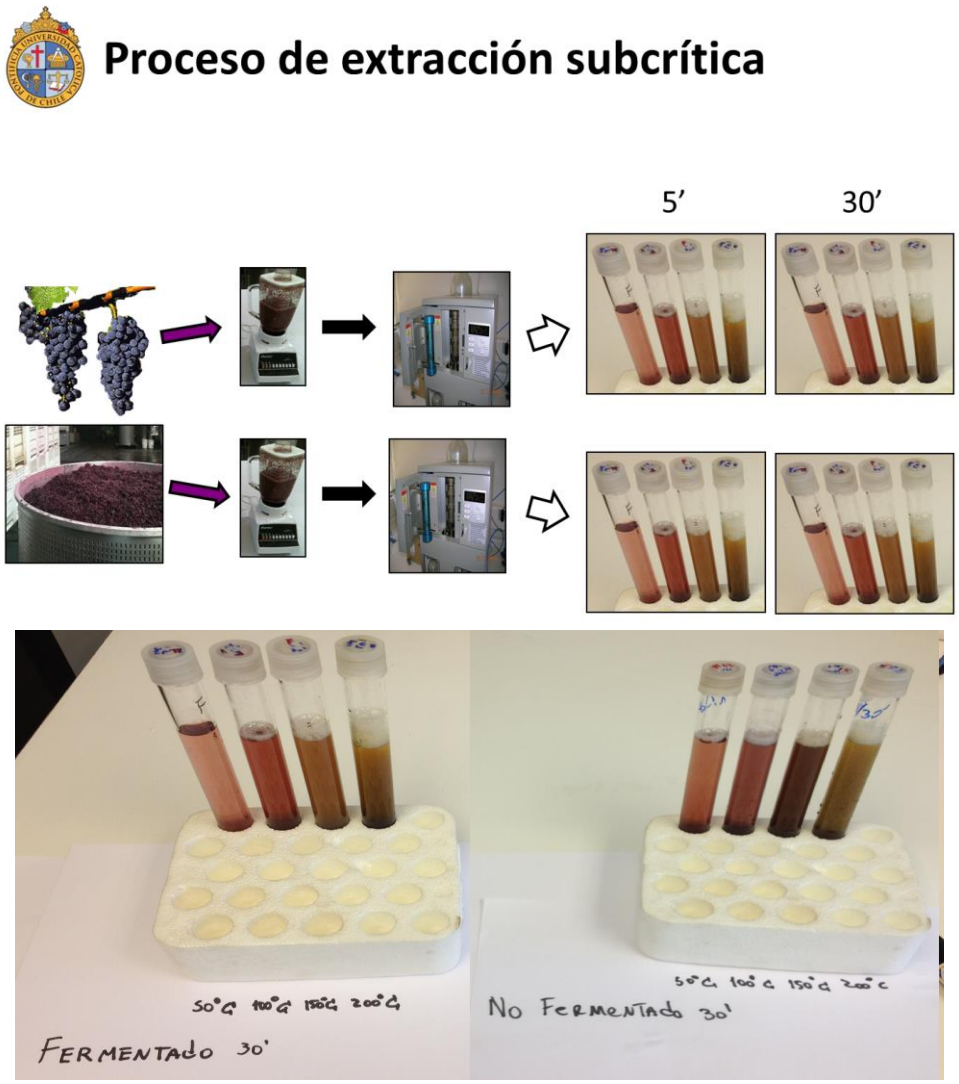


Figura D1.Proceso y Colores de extracción, 30 minutos. De izquierda a derecha respectivamente: 50°C, 100°C, 150°C, 200°C .

APÉNDICE E: LITERATURA DE EXTRACTOS DE UVA

Metodo de extraccion	Tiempos de extracción	Temperaturas de extracción	Presion de extracción	Método identificacion de moleculas	Ensayos antioxidantes	Familias de polifenoles identificadas	Proantocianidinas: grado identificado de polimerizacion	Condición de Fermentación	Autor
HPTE mezcla agua-solvente	30 min	100, 120 y 140◦ C	79 , 114 y 148 atm	flavonoides	Folin-Ciocalteu, Dpph	fenoles, flavonoides	N.I.	fermentado	Aliakbarian et. al.
HPTE	15 - 90 min	110° C	197 atm	HPLC, flavonoides totales (TF), o-difenoles (OD); método molybdate (Gutfinger, 1981).	Dpph, Folin–Ciocalteau	5-hidroximetilfurfural, hidroxitirosol, ácido protocatechuic, ácido p-hidroxibenzoico, catequina, ácido siringico, ácido vainillico, ácido cumarico, trans-resveratrol, quercetina, ácido galico.	N.I.	no fermentado	Casazza et al.
HPTE diferentes solventes hidroetanolicos	30–90 min	20–70°C	1973, 3948 y 5921 atm	HPLC-DAD/ESI-MS	ABTS+ (TROLOX equivalentes)	antocianinas	N.I.	no fermentado	Corrales et al.
HPTE agua etanol	5−90 min	160-240°C	10 atm	Analisis LC-DAD , LC-TOF/MS	Folin−Ciocalteu, ORAC	5-hidroximetilfurfural, ácido gálico, ácido ferúlico pirocatecol, ácido protocatéquico, pirogabol guayacol, ácido vanillico, ácido siringico, ácido 4-hidroxibenzoico, catequina, a.o-cumárico, ácido sinápico	N.I.	no fermentado	Delgado-Torre et al.
HPTE	30 min	50, 100 y 150 ◦C,	102 atm	HPLC–DAD–MS	N.I.	catequinas, epicatequinas y proantocianidinas(6)	N.I.	no fermentado	García-Marino et. al.
			N.I.	MALDI-TOF-MS y GC-MS	N.I.	antocianinas	N.I.	no fermentado	Hakimuddin et al.
HPTE 6 diferentes solventes	3 -5 min	20 to 140 °C con cambios de 20 °C	100 atm	HPLC, monoglucosidos totales, antocianinas,	ORAC, Folin-Ciocalteu	6 antocianinas	N.I.	no fermentado	Ju et al.
HPTE	40 s	100 to 160°C con incrementos de 10°C	N.I.	N.I.	ORAC		N.I.	no fermentado	Ju et al.
Con solventes	N.I.	N.I.	N.I.	MALDI-TOF-MS	N.I.	poli-galloI, poliflavan-3-oles	polimeros de hasta 11 unidades	no fermentado	Krueger et al.
HPTE diferentes solventes: etanol-HCL–H2O	20-60 min	60-120°C	40-79 atm	Espectrofotometria (antocianinas), flavanoles totales: reaccion de dimetil aminocinamaldeido (DMACA), HPLC-DAD y HPLC-MS-ESI	Folin-Ciocalteu	antocianinas, fenoles totales , flavanoles	N.I.	fermentado	Luque-Rodríguez et.al.
HPTE diferentes solventes	"1 ciclo"	40, 60, 80, 100, 120, y 140 C	67 atm	HPLC-MS y HPLC	ORAC	procianidinas	grado de polimerizacion 5	no fermentado	Monrad et al.
HPTE solventes hidroetanolicos	N.I.	40, 60, 80, 100, 120, y 140 C	67 atm	HPLC-MS y HPLC	ORAC	antocianinas	N.I.	no fermentado	Monrad et al.
HPTE usando agua como solvente	11-28 min	60 y 140 °C	4 atm	HPLC−MS, HPLC/ESI-MS	N.I.	antocianinas, procianidinas	N.I.	no fermentado	Monrad et al.
HTPE diferentes solventes	10 min	40 y 100°C	40-150 atm	HPLC	N.I.	ácido galico , ácido p-hidroxybenzoico , ácido ferulico, ácido Sinapico, aldehido Veratrico	N.I.	no fermentado	Palma et al.
HTPE diferentes solventes	5-10 min	100–200 ◦C	100 atm	HPLC	N.I.	catequina, epicatequina	N.I.	no fermentado	Pineiro et. al.
HTPE agua-metanol	5-20 min	40-150 ◦C	40 atm	HPLC	N.I.	trans-resveratrol	N.I.	no fermentado	Pineiro et. al.
N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	FT-IR y MALDITOF	N.I.	taninos	hasta polimeros de 6 unidades	no fermentado	Ping et al.
HTPE diferentes solventes	3-5min	40 to 120 ◦C	148 atm	HPLC	DPPH y ABTS	fenoles, antocianinas	N.I.	no fermentado	Polovka et al.
HPTE diferentes solventes	30 min	60° - 140°C	102 atm	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	no fermentado	Srinivas et al.
Con solventes	12 h.	N.I.	N.I.	MALDI-TOF-MS	N.I.	proantocianidinas	polimeros de hasta 10 unidades	no fermentado	Vivas et al.
Con solventes	N.I.	50 °C.	Atmosferica	HPLC/MS y MALDI-	N.I.	procianidinas	hasta de 9 unidades	no fermentado	Yang et al.

APÉNDICE F: RESULTADOS CON ANALISIS ESTADÍSCO COMPARATIVO

Temp. (°C)	Tiem. (min)	Rendimiento extracción (mg d.e./g d.m.)			Fenoles (Folin) (mg GAE/g d.m.)			DPPH (mg TE/g d.m.)			FRAP (mg AAE/g d.m.)			Antocianinas (mg M3GE/g d.m.)			Taninos (mg CE./g d.m.)			LPP/SPP proporción		
		NF	F		NF	F		NF	F		NF	F		NF	F		NF	F		NF	F	
50	5	124 a	115 a		0.8 a	0.9 a		28 a	42 ab		1.2 a	1.3 a		1.0 b	1.1 b		1.2 a	4.1 b	*	2.6 bc	3.9 b	
	30	182 ab	141 ab		1.6 b	1.1 a		44 b	39 a		1.6 ab	1.2 a	*	1.8 c	0.8 b	*	4.8 b	3.7 ab		2.2 b	5.2 b	*
100	5	208 b	169 bc		1.4 b	1.8 ab		46 bc	65 c	*	2.2 bc	1.7 b		3.1 d	1.7 c	*	6.5 b	8.8 d	*	5.3 d	4.7 b	
	30	184 b	199 c		1.7 b	2.7 b	*	48 bc	60 bc		2.4 c	2.2 c		2.2 c	1.0 b	*	6.0 b	9.4 d	*	2.9 bc	8.1 c	*
150	5	237 bc	195 c		2.1 c	4.2 c	*	70 d	125 e	*	4.4 e	3.4 d	*	0.0 a	0.0 a		9.6 c	14.7 e	*	10.8 e	12.6 d	*
	30	325 d	259 d	*	2.2 c	3.8 c	*	57 c	100 d	*	3.8 de	3.7 d		0.0 a	0.0 a		5.8 b	3.3 ab	*	3.3 c	4.3 b	
200	5	258 c	329 e	*	4.1 e	4.2 c		72 d	184 f	*	3.5 d	4.6 f	*	0.0 a	0.0 a		2.2 a	6.0 c	*	2.3 bc	4.4 b	*
	30	390 e	338 e		3.2 d	4.2 c	*	115 e	103 d		3.4 d	4.2 e	*	0.0 a	0.0 a		1.7 a	2.2 a		0.7 a	1.0 a	

Los valores con el mismo superíndice (a, b, c, d, e o f) en cada columna no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el intervalo de confianza de 95%. El símbolo * en la comparación de pretratamiento (filas) indica una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de acuerdo con el intervalo de confianza de 95%. Nomenclatura: GAE, equivalentes de ácido gálico, TE, Trolox equivalentes; AAE, equivalentes de ácido ascórbico; M3GE, malvidina 3-O-glucósido equivalentes; CE, catequinas equivalentes, d.e. extracto seco, dm, orujo seco.