

Universidad Nacional de Cuyo – Facultad de Ciencias Agrarias

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Bromatología



EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS REMANENTES EN ORUJOS Y SU UTILIZACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA CON FINES TECNOLÓGICOS



Tesista: María Agustina D'Amario

Director: Dr. Ariel Fontana Codirector: Dra. Andrea Antonioli

Mendoza, 2018

RESUMEN

La industria vitivinícola genera un volumen importante de subproductos, entre ellos el orujo, que es la mezcla de hollejos y semillas remanente luego de la fermentación del vino. En las últimas décadas, por razones tanto económicas como ambientales, ha habido una demanda continua y creciente en la recuperación y aprovechamiento de los subproductos de la industria alimentaria. El objetivo de este trabajo fue recuperar y caracterizar compuestos bioactivos presentes en orujos de variedades de vid cultivadas en la provincia de Mendoza (Malbec, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc y Merlot). Inicialmente, se obtuvo un extracto de orujo de uva liofilizado mediante una técnica de extracción sólido-líquido. Dicho extracto fue caracterizado inicialmente mediante la determinación de la capacidad antioxidante a través de la técnica ORAC, y el contenido total de polifenoles y antocianos a través de espectrofotometría UV-vis. Posteriormente, se realizó un perfilado de compuestos fenólicos, identificando y cuantificando 30 compuestos, de los cuales 17 fueron no antocianos y 13 antocianos. En cuanto a los compuestos no antocianos, las máximas concentraciones correspondieron a los flavonoides: (-)-epicatequina (5518 mg g^{-1}), (+)-catequina (5340 mg g^{-1}), procianidina B1 (1820 mg g^{-1}) y ácido siríngico (6665 mg g^{-1}). Malvidina-3-O-glucósido fue el antociano más abundante (32.056 mg g^{-1}). El compuesto OH-tirosol se identificó y cuantificó por primera vez en orujos de Cabernet Franc y Malbec. Por otra parte, el estilbeno *trans*-resveratrol se encontró en niveles elevados (328 mg g^{-1}) en Malbec comparado con reportes previos en otras variedades, destacando así la potencialidad de la variedad como una fuente de compuestos con valor nutracéutico. Además, se presenta una discusión sobre la relación entre los elevados niveles de ácido siríngico y malvidina-3-O-glucósido. Con los resultados obtenidos, se generaron nuevos conocimientos para poder seleccionar el orujo más adecuado en función a cada aplicación. Esta información puede ser útil para la aplicación tecnológica de los

extractos y para justificar los efectos benéficos obtenidos cuando son utilizados en diferentes modelos experimentales.

Palabras claves: orujo, compuestos fenólicos, subproductos agroindustriales, aplicaciones biotecnológicas

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Presentaciones a congresos

- Second Latin American Metabolic Profiling Symposium 2016, Rosario, Argentina. Octubre 2016. Modalidad poster: "Grape pomaces anthocyanins and non-anthocyanins phenolics profiling: valorization of food industry by-products". Ariel Fontana, Agustina D'Amario, Andrea Antonioli, Rubén Urvieta, Rubén Bottini.

- Pre Jornadas de Jóvenes Investigadores "La noche de los bastones largos", Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. Julio de 2016. Modalidad poster: "Caracterización del perfil de compuestos fenólicos en orujos de diferentes variedades de vid cultivadas en Mendoza". Agustina D'Amario, Andrea Antonioli, Ariel Fontana.

- XXIV Jornadas de Investigación y VI Jornadas de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. Abril de 2016. Modalidad poster: "Perfilado químico de compuestos fenólicos antocianos en orujo". Agustina D'Amario; Ariel R. Fontana; Andrea Antonioli; Estefanía Ingrassia; Lucía Becerra; Rubén Bottini.

- VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, Argentina. Noviembre de 2015. Modalidad poster: "Determinación de compuestos fenólicos en extractos de orujo mediante la utilización de columnas cromatográficas core-shell". Ariel Fontana, Andrea Antonioli, Agustina D'Amario, Rubén Bottini.

Publicaciones en revistas

- Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. Ariel Fontana, Andrea Antonioli, Agustina D'Amario, Rubén Bottini. 2017. RSC Adv. 7, 29446-29457.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	III
ÍNDICE	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. El orujo de uva.....	2
1.2. El orujo de uva como fuente de compuestos fenólicos con potencial bioactividad	4
1.3. Propiedades antioxidantes del orujo de uva	7
1.4. Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	9
1.5. Caracterización química de extractos de orujo	11
1.6. Aplicaciones biotecnológicas	13
1.6.1. Aplicación del orujo de uva como antioxidante en alimentos	13
1.6.2. Aplicación del orujo de uva como antimicrobiano en alimentos	16
1.6.3. Aplicación del orujo de uva como colorante en alimentos.....	17
1.6.4. Aplicación del orujo de uva en el envasado activo de alimentos.....	19
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1. Hipótesis.....	23
2.2. Objetivos	23
2.2.1. Objetivo general	23
2.2.2. Objetivos particulares	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Estándares, solventes y químicos utilizados.....	25
3.2. Muestras y extracción de compuestos fenólicos	25
3.3. Determinación de la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles totales y antocianos totales.....	29
3.4. Caracterización del perfil de compuestos fenólicos (antocianos y no antocianos)	33
3.4.1. Caracterización de compuestos fenólicos no antocianos.....	33
3.4.2. Caracterización de compuestos fenólicos antocianos.....	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Capacidad antioxidante, contenido de polifenoles totales (TPC) y contenido de antocianos totales	39
4.2. Caracterización del perfil y concentración de compuestos fenólicos.....	45

4.2.1. Perfil de compuestos fenólicos no antocianos	45
4.2.2. Perfil de compuestos fenólicos antocianos	54
4.3. Análisis de componentes principales (PCA).....	60
4.4. Elección del orujo de uva según su aplicación.....	62
5. CONCLUSIONES	65
6. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	67
7. ANEXOS.....	72

1

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El orujo de uva

La uva es el mayor cultivo frutícola del mundo con una producción anual de más de 67 millones de toneladas. Alrededor del 80% de dicha producción mundial se utiliza en la elaboración del vino (Fontana et al., 2013; Kammerer et al., 2004). La actividad vitivinícola constituye una de las fuentes de ingresos más importantes en la provincia de Mendoza, siendo este hecho aún más relevante en cuanto al impacto social si se tiene en cuenta la mano de obra ocupada en los diferentes procesos de producción e industrialización. La superficie cultivada con vid en Argentina se mantiene hace varios años en alrededor de 160.000 ha, que corresponde al 71% de la superficie cultivada con vid en el país. El departamento de Mendoza con mayor superficie cultivada es San Martín con 19% del total; le siguen en importancia, Luján de Cuyo (10%), Rivadavia (10%), Lavalle (9%), San Rafael (9%), Maipú (8%) y Junín (7%). La variedad que más ha aumentado la superficie cultivada en Mendoza, es Malbec, que pasó de 14.338 ha en el año 2000 a 35.300 ha en el año 2017 (INV, 2017). Le siguen en importancia por su crecimiento en superficie, aunque con bastante diferencia cuantitativa: Syrah, Aspirant Bouchet, Bonarda y Cabernet Sauvignon (INV, 2017). La producción de vinos en Mendoza en el año 2016 fue aproximadamente de 6.600.000 litros, lo que supera el 80% del total de la elaboración nacional (INV, 2016).

El orujo de uva se obtiene del proceso de elaboración del vino como el residuo remanente después de la fermentación, y está constituido principalmente por los hollejos y semillas de las uvas (Fontana et al., 2013). En la vinificación para la obtención de vinos blancos, las semillas y los hollejos de la uva se separan antes de la fermentación. En cambio, en la elaboración de vinos tintos, las semillas y los hollejos son removidos luego de un periodo de maceración durante el cual éstos permanecen

en contacto con el mosto en fermentación (Fontana et al., 2013; Kammerer et al., 2004).

La industria vitivinícola genera un volumen importante de residuos (15 y 20 % del peso de la fruta cosechada) como el orujo. Debido a que la extracción durante la vinificación es incompleta, el orujo de uva remanente de dicho proceso presenta elevados contenidos de compuestos fenólicos, retiene alrededor del 20 – 30 % del total de compuestos fenólicos en el hollejo y entre 60 - 70 % en las semillas. El grado de extracción depende de la variedad de uva, madurez de la baya, factores ambientales y tecnológicos y procedimientos realizados durante la vinificación (Kammerer et al., 2004; Monrad et al., 2010).

Estos compuestos presentes en el orujo, están actualmente recibiendo significativa atención por sus propiedades relacionadas a la promoción de la salud, las cuales pueden ser explotadas desde un punto de vista tecnológico. Dentro de estas propiedades se incluyen sus capacidades antioxidantes, antiinflamatorias, cardioprotectoras, anticancerígenas y neuroprotectoras (Fontana et al., 2013).

Debido a estas propiedades promotoras de la salud o de prevención de enfermedades, los productos que contienen compuestos fenólicos pueden ser potencialmente considerados como alimentos saludables, lo que hoy en día conocemos como alimentos funcionales (Fontana et al., 2017).

En la actualidad, el orujo es parcialmente utilizado para la obtención de ácido tartárico o etanol; además, puede ser utilizado como mejorador de suelo, pero los elevados niveles de compuestos fenólicos constituyen un problema ya que inhiben la germinación de las semillas y el desarrollo de las plantas. Dicho residuo también puede ser utilizado en la alimentación animal, sin embargo, la presencia de polifenoles poliméricos (lignina) reduce la digestibilidad al inhibir las enzimas celulolíticas y

proteolíticas, así como el crecimiento de las bacterias del rumen (Fontana et al., 2013). Si bien hay un parcial aprovechamiento, se descarta una importante cantidad de compuestos bioactivos remanentes en los mismos.

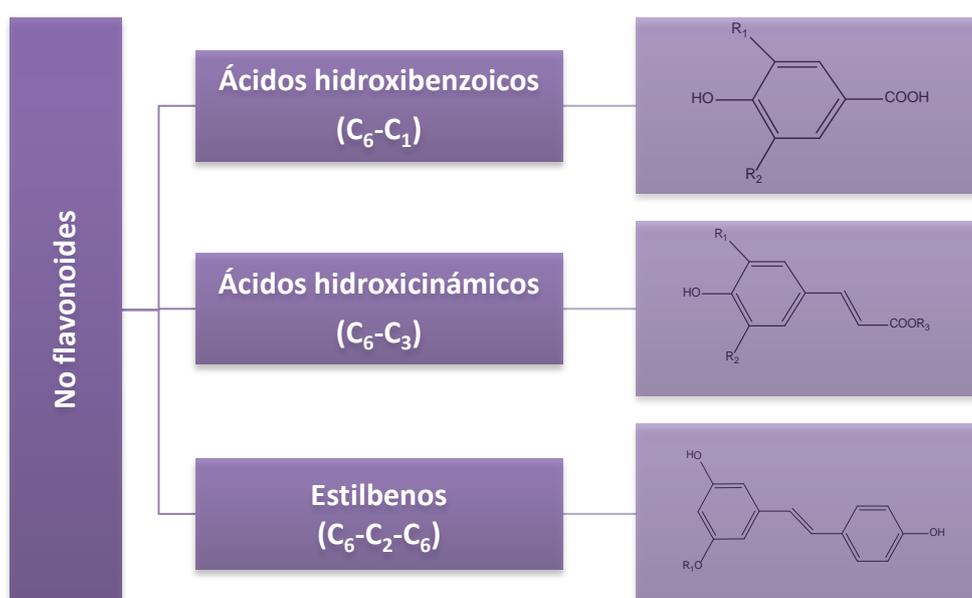
Con la creciente demanda de alimentos seguros por parte de los consumidores, principalmente relacionada con el agregado de aditivos y el considerable interés que los alimentos funcionales han adquirido en los últimos años, hoy en día existe la necesidad de identificar alternativas naturales y probablemente más seguras de antioxidantes para la industria alimentaria. Así, la utilización eficiente, de bajo costo relativo y ambientalmente sustentable de los subproductos de la industria agroalimentaria es de una importancia indiscutible (Spigno et al., 2007). Una de las opciones de mayor valor es la recuperación de los componentes con potenciales propiedades bioactivas como compuestos fenólicos. Como se mencionó previamente, éstos poseen propiedades antioxidantes y pueden ser utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. En el mismo sentido, las industrias modernas pretenden incrementar la calidad y sustentabilidad de su producción a través de la reducción del impacto ambiental de sus residuos (que son generados inevitablemente), por lo que cada día requieren procesos de producción más limpios y productos que permitan diferenciarse de sus competidores (Amendola et al. 2010).

1.2. El orujo de uva como fuente de compuestos fenólicos con potencial bioactividad

Los denominados compuestos bioactivos son constituyentes extra-nutricionales que se encuentran en pequeñas cantidades en plantas y productos alimenticios. Debido a que muchos estudios epidemiológicos han mostrado efectos protectores de enfermedades cardiovasculares y tumorales con el consumo de dietas basadas en plantas o sus extractos, es que se están estudiando intensamente diferentes compuestos bioactivos para evaluar sus efectos sobre la salud. Estos compuestos varían ampliamente y se

agrupan en función de su estructura química y función (Kris-Etherton et al., 2002). Los compuestos bioactivos más comunes incluyen metabolitos secundarios como antibióticos, micotoxinas, alcaloides y compuestos fenólicos (Martins et al., 2011).

Los compuestos fenólicos (polifenoles) constituyen uno de los grupos de productos naturales más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Incluyen, no solo una amplia variedad de moléculas con una estructura polifenólica (es decir, uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o más anillos bencénicos), sino también moléculas con un anillo fenólico, como ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos. Los compuestos fenólicos contenidos en las uvas y el vino se pueden clasificar, de acuerdo a la estructura química de las agliconas, en dos grandes grupos: los compuestos flavonoides y los no flavonoides. Los no flavonoides comprenden a los ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos y estilbenos (Kammerer et al., 2014). Entre los flavonoides, los principales compuestos son: antocianos, flavanoles y flavonoles (Figura 1) (Antoniolli et al., 2015; Fanzone et al., 2012).



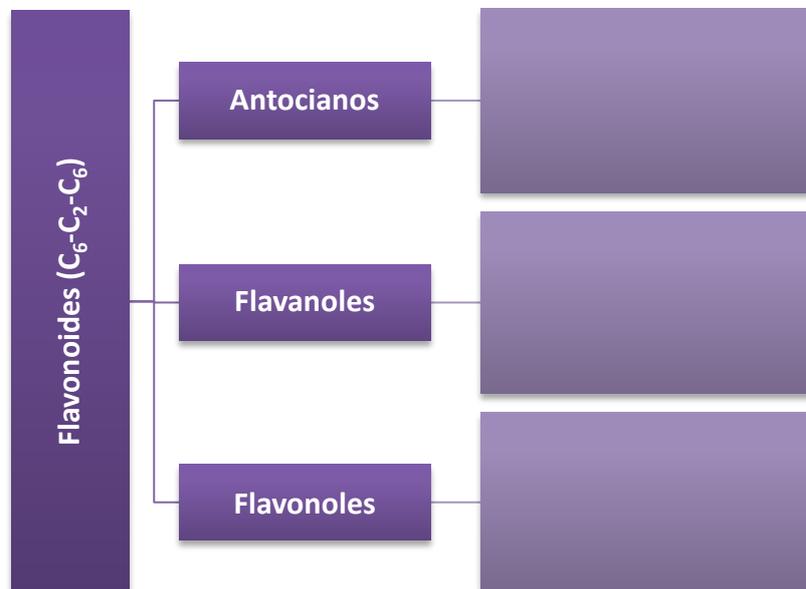


Figura 1: Estructuras químicas básicas de los principales grupos de compuestos fenólicos

Muchos compuestos fenólicos han sido identificados en el orujo de uva, donde los más abundantes son antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y estilbenos (Barcia et al., 2014; Kammerer et al., 2004).

Las características químicas de los extractos de orujo están relacionadas en gran parte con el contenido de dichos compuestos fenólicos, por lo que es relevante determinar su composición individual previo a su aplicación tecnológica y/o biotecnológica. En este sentido, existen varios reportes enfocados principalmente en datos cuantitativos generales como contenido de fenoles totales y actividad antioxidante (Fontana et al., 2013). Sin embargo, la determinación de metabolitos individuales es de particular interés para reconocer posibles interacciones entre los parámetros mencionados y las propiedades antioxidantes de los extractos, como así también identificar efectos sinérgicos o antagónicos entre las diferentes familias de

compuestos. Estos resultados brindarían información valiosa para una caracterización más completa de las muestras, incrementando el valor del producto obtenido y justificando sus posibles usos/efectos en los sistemas estudiados. Además, considerando las diferencias intrínsecas de cada variedad de uva, la determinación del perfil de compuestos fenólicos contribuye a generar una valiosa base de datos para seleccionar el orujo más adecuado dependiendo de los compuestos requeridos para cada aplicación.

1.3. Propiedades antioxidantes del orujo de uva

En los últimos años, ha habido un aumento en el consumo de alimentos que contienen cantidades significativas de ácidos grasos poliinsaturados, y con ellos, un incremento en el uso de antioxidantes para prevenir la oxidación de los lípidos. La adición de antioxidantes es una forma de aumentar la vida útil, especialmente de alimentos ricos en lípidos. El uso de antioxidantes sintéticos está restringido en algunos países debido a sus efectos tóxicos o cancerígenos. En vista de estos efectos negativos para la salud, es donde radica la importancia de la búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes, especialmente de origen vegetal (Jayaprakasha et al., 2003).

Las células y los tejidos corporales están continuamente amenazados por el daño causado por los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, que se producen durante el metabolismo normal del oxígeno o son inducidas por daño exógeno. Los mecanismos y la secuencia de reacciones por los cuales los radicales libres interfieren en las funciones celulares no se conocen completamente, pero una de las más importantes parece ser la peroxidación de lípidos, que da como resultado el daño de la membrana celular. Dicho daño causa un cambio en la carga neta de la célula, modificando la presión osmótica, lo que lleva a la hinchazón y muerte celular. Los radicales libres pueden atraer a varios mediadores inflamatorios, lo que contribuye a una respuesta inflamatoria general y al daño tisular. Para protegerse de las especies

reactivas del oxígeno, los organismos vivos han desarrollado varios mecanismos antioxidantes de defensa. Estos mecanismos del cuerpo incluyen a enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y otros compuestos tales como glutatión, ácido ascórbico y α -tocoferol. La producción incrementada de especies reactivas del oxígeno durante la lesión, da como resultado el consumo y el agotamiento de los compuestos de barrido de radicales endógenos. Los flavonoides y otros polifenoles pueden tener un efecto aditivo con dichos compuestos (Panche et al., 2016).

La mayoría de los grupos de flavonoides tienen la capacidad de actuar como antioxidantes. Se ha informado que las flavonas y las catequinas parecen ser los flavonoides más poderosos para proteger el cuerpo contra las especies reactivas del oxígeno (Hidalgo et al., 2010). Esta capacidad antioxidante se debe a su elevado potencial rédox, que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores de oxígeno singulete, además de poseer potencial de quelación de metales (Ignat et al., 2011).

Muchos estudios sobre el potencial antioxidante de los flavonoides en frutas, verduras y productos elaborados como té o vino, han llegado a la conclusión de que es muy difícil predecir el poder antioxidante de un producto determinado mediante el estudio de sólo un tipo de flavonoide o de otro tipo de antioxidante contenido en el producto, tales como la vitamina C o E. En algunos casos se ha postulado la posible existencia de efectos sinérgicos o antagónicos entre los distintos antioxidantes presentes en los alimentos vegetales y productos derivados (Hidalgo et al., 2010).

Yilmaz y Toledo (2004) estudiaron la actividad secuestrante de radicales libres peroxilo de compuestos fenólicos puros presentes en semillas y hollejos de uva. Los resultados que obtuvieron sobre la actividad antioxidante fueron: resveratrol > catequina > epicatequina = galocatequina > ácido gálico = ácido elágico. Sin embargo, en vista de

dichos resultados, existiría una actividad global debido a efectos sinérgicos o antagónicos de las actividades de los compuestos que podría ser estudiado para agregar claridad.

1.4. Métodos de extracción de compuestos fenólicos

La extracción es un paso importante en la recuperación, el aislamiento y la identificación de los compuestos fenólicos presentes en el orujo, y no existe un método de extracción estándar. Las técnicas tradicionales como las extracciones sólido-líquido y Soxhlet, se han utilizado durante muchas décadas, pero tienen la desventaja de consumir cantidades elevadas de solventes y requerir mucho tiempo de extracción. Además, debido a las diferentes etapas y tratamientos extractivos utilizados en dichas técnicas, como son el calentamiento, la ebullición y el reflujo, se producen pérdidas/degradaciones de compuestos fenólicos por fenómenos de ionización, hidrólisis y oxidación. Factores tales como el solvente de extracción y la relación muestra/solvente son relevantes para lograr recuperaciones satisfactorias, considerando siempre la naturaleza polar que presentan estos compuestos. Las técnicas tradicionales de extracción han ido cambiando gradualmente con una tendencia a nuevos métodos con tiempos de extracción reducidos y bajo consumo de solventes orgánicos, que aumentan la sostenibilidad del proceso, manteniendo (o incluso mejorando) la recuperación de los compuestos de interés (Fontana et al., 2013).

La extracción sólido-líquido constituye la técnica más comúnmente reportada para la extracción de compuestos fenólicos en orujos. Se basa en un fenómeno de transporte de masa en el que los analitos contenidos en una matriz sólida migran a una fase de solvente que está en contacto con la matriz. Los fenómenos de transporte de masa, y por lo tanto la eficiencia de extracción, pueden mejorarse mediante cambios en los gradientes de concentración, coeficientes de dispersión o capa límite, todos ellos

afectados por el método de extracción, tipo de disolvente, tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción, así como la presencia de sustancias interferentes en la matriz. El tipo de solvente es uno de los principales factores que afectan la eficiencia de extracción del proceso, siendo el metanol, el etanol, la acetona y el agua los más utilizados. Debido a la naturaleza polar de los compuestos fenólicos, estos se solubilizan fácilmente en medios próticos polares tales como soluciones hidroalcohólicas (Galanakis, 2012). La presencia de agua en la mezcla aumenta la permeabilidad del tejido celular, permitiendo una mejor transferencia de masa por difusión molecular y por lo tanto la recuperación de los compuestos solubles en agua. En términos de la extracción del contenido fenólico total, las mezclas de etanol/agua han mostrado resultados relativamente mejores en comparación con las mezclas de acetona o metanol/agua. El etanol es el disolvente seleccionado en el caso de una posterior utilización de los extractos en alimentos. Además, es más barato que los disolventes nombrados anteriormente y tiene categoría GRAS (generalmente reconocido como seguro de acuerdo con la definición de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la eficiencia de extracción también depende de la fracción de subproductos, la variedad de uva, el tiempo de extracción, la temperatura, la acidificación de los solventes y las interacciones entre todas estas variables (Fontana et al., 2013).

El tiempo y la temperatura de extracción son parámetros importantes que deben optimizarse para minimizar el consumo de energía del proceso y lograr elevadas recuperaciones de los compuestos. Muchos autores coinciden en que un aumento de la temperatura de trabajo favorece la eficiencia de la extracción mejorando tanto la solubilidad de los solutos como el coeficiente de dispersión. Independientemente de los efectos positivos de las altas temperaturas en los rendimientos de extracción, este factor no puede aumentarse indefinidamente porque a temperaturas superiores a 50°C, disminuye la estabilidad de los compuestos fenólicos y se pueden desnaturalizar

las membranas. Algunos trabajos informaron que temperaturas de 60°C aumentan la extracción de compuestos fenólicos de los orujos, pero igualmente se debe evaluar la estabilidad de los compuestos en esta condición (Spigno et al., 2007).

1.5. Caracterización química de extractos de orujo

La capacidad antioxidante de los extractos de orujo es un parámetro sumamente importante ya que permite cuantificar el poder antioxidante que tendrían los compuestos presentes en la muestra para actuar simultáneamente en un sistema. Existen diferentes técnicas para evaluarla en un alimento o extracto, una de ellas es la técnica ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity). La ORAC mide la actividad o capacidad global que poseen todos los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar radicales peroxilo generados por la descomposición térmica de AAPH (2,2-azobis-2-metilpropionamidina). Éstos últimos son especies reactivas, comparables con aquellas especies reactivas del oxígeno generadas en el organismo, de ahí la importancia del ensayo en un sentido biológico. La presencia de antioxidantes en el medio protege a una sonda fluorescente de prueba (fluoresceína) de la oxidación provocada por el radical peroxilo y prolonga el tiempo de emisión de fluorescencia de este compuesto. La capacidad antioxidante de las muestras es cuantificada mediante la medición del área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia relativa (Yilmaz y Toledo, 2006).

Los orujos de uva son muestras complejas debido a la presencia de una gran cantidad de analitos diana con diferente naturaleza química. Es por ello que se necesitan métodos analíticos altamente selectivos y sensibles para la caracterización de los extractos de orujo. Para la caracterización del perfil de los compuestos fenólicos antocianos y no antocianos presentes en los extractos, comúnmente se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detectores de arreglo de diodos (DAD) o espectrometría de masa (MS). Hoy en día, las novedosas técnicas de

separación con sistemas de presión ultra alta pueden lograr métodos rápidos, versátiles y de alto rendimiento, adecuados para el análisis de muestras complejas como son los extractos de plantas.

En dichas técnicas cromatográficas utilizadas para la separación de compuestos fenólicos, se eligen casi exclusivamente columnas del tipo de fase reversa, con C₁₈ como fase estacionaria, un diámetro interno entre 2 y 4,6 mm, y un tamaño de partícula que varía de 3 a 10 µm. El sistema de fases móviles consiste en una fase acuosa y una fase orgánica (generalmente metanol o acetonitrilo) que se mezclan en un gradiente. Usualmente, se agrega un ácido orgánico a los solventes en concentraciones que varían de 0,1 a 10%, dependiendo de los compuestos a analizar para favorecer la formación de las especies iónicas más adecuadas que permitan una buena forma de pico durante la metodología cromatográfica. Los ácidos acético y fórmico son los más comúnmente utilizados, aunque también se han empleado ácido fosfórico y trifluoroacético. La combinación mencionada de columnas, sistemas de disolventes y condiciones, se ha aplicado con éxito para la separación de familias de compuestos fenólicos tales como antocianinas, procianidinas, flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos.

Clásicamente, la detección de rutina en HPLC se basa en la medición de la absorción de UV-Vis, utilizando la detección de arreglo de diodos (DAD). La desventaja de estos métodos de detección es la falta de información estructural que conduce a la posibilidad de interferencias de componentes de la matriz de la muestra y la eventual aparición de picos con identificación errónea. Una forma de eliminar este problema es mediante el acoplamiento de un detector MS a los sistemas de HPLC, lo que mejora notablemente la identificación y caracterización estructural de los compuestos fenólicos (Fontana et al., 2013). Asimismo, una forma válida de evitar los inconvenientes mencionados es la utilización de estándares puros de los compuestos que se analizan. De esta forma, la identificación con los compuestos puros permite

obtener los espectros de absorción y su posterior comparación con los obtenidos en las muestras. Esto incrementa la selectividad del método, logrando una identificación satisfactoria cuando no se cuenta con detectores de MS.

1.6. Aplicaciones biotecnológicas

En los últimos años, los compuestos fenólicos han cobrado relevancia en la industria agroalimentaria debido a la gran cantidad de aplicaciones. Una de las opciones más valiosas es la recuperación de compuestos bioactivos presentes en plantas que poseen actividad antioxidante y podrían ser utilizados en productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios (Fontana et al., 2013). Los extractos de orujo son uno de los tantos ejemplos que se han investigado como fuente de antioxidantes naturales debido al contenido de grandes cantidades de compuestos fenólicos monoméricos tales como (+)-catequina, (-)-epicatequina, así como compuestos fenólicos diméricos, triméricos y procianidinas tetrámeras, entre otros. En esta sección se detallan las posibles aplicaciones del orujo de uva en la industria alimentaria.

1.6.1. Aplicación del orujo de uva como antioxidante en alimentos

En la industria alimentaria los antioxidantes se utilizan principalmente para evitar la oxidación de lípidos y son añadidos a las carnes frescas o procesadas para prevenir la rancidez oxidativa, retardar el desarrollo de malos sabores y mejorar la estabilidad del color (Fontana et al., 2013).

Algunos estudios han demostrado que el uso de extractos de té verde y de semilla de uva tiene efecto conservante en hamburguesas de carne vacuna con bajo contenido de sulfito. Los autores observaron efectos positivos sobre las principales causas de deterioro de la carne cruda, como son el desarrollo microbiano, la pérdida del color rojo y la oxidación lipídica. Esto sugirió que la cantidad de sulfito agregada a las hamburguesas puede reducirse y así, obtener productos más saludables (Bañón et al.,

2007). Selani et al. (2011) estudiaron la acción de extractos de orujo (variedades de uva Isabel y Niagara) sobre la oxidación de los lípidos, el color, el pH y las propiedades sensoriales de la carne de pollo cruda y cocida. Al igual que otros autores, afirmaron que estos extractos retardan la oxidación de lípidos de la carne cruda y cocida congelada. El pH y el color de la materia prima cruda no experimentaron cambios en ninguno de los casos. Sin embargo, se observaron cambios de color (oscurecimiento y menor intensidad del color rojo y amarillo) en la carne cocida. En la evaluación sensorial de olor y sabor se obtuvieron resultados satisfactorios y no hubo diferencias con los antioxidantes sintéticos. Un estudio similar fue realizado por Garrido et al. (2011), quienes evaluaron dos extractos de orujos de diferentes variedades tintas en hamburguesas de cerdo. Hallaron una estabilidad en el color de la carne y una disminución de la oxidación de los lípidos; sin embargo, los extractos no alteraron el valor de pH ni evitaron el deterioro por microorganismos en las hamburguesas.

Maestre et al. (2010) estudiaron la interacción y ubicación de los antioxidantes fenólicos (obtenidos a partir de extracto de semilla de uva) en membranas modelo y la relación con su efectividad para inhibir la oxidación lipídica de carne picada de pescado. La capacidad de estos compuestos para quelar metales, donar electrones y eliminar radicales libres, puede explicar la mayor capacidad antioxidante que se encontró en el músculo de pescado. Pazos et al. (2005) determinaron la capacidad de los flavonoides de extractos de orujo para inhibir la oxidación de lípidos de pescado. Las pruebas se realizaron en aceite de pescado y pescado graso congelado como la caballa. Los monómeros de flavanoles mostraron una mayor actividad antioxidante que los monómeros de flavonoles, y dicho efecto no mostró una relación directa con la cantidad de grupos fenólicos y el grado de grupos galato. El mismo equipo estudió la influencia del grado de polimerización (número de unidades monoméricas enlazadas covalentemente) y de grupos galato de los compuestos fenólicos en músculo de

pescado. Los autores encontraron que las proantocianidinas con tamaño medio (2-3 unidades monoméricas) y bajo grado de sustitución con galato (0,15-0,25 grupos galato/molécula) son más adecuados que las proantocianidinas altamente polimerizadas y con elevado grado de sustitución con galato (Pazos et al., 2010).

La aplicación de compuestos fenólicos individuales (catequina, galato de epigallocatequina, ácido tánico) y diversos extractos ricos en compuestos fenólicos (provenientes de uva, té verde y polvo de arándanos deshidratados) en el queso ha sido reportado por Han et al. (2011). Los resultados evidenciaron que los productos formulados con dichos compuestos mejoran las propiedades antioxidantes del queso. Las cuajadas con concentraciones de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de compuestos fenólicos presentaron una efectiva actividad de eliminación de radicales libres; además, no hubo cambios en los atributos físicos como son la textura y la firmeza del queso. Sin embargo, debido a un aumento en la concentración de compuestos fenólicos añadidos, puede ocurrir eventualmente un aumento de la resistencia del gel junto con la disminución de contenido de humedad de la cuajada. Los geles lácteos formulados con compuestos bioactivos mostraron características ligeramente alteradas de la cuajada de queso. Los autores propusieron realizar estudios adicionales para examinar la posibilidad de aplicar esta tecnología a otros productos lácteos.

Otra aplicación interesante fue reportada por Tseng et al. (2013), quienes aplicaron el orujo (de uva variedad Pinot Noir) como fibra dietética antioxidante para mejorar el valor nutricional y la vida útil de yogur. Esta fortificación no afectó sensiblemente el pH ni la viabilidad de las bacterias lácticas, tampoco causó defectos en la consistencia, color o sabor. Además, se observó un aumento en el contenido de fibra como así también una mayor actividad antirradicalaria y antioxidante, aumentando la vida útil del producto.

1.6.2. Aplicación del orujo de uva como antimicrobiano en alimentos

La actividad microbiana es la principal causa de deterioro de los alimentos y a menudo, es la responsable de la pérdida de la calidad y seguridad de estos. En la actualidad, se ha observado un aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos; es por ello que existe un gran interés por obtener fuentes naturales de compuestos antibacterianos, como son las frutas, verduras y extractos de plantas para la conservación de los alimentos (Jayaprakasha et al., 2003).

Baydar et al. (2014) estudiaron los efectos antibacterianos del orujo y bagazo de uva. Si bien, los autores no encontraron actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de hollejo de uva cv. Narince contra quince bacterias patógenas, hallaron actividad antibacteriana empleando los extractos de semillas (ambos procedentes de uva no vinificada).

Jayaprakasha et al. (2003) aplicaron extractos de semillas obtenido a partir de industrias de procesamiento de jugo de uva a medios de cultivo con diferentes cepas bacterianas y determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) con capacidad antibacteriana (es decir, la menor concentración capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la bacteria testeada). Los resultados indicaron que estos extractos presentan un efecto antibacteriano contra todas las bacterias analizadas (*Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Dichos extractos fueron más eficaces contra bacterias Gram (+) en comparación con las Gram (-). Un estudio similar fue realizado por Anastasiadi et al. (2009) donde se evaluó la CMI de extracto de orujo contra *Listeria monocytogenes*, y los resultados justificaron su incorporación en sistemas de alimentos para prevenir el crecimiento de dicha bacteria.

Thimothe et al. (2007) estudiaron la composición química y actividad biológica de los compuestos fenólicos presentes en uvas tintas para vinificación y extractos de orujo, sobre la virulencia de *Streptococcus mutans*. Observaron que la actividad biológica del orujo fue tan eficaz (o significativamente mejor) que la de los extractos de bayas enteras. Por ejemplo, algunos de los extractos de orujo estudiados produjeron un mayor grado de inhibición de la actividad de enzimas glucosiltransferasas (>60% de inhibición) y de la acidogenicidad ($\geq 48\%$) del *Streptococcus mutans* que los extractos de uva entera. Estas enzimas sintetizan glucanos, que son los principales componentes del biofilm bacteriano. Además, las glucosiltransferasas son rasgos de virulencia específicos de dicho microorganismo asociados con la patogenia de las caries dentales y la integridad estructural de la biopelícula dental (placa). El mayor porcentaje de inhibición de las actividades glucosiltransferasas por extractos de orujo, puede deberse al mayor contenido de compuestos fenólicos en el orujo en comparación con los extractos de uva enteras. Los resultados también mostraron que los compuestos fenólicos de uva, especialmente de extractos de orujo, son altamente efectivos contra la virulencia de *Streptococcus mutans*, aunque la viabilidad bacteriana no es afectada. Es decir, los extractos actuaron como bacteriostáticos pero no como bactericidas. En este sentido, el orujo es una fuente factible (bajo costo y disponibilidad) para la extracción y aislamiento de compuestos para la prevención de enfermedades orales, tales como caries y placa dental.

1.6.3. Aplicación del orujo de uva como colorante en alimentos

Las antocianinas son pigmentos naturales hidrosolubles que poseen considerable potencial en la industria alimentaria; son las responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales. El interés en estos pigmentos ha aumentado gracias a sus posibles efectos terapéuticos y benéficos (Garzón, 2008). A diferencia de los tintes sintéticos, que poseen una excelente estabilidad a la luz, el oxígeno, el calor y el cambio de pH, las antocianinas

son afectadas por las condiciones del procesamiento, produciéndose pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos.

En soluciones acuosas existen cuatro estructuras de antocianinas diferentes, que varían de forma reversible a lo largo de la escala de pH y con diferentes espectros de absorbancia. Las antocianinas de la uva poseen un grado de color apreciable a pH mayor a 4. Por el contrario, los pigmentos de antocianinas polimerizadas no muestran cambios de color con la variación de pH. Los factores intrínsecos y la composición de la matriz del alimento afectan en gran medida a la estabilidad antociánica. Sin embargo, hay estudios limitados sobre el impacto del procesamiento y almacenamiento en la estabilidad de las antocianinas de la uva en matrices de alimentos (Lavelli et al., 2017).

Lavelli et al. (2017) estudiaron que la encapsulación con maltodextrina aumenta la estabilidad de antocianinas en el procesamiento y almacenamiento de alimentos ricos en azúcares. Los compuestos fenólicos del hollejo de uva encapsulado se añadieron a un puré de manzana, y se caracterizaron en cuanto a su estabilidad bajo tratamiento térmico y condiciones de almacenamiento. Se ha reportado que la maltodextrina limita las reacciones entre azúcares y antocianinas. Además, la encapsulación podría aumentar la concentración de antocianinas y no antocianinas en las microcápsulas, promoviendo auto-asociaciones y fenómenos de co-pigmentación.

La estabilidad de la antocianina también se ha estudiado en productos lácteos. El extracto de uva fue utilizado como un agente colorante en yogur en cantidades de 0.018 g kg^{-1} , donde la concentración de antocianinas se vio muy afectada por el tiempo de almacenamiento. Además, se utilizó un extracto comercial de hollejo de uva como agente colorante para quesos semisólidos principalmente dirigidos a niños, donde hubo una gran estabilidad durante la vida útil del producto (Lavelli et al., 2017).

Las antocianinas también se han investigado en sistemas alimentarios a base de cereales. Un concentrado de jugo de uva comercial se utilizó como colorante en una mezcla de maíz: sacarosa (90:10) y se extruyó para producir un cereal de desayuno. La extrusión redujo el contenido de antocianinas monoméricas. Sin embargo, no se modificó el contenido de antocianinas poliméricas, y no hubo cambios durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante 90 días (Lavelli et al., 2017).

En otro enfoque, el extracto de uva tinta se utilizó en la preparación de tapas de galletas, donde se observó una disminución de alrededor del 40% de las antocianinas. Estas pérdidas están relacionadas con reacciones de oxidación durante el amasado y degradaciones térmicas durante el horneado (Lavelli et al., 2017).

En general, estos estudios indican que la estabilidad de la antocianina de la uva es baja durante tratamientos térmicos intensos tales como extrusión y cocción, pero las antocianinas pueden ser relativamente estables durante la pasteurización. La estabilidad es baja en alimentos líquidos almacenados, pero estos compuestos son muy estables en estado seco. En este último caso, la estabilidad se debe al bajo contenido de agua que conduce a un aumento de viscosidad y disminución de movilidad molecular (Lavelli et al., 2017). Sin embargo, es necesario realizar más estudios acerca de la estabilidad de las antocianinas en matrices específicas y la relación entre su estructura, la actividad biológica de los metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas (Garzón, 2008).

1.6.4. Aplicación del orujo de uva en el envasado activo de alimentos

El deterioro oxidativo de los polímeros utilizados en los envases de alimentos es un problema de considerable importancia económica y preocupación práctica, debido a que la pérdida de calidad del polímero puede alterar la vida útil del alimento. Algunas sustancias como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT),

terbutilhidroquinona (TBHQ) y galato de propilo, son ampliamente utilizadas como antioxidantes primarios para polímeros empleados en el envasado. Sin embargo, han aumentado los problemas relacionados con la posible toxicidad, mutagenicidad y efectos cancerígenos de estos aditivos, debido a que pequeñas cantidades pueden liberarse de las películas del empaque al alimento. Es por ello que se está prestando cada vez más atención al uso de compuestos fenólicos como antioxidantes para la estabilización de polímeros en envases y tecnologías relacionadas. Las ventajas esperadas incluirían una mayor estabilidad química en las condiciones de procesamiento y menor tendencia a la liberación del polímero en el medio de contacto (alimento, agua, etc.) (Panzella y Napolitano, 2017).

El deterioro oxidativo de los alimentos envasados puede causar disminuciones significativas en la vida útil asociadas con sabores desagradables, malos olores, cambios de color y pérdida nutricional. En consecuencia, existe una demanda creciente por parte de los consumidores y el mercado, de antioxidantes derivados de productos naturales que podrían reemplazar a los aditivos sintéticos, no solo para la estabilización del material plástico, sino también como ingredientes para el envasado activo (Panzella y Napolitano, 2017).

El quitosano se ha reportado como un polímero renovable para formar películas comestibles que permiten la incorporación de compuestos funcionales. La incorporación de aceite y extracto de semilla de uva a películas de quitosano resultó beneficiosa para la estabilidad de las películas y el incremento de la actividad antioxidante de las mismas. Por lo tanto, los autores sugieren que estas películas pueden ser una alternativa promisoría para reemplazar a los materiales sintéticos, y como vehículo para compuestos funcionales contribuyendo a aplicaciones biotecnológicas, aumentando la vida útil de los alimentos en los que se aplican. Hay estudios acerca de la incorporación de estos extractos por fusión en poliolefinas o

etilcelulosa, obteniendo películas con actividad antioxidante sin alterar las propiedades mecánicas de los materiales originales (Ferreira et al., 2014).

El envasado de alimentos con compuestos bioactivos es un enfoque innovador también para la prevención del crecimiento de microorganismos que deterioran los alimentos. Los ensayos antimicrobianos revelaron una capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (-): *Erwinia carotovora subsp. carotovora* y *Xanthomonas arboricola pv. pruni* para películas poliméricas fabricadas con quitosano y nanopartículas de lignina (Panzella y Napolitano, 2017).

Extractos activos de subproductos agroindustriales, como cáscaras de almendra y orujo de uva incorporado a películas de alginato de sodio, exhibieron propiedades antimicrobianas contra cinco patógenos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* (Panzella y Napolitano, 2017).

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Los orujos de uvas de las variedades *Vitis vinífera* L. cv Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot y Malbec son una fuente económica y ambientalmente sustentable de compuestos bioactivos. Dichos subproductos contienen una amplia variedad y concentración de compuestos fenólicos que le otorgan una elevada actividad antioxidante justificando su aplicación en la industria alimentaria.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Desarrollar bases científico-tecnológicas que permitan utilizar el orujo de uva de diferentes variedades cultivadas en Argentina como fuente de principios bioactivos que pueden ser aplicados en la industria alimentaria y otras industrias.

2.2.2. Objetivos particulares

- I) Extraer compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva de las variedades mencionadas utilizando técnicas de extracción que generen un producto apto para su aplicación tecnológica.
- II) Determinar la capacidad antioxidante mediante la técnica ORAC (del inglés, Oxygen Radical Absorbance Capacity) y el contenido de polifenoles y antocianos totales en los extractos obtenidos.
- III) Caracterizar el perfil de compuestos fenólicos (antocianos y no antocianos) en los extractos de orujo aplicando cromatografía líquida de alta presión con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

3

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estándares, solventes y químicos utilizados

Los estándares de ácido gálico, 3-hidroxitirosol, (-)-galocatequina, (-)-galocatequina galate, (-)-epicatequina galate, procianidina B1, (+)-catequina, procianidina B2, (+)-epicatequina, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido ferúlico, *trans*-resveratrol, quercetina hidrato, kaempferol-3-glucósido y malvidina-3-O-glucósido con grado de pureza $\geq 90\%$ se adquirieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El estándar 2-(4-hidroxifenil) etanol (tirosol) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza). Las soluciones de estándares puros se prepararon en metanol en niveles de concentración de 1000 mg mL^{-1} .

Los estándares de calibración se disolvieron en fase móvil inicial de cada método (LMW-PP o antocianinas). Se adquirieron acetonitrilo de calidad HPLC y ácido fórmico de Mallinckrodt Baker (Inc. Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Tanto la amina primaria-secundaria (PSA) como el octadecilsilano (C_{18}) se obtuvieron de Waters (Milford, MA, EE. UU.). Los reactivos: NaCl, Na_2CO_3 anhidro, MgSO_4 y CaCl_2 fueron comprados en Biopack (Buenos Aires, Argentina). El ácido clorhídrico, etanol y reactivo de Folin-Ciocalteu se compraron en Merck (São Paulo, Brasil). El reactivo Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, fluoresceína y 2,2-azobis-2-metilpropionamida (AAPH) fueron comprados en Sigma-Aldrich.

El agua ultrapura para la preparación de soluciones se obtuvo utilizando un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.).

3.2. Muestras y extracción de compuestos fenólicos

En este estudio, se analizaron un total de 11 muestras obtenidas del Catena Institute of Wine (Bodega Catena Zapata) provenientes de diferentes viñedos de Mendoza ubicados en Gualtallary (Tupungato), Altamira (San Carlos) y Agrelo (Luján de Cuyo).

En la Figura 2 se presenta un mapa de la provincia de Mendoza con dichas zonas vitivinícolas. Las muestras de orujo corresponden a las temporadas 2015 y 2016 de las variedades *Vitis vinifera* L. cv. Malbec de 2 orígenes geográficos diferentes (MB1 y MB2)], Cabernet Sauvignon de 3 orígenes geográficos diferentes (CS1, CS2 y CS3)], Cabernet Franc de 2 orígenes geográficos diferentes (CF1 y CF2)] y Merlot (MLT, para esta variedad solo se analizó una muestra de la cosecha 2015).

Dichas muestras fueron recolectadas inmediatamente luego del prensado del mosto en la bodega y colocadas en cajas refrigeradas con hielo durante el transporte al laboratorio, y luego, almacenadas a -20°C hasta el procesamiento.

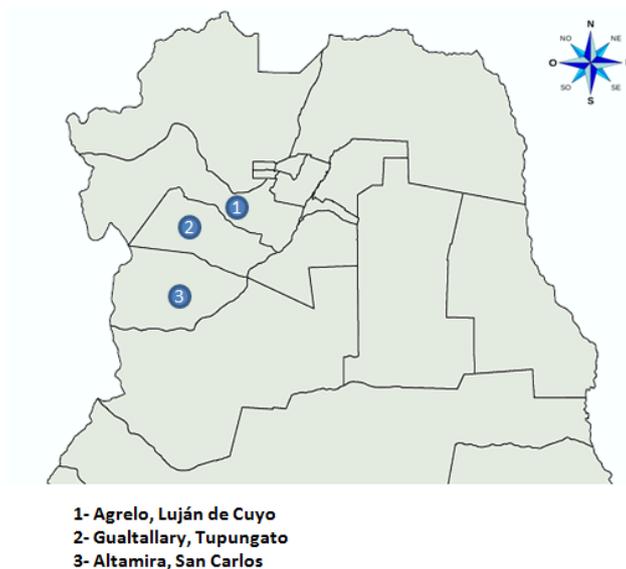


Figura 2: Mapa de la provincia de Mendoza con las zonas vitivinícolas de los orujos estudiados

La extracción del orujo fresco de uvas se realizó mediante una extracción sólido-líquido, por triplicado. Para ello, una porción de orujo fresco se trituró en un mixer de laboratorio con una alícuota del solvente de extracción (solución de etanol: agua en relación 1:10 (p/v)) manteniendo el sistema termostatzado a 60°C con agitación. El tiempo de extracción fue de 3 horas. Luego se procedió a la centrifugación para eliminar los residuos sólidos y el sobrenadante se concentró en rotavapor a 40°C .

Finalmente, el extracto concentrado se secó mediante liofilización durante 96 horas a 0,12 bar y 45°C, para ser luego almacenado en tubos sellados mantenidos a -20°C en atmósfera seca y oscuridad hasta el análisis (Antoniolli et al., 2015). El polvo obtenido se analizó mediante diferentes técnicas con el objetivo de realizar su caracterización química. El procedimiento completo de preparación de las muestras se presenta en la Figura 3.

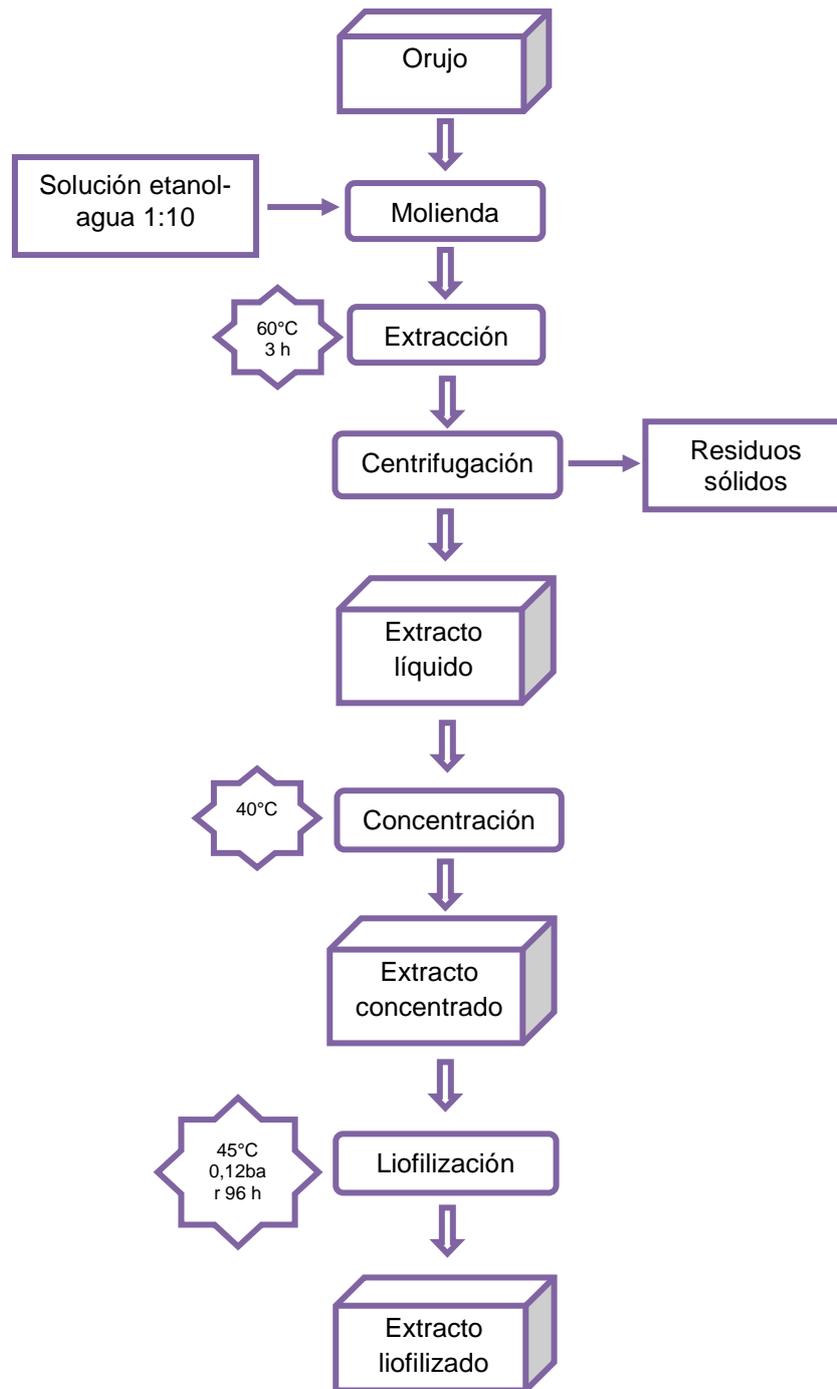


Figura 3: Diagrama del proceso de extracción de compuestos fenólicos del orujo

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles totales y antocianos totales

La capacidad antioxidante se determinó mediante la técnica ORAC. Se utilizó un espectrofluorómetro y microplacas negras de acuerdo al método reportado por Antonioli et al. (2015). Los extractos crudos se solubilizaron en buffer fosfato de potasio y se agregaron en las celdas junto con diferentes concentraciones de Trolox (0; 3,125; 6,25; 12,5 y 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A continuación, se añadieron 100 μL de solución de fluoresceína y se incubó a 37 °C durante 7 minutos, posteriormente se adicionó 50 μL de solución generadora de radicales peroxilo AAPH (Figura 4). La intensidad de la fluorescencia fue monitoreada aplicando excitación a 485 nm y emisión a 538 nm con intervalos de 1 minuto durante 90 minutos en un fluorómetro de microplacas (Fluoroskan Ascenso FL, Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE). El área bajo la curva de la disminución de la fluorescencia relativa durante 90 minutos (relacionada con la capacidad de la muestra de proteger a la fluoresceína de la oxidación por el AAPH) fue calculada mediante el programa informático GraphPad Prism y se expresó como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de extracto ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) (Antonioli et al., 2015). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Infostat (versión 2018, Argentina).

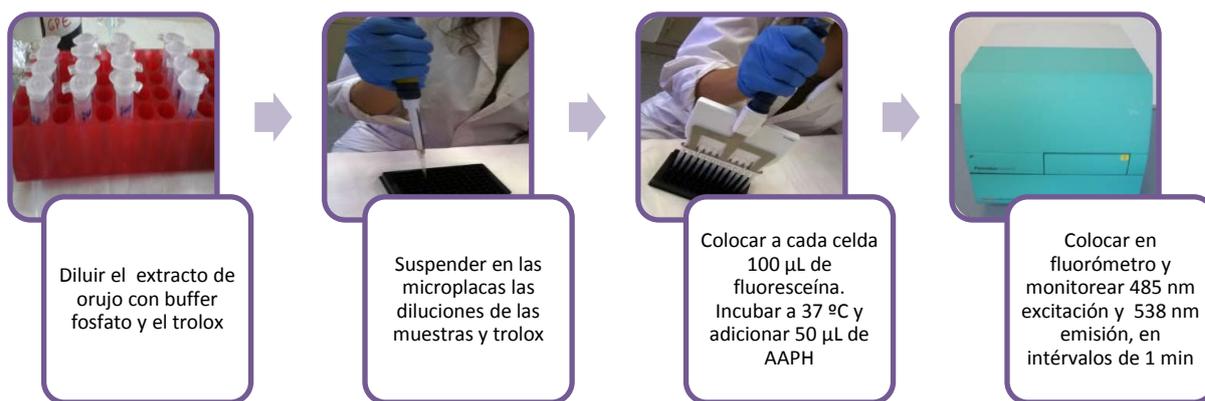


Figura 4: Esquema de la técnica ORAC para la determinación de la capacidad antioxidante

Adicionalmente, se abordaron diferentes técnicas espectrofotométricas utilizando el espectrofotómetro UV-vis Cary-50 (Varian Inc., Mulgrave, Australia) para la determinación del contenido de polifenoles totales (TPC) y antocianos totales.

El método más simple y rápido para la estimación del TPC es la medida de la absorbancia a 280 nm en una muestra apropiadamente diluida. Este valor se basa en la absorbancia característica de los anillos bencénicos presentes en la mayoría de los compuestos fenólicos. La principal ventaja de este método es la reproducibilidad. Sin embargo, moléculas como ácidos hidroxicinámicos y chalconas no poseen un máximo de absorción a ésta longitud de onda. Éste inconveniente no resulta un problema en el análisis de extracto de orujo debido a que estos analitos están presentes a una muy baja concentración, por lo tanto, los valores de TPC se ven poco afectados. Además, las moléculas no fenólicas que poseen un anillo bencénico (como por ejemplo los aminoácidos) también absorben a 280 nm generando algunas interferencias (Lorrain et al., 2013).

El segundo método más comúnmente utilizado para TPC es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Esta técnica se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo de los fenoles en medio básico con el reactivo de Folin-Ciocalteu. El último consiste en una mezcla

de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (de color amarillo) que resulta en el desarrollo de un color azul debido a la reducción del fosfomolibdato por los fenoles en condiciones alcalinas. Este reactivo no es específico para compuestos fenólicos, ya que los grupos fenólicos que se encuentran en proteínas u otras sustancias capaces de reducir al reactivo, como el ácido ascórbico, pueden también participar en la reacción de reducción (Lorrain et al., 2013). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, ambos métodos espectrofotométricos son utilizados como una caracterización preliminar de los extractos o una medida global del TPC. La cuantificación del TPC es realizada utilizando una curva de calibración de ácido gálico y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico relativos a la masa o volumen de los extractos (Monagas et al., 2006).

Para la determinación de TPC, se obtuvo una solución madre de extracto de orujo liofilizado, efectuando una dilución de 5 mg de extracto liofilizado de orujo en solución acuosa de etanol al 50% (v/v). Luego se llevaron a cabo dos métodos diferentes: la lectura directa de la absorbancia a 280 nm (280) y el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), según la técnica reportada por Antonioli et al. (2015) (Figura 5). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados se analizaron mediante ANOVA y prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Infostat (versión 2018, Argentina).

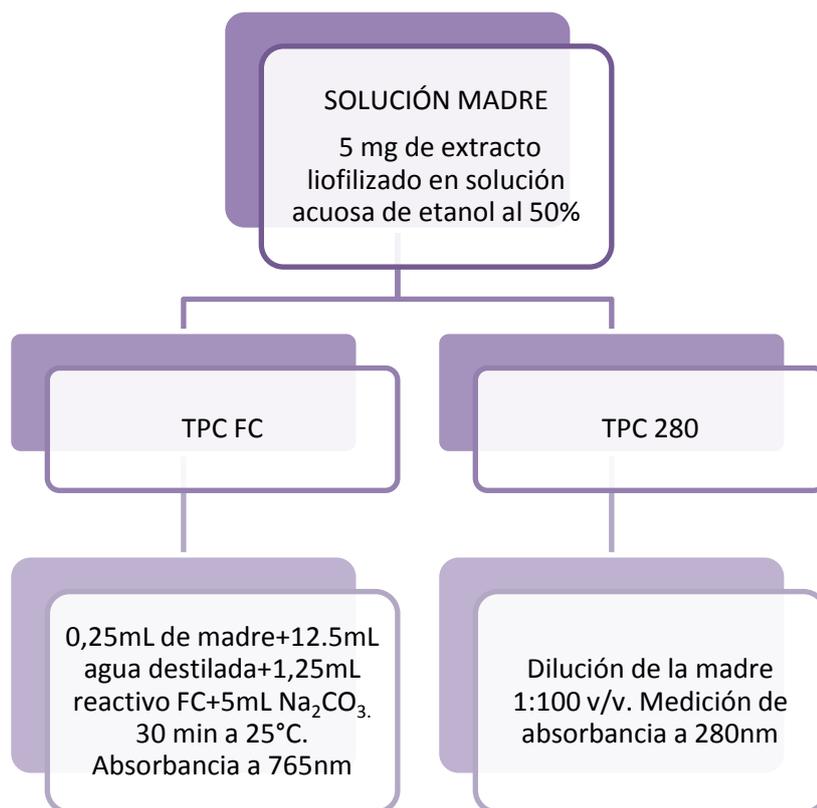


Figura 5: Esquema para la determinación de TPC por los métodos FC y 280

Para llevar a cabo el primer método, se diluyó la solución madre 1:100 v/v y se midió la absorbancia a 280 nm en cubeta de cuarzo de 10 mm, utilizando agua destilada como blanco. El contenido total de polifenoles (TPC) se calculó a partir de una curva de calibración realizada con soluciones estándar de ácido gálico (por triplicado) en el rango entre 5,4 y 31,5 mg L⁻¹ ($R^2 = 0.999$), y expresado como equivalentes de ácido gálico (mg g⁻¹ extracto).

Para realizar el método FC, se disolvió una alícuota de 0,25 mL de solución madre en 12,5 mL de agua destilada, se agregó 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 5 mL de solución de Na₂CO₃ al 20% (siguiendo dicho orden) en un matraz de 25 mL, enrazando con agua destilada hasta el volumen final. La mezcla se homogeneizó y se incubó durante 30 minutos en la oscuridad a 25°C y se realizó la medición de la absorbancia a 765 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico. El TPC se expresó como miligramo de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto

lío-filizado (mg g^{-1} extracto), utilizando una recta de calibración con ácido gálico como estándar ($n=3$) en un rango entre 0 y 200 mg L^{-1} ($R^2 = 0.999$) (Antoniolli et al., 2015).

Además, se determinó el contenido total de antocianos de los extractos de orujo llevando a cabo el método informado por Iacopini et al. (2008). Las muestras se diluyeron con etanol: agua: ácido clorhídrico ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$) (79:29:1 v/v/v), y se midió la absorbancia utilizando el espectrofotómetro UV-vis Cary-50 (Varian Inc., Mulgrave, Australia) a 540 nm. La curva de calibración se realizó con soluciones estándar de malvidina-3-O-glucósido (tres repeticiones) en el rango entre 25 y 250 mg L^{-1} ($R^2=0.997$), y los resultados fueron expresados en miligramo de malvidin-3-O-glucósido por gramo de extracto de orujo (mg g^{-1}).

3.4. Caracterización del perfil de compuestos fenólicos (antocianos y no antocianos)

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de orujo se realizó mediante HPLC-DAD, utilizando un método de preparación de muestras previamente desarrollado por Fontana et al. (2016) que se describe a continuación.

3.4.1. Caracterización de compuestos fenólicos no antocianos

El método de preparación de muestras para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos no antocianos se basa en la técnica de extracción QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) junto con la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Los analitos se extrajeron de una solución acuosa del extracto de orujo agregando 2,5 mL de acetonitrilo (MeCN) previamente acidificado con ácido fórmico al 1%. Para la separación de fases, se añadieron 1,5 g de NaCl y 4g de MgSO_4 anhidro, seguido de una agitación manual durante 1 minuto y centrifugación durante 10 minutos a 8000 rpm. A continuación, para obtener un extracto más limpio y compatible con el análisis por HPLC-DAD, se tomó una alícuota de 1 mL de la fase

superior obtenida en la etapa de extracción y se transfirió a un tubo de extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) que contenía una combinación de 150 mg de CaCl_2 anhidro, 100 mg de PSA y 100 mg de C_{18} como adsorbentes. La mezcla se agitó con vórtex durante 30 segundos y posteriormente se centrifugó 2 minutos a 8.000 rpm. Antes del análisis por HPLC-DAD, una alícuota de 500 μL del extracto limpio se evaporó hasta sequedad y se resuspendió con fase móvil inicial del método HPLC-DAD para no antocianos (Figura 6).

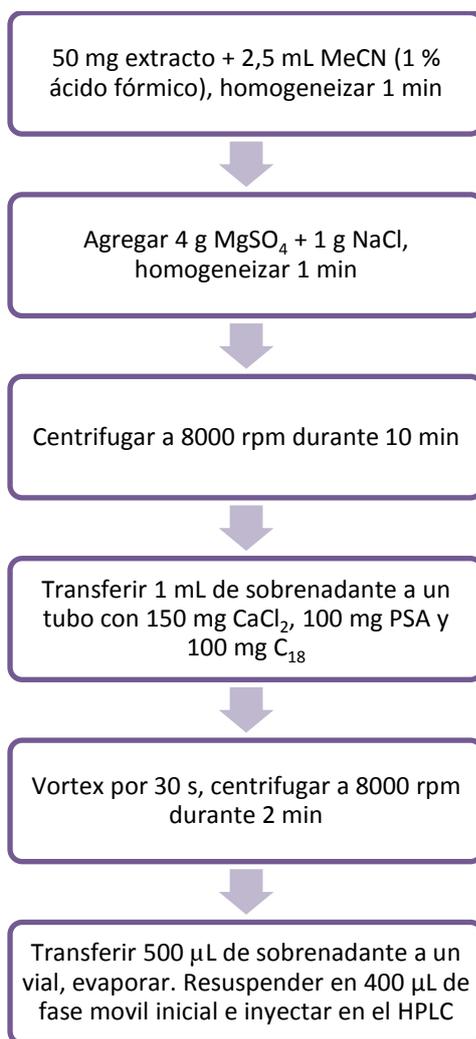


Figura 6: Esquema de la técnica de extracción QuEChERS y d-SPE

El método cromatográfico para la determinación de estos compuestos consiste en la separación de los analitos utilizando una columna de fase reversa (C_{18} ; 3.0 mm x 100

mm, 2.6 μm) y el siguiente gradiente de solventes: [A: Agua (0,1 ácido fórmico); B: Acetonitrilo]: 0–2.7 min, 5% B; 2.7–11 min, 30% B; 11–14 min, 95% B; 14–15.5 min, 95% B; 15.5–17 min, 5% B; 17–20, 5% B. El flujo de fase móvil fue 0.8 mL min^{-1} , la temperatura de la columna 35°C y el volumen de inyección $5 \mu\text{L}$. Este método permite la separación de 20 compuestos fenólicos representativos de diferentes familias químicas (ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos). Las longitudes de onda de cuantificación para las diferentes familias de analitos fueron: 254nm, 280nm, 320nm y 370nm. La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos no antocianos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros de absorbancia de los picos detectados en las muestras con los obtenidos mediante la inyección de estándares puros de cada compuesto.

Además, las muestras se enriquecieron con concentraciones conocidas de compuestos para verificar la identificación del pico y la ausencia de interferencias en los tiempos de retención de cada analito. Las muestras se cuantificaron utilizando una calibración externa con patrones puros de cada compuesto. Se obtuvieron rangos lineales entre 2 y 1000 mg mL^{-1} con un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.998 para todos los compuestos fenólicos estudiados. La exactitud de la metodología se evaluó mediante un estudio de recuperación de los compuestos a dos niveles de concentración (2,5 y $25 \mu\text{g g}^{-1}$). Los valores obtenidos estuvieron en el rango de 70% ((-)-gallocatechin) y 125% ((+)-catechin), con desviaciones estándares inferiores a 12% (Fontana et al., 2014, 2016).

Para el análisis estadístico de los datos, se realizaron las determinaciones por triplicado y los resultados se analizaron mediante ANOVA y prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Infostat (versión 2018, Argentina). Cada muestra fue extraída y los compuestos fenólicos cuantificados individualmente.

Se realizó un mapa de calor (Figura 9) con el programa Excel para relacionar los parámetros determinados (contenido total de no antocianos, antocianos y actividad antioxidante) en los extractos de orujo. Este tipo de gráficos permiten una mejor visualización de los datos a través de una escala graduada de colores que se asocia a un nivel de concentración de una respectiva variable. En este trabajo se utilizó el color verde para indicar que el compuesto se halla en una concentración mayor que el nivel medio en una muestra, el color rojo para indicar que un analito presenta un nivel inferior. El resto de los colores representan concentraciones intermedias entre los valores superiores e inferiores.

3.4.2. Caracterización de compuestos fenólicos antocianos

El análisis de antocianos se realizó de acuerdo al método reportado por Antonioli et al. (2015) con algunas modificaciones y utilizando la misma columna que para los no antocianos. En este caso, una alícuota de 5 mg de extracto liofilizado de orujo fue re-suspendida en fase móvil inicial del método HPLC para antocianos y luego se procedió a la inyección. La fase móvil fue [A: agua/ácido fórmico/Acetonitrilo (87:10:3, v/v/v) y B: agua/ácido fórmico/Acetonitrilo (40:10:50, v/v/v;)] usando el siguiente gradiente: 0 min, 10% B; 0-6 min, 25% B; 6-10 min, 31% B; 10-11min, 40% B; 11-14 min, 50% B; 14-15 min, 100% B; 15-17 min, 10% B; 17-21 min, 10% B. El flujo fue $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, la temperatura de la columna 25°C y el volumen de inyección $5 \mu\text{L}$. La cuantificación se llevó a cabo mediante mediciones del área de los compuestos a 520 nm, y la concentración de cada antociano fue expresada como malvidina-3-O-glucósido, utilizando una curva de calibración externa (Antonioli et al., 2015). Los antocianos detectados mediante HPLC-DAD se confirmaron mediante la comparación con el perfil de elución y la identificación mediante HPLC-MS realizada en un trabajo previo del grupo (Antonioli et al., 2015).

Al igual que en la caracterización de compuestos fenólicos no antocianos, las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados se analizaron

mediante ANOVA y prueba de medias de Tukey ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Infostat (versión 2018, Argentina).

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, fueron analizadas 11 muestras de orujos de diferentes variedades de vid y zonas vitivinícolas de Mendoza. Para mayor comprensión y simplificación del texto, a continuación, se presenta la Tabla 1 con la identificación de las muestras utilizadas a lo largo del texto.

Tabla 1: Muestras de orujo analizadas y sus correspondientes abreviaciones

Muestra	Abreviatura
Merlot cosecha 2015 de Gualtallary	MLT
Cabernet Sauvignon cosecha 2015 de Gualtallary	CS1
Cabernet Sauvignon cosecha 2015 de Altamira	CS2
Cabernet Sauvignon cosecha 2015 de Altamira lado norte	CS3
Cabernet Sauvignon cosecha 2016 de Agrelo	CS4
Cabernet Franc cosecha 2015 de Altamira	CF1
Cabernet Franc cosecha 2015 de Altamira lado norte	CF2
Cabernet Franc cosecha 2016 de Altamira	CF3
Malbec cosecha 2016 de Gualtallary	MB1
Malbec cosecha 2016 de Agrelo	MB2
Malbec cosecha 2015 de Gualtallary	MB3

4.1. Capacidad antioxidante, contenido de polifenoles totales (TPC) y contenido de antocianos totales

La determinación de TPC y contenido total de antocianos junto con la actividad antioxidante, son el punto de partida para la caracterización del orujo de uva, debido a que proporcionan información valiosa acerca de la composición relativa de la muestra y su potencialidad como ingrediente bioactivo.

Con respecto al contenido de antocianos totales, CS3 y MB1 mostraron los niveles máximos con 34,3 y 31,5 mg de malvidina-3-O-glucósido g⁻¹ de extracto, respectivamente (Tabla 2). De todas las variedades analizadas, las muestras de orujo Malbec junto con CS3 fueron las que presentaron niveles más elevados de antocianos totales, con valores dos veces mayores (o inclusive más) que el resto de los orujos. En

las muestras de Cabernet Sauvignon, solo CS3 presentó elevadas cantidades en comparación con las otras muestras estudiadas. Iacopini et al. (2008) también encontraron niveles elevados en hollejo de Cabernet Sauvignon, hallaron concentraciones desde 15,9 a 39,3 mg de malvidina-3-O-glucósido g⁻¹ de hollejo. En contraste, De la Cerda-Carrasco et al. (2004) encontraron cantidades inferiores de antocianos totales en orujos de las variedades Cabernet Sauvignon y Carménere (1,4 y 0,7 mg de malvidina-3-O-glucósido g⁻¹ orujo, respectivamente).

Tabla 2: Contenido de antocianos totales (mg de malvidina-3-O-glucósido g⁻¹ de extracto de orujo). Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, P <0.05).

Muestra	Antocianos totales
MLT	13,1 ^B
CS1	14,8 ^B
CS2	10,7 ^B
CS3	34,3 ^A
CS4	14,7 ^B
CF1	12,3 ^B
CF2	16,4 ^B
CF3	13,6 ^B
MB1	31,5 ^A
MB2	29,4 ^A
MB3	29,4 ^A
P valor	<0.0001

Como se mencionó en la metodología, el TPC se determinó a través de dos métodos: lectura directa de la absorbancia a 280 nm (280) y el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC); los resultados se expresaron como miligramo de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto liofilizado (mg g⁻¹ extracto). En los resultados de ambos métodos (Tabla 3), se observó que MB3 presentó los niveles más elevados con 352,8 (FC) y 332 (280) mg g⁻¹ extracto de orujo, seguido de MB2, CS3, MB1 y CS4. Los valores

más bajos de TPC se observaron en CS2 con 182,1 (FC) y 137,1 (280), y CF3 con 182,6 (FC) y 139,4 (280). Antonioli et al. (2015) analizaron extracto de orujo de la variedad Malbec (de origen Gualtallary, cosecha 2013) y encontraron niveles de 196,2 mg g⁻¹ extracto de orujo (FC) y 165,7 mg g⁻¹ extracto de orujo (280), valores inferiores a los hallados en este trabajo en los orujos de la variedad Malbec.

Tabla 3: Contenido de TPC (mg g⁻¹ extracto) por método FC y 280 en extractos de orujos. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, P <0.05).

Muestra	TPC FC	TPC 280
MLT	201 ^C	165 ^{CD}
CS1	193 ^C	145 ^D
CS2	182 ^C	137 ^D
CS3	264 ^B	237 ^B
CS4	278 ^B	194 ^{BC}
CF1	197 ^C	163 ^{CD}
CF2	193 ^C	156 ^{CD}
CF3	182 ^C	139 ^D
MB1	263 ^B	234 ^B
MB2	329 ^A	299 ^A
MB3	352 ^A	332 ^A
P valor	<0.0001	<0.0001

La capacidad antioxidante se determinó a través del ensayo ORAC y se expresó como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de extracto de orujo (μmol TE g⁻¹). En los resultados obtenidos (Tabla 4), se observó la actividad máxima en la muestra MB3 (3889 μmol TE g⁻¹ extracto), seguido de CS3, MB2 y MB1 (entre 2069 y 2701 μmol TE g⁻¹ extracto). Ky et al. (2014) determinaron la capacidad antioxidante mediante ORAC de semillas y hollejo de uva, donde encontraron niveles más bajos que los hallados en este trabajo (entre 202 y 571 μmol TE g⁻¹ extracto de semilla de las variedades Garnacha, Syrah, Carignan Noir, Mourvedre, Cunoise, Alicante Bouchet; y entre 201 y 532 en extractos de hollejo de las mismas variedades de uva), mientras que Wang et

al. (2017) obtuvieron valores de 1921 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extracto para la variedad Tempranillo. Otros autores encontraron niveles de ORAC en extractos de orujo similares a los hallados en este trabajo, obteniendo valores de 2756 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extracto de orujo liofilizado en Malbec (Antoniolli et al., 2013), y valores que oscilan entre 1426 y 3669 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extracto de orujo para variedades Alicante y Pinot Noir respectivamente (Boussenna et al., 2015). En un extracto comercial de semilla de uva, Cádiz-Gurrea et al. (2017) obtuvieron valores de ORAC de 8620 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ extracto, niveles considerablemente mayores a los encontrados en los extractos de orujos de este trabajo.

Tabla 4: Capacidad antioxidante determinada mediante ORAC ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$ de extracto de orujo). Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Muestra	ORAC
MLT	1252 ^F
CS1	1430 ^{EF}
CS2	1745 ^{DE}
CS3	2700 ^B
CS4	1892 ^{BC}
CF1	1156 ^F
CF2	627 ^G
CF3	1277 ^{EF}
MB1	2069 ^{CD}
MB2	2487 ^{BC}
MB3	3888 ^A
P valor	<0.0001

En la Figura 7, se observa una tendencia similar en los valores de ORAC y TPC en las muestras analizadas, excepto CS2, que presentó un elevado valor de ORAC a pesar de su bajo valor de TPC. Es por ello que se realizó un análisis de correlación entre ORAC y TPC donde se obtuvo un coeficiente de Pearson (r) de 0,87 (TPC FC) y 0,88

(TPC 280) por lo que existe correlación entre ambas variables (Ver ANEXOS). Estas correspondencias generales, se han observado en varios estudios realizados por otros autores que han descrito una elevada correlación entre los valores TPC y ORAC en diferentes muestras. Campos et al. (2013) encontraron esta correlación en vinos, té y extractos de plantas, mientras que Dávalos et al. (2004) lo hicieron en vinos tintos y suplementos dietéticos antioxidantes. Sin embargo, otros autores no observaron dicha correlación en extractos de uva Chardonay y Cabernet Franc (Hogan et al., 2010), lo que puede deberse a que la capacidad antioxidante del extracto de uva para eliminar radicales peroxilo no depende solo del contenido de compuestos fenólicos. En la Figura 7, también se puede observar que las muestras CS3, MB1, MB2 y MB3 presentaron una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) de antocianos y además mostraron mayor actividad antioxidante. En el análisis de correlación entre ORAC y contenido de antocianos (ver ANEXO) se obtuvo un valor de “r” de 0,74 lo que sugiere una buena correlación entre ambas variables.

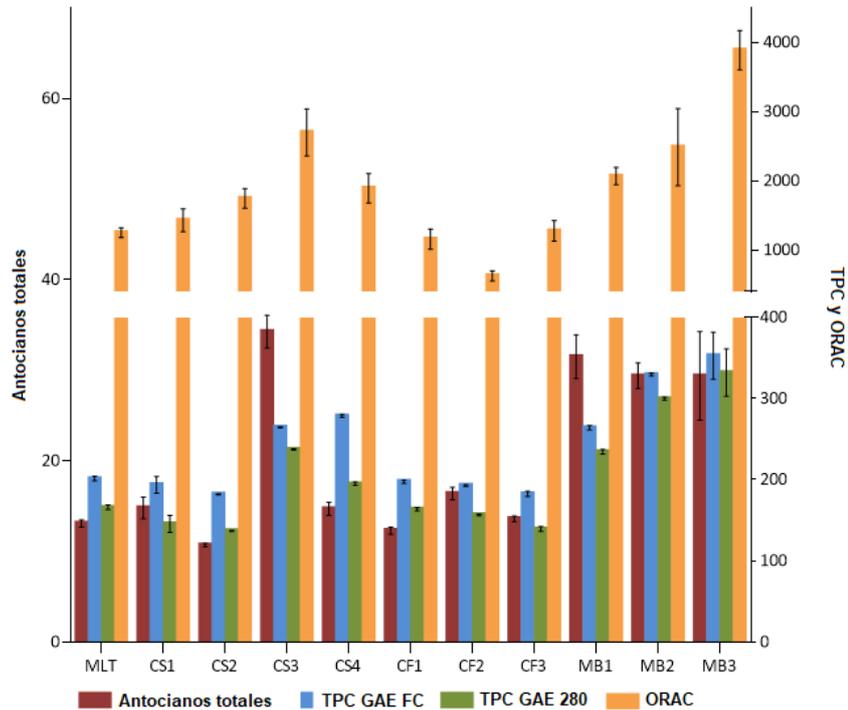


Figura 7: Niveles de antocianos totales, TPC y actividad antioxidante

(ORAC) en extractos liofilizados. Contenido promedio con las desviaciones estándares, $n = 3$ réplicas.

Con el objetivo de comparar los valores obtenidos en esta tesis con los del trabajo de Antonioli et al. (2015) para extractos de orujo, se realizaron tres pruebas estadísticas ANOVA con los valores de ORAC, TPC FC y TPC 280 de los extractos de orujo de la variedad Malbec de este trabajo (MB1, MB2 y MB3) y el orujo Malbec del trabajo de Antonioli et al. (ver ANEXOS). En todas las pruebas, al menos dos de las medias de los grupos son estadísticamente significativas ($P < 0,05$), por lo que se realizó una prueba de Tukey. El valor medio de ORAC correspondiente al extracto de orujo del trabajo de Antonioli et al. es significativamente diferente ($P < 0,05$) de los valores de MB1 y MB3, pero no del extracto MB2. El contenido medio de TPC FC del extracto de orujo del trabajo de Antonioli et al. es significativamente diferente ($P < 0,05$) a los valores de todos los extractos estudiados en esta tesis. Por último, el valor medio de TPC 280 presentado por Antonioli et al. es significativamente diferente ($P < 0,05$) a los valores correspondientes a MB2 y MB3, pero no al de MB1. Esta diferencia en los

resultados puede deberse a que, si bien se trata de la misma variedad de uva, las muestras corresponden a temporadas diferentes, y en algunos casos, sitios de cultivo distintos. Es conocido que los factores ambientales y de vinificación pueden producir modificaciones en la acumulación de compuestos fenólicos en los productos finales.

4.2. Caracterización del perfil y concentración de compuestos fenólicos

La caracterización del perfil de compuestos fenólicos en las muestras estudiadas resulta muy importante para desarrollar bases tecnológicas que permitan la utilización de los orujos en ámbitos sustentables para el ambiente y con alto valor agregado, más aun teniendo en cuenta el impacto económico de la actividad vitivinícola en la región. Es necesario destacar que en Argentina solo existe un reporte acerca del nivel de compuestos fenólicos presentes en orujo de uvas cv. Malbec realizado por Antonioli et al. (2015) en la Cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Facultad de Ciencias Agrarias, por lo que la información obtenida para otras variedades resulta sumamente importante para la utilización de este subproducto.

4.2.1. Perfil de compuestos fenólicos no antocianos

Se identificaron y cuantificaron un total de 17 compuestos no antocianos en los extractos de orujos de uva, entre ellos se encuentran los no flavonoides (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, estilbenos y análogos de feniletanol) y los flavonoides (flavanoles y flavonoles). Estos compuestos fueron separados con éxito e identificados comparando sus tiempos de retención y espectros UV con los obtenidos en los estándares puros. La Tabla 5 muestra la concentración de compuestos fenólicos individuales no antocianos detectados y cuantificados.

Tabla 5: Niveles de compuestos fenólicos no antocianos en extractos de uva liofilizados. Contenido promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto de orujo) con sus desviaciones estándar, $n = 3$ réplicas. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

	Ácidos hidroxibenzoicos			Ácidos hidroxicinámico				Flavonoles			Otros compuestos		
	Ácido gálico	Ácido siríngico	Total	Ácido cafeico	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico	Total	Kaempferol-3-glucoside	Quercetina	Total	OH-tirosol	Tirosol	Total
MLT	116.5 ^{AB}	730.1 ^A	846.6 ^{BC}	13.9 ^A	25.7 ^A	14.7 ^A	54.3 ^{DE}	n.d.	581.8 ^{AB}	581.8 ^{ABC}	n.d.	39.8 ^{AB}	39.8 ^B
CS1	147.6 ^{AB}	794.5 ^A	942.1 ^{BC}	10.1 ^A	18 ^A	12 ^A	40.1 ^E	45.2 ^C	687.8 ^{AB}	733 ^{ABC}	n.d.	27 ^{AB}	27 ^B
CS2	361.4 ^{AB}	935.9 ^A	1297.3 ^{BC}	55.5 ^C	57 ^{BA}	15.8 ^A	128.3 ^{BC}	41.2 ^{B^C}	922 ^{AB}	963.2 ^C	n.d.	n.d.	-
CS3	42.9 ^A	6664.6 ^B	1297.3 ^A	5.3 ^A	130.4 ^A	32.2 ^{BC}	167.9 ^{AB}	n.d.	n.d.	-	11.7 ^A	24.1 ^{AB}	35.7 ^B
CS4	599.1 ^C	1043.9 ^A	1642.9 ^{BC}	79.3 ^D	91.6 ^{BC}	26.3 ^{BC}	197.1 ^A	39.4 ^{BC}	1694.6 ^B	1734 ^A	38.9 ^A	285.2 ^C	324.2 ^A
CF1	50.1 ^A	696.7 ^A	746.7 ^C	14.4 ^A	28.4 ^A	18.1 ^{AB}	60.8 ^{DE}	40.3 ^{BC}	742 ^A	782.3 ^{BC}	12 ^A	44.1 ^{AB}	56.1 ^B
CF2	99.4 ^{AC}	720.3 ^A	819.7 ^{BC}	28.2 ^B	49.6 ^A	21.2 ^{AB}	99.1 ^{CD}	n.d.	217.9 ^{AB}	217.9 ^{ABC}	14.8 ^A	42.2 ^B	56.9 ^B
CF3	45.0 ^A	1713.9 ^A	1758.9 ^{BC}	13.2 ^A	55.1 ^{AC}	26.7 ^{CD}	95 ^{CD}	n.d.	n.d.	-	9.1 ^A	62.9 ^B	72 ^B
MB1	284.7 ^A	1442.1 ^A	1726.8 ^{BC}	11.3 ^A	44.6 ^A	19.7 ^{AB}	75.6 ^{DE}	35.8 ^{BC}	847 ^{AB}	882.8 ^{ABC}	11.5 ^A	12.9 ^{AB}	33.4 ^B
MB2	71.6 ^A	1494 ^A	1565.5 ^{BC}	36.1 ^B	115.4 ^{BC}	38 ^D	189.5 ^A	42.6 ^{BC}	1639.1 ^{AB}	1681.6 ^{ABC}	15.2 ^A	43.5 ^{AB}	58.7 ^B
MB3	447.7 ^{BC}	1604.9 ^A	2052.5 ^B	35.8 ^B	118.7 ^C	40.6 ^D	195.1 ^A	n.d.	1668 ^{AB}	1668 ^{AB}	n.d.	17.2 ^{AB}	17.2 ^B
ANOVA													
P valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0119	0.0105	0.2208	<0.0001	<0.0001

Continuación Tabla 5: Niveles de compuestos fenólicos no antocianos en extractos de uva liofilizados. Contenido promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto de orujo) con sus desviaciones estándar, $n = 3$ réplicas. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

	Estilbenos		Flavanoles							Total no antocianos	
	Trans-resveratrol	Total	Procianidina B1	(+)-catequina	Procianidina B2	(-)-epicatequina	(-)-galocatequina	(-)-gallocatequin galate	(-)-epicatequin galate		Total
MLT	24.8 ^{AB}	24.8 ^{AB}	824.4 ^A	127.4 ^A	n.d.	295.8 ^A	195.2 ^A	n.d.	103 ^A	1545.8 ^B	3093.1 ^B
CS1	5.2 ^{AB}	5.2 ^{AB}	198.8 ^A	380.2 ^A	20.4 ^A	252 ^A	202.5 ^A	n.d.	13.2 ^A	1067.2 ^B	2814.6 ^B
CS2	15 ^{AB}	15 ^{AB}	861.6 ^A	3399.7 ^{ABC}	14.6 ^A	1840.7 ^B	342.4 ^A	362.2 ^C	290.9 ^A	7112.2 ^{AB}	9516.1 ^{AB}
CS3	12.8 ^{AB}	12.8 ^{AB}	55.3 ^A	412.9 ^A	n.d.	192.1 ^A	848 ^B	n.d.	n.d.	1508.5 ^B	8432.3 ^{AB}
CS4	68.9 ^C	68.9 ^C	612.8 ^A	4532.6 ^{BC}	257.3 ^A	5518.1 ^D	496.5 ^{AB}	232.8 ^{BC}	1235.6 ^B	12885.8 ^A	16852.9 ^A
CF1	7.2 ^{AB}	7.2 ^{AB}	373.3 ^A	615.3 ^A	666.5 ^A	194.3 ^A	163.2 ^A	124.3 ^A	193.4 ^A	2340.5 ^B	3993.4 ^B
CF2	1.5 ^A	1.5 ^A	1237.2 ^A	605.5 ^A	n.d.	147.4 ^A	235.6 ^A	129.9 ^{AB}	28.9 ^A	2384.5 ^B	3579.6 ^B
CF3	22.5 ^{AB}	22.5 ^{AB}	44.4 ^A	675.3 ^A	n.d.	584.2 ^A	428.4 ^A	n.d.	52.9 ^A	1785.1 ^B	3733.6 ^B
MB1	18.2 ^{AB}	18.2 ^{AB}	1286 ^A	514 ^{AB}	1378.4 ^A	82.1 ^A	166.8 ^A	138.4 ^A	320.8 ^A	3887.5 ^{AB}	6624.3 ^{AB}
MB2	36.4 ^{BC}	36.4 ^{BC}	1819.8 ^A	531.9 ^{AB}	322.6 ^A	24.9 ^A	196.1 ^A	97.2 ^{AB}	15.1 ^A	3007.5 ^{AB}	6539.3 ^{AB}
MB3	327.8 ^D	327.8 ^D	1430.2 ^A	5340 ^C	18.1 ^A	3961.6 ^C	300.3 ^A	229.5 ^{BC}	n.d.	11279.7 ^{AB}	15540.3 ^A
ANOVA											
P valor	<0.0001	<0.0001	0.2057	0.0004	0.4715	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0039	0.0027

En la Figura 8 se observan los perfiles cromatográficos correspondiente a cada longitud de onda para 16 compuestos no antocianos presentes en orujo liofilizado de la variedad Cabernet Sauvignon (CS4).

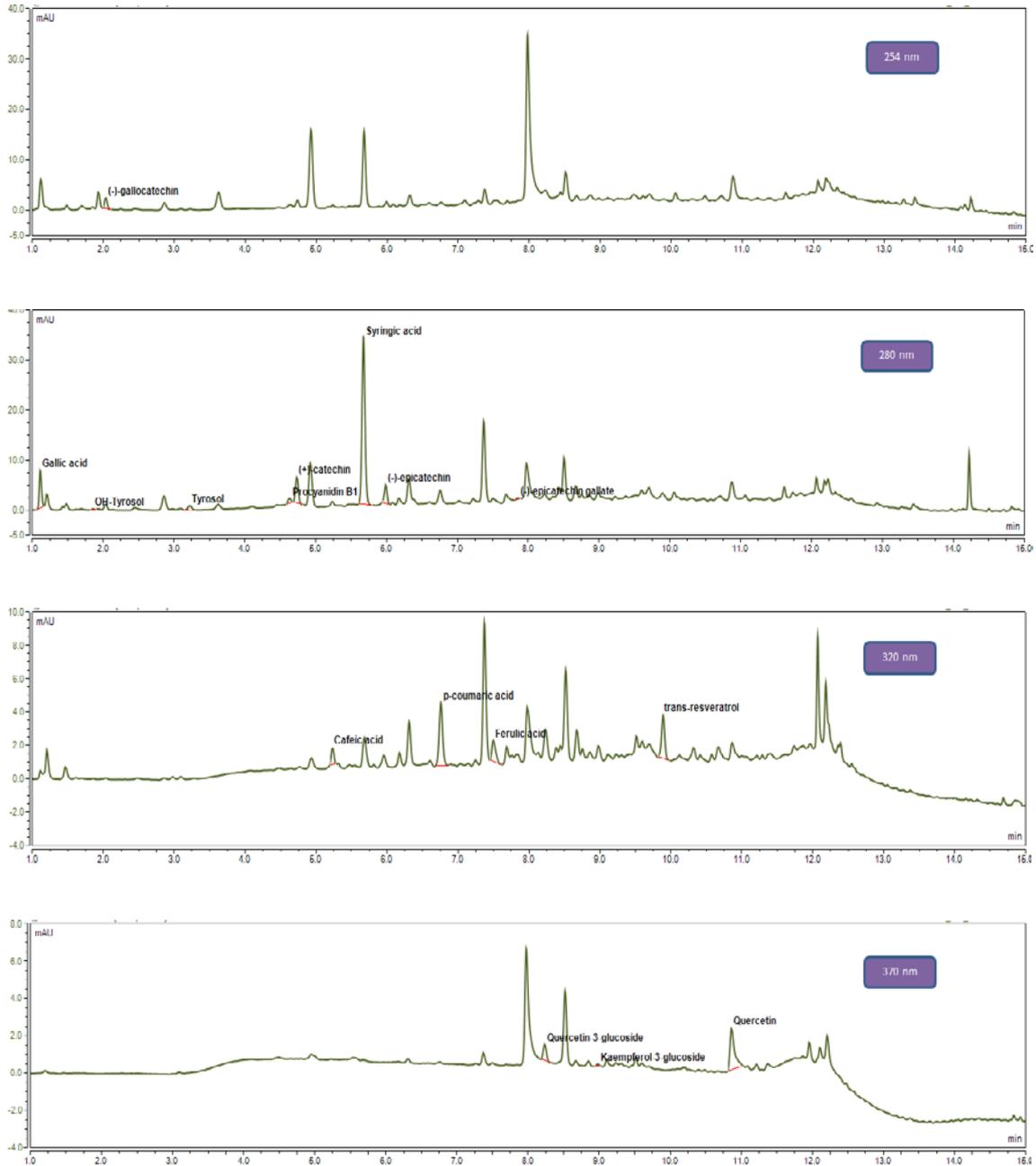


Figura 8: Perfiles cromatográficos para 10 compuestos no antocianos presentes en orujo liofilizado de la variedad Cabernet Sauvignon (CS4) analizados por HPLC-DAD

La Figura 9 presenta un mapa de calor que combina los datos de los compuestos fenólicos antocianos y no antocianos para cada extracto de orujo con la finalidad de visualizar los cambios relacionados con cada muestra. Se puede observar que las muestras CS4, CF1, MB1 y MB2 presentaron 16 compuestos no antocianos, mientras que en el resto se detectaron un número menor de estos compuestos. En cuanto al contenido de no antocianos totales (suma de los compuestos cuantificados), CS4 y MB3 exhibieron los niveles más elevados. Para todas las muestras estudiadas, con excepción de CS3, la familia de flavanoles presentó los niveles más elevados, con concentraciones que oscilaron entre 1.066 (CS1) y 12.886 (CS4) $\mu\text{g g}^{-1}$. Las concentraciones máximas correspondieron a (-)-epicatequina (5518 $\mu\text{g g}^{-1}$ en CS4), (+)-catequina (5340 $\mu\text{g g}^{-1}$ en MB3) y procianidina B1 (1820 $\mu\text{g g}^{-1}$ en MB2).

afectar en dicha transferencia (Barcia et al., 2014). Otra explicación de los elevados niveles observados de (-)-epicatequina en comparación con los de (+)-catequina, es la hidrólisis de los precursores con grupos galato como (-)-epicatequin galato. Este compuesto fue cuantificado en un nivel de $1236 \mu\text{g g}^{-1}$ en CS4, siendo esta muestra la que presentó la mayor cantidad en las analizadas en este trabajo. Esta explicación también está justificada por la elevada cantidad de ácido gálico presente en CS4 en comparación con las otras muestras. Resultados similares fueron reportados por otros autores para orujos de las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon (Lingua et al., 2016).

Los ácidos fenólicos (gálico, sirínico, cafeico, p-cumárico, y ferúlico) se identificaron y cuantificaron en todas las muestras de orujo analizadas. El ácido sirínico (de la familia del ácido hidroxibenzoico) fue el más abundante, con concentraciones que oscilaron entre 720 (CF2) y $6665 \mu\text{g g}^{-1}$ (CS3). De hecho, este compuesto fue el más abundante en la muestra CS3, representando aproximadamente el 80% del total de compuestos no antocianos. Sin bien hay poca información disponible acerca del origen de este compuesto; se ha sugerido que puede ser un producto de la descomposición alcalina de malvidina-3-O-glucósido (Jackson, 2014). Otros autores también encontraron elevados niveles de este compuesto en cultivares de tres uvas tintas autóctonas (*Vitis vinifera* L.) de Portugal (Tournour et al., 2015). Además, se encontró una relación entre los contenidos de malvidin-3-glucósido y ácido sirínico, donde las muestras con elevado contenido de este antociano fueron las que presentaron niveles mayores de ácidos fenólicos (ver Figura 9 y Tablas 5 y 6); es por eso que se puede suponer que el contenido de ácido sirínico está directamente relacionado con los niveles de antocianos. Además, al observar los datos generales, se puede observar que la muestra CS3 presenta una elevada actividad antioxidante ($2700 \mu\text{mol TE por g extracto}$), que también se correlaciona con su elevado nivel de ácido sirínico (Figura 9). Sin embargo, esta muestra también presenta un elevado nivel de antocianos; por lo

tanto, es difícil asociar directamente estos parámetros, aunque la elevada concentración de estos compuestos podría actuar de forma sinérgica, aumentando la actividad antioxidante del extracto. Se ha informado que este ácido actúa en la inhibición de la proliferación de la línea celular de cáncer de mama sensible a hormonas (Kampa et al., 2015); la protección del axón en el nervio ciático de ratas luego de una isquemia (lesión por reperfusión) (Tokmak et al., 2017); la supresión de lesión hepática inducida por concanavalina en ratones (Itoh et al., 2009); y además, evita el aumento de peso, adiposidad, resistencia a la insulina, dislipidemia y esteatosis hepática en ratas con dieta obesogénica (Ham et al., 2016). Teniendo en cuenta los elevados niveles de ácido siríngico hallados en los extractos y las propiedades bioactivas mencionadas, se deben realizar estudios para establecer sus propiedades antioxidantes y/o efectos sinérgicos con otros compuestos fenólicos en diferentes sistemas.

El tirosol, un derivado del feniletanol, fue cuantificado en todas las muestras analizadas con excepción de CS2. El OH-tirosol fue encontrado solo en algunas muestras en niveles entre $9,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (CF3) y $38,9 \mu\text{g g}^{-1}$ (CS4). En un estudio previo (Fontana et al., 2016), se halló este compuesto en un nivel de $13 \mu\text{g g}^{-1}$ en extracto de orujo de Cabernet Sauvignon y Bonarda. Comparado con el resto de los compuestos fenólicos, existen estudios limitados que proporcionan información sobre la concentración de OH-tirosol en el vino (o derivados). Este compuesto es relevante, ya que ha demostrado una actividad antioxidante in vitro mediante la captación de peróxido, hidroxilo y otros radicales, especies reactivas del oxígeno y aniones superóxido; además, detienen las reacciones en cadena, disminuyen el efecto catalizador de los iones metálicos y aumentan los sistemas de defensa endógenos (Fernández-Mar et al., 2012). Teniendo en cuenta la actividad antioxidante del OH-tirosol, podría estar involucrado en la prevención de patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, diabetes e

inflamación (Fernández-Mar et al., 2012). Considerando los probables efectos sinérgicos con otros fenoles, la cuantificación de OH-tirosol proporciona información novedosa para utilizar el extracto de orujo como un aditivo nutricional/farmacológico. En este sentido, este estudio proporciona nuevos conocimientos para la posible explotación de estos compuestos bioactivos en diferentes aplicaciones relacionadas con la industria biotecnológica.

Otros compuestos importantes en la categoría de no flavonoides son los estilbenos. La cuantificación de dichos compuestos es relevante debido a que presentan propiedades antioxidantes y diferentes aplicaciones nutricionales. El estilbeno *trans*-resveratrol se encontró en todas las muestras estudiadas en concentraciones que oscilan entre 4 (CF2) y 328 $\mu\text{g g}^{-1}$ de extracto (MB3). Estos niveles elevados también están correlacionados con mayores actividades antioxidantes observadas en las mismas muestras (Figura 7). En cuanto al contenido de *trans*-resveratrol en las muestras, se observaron resultados variables con niveles más bajos que los hallados en otros reportes, como así también concentraciones similares o mayores, como es el caso de MB3, que es la muestra que mayores niveles de *trans*-resveratrol ha reportado hasta la actualidad en base a las publicaciones para extractos de orujo (Antoniolli et al., 2015; Fontana et al., 2016, Barcia et al., 2014). Estudios previos realizados con orujos de variedades argentinas, mostraron niveles cuantificables de *trans*-resveratrol, entre 7 (variedad Aspirant Bouchet) y 36 $\mu\text{g g}^{-1}$ (variedad Malbec) (Antoniolli et al., 2015; Fontana et al., 2016). Sin embargo, otros autores no hallaron este compuesto en los orujos de variedades Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon cultivados en la provincia de San Juan, Argentina (Lingua et al., 2016). Esta amplia variabilidad probablemente se debe al hecho de que la cantidad de *trans*-resveratrol en las uvas para vinificación (y en consecuencia sus residuos) varía ampliamente dependiendo de muchos factores, como la variedad de uva, región geográfica, factores agronómicos, factores climáticos, condiciones de estrés de la planta y prácticas enológicas (Fernández-Mar et al., 2012).

Debido a la variabilidad y los elevados niveles obtenidos para algunas muestras (como es MB3), es necesario evaluar la concentración de dichos compuestos para que se aproveche al máximo el contenido de cada residuo en función a una aplicación específica.

Con respecto al contenido de flavonoles en los orujos estudiados, la quercetina fue el compuesto más abundante detectado y cuantificado con concentraciones entre 218 y 1694 $\mu\text{g g}^{-1}$. Las muestras CS3 y CF3 no presentaron niveles detectables de este compuesto. Las concentraciones de quercetina halladas en este estudio para orujos de variedades tintas de Cabernet Sauvignon, Merlot, Malbec y Cabernet Franc son más elevados que los informados por Lingua et al. (2016) para uvas cultivadas en San Juan, Argentina (entre 93 y 251 $\mu\text{g g}^{-1}$ para orujos de Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon) y similares a los informados para orujos de Malbec (557 $\mu\text{g g}^{-1}$), Cabernet Sauvignon (2092 $\mu\text{g g}^{-1}$) y Bonarda (1675 $\mu\text{g g}^{-1}$) (Antoniolli et al., 2015; Fontana et al., 2016).

4.2.2. Perfil de compuestos fenólicos antocianos

Los antocianos son compuestos naturales que poseen colores atractivos y brillantes, además de una buena solubilidad en agua, lo que permite su fácil incorporación en varios sistemas alimentarios. También presentan actividad antioxidante relacionada con la prevención de varias enfermedades degenerativas (Ignat et al., 2011).

El perfil y la concentración de antocianos en uvas de determinados cultivares están estrechamente vinculados con caracteres genéticos de las variedades y factores del ambiente donde las plantas se desarrollan. La transferencia de antocianos de la uva al vino es relativamente limitada, con valores inferiores al 40 % (Kammerer et al., 2005), en consecuencia, una elevada cantidad de antocianos de la uva permanece en el orujo, convirtiéndolo en una fuente abundante de colorantes y antioxidantes naturales para la industria alimentaria.

La Tabla 6 expone las concentraciones individuales de antocianos presentes en los extractos de orujo agrupadas en función al tipo de derivado (glucosilados, acetilados y acetilcumarilados), y la Figura 9 presenta dichos resultados en un mapa de calor. La Figura 10 muestra el perfil cromatográfico para 13 antocianos presentes en orujo liofilizado de la variedad Malbec (MB1); los cromatogramas del resto de las variedades estudiadas mostraron perfiles similares, identificándose los mismos compuestos.

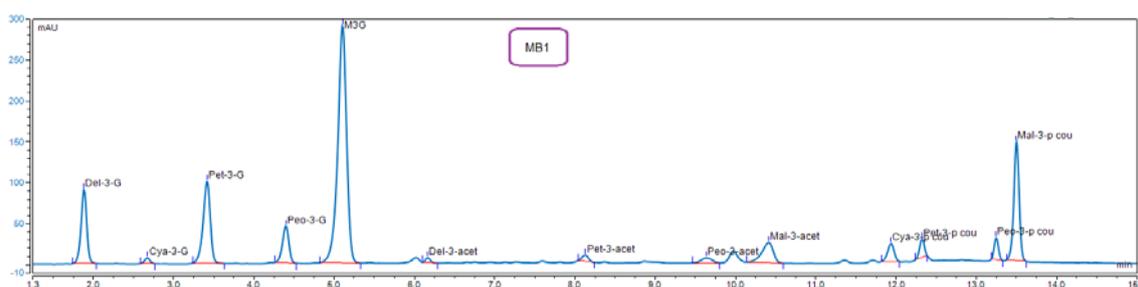


Figura 10: Perfil cromatográfico de antocianos presentes en presentes en orujo liofilizado de la variedad Malbec (MB1) analizados por HPLC-DAD.

Los antocianos encontrados en este estudio, fueron similares a los datos reportados previamente para orujos de la variedad Malbec en Argentina (Antoniolli et al., 2015). Sin embargo, los datos hallados difieren de los resultados presentados por Lingua et al. (2016) para orujos de las variedades Cabernet Sauvignon y Merlot. Estos autores no encontraron delfinidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido y delfinidina 3-O-acetilglucósido en sus muestras, mientras que nuestros resultados mostraron niveles que oscilan entre 674 y 7023 $\mu\text{g g}^{-1}$ de orujo para dichos compuestos. Esta diferencia podría deberse al tipo de proceso de extracción utilizado en cada estudio. Además, los perfiles de compuestos fenólicos evaluados en este estudio fueron similares al de otras variedades de uva cultivadas en el mundo: Cabernet Mitos, Cabernet Sauvignon, Merlot, Garnacha, Syrah, Carignan Noir, Mourvedre, Counoise y Alicante Bouchet (Kammerer et al., 2004; Ribeiro et al., 2015; Ky et al., 2014). Para la variedad Cabernet Franc, hay un estudio que informa los niveles de acuerdo con el tipo de

antocianidina, pero no se llevó a cabo la cuantificación ni la diferenciación entre derivados glucocilados, acetilados y cumarilados como se presenta en este trabajo (Thimothe et al., 2007). Por lo tanto, este estudio proporciona información nueva acerca de la composición y distribución de antocianos en esta variedad de uva.

Los datos obtenidos de las concentraciones de antocianos individuales mostraron diferencias con la cantidad de antocianos totales de las muestras. Se determinó que malvidina-3-O-glucósido fue el compuesto predominante, seguido por malvidina-3-O-p-cumarilglucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido (Tabla 6 y Figura 9). MB3 fue la muestra con mayor contenido total de antocianos ($78.537 \mu\text{g g}^{-1}$ de orujo) seguido de CS3 ($64.563 \mu\text{g g}^{-1}$ de orujo) y MB2 ($53.629 \mu\text{g g}^{-1}$ de orujo). Estos resultados coinciden con el análisis espectrofotométrico de antocianos totales. En cuanto a la distribución de antocianos en función al tipo de antocianidina, la segunda antocianidina más abundante fue la petunidina, aunque se observaron diferencias en el contenido entre muestras de la misma variedad de uva. Esto probablemente se debe a que los orujos estudiados pertenecen a diferentes zonas vitivinícolas y han sufrido distintos procedimientos de vinificación, los que afectan al contenido final de compuestos fenólicos.

Tabla 6: Niveles de compuestos fenólicos antocianos en extractos de uva liofilizados. Contenido promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto de orujo) con sus desviaciones estándar, $n = 3$ réplicas. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

	Antocianos glucosilados						Antocianos acetilados				
	Delfinidina 3-O-glucosido	Cianidina 3-O-glucosido	Petunidina 3-O-glucosido	Peonidina 3-O-glucosido	Malvidina 3-O-glucosido	Total	Delfinidina 3-O-acetilglucosido	Petunidina 3-O-acetilglucosido	Peonidina 3-O-acetilglucosido	Malvidina 3-O-acetilglucosido	Total
MLT	1129 ^{DE}	731 ^{CD}	1256 ^{FG}	1016 ^{EF}	4057 ^{EF}	8198 ^G	748 ^{DE}	788 ^{DE}	734 ^F	1242 ^{FG}	3513 ^G
CS1	2303 ^{CDE}	832 ^{BC}	2025 ^E	1265 ^{EF}	7540 ^{DE}	13964 ^{FG}	808 ^{CDE}	962 ^{CD}	674 ^F	2382 ^D	4827 ^{FG}
CS2	748 ^{CDE}	674 ^D	794 ^G	749 ^G	3525 ^F	6489 ^G	764 ^{CDE}	706 ^E	674 ^F	1203 ^{FG}	3346 ^G
CS3	3667 ^{BC}	840 ^{CD}	5708 ^B	2004 ^C	22674 ^B	34893 ^B	873 ^{BC}	1029 ^C	1119 ^C	3381 ^B	6402 ^B
CS4	881 ^E	693 ^D	1080 ^{FG}	911 ^{FG}	6925 ^{DEF}	10489 ^E	716 ^E	717 ^E	809 ^{EF}	1909 ^E	4151 ^E
CF1	1232 ^{DE}	718 ^{CD}	1427 ^F	1022 ^{EF}	8216 ^D	12615 ^E	726 ^{DE}	762 ^E	850 ^{DEF}	2468 ^{CD}	4806 ^{EF}
CF2	797 ^{CDE}	683 ^{CD}	920 ^G	813 ^G	4709 ^{DEF}	7923 ^{EF}	728 ^{CD}	706 ^E	757 ^{EF}	1482 ^F	3673 ^{EF}
CF3	3981 ^{BC}	910 ^B	5197 ^C	2494 ^B	17422 ^C	30004 ^D	894 ^{BC}	987 ^C	1110 ^{CD}	2682 ^C	5672 ^D
MB1	2611 ^A	810 ^{BCD}	3224 ^D	1689 ^{CD}	16488 ^C	25322 ^C	1024 ^A	1866 ^A	2401 ^A	1120 ^G	6412 ^C
MB2	1602 ^{CD}	737 ^{CD}	2507 ^E	1422 ^{DE}	16135 ^C	22403 ^A	820 ^{CD}	902 ^{CD}	986 ^{CDE}	3607 ^B	6315 ^A
MB3	7023 ^{AB}	113 ^A	9454 ^A	4201 ^A	32056 ^A	53866 ^C	1001 ^{AB}	1275 ^B	1485 ^B	4136 ^A	7897 ^C
ANOVA											
P valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Continuación Tabla 6: Niveles de compuestos fenólicos antocianos en extractos de uva liofilizados. Contenido promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$ extracto de orujo) con sus desviaciones estándar, $n = 3$ réplicas. Letras diferentes dentro de una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre extractos (prueba de Tukey, $P < 0.05$).

	Antocianos cumarilados					Total antocianos	Σ antocianos di-hidroxilados	Σ antocianos tri-hidroxilados	Proporción antocianos tri/di-hidroxilados
	Cianidina 3-O-p-cumarilglucosido	Petunidina 3-O-p-cumarilglucosido	Peonidina 3-O-p-cumarilglucosido	Malvidina 3-O-p-cumarilglucosido	Total				
MLT	833 ^E	767 ^D	776 ^D	1206 ^G	3581 ^G	15283 ^G	4091 ^{GG}	11193 ^G	2.7 ^G
CS1	925 ^E	762 ^D	799 ^D	1265 ^{FG}	3751 ^{FG}	22542 ^{FG}	4494 ^{FGG}	18048 ^{FG}	4 ^{FG}
CS2	756 ^E	720 ^D	722 ^D	1135 ^G	3333 ^G	13169 ^G	3575 ^G	9594 ^G	2.7 ^G
CS3	1937 ^B	2767 ^A	190 ^B	16663 ^B	23267 ^B	64563 ^B	7801 ^B	56762 ^B	7.3 ^B
CS4	775 ^E	731 ^D	977 ^D	2702 ^E	5184 ^E	19824 ^E	4164 ^E	15661 ^E	3.8 ^E
CF1	923 ^E	714 ^D	871 ^D	2013 ^{EF}	4521 ^{EF}	21942 ^{EF}	4384 ^{EF}	17558 ^{EF}	4 ^{EF}
CF2	754 ^E	708 ^D	866 ^D	2044 ^{EF}	4372 ^{EF}	15968 ^{EF}	3873 ^{EEG}	12094 ^{EF}	3.1 ^{EF}
CF3	1600 ^C	1341 ^C	1425 ^C	5673 ^D	10039 ^D	45715 ^D	7539 ^D	38176 ^D	5.1 ^D
MB1	1120 ^D	2277 ^B	1635 ^C	10684 ^C	1571 ^{5C}	47449 ^C	7655 ^C	39794 ^C	5.2 ^C
MB2	1565 ^C	2521 ^A	2198 ^{AB}	18626 ^A	24911 ^A	53629 ^A	6909 ^A	46720 ^A	6.8 ^A
MB3	2430 ^A	1992 ^B	2097 ^A	10255 ^C	16774 ^C	78537 ^C	11344 ^C	67193 ^C	5.9 ^C
ANOVA									
P valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

En la Figura 11 se observa que los derivados glucosilados fueron el grupo más abundante de pigmentos en los orujos (50% para CF3 y 69% para MB3) en comparación con las formas acetiladas y cumariladas. La Figura 12 presenta el contenido de dos grupos de antocianos: trihidroxilados (delfinidina, petunidina y derivados de malvidina) y dihidroxilados (derivados de cianidina y peonidina). Similar a lo que se ha informado para vinos, la proporción de derivados trihidroxilados fue mayor, pero no se observa una distribución regular entre variedades. Algunos autores hallaron que la proporción de antocianos dihidroxilados en uvas Cabernet Sauvignon es más elevado en los viñedos ubicados en zonas con elevadas altitudes (Li et al., 2011). Por lo tanto, se deberían realizar estudios para evaluar este hecho en las uvas de los viñedos de Mendoza y así, establecer el efecto sobre la composición de los orujos.

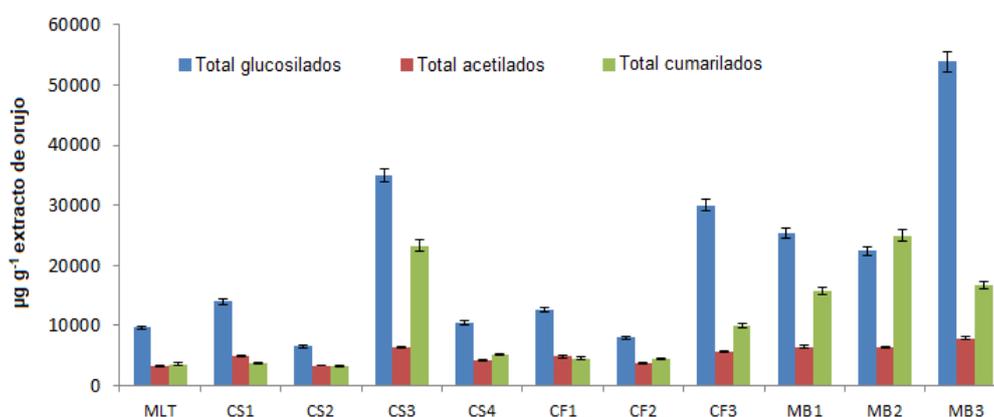


Figura 11: Distribución de los antocianos según el tipo de derivado (glucosilados, acetilados y cumarilados)

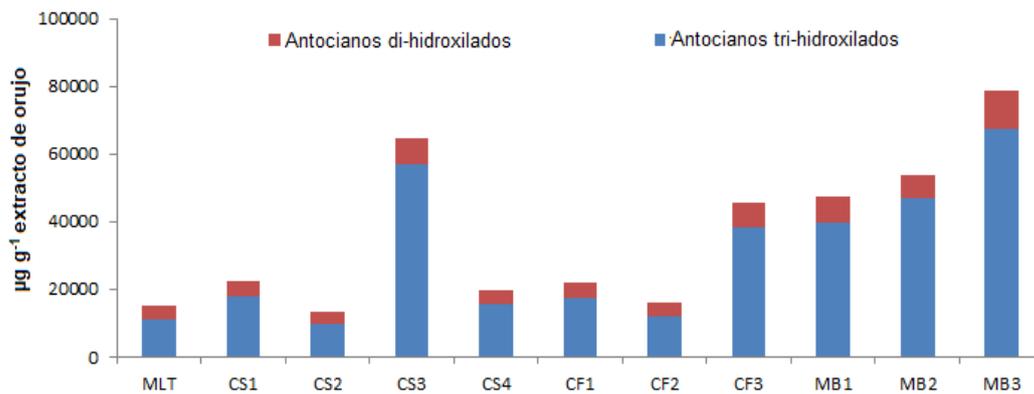


Figura 12: Distribución de los antocianos trihidroxilados y dihidroxilados

En general, las muestras que presentaron mayores contenidos de antocianos y actividades antioxidantes, como son MB1, MB2, MB3 y CS3, también presentaron una elevada proporción de antocianos dihidroxilados, por lo que se realizó un análisis de correlación entre las variables ORAC y contenido de antocianos dihidroxilados (ver ANEXOS). Se obtuvo un valor de “r” de 0,82 por lo que existe una correlación lineal positiva entre ambas variables.

4.3. Análisis de componentes principales (PCA)

Como se mencionó previamente, los orujos estudiados corresponden a diferentes variedades de uvas tintas cultivadas en Mendoza y cada uno de ellos presentó diferentes perfiles y concentraciones de compuestos fenólicos. Se realizó un Análisis de componentes principales (PCA) con el fin de evaluar las variaciones y estudiar la posible relación entre los diferentes tipos de orujos en función de su composición fenólica. Los datos crudos de concentración de antocianos y no antocianos fueron autoescalados para evitar el efecto de variables de diferente tamaño, y fueron elegidos un total de 30 variables (compuestos analizados en cada muestra) como marcadores de las muestras. En relación a los resultados presentados en la Figura 13, más del 90 % de la variabilidad fue descrita por los primeros 3 componentes principales, y PC1 y

PC2 presentaron una variabilidad del 55% y 27%, respectivamente. El PCA muestra las mismas tendencias entre diferentes muestras y niveles de compuestos fenólicos. Las muestras CS2 y CS4 aparecen agrupadas en el PC2, estando correlacionadas mediante las concentraciones de ácido cafeico, (+)-catequina, ácido gálico, quercetina y ácido p-cumárico. La muestra MB2 se halla bien separada del resto y se caracteriza por presentar elevados niveles de malvidina 3-O-p-cumarilglucósido en el PC1, siendo este compuesto el que permite discriminarla del resto de las muestras. Observado este análisis, no se hallaron tendencias para la posible separación de variedades de orujos entre las muestras analizadas en este trabajo. Como se mencionó previamente, la razón de estos resultados puede deberse a los factores involucrados en los procesos de vinificación, así como las características genéticas de las variedades, tipo de conducción del viñedo y factores ambientales, que pueden afectar la composición fenólica final del residuo luego de la vinificación. Asimismo, es importante considerar que sería necesario estudiar un número más grande de muestras de cada variedad con el fin de establecer con certeza la posible discriminación de las variedades.

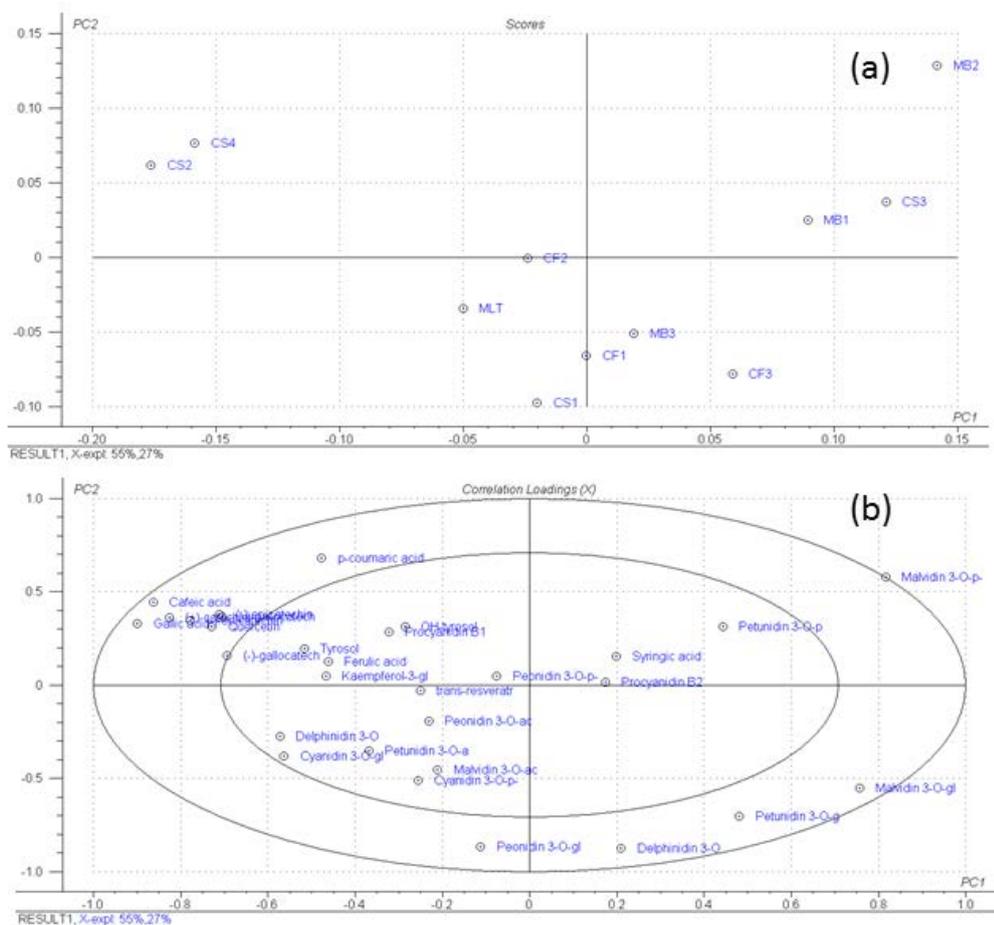


Figura 13: PCA de la composición fenólica de las muestras de orujo: (a) Puntuaciones de PCA de muestras de los extractos de orujo. (b) Cargas de correlación de PCA para los compuestos analizados.

4.4. Elección del orujo de uva según su aplicación

En función de los resultados informados en el presente estudio, se pudo establecer que los orujos de las muestras analizadas de las variedades de uva Malbec, Merlot, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc poseen diferencias en su composición fenólica, presentando perfiles cualitativos y cuantitativos variables, además de diversas capacidades antioxidantes. Estas variaciones, probablemente se deban a diferencias en la disponibilidad de ciertos compuestos relacionadas con el terroir, y/o a los procesos de extracción durante la vinificación. Los resultados obtenidos sugieren que el orujo de la variedad Malbec es el más prometedor debido a sus elevados contenidos

de compuestos fenólicos (antocianos y no antocianos) y de *trans*-resveratrol (328 mg g⁻¹ de extracto de orujo para MB3). Estos resultados se condicen con estudios previos en dicho cultivar. Dichos contenidos de compuestos están bien correlacionados con las actividades antioxidantes y TPC obtenidos en las muestras MB3, MB2, CS4 y CS3 (Figura 10). Por otra parte, se observó una alta correlación entre el contenido total de antocianos y no antocianos individuales, donde las muestras con elevados niveles de estos compuestos también presentaron mayores propiedades antioxidantes (Figura 10).

Malbec es la principal variedad de uva producida en Argentina, representando el 31% del área cultivada de uvas tintas, siendo la variedad que genera mayor volumen de residuos. En este sentido, la implementación de estrategias sostenibles para desactivar dichos residuos es útil tanto desde el punto de vista enológico como ambiental. El estudio de los perfiles y las propiedades de las muestras permiten incrementar el valor de un posible producto comercial y seleccionar la variedad de orujo más conveniente para la industria. En el caso de la aplicación de estos residuos en la industria alimentaria, debe tenerse en cuenta la posible presencia de contaminantes, como micotoxinas y/o residuos de plaguicidas, por lo que es necesario realizar controles adicionales (Solfrizzo et al., 2015).

5

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

En la presente tesis de grado, se logró la extracción y caracterización de los compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva de diferentes variedades tintas.

Se identificaron un total de 30 compuestos fenólicos, de los cuales 17 fueron antocianos y 13 no antocianos mediante HPLC-DAD. La caracterización también incluyó la determinación de la actividad antioxidante, TPC y antocianos totales mediante diferentes métodos espectrofotométricos. Se encontraron correlaciones entre los parámetros evaluados que permiten justificar las propiedades antioxidantes de los extractos en base a su contenido fenólico. Asimismo, se establecieron la composición y las bases químicas de los mismos de una manera integral.

Malbec fue la variedad que presentó los niveles más elevados de los compuestos estudiados. En este sentido, aparece como el cultivar más prometedor debido a sus elevados contenidos de *trans*-resveratrol (328 mg g^{-1} de extracto de orujo para MB3) y compuestos fenólicos no antocianos. También fue la variedad que mayores niveles de antocianos reportó, característica que podría aplicarse en la industria alimentaria para su utilización como colorante natural. Además, estas muestras ricas en compuestos fenólicos también reportaron los mayores niveles de capacidad antioxidante. El OH-tirosol no ha sido reportado en otras variedades de uva cultivadas en todo el mundo; asimismo fue hallado en varias muestras analizadas generando nuevos datos relacionados con dicho compuesto cuya importancia está dada por sus propiedades antioxidantes. Además, se encontró una elevada concentración de ácido siríngico que también presenta propiedades bioactivas, compuesto para el cual se hipotetizaron posibles orígenes en las muestras estudiadas.

Los resultados presentados proporcionan información para la utilización de los subproductos, comúnmente desechados, como una fuente de bajo costo de

compuestos bioactivos con aplicación inmediata para obtener valor agregado, no solo en la industria vitivinícola sino también en otras industrias relacionadas. Además, la información presentada y discutida será de ayuda para comprender los posibles efectos sinérgicos entre compuestos fenólicos cuando los extractos sean aplicados a diferentes sistemas experimentales.

Habiendo desarrollado las bases científicas que justifican la utilización del orujo, en el futuro abordaremos la aplicación de los extractos o inclusive los subproductos crudos en diferentes alimentos con el objetivo de estudiar el comportamiento y los beneficios que pueden aportarles durante la elaboración de alimentos o ingredientes funcionales.

6. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Amendola, D.; De Faveri, D.M.; Spigno, G. 2010. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*. 97: 384–392.
- Anastasiadi, M.; Chorianopoulos, N. G.; Nychas, G. J. E.; Karoutounian, S. A. 2009. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal Agric Food Chem*. 57: 457–463.
- Antoniolli, A.; Fontana, A.R.; Piccoli, P.; Bottini, R. 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*. 178: 172-178.
- Bañón, S.; Díaz, P.; Rodríguez, M.; Garrido, M. D.; Price, A. 2007. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Sci*. 77: 626–633.
- Barcia, M. T.; Pertuzatti, P. B.; Rodrigues, D.; Gómez-Alonso, S.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Godoy, H. T. 2014. Occurrence of low molecular weight phenolics in *Vitis vinifera* red grape cultivars and their winemaking by-products from São Paulo (Brazil). *Food Research International*. 62: 500-513.
- Baydar, N. G.; Özkan, G.; Sağdıç, O. 2014. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 15: 335–339.
- Boussenna, A.; Cholet, J.; Goncalves-Mendes, N.; Joubert-Zakeyh, J.; Fraisse, D.; Vasson, M.; Texiera, O.; Felginesa, C. 2015. Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. *Sci. Food Agric*. 96: 1260–1268.
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. 2004. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal Agric. Food Chem*. 52: 48–54.
- De la Cerda-Carrasco, A.; López-Solís, R.; Nuñez-Kalasic, H.; Peña-Neiraa, A.; Obreque-Sliera, E. 2014. Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal Sci Food Agric*.. 95:1521-7.
- Cádiz-Gurrea, M.L.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Fernández-Arroyo, S.; Segura-Carretero, A. 2017. Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 376.
- Campos, A. M.; Lopez-Alarcón, C.; Lissi, E. 2013. Evaluation of the total amount of phenol groups in complex mixtures by folin's and orac-fluorescein methodologies. *J. Chil. Chem. Soc*. 58: 2144–2147.
- Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Gómez-Cordovés, C.; Peña-Neira, A. 2012. Phenolic characterisation of red wines from different grape

- varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92: 704-718.
- Fernández-Mar, M. I.; Mateos, R.; García-Parrilla, M. C.; Puertas, B.; Cantos-Villar, E. 2012. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chem.*130: 797–813.
- Ferreira, A. S., Nunes, C., Castro, A., Ferreira, P., Coimbra, M. A. 2014. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*. 113: 490-499.
- Fontana, A.R.; Antonioli, A.; Bottini R. 2013. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 8987–9003.
- Fontana, A.R.; Bottini, R. 2014. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. *Journal of Chromatography A*. 1342: 44-53.
- Fontana, A.; Antonioli, A.; Bottini, R. 2016. Development of a high-performance liquid chromatography method based on a core–shell column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape pomaces. *Food Chemistry* 192: 1-8.
- Fontana, A.R.; Antonioli, A.; Bottini, R.; D’Amario Fernández, M.A. 2017. Phenolics profiling of pomace extracts from different grape varieties cultivated in Argentina. *The Royal Society of Chemistry*. 7: 29446–29457.
- Galanakis, C. M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Technol.* 26: 68–87.
- Garrido, M. D.; Auqui, M.; Martí, N.; Linares, M. B. 2011. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology*. 44: 2238-2243.
- Garzón, G. A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colombia*. 13: 27-36.
- Ham, J. R.; Lee, H.I.; Choi, R.Y.; Sim, M.O.; Seo, K.I.; Lee, M.K. 2016. Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. *Food Funct.* 7: 689–697.
- Han, J.; Britten, M.; St-Gelais, D.; Champagne, C. P.; Fustier, P.; Salmieri, S.; Lacroix, M. 2011. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chem.* 124: 1589–1594.
- Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C.; Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 121: 691-696.

- Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.; Sun, S.; Canning, C.; Zhou, K. 2010. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr. Metab.* 7: 1–9.
- Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P.; Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21: 589–598.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry.* 126: 1821-1835.
- INV, Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2017. Registro de viñedos y superficie en el año 2017. Disponible en: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2017/INFORME_ANUAL_SUPERFICIE_2017.pdf (Fecha de consulta: 3/05/2018).
- INV, Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2016. Registro de elaboración de vino y otros productos en el año 2016. Disponible en: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/Cosecha/2016/8-ELABORACION-DE-VINOS-Y-OTROS-PRODUCTOS-2016.pdf (Fecha de consulta: 3/05/2018).
- Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Kobayashi, M.; Tamesada M.; Yagi, K. 2009. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1215–1219.
- Jackson, R. 2014. *Wine Science: Principles and Applications*, Academic Press, Cambridge, 4th edn.
- Jayaprakasha, G. K.; Selvi, T.; Sakariah, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International.* 36:117–122.
- Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. 2004. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 4360–4367.
- Kampa, M.; Alexaki, V.I.; Notas, G.; Nifli, A.P.; Nistikaki, A.; Hatzoglou, A.; Bakogeorgou, E.; Kouimtoglou, E.; Blekas, G.; Boskou, D.; Gravanis A.; Castanas. E. 2013. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 6: R63 -74
- Kris-Etherton, P. M.; Hecker, K. D.; Bonanome, A.; Coval, S. M.; Binkoski, A. E.; Hilpert, K. F.; Etherton, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine.* 113: 71-88.
- Ky, I.; Lorrain, B.; Kolbas, N.; Crozier, A.; Teissedre, P.L. 2014. Wine by-Products: Phenolic Characterization and Antioxidant Activity Evaluation of Grapes and Grape Pomaces from Six Different French Grape Varieties. *Molecules.* 19: 482-506.

- Lavelli, V.; Kerr, W. L.; García-Lomillo, J.; González-SanJosé, M.L. 2017. Applications of Recovered Bioactive Compounds in Food Products. Handbook of Grape Processing By-Products. 231–253.
- Lingua, M. S.; Fabani, M. P.; Wunderlin, D. A.; Baroni, M. V. 2016. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. Food Chem. 208: 228–238.
- Li, Z.; Pan, Q.; Jin, Z.; Mu, L.; Duan, C. 2011. Comparison on phenolic compounds in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. Food Chem. 125: 77–83.
- Lorrain, B.; Ky, I.; Pechamat, L.; Teissedre, P.-L. 2013. Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines and Extracts. Molecules. 18: 1076-100.
- Maestre, R.; Micol, V.; Funes, L.; Medina, I. 2010. Incorporation and interaction of grape seed extract in membranes and relation with efficacy in muscle foods. Journal Agric. Food Chem. 58: 8365–8374.
- Martins, S.; Mussatto, S. I.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C. N.; Teixeira, J. A. 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. Biotechnology Advances. 29: 365-373.
- Monagas, M.; Hernández-Ledesma, B.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: Antioxidant and chemical characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 319-327.
- Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science. 5: 1-15.
- Panzella, L.; Napolitano, A. 2017. Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications. Antioxidants. 6: 2-24.
- Pazos, M.; Gallardo, J. M.; Torres, J. L.; Medina, I. 2005. Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. Food Chem. 92: 547–557.
- Pazos, M.; Iglesias, J.; Maestre, R.; Medina, I. 2010. Structure-activity relationships of polyphenols to prevent lipid oxidation in pelagic fish muscle. J. Agric. Food Chem. 58: 11067–11074.
- Ribeiro, L. F.; Ribani, R. H.; Francisco, T. M.; Soares, A. A.; Pontarolo, R.; Haminiuk, C. W. I. 2015. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. Journal of Chromatography B, 1007, 72-80.
- Selani, M. M.; Contreras-Castillo, C. J.; Shirahigue, L. D.; Gallo, C. R.; Plata-Oviedo, M.; Montes-Villanueva, N. D. 2011. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. Meat Sci. 88: 397–403.

- Solfrizzo, M.; Piemontese, L.; Gambacorta, L.; Zivoli, R.; Longobardi, F. 2015. Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *Journal Agric. Food Chem.* 13: 3609-3614.
- 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: 200-208.
- Thimothe, J.; Bonsi, I. A.; Padilla-Zakour, O. I.; Koo, H. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal Agric. Food Chem.* 55: 10200–10207.
- Tokmak, M.; Sehitoglu, M. H.; Yuksel, Y.; Guven, M.; Akman, T.; Aras, A. B.; Yaka, U.; Gomleksiz, C.; Albayrak, S. B.; Cosar, M. 2017. The Axon Protective Effects of Syringic Acid on Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Sciatic Nerve Model. *Turkish Neurosurgery.* 27: 124–132.
- Tournour, H. H.; Segundo, M. A.; Magalhaes, L. M.; Barreiros, L.; Queiroz, J.; Cunha, L. 2015. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *M. Ind. Crops Prod.* 74: 397–406.
- Tseng, A.; Zhao, Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem.* 138: 356–365.
- Wang, S.; Amigo-Benavent, M.; Mateos, R.; Bravo, L.; Sarria, B. 2017. Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 68: 188–200.
- Yilmaz, Y.; Toledo, R. T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52: 255–260.

7. ANEXOS

Correlación entre ORAC y TPC FC

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
ORAC	11	0,76	0,73	388091,27	170,39	171,59

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const	-1208,04	598,44	-2561,80	145,72	-2,02	0,0743		
TPC GAE FC	12,81	2,42	7,33	18,29	5,29	0,0005	27,97	1,00

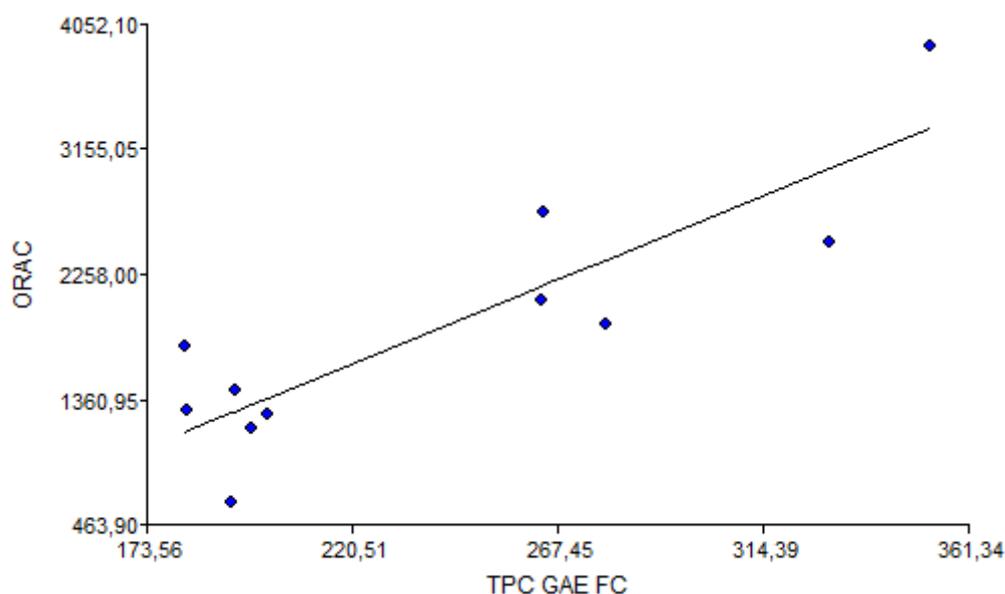
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6190504,53	1	6190504,53	27,97	0,0005
TPC GAE FC	6190504,53	1	6190504,53	27,97	0,0005
Error	1992236,20	9	221359,58		
Total	8182740,73	10			

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	ORAC	TPC GAE FC
ORAC	1,00	5,0E-04
TPC GAE FC	0,87	1,00



Correlación entre ORAC y TPC 280

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
ORAC	11	0,78	0,75	357428,84	169,44	170,64

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

	Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const		-519,60	447,67	-1532,29	493,10	-1,16	0,2756		
TPC GAE 280		11,89	2,13	7,08	16,70	5,59	0,0003	31,29	1,00

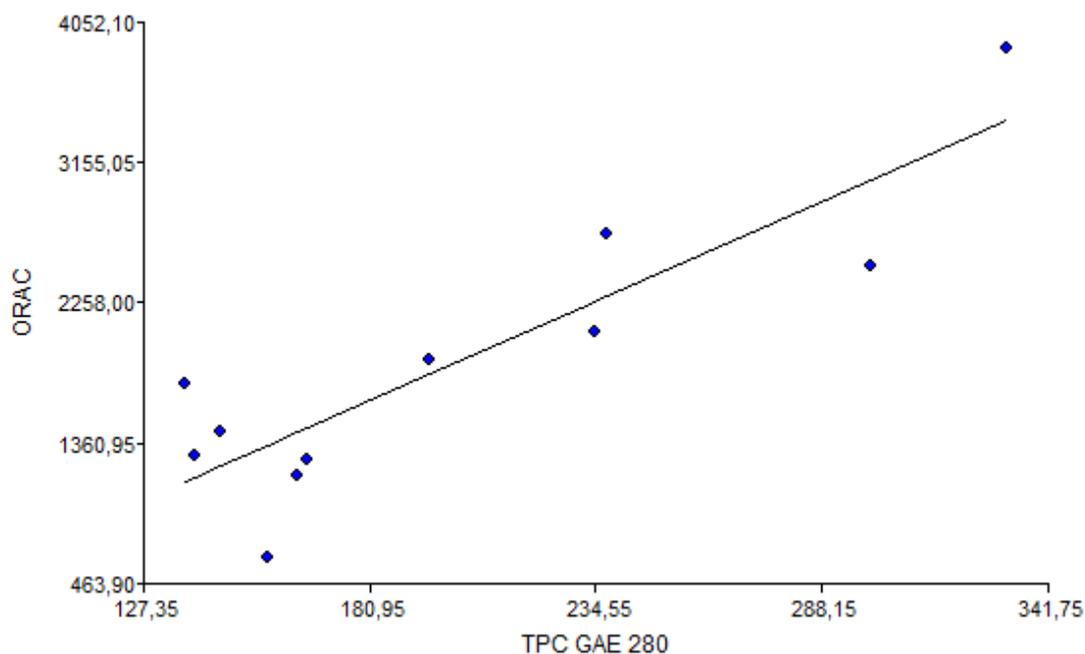
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6354929,46	1	6354929,46	31,29	0,0003
TPC GAE 280	6354929,46	1	6354929,46	31,29	0,0003
Error	1827811,27	9	203090,14		
Total	8182740,73	10			

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	ORAC	TPC GAE 280
ORAC	1,00	3,4E-04
TPC GAE 280	0,88	1,00



Correlación entre ORAC y contenido de antocianos totales

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
ORAC	11	0,54	0,49	622087,90	177,28	178,48

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

	Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const		387,17	490,98	-723,49	1497,84	0,79	0,4506		
Antocianos totales		73,90	22,53	22,93	124,86	3,28	0,0095	10,76	1,00

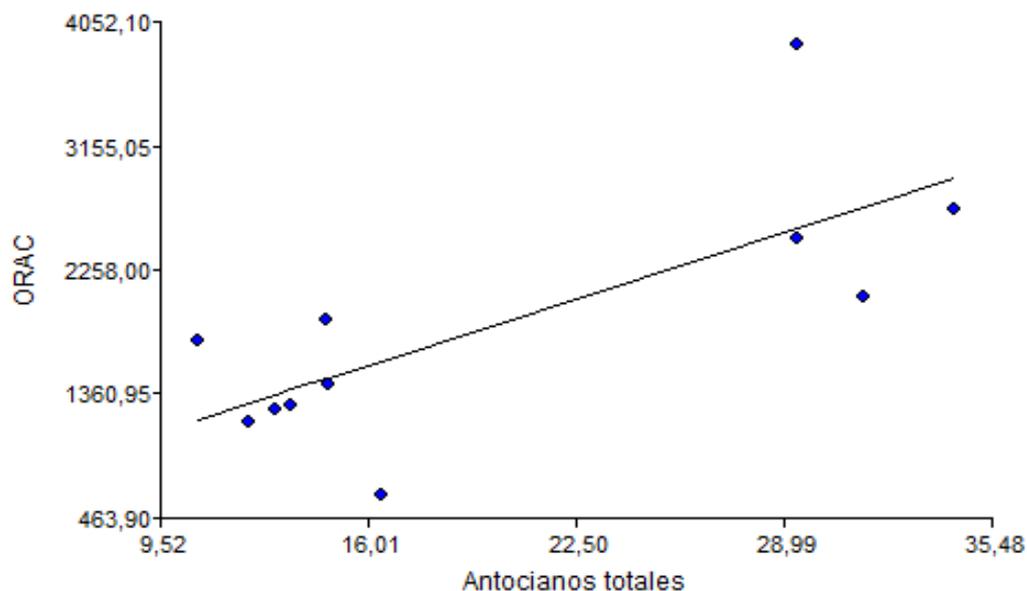
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4455421,91	1	4455421,91	10,76	0,0095
Antocianos totales	4455421,91	1	4455421,91	10,76	0,0095
Error	3727318,82	9	414146,54		
Total	8182740,73	10			

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	ORAC	Antocianos totales
ORAC	1,00	0,01
Antocianos totales	0,74	1,00



Correlación entre ORAC y contenido de antocianos dihidroxilados

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
ORAC	11	0,67	0,63	482166,77	173,69	174,88

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

	Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows	VIF
const		56,04	453,19	-969,14	1081,22	0,12	0,9043		
Antocianos dihidroxilados	0,30	0,07	0,14	0,46	4,29	0,0020		18,39	1,00

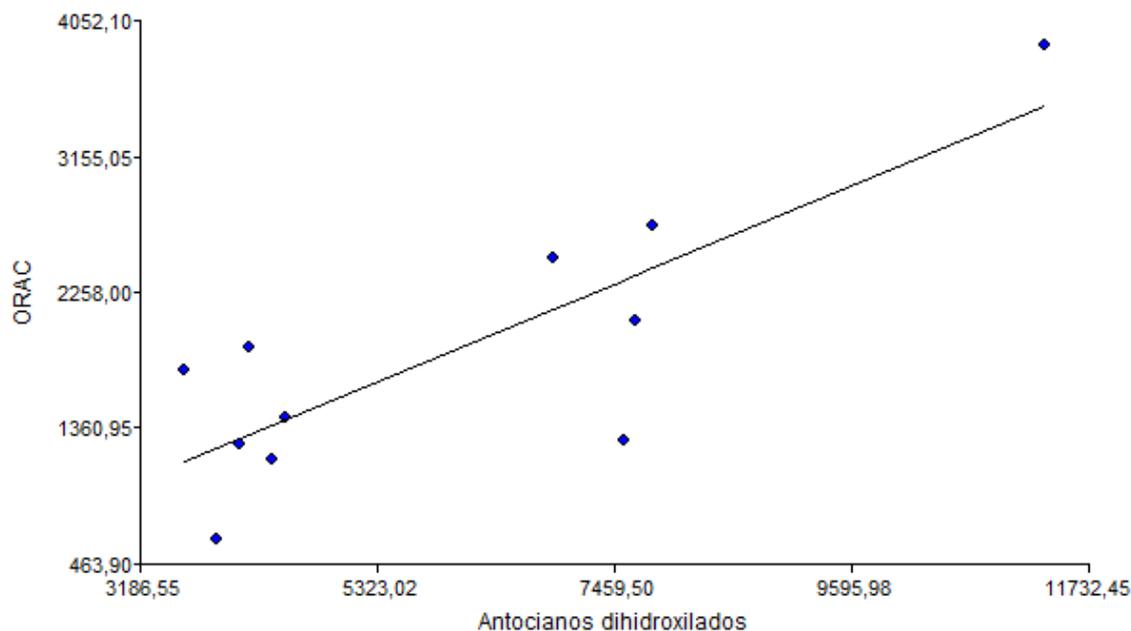
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		5494063,56	1	5494063,56	18,39	0,0020
Antocianos dihidroxilados		5494063,56	1	5494063,56	18,39	0,0020
Error		2688677,17	9	298741,91		
Total		8182740,73	10			

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	ORAC	Antocianos dihidroxilados
ORAC	1,00	2,0E-03
Antocianos dihidroxilados	0,82	1,00



Prueba estadística ANOVA y TUCKEY para la comparación de valores de ORAC de los orujos variedad Malbec de este trabajo con los de Antonioli et al (2015)

1. Resultados InfoStat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ORAC	29	0,83	0,81	12,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15153325,52	3	5051108,51	39,55	<0,0001
MUESTRA	15153325,52	3	5051108,51	39,55	<0,0001
Error	3192903,04	25	127716,12		
Total	18346228,55	28			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=573,42147

Error: 127716,1214 gl: 25

MUESTRA	Medias	n	E.E.	
MB3	3888,80	8	126,35	A
MBAntonioli	2756,03	3	206,33	B
MB2	2487,59	9	119,12	B C
MB1	2069,10	9	119,12	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2. Prueba de hipótesis

1) Planteo de las hipótesis

H_0 : el promedio de los valores de ORAC en los cuatro extractos de orujo de la variedad Malbec es igual, con un 95% de confiabilidad ($\mu_{MB1} = \mu_{MB2} = \mu_{MB3} = \mu_{\text{Malbec antonioli et al.}}$).

H_1 : en al menos un extracto de orujo el promedio de los valores de ORAC es distinto, con un 95% de confiabilidad (al menos una μ es diferente).

2) Nivel de significancia

$\alpha=0.05$

3) Elección de estadígrafo de prueba

$$F = \frac{CMT}{CME} = \frac{SCT/V_T}{SCE/V_E}$$

Donde:

CMT: cuadrado medio de tratamientos

CME: cuadrado medio del error

SCT: variación entre los grupos

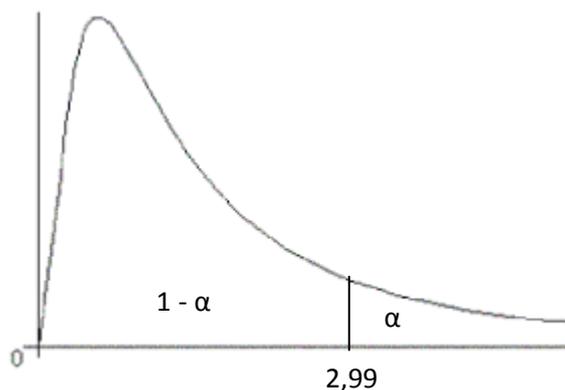
SCE: variación dentro de grupos

V_T : grados de libertad de tratamientos

4) Regla de decisión

Se rechaza H_0 cuando $F_m > F_c$

$$F_c = F_{(0,05; 3; 25)} = 2,99$$



5) Estadígrafo de prueba

$$F_m = 39,55$$

6) Toma de decisión y conclusión

Como $F_m > F_c$ y p valor $< \alpha$, se rechaza la H_0 . Al menos en uno de los extractos de orujo el valor medio de ORAC es diferente, por lo que se realizó la prueba de Tukey. En ella se puede observar que el valor medio de ORAC presentado en el trabajo de Antonioli et al. (2015) es significativamente diferentes de los valores correspondientes a MB1 y MB3, pero no al de MB2.

Prueba estadística ANOVA y TUCKEY para la comparación de valores de TPC FC de los orujos variedad Malbec de este trabajo con los de Antonioli et al (2015)

1. Resultados InfoStat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TPC GAE FC	14	0,93	0,91	8,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	60467,59	3	20155,86	42,57	<0,0001
MUESTRA	60467,59	3	20155,86	42,57	<0,0001
Error	4734,28	10	473,43		
Total	65201,87	13			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=54,35147

Error: 473,4280 gl: 10

MUESTRA	Medias	n	E.E.	
MB3	352,79	2	15,39	A
MB2	329,60	3	12,56	A
MB1	263,10	3	12,56	B
MBAntoniolli	190,84	6	8,88	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

2. Prueba de hipótesis

1) Planteo de las hipótesis

H₀: el promedio de los valores de TPC FC en los cuatro extractos de orujo de la variedad Malbec es igual, con un 95% de confiabilidad ($\mu_{MB1} = \mu_{MB2} = \mu_{MB3} = \mu_{\text{Malbec antonioli et al.}}$).

H₁: en al menos un extracto de orujo el promedio de los valores de TPC FC es distinto, con un 95% de confiabilidad (al menos una μ es diferente).

1) Nivel de significancia

$\alpha=0.05$

2) Elección del estadígrafo de prueba

$$F = \frac{CMT}{CME} = \frac{SCT/V_T}{SCE/V_E}$$

Donde:

CMT: cuadrado medio de tratamientos

CME: cuadrado medio del error

SCT: variación entre los grupos

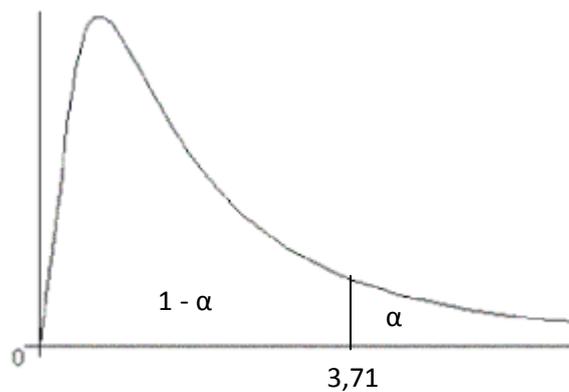
SCE: variación dentro de grupos

V_T : grados de libertad de tratamientos

3) Regla de decisión

Se rechaza H_0 cuando $F_m > F_c$

$$F_c = F_{(0,05; 3; 10)} = 3.71$$



4) Estadígrafo de prueba

$$F_m = 42.57$$

5) Toma de decisión y conclusión

Como $F_m > F_c$ y p valor $< \alpha$, se rechaza la H_0 . Al menos en uno de los extractos de orujo el valor medio de TPC FC es diferente, por lo que se realizó la prueba de Tukey. En ella se puede observar que el valor medio correspondiente al extracto de orujo del trabajo de Antonioli et al. (2015) es significativamente diferente a los valores del resto de los extractos.

Prueba estadística ANOVA y TUCKEY para la comparación de valores de TPC 280 de los orujos variedad Malbec de este trabajo con los de Antonioli et al (2015)

1. Resultados InfoStat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TPC GAE	280	10	0,93	0,89 9,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	46529,51	3	15509,84	26,35	0,0007
MUESTRA	46529,51	3	15509,84	26,35	0,0007
Error	3531,14	6	588,52		
Total	50060,65	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=76,66232

Error: 588,5230 gl: 6

MUESTRA	Medias	n	E.E.	
MB3	331,97	3	14,01	A
MB2	299,75	2	17,15	A B
MB1	234,45	2	17,15	B C
MBAntoniolli	165,70	3	14,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2. Prueba de hipótesis

1) Planteo de las hipótesis

H_0 : el promedio de los valores de TPC 280 en los cuatro extractos de orujo de la variedad Malbec es igual, con un 95% de confiabilidad ($\mu_{MB1} = \mu_{MB2} = \mu_{MB3} = \mu_{\text{Malbec Antonioli et al.}}$).

H_1 : en al menos un extracto de orujo el promedio de los valores de TPC 280 es distinto, con un 95% de confiabilidad (al menos una μ es diferente).

2) Nivel de significancia

$\alpha=0.05$

3) Elección del estadígrafo de prueba

$$F = \frac{CMT}{CME} = \frac{SCT/V_T}{SCE/V_E}$$

Donde:

CMT: cuadrado medio de tratamientos

CME: cuadrado medio del error

SCT: variación entre los grupos

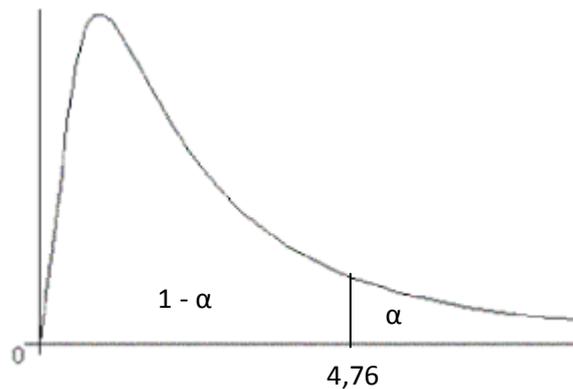
SCE: variación dentro de grupos

V_T : arados de libertad de tratamientos

4) Regla de decisión

Se rechaza H_0 cuando $F_m > F_c$

$$F_c = F_{(0.05; 3; 6)} = 4,76$$



5) Estadígrafo de prueba

$$F_m = 26,35$$

6) Toma de decisión y conclusión

Como $F_m > F_c$ y p valor $< \alpha$, se rechaza la H_0 . Al menos en uno de los extractos de orujo, el valor medio de TPC 280 es diferente, por lo que se realizó la prueba de Tukey. En ella se puede observar que el valor medio de TPC 280 presentado en el trabajo de Antonioli et al. (2015) es significativamente diferentes de los valores correspondientes a MB2 y MB3, pero no al de MB1.