



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería Agrícola -Programa de Magister en Ingeniería Agrícola con mención
en Agroindustrias



USO INTEGRAL DE LA VID EN LA ELABORACIÓN DE JUGO DE UVA ENRIQUECIDO CON ANTIOXIDANTES

Tesis para optar al grado de Magister en Ingeniería Agrícola con
mención en Agroindustrias

Tabita Febe Aguilar Vilaza
CHILLÁN-CHILE
2015

Profesor Guía: Johannes de Bruijn
Dpto. de Agroindustrias, Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Uso integral de la vid en la elaboración de jugo de uva enriquecido con antioxidantes

Aprobada por:

Johannes de Bruijn
Ingeniero en Alimentos, Ph. D.

Profesor Guía

Ignacio Serra Stepke
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

Evaluador Interno

Dietrich von Baer von Lochow
Bioquímico, Ph.D.

Evaluador Externo



María Eugenia González Rodríguez
Ingeniero Agrónomo, Ph.D.

Directora de Programa

Índice de contenido

	Página
Resumen	4
1. Introducción	4
2. Materiales y métodos	5
2.1 Obtención, acondicionamiento y almacenamiento de materias primas	5
2.2 Extracción de antioxidantes	5
2.2.1 Calor	5
2.2.2 Maceración enzimática	6
2.3 Medición de pH	6
2.4 Acidez total	6
2.5 Sólidos solubles	6
2.6 Sulfuroso total	7
2.7 Sulfuroso libre	7
2.8 Color por espectrofotometría	7
2.9 Test de capacidad antioxidante ABTS	7
2.10 Test de capacidad antioxidante ORAC-PGR	8
2.11 Test de capacidad antioxidante ORAC-FL	8
2.12 Test de capacidad antioxidante CUPRAC	8
2.13 Flavonoides totales	8
2.14 Polifenoles totales	9
2.15 Antocianinas monoméricas	9
2.16 Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC	9
2.16.1 Purificación de los compuestos fenólicos en fase sólida	9
2.16.2 Instrumentación	10
2.16.3 Método cromatográfico de antocianinas	10
2.16.4 Método cromatográfico de flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos	10
2.16.5 Método cromatográfico de estilbenoides	10
2.17 Evaluaciones sensoriales	11
2.18 Análisis estadísticos	11
3. Resultados y discusión	11
3.1 Proceso de extracción	11
3.2 Caracterización fisicoquímica de los extractos	14
3.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos	17
3.4 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos	20
3.5 Formulación del producto final	23
3.6 Caracterización del producto final	25
3.7 Capacidad antioxidante del producto final y sus componentes	25
4. Conclusiones	27
5. Agradecimientos	27
6. Nota	27
7. Referencias	27

Índice de tablas

	Página
Tabla 1	6
Tabla 2	13
Tabla 3	13
Tabla 4	15
Tabla 5	19
Tabla 6	21
Tabla 7	24
Tabla 8	25
Tabla 9	26
Anexo I	35
Anexo II	36
Anexo III	37
Anexo IV	38

Índice de figuras

	Página
Figura 1	12
Figura 2	14
Figura 3	22
Figura 4	24

Resumen

Hollejos, semillas, hojas y tallos de la vid, considerados desechos dentro de la industria vitivinícola, son una buena fuente de compuestos fenólicos que pueden ser recuperados para ser incluidos en un jugo de uva, enriquecido de esta manera en antioxidantes. Extractos generados a partir de jugo de uva no enriquecido en antioxidantes y hollejos (proporción 8:1), por medio de calor (60 °C) y agitación continua, lograron una concentración de polifenoles más alta que los jugos generados con hollejos y aplicación de enzimas. Los extractos de hojas alcanzaron concentraciones superiores de compuestos fenólicos que los extractos de hollejos y tallos, con un máximo de 3169 mg L⁻¹ de equivalentes de ácido gálico en la variedad Cabernet Sauvignon, y 93,5 mmol L⁻¹ de antioxidantes en la variedad Lachryma Christi, según ABTS. Los extractos de hollejos demostraron ser ricos en antocianinas y en flavan-3-oles, y los extractos de hojas demostraron poseer concentraciones mayores de flavonoles y ácidos fenólicos, por sobre los otros tipos de extractos, según el análisis por HPLC-MS. El jugo de uva final fue elaborado a partir de las variedades País y Lachryma Christi logrando concentraciones de 19,6 mmol L⁻¹ para ORAC-fluoresceína y 13,7 mmol L⁻¹ para ORAC-rojo de pirogalol. La correlación lineal (r=0,965) entre ORAC-fluoresceína y polifenoles totales demostró que el mecanismo de neutralización de radicales libres por polifenoles se produjo por transferencia de hidrógeno en las muestras analizadas.

1. Introducción

Los polifenoles están presentes en diferentes partes de la planta y juegan un rol de protección contra enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas. Son generados como una respuesta al estrés. Mientras más estrés se genere en la planta, más polifenoles son biosintetizados. Siendo así, cada variedad o cultivar tiene una composición fenólica propia, pero está fuertemente condicionada por factores agronómicos y ambientales, como el ataque de hongos, restricción hídrica, radiación ultravioleta y variación de temperatura (Ferrer-Gallego *et al.*, 2012).

La función protectora de los polifenoles en la planta puede ser extrapolada al ser humano. Se ha demostrado que la ingesta continua de estos compuestos previene el daño producido por especies reactivas del oxígeno (ROS). Un exceso de ROS en el organismo puede potenciar el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como cáncer, desórdenes cardiovasculares, daño neurodegenerativo, Alzheimer e inflamaciones en diferentes órganos (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Los polifenoles y la capacidad antioxidante contenida en un producto han tomado importancia en la elaboración de alimentos saludables como una forma de dar valor agregado a la materia prima utilizada y al producto final.

Se ha comprobado que *Vitis vinífera* es una de las plantas que contiene altos índices de polifenoles en sus diferentes tejidos (Burin *et al.*, 2014; Obreque-Slier *et al.*, 2013), encontrándose una mayor concentración en los hollejos. Todas las variedades con uvas coloreadas de la especie *Vitis vinífera*, con la excepción de unos pocos genotipos tintoreros como es el caso de Garnacha Tintorera (Alicante Bouschet) (Figueiredo-González *et al.*, 2013; Castillo-Muñoz *et al.*, 2009a), acumulan antocianinas en los hollejos pero no en la pulpa. Es por ello que se requiere la maceración del jugo junto con los hollejos de las uvas tintas para extraer sus pigmentos (Barcia *et al.*, 2014; Río *et al.*, 2015). Otros flavonoides relevantes son los flavanoles y en particular las catequinas en sus formas libres o polimerizadas, que confieren un sabor amargo y astringencia (Alcalde-Eon *et al.*, 2014), y por lo tanto contribuyen de manera importante a la percepción de estructura en la boca; estos flavonoides se encuentran tanto en los hollejos como en las semillas. Entre los flavonoides cabe también mencionar a los taninos o polímeros complejos de ácidos fenólicos o protoantocianidinas con efectos organolépticos similares a las catequinas (Perestrelo *et al.*, 2012).

Se ha determinado que las hojas presentan altas concentraciones de flavonoides, identificándose catequina, epicatequina, quercetina y glucósidos como quercitina, miricetina, kaempferol y rutina (Monagas *et al.*, 2006; Abramovic *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013), y se ha podido comprobar que los extractos de hojas son beneficiosos en el tratamiento de la hipertensión, diarrea, hemorragia, inflamaciones, reducir el nivel de glucosa en diabéticos y en el tratamiento de insuficiencia venosa crónica, logrando reducir edemas, eczemas venosos, hiperpigmentación de la piel y úlceras venosas (Orhan *et al.*, 2006; Dani *et al.*, 2010; Rabe *et al.*, 2011). Las hojas recolectadas en otoño, entre la vendimia y el envero, son las que presentan una concentración más alta de polifenoles (Katalinic *et al.*, 2009).

Los extractos de tallos de vid, son menos usuales que los de hojas. En los estudios encontrados, la extracción es realizada con los escobajos desechados del despallado de la uva (Karvela *et al.*, 2009), y no con tallos lignificados. Estos escobajos presentaron altos índices de polifenoles y fueron capaces de actuar contra tumores y cáncer (Apostolou *et al.*, 2013).

El uso de extractos de hojas y tallos de vid a nivel comercial, se ha podido encontrar en la preparación de suplementos alimenticios e infusiones curativas, sin embargo no en la elaboración de jugo de uva. En el presente trabajo se desarrolló un jugo de uva (*Vitis vinifera*) enriquecido en polifenoles extraídos desde los hollejos y semillas de bayas, hojas y tallos de la vid por medio de calor y maceración. Se determinaron las condiciones óptimas del proceso para lograr la mayor concentración de polifenoles extraídos desde los hollejos, semillas, hojas otoñales y tallos lignificados de la vid. Se cuantificaron los polifenoles totales, antocianinas totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en cada variedad de jugo y se identificaron y cuantificaron los principales componentes fenólicos en los jugos mediante HPLC.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención, acondicionamiento y almacenamiento de materias primas

La materia prima fue obtenida de un cultivo convencional de *Vitis vinifera* y consiste en bayas de uva de las variedades tintas: Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, País, y Lachryma Christi (Tintorera), y la variedad blanca Moscatel de Alejandría, provenientes de la cosecha 2013 de Sociedad Viña Zamora Ltda., ubicada en la localidad de San Nicolás, Región del Biobío de Chile. La uva fue cosechada según criterios internos de la viña. Los jugos fueron procesados en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agrícola, y obtenidos a través del pulpado (Bertuzzi, PAS.0540, Brugherio – Milano, Italia), inmediato prensado (Willmes, D.64625, Bensheim, Alemania), y posterior almacenado en una cámara a -22 °C. Paralelamente, los hollejos y semillas derivadas del prensado se almacenaron también a -22 °C, y así mismo, las hojas otoñales y tallos de cada variedad de vid.

2.2 Extracción de antioxidantes

Se evaluaron dos métodos de extracción: a través de la aplicación de calor en el tiempo y por maceración enzimática.

2.2.1 Calor

Se mezclaron hollejos, hojas o tallos por separado (previamente triturados a 1-2 mm), en jugo de uva en una proporción de 1:8 en un vaso de vidrio Schott Duran de doble manto con agitación magnética (agitador magnético Barnstead Thermolyne, Super Nuova) a 500 rpm y a temperaturas de 20 y 60 °C (baño termostático Haake K15, DC 10) durante 24 horas. El sistema fue sellado con Parafilm para evitar la evaporación de agua. Se realizó un muestreo (1 mL) en triplicado a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas, con la correspondiente determinación del índice de polifenoles totales. Se determinó el

tiempo necesario para lograr el equilibrio químico de los polifenoles entre la fase sólida (refinado) y líquida (extracto) y la temperatura que otorgó una mejor extracción. Se utilizaron las variedades País y Lachryma Christi, y el resultado fue extrapolado a las variedades restantes.

2.2.2 Maceración enzimática

Se utilizaron tres enzimas pectinolíticas (Laffort): Lafase Fruit (LF), Lafase HE Grand Cru (GC) y Optizym Extracción (OE) y se determinó cuál de ellas generó una mejor extracción de polifenoles. El proceso se realizó por 60 minutos con un agitador magnético (Barnstead Thermolyne, Super Nuova) a 500 rpm, para las variedades País y Lachryma Christi, aplicando la misma razón de 1:8 entre hollejos y jugo fijada en la etapa previa. Se contó además con un testigo o blanco sin enzima y una muestra de jugo sin hollejos. Se utilizaron 5 g hL⁻¹ de enzima y temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60°C. El control del proceso se realizó por medio del análisis de polifenoles. Se definió la enzima que otorgó un mejor resultado de maceración enzimática en función de la temperatura.

La maceración enzimática para ambos jugos fue además optimizada respecto a las variables concentración de enzima y tiempo de maceración (Tabla 1) mediante análisis de superficie de respuesta utilizando un diseño experimental de composición central giratoria (Sun *et al.*, 2006) y para la enzima elegida en la etapa anterior, determinando la concentración de polifenoles en triplicado.

Tabla 1: Diseño experimental de composición central giratoria.

Variable	Símbolos		Niveles				
	Código	Parámetro ^{*)}	-1,414	-1	0	1	1,414
Concentración de enzima (g hL ⁻¹)	X ₁	x ₁	1,5	2,5	5,0	7,5	8,5
Tiempo (min)	X ₂	x ₂	32,0	40,0	60,0	80,0	88,3

*) X₁ = (x₁ - 5)/2,5 y X₂ = (x₂ - 60)/20

2.3 Medición de pH

El método utilizado fue el descrito por Bordeu y Scarpa (2000), donde se calibró el pH-metro (OAKTON, pH 510 series, EU Tech Instruments, Singapore) utilizando soluciones tampón de pH 6,88 y pH 3,57. Luego se tomaron 30 mL de muestra a 20 °C para efectuar la lectura del pH de forma directa. Cada muestra se analizó en triplicado.

2.4 Acidez total

El análisis se encuentra basado en la metodología descrita por Bordeu y Scarpa (2000), donde se titularon 20 mL de muestra desgasificada a 20 °C, con NaOH 0,1 N hasta pH= 7. Se analizó cada muestra en triplicado. Los resultados se expresaron como g L⁻¹ de ácido tartárico, como se indica en dicho texto para mostos.

2.5 Sólidos solubles

La medición se realizó en triplicado por medio de un refractómetro manual (ATAGO N-1e, Atago Co., Japón), en el cual se depositó una gota de muestra de jugo a 20 °C y se observó el resultado. Los resultados se expresaron en °Brix (Bordeu y Scarpa, 2000).

2.6 Sulfuroso total

El método utilizado corresponde al método oficial en Chile, descrito por Bordeu y Scarpa (2000), donde a un matraz Erlenmeyer de 300 mL se le añadieron 10 mL de jugo y 10 mL de NaOH 1N. Se agitó, se tapó el matraz y se dejó en reposo por 10 minutos. Luego se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico previamente preparado con 100 mL de H₂SO₄ al 98% p/p y 200 mL de agua destilada, 1 mL de almidón al 1% p/v y 0,5 gramos de NaHCO₃. Finalmente se tituló con yodo 0,02 N hasta viraje azul, realizando cada determinación en triplicado. Se expresó el resultado en mg L⁻¹ de SO₂.

2.7 Sulfuroso libre

La metodología utilizada corresponde al método oficial en Chile (Bordeu y Scarpa, 2000), donde a un matraz Erlenmeyer de 250 mL se le añadieron 10 mL de jugo, 1 mL de ácido sulfúrico previamente preparado con 100 mL de H₂SO₄ 98% p/p y 200 mL de agua destilada, más 1 mL de almidón al 1% p/v y 0,5 gramos de NaHCO₃. Se tituló con yodo 0,02 N hasta obtener una coloración azul-morado, persistente por 30 segundos. Cada análisis se realizó en triplicado. El SO₂ libre se expresó en mg L⁻¹.

2.8 Color por espectrofotometría

Se centrifugaron las muestras para luego medir su absorbancia (A) a 420 nm, 520 nm y 620 nm (SPECORD 200 PLUS, Analytik Jena) en una cubeta de 1 mm, utilizando agua destilada como referencia. Cada muestra se analizó en triplicado. El resultado se expresó como índice de color IC, con la fórmula:

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Además, se calculó la tonalidad T, que representa la proporción de color amarillo en relación al color rojo que es el nivel de evolución del color hacia el naranja. La tonalidad se determinó por la ecuación:

$$T = A_{420} / A_{520}$$

2.9 Test de capacidad antioxidante ABTS

La capacidad antioxidante de las muestras se interpreta como la absorbancia correspondiente a la disminución del color de la muestra al reaccionar directamente con el radical ABTS (Rebolo, 2007). Para ello se preparó una solución de ABTS puro, tomando 193 mg de ABTS que fueron disueltos en 250 mL de etanol, llegando a una concentración de 7 mM. En forma paralela, se preparó una solución de persulfato de potasio 2,4 mM. A continuación se mezclaron 10 mL de ABTS y 20 mL de persulfato de potasio, para formar el radical ABTS y se dejó reposar durante 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente para producir la reacción completa. Tras obtener el ABTS activado, se diluyó con etanol al 96% hasta obtener una absorbancia de 0,70 (±0,02), a una longitud de onda de 734 nm (SPECORD 200 PLUS, Analytik Jena).

Se preparó una disolución 6,4 mM de Trolox en etanol p.a. Paralelamente, se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 2000 rpm. El Trolox de 6,4 mM se diluyó en etanol (1:10) para poder efectuar las mediciones. Posteriormente, se mezclaron 2 mL de ABTS activado con 20 µL de Trolox y se procedió a medir su absorbancia al inicio y al cabo de 6 minutos. Se repitió la misma operación, pero esta vez mezclando 2 mL de ABTS activado con 20 µL de muestra. Se obtuvo la actividad antioxidante total (ATT), mediante la fórmula:

$$ATT = (6 \text{ mM Trolox})(\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ muestra})((\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ Trolox})^{-1})$$

Donde A₂ - A₁ = ΔA del blanco, de la muestra o del Trolox 6,0 mM.

A1: Absorbancia a 734 nm al inicio de la reacción.
A2: Absorbancia a 734 nm después de seis minutos de la reacción.
El resultado se expresó en equivalentes de Trolox (mmol ET L^{-1}).

2.10 Test de capacidad antioxidante ORAC-PGR

Según estudios realizados, el uso de rojo de pirogalol (PGR) en concentraciones relativamente altas presenta dos ventajas con respecto a las metodologías ORAC clásicas. La primera es que los resultados se correlacionan mejor con la reactividad de los compuestos analizados, y la segunda es que es posible usar un espectrofotómetro de espectro visible para la determinación, en vez de un espectrofluorímetro, el cual habitualmente es menos frecuente encontrar en un laboratorio de análisis de alimentos (López-Alarcón and Lissi, 2006). El análisis se realizó por separado para las dos variedades a utilizar como producto final y para la mezcla de ambas (producto final). Se utilizó una microplaca de 300 μL de 96 pocillos a la cual se le incorporó 25 μL de rojo de pirogalol 50 μM , 175 μL de tampón fosfato 75 mM, pH 7,4 y 25 μL de muestra. Al mismo tiempo, se elaboró una curva de calibración utilizando Trolox en vez de la muestra. Las muestras y la curva de calibración fueron incubadas a 37 °C por 30 minutos. Finalmente la reacción se activó agregando 25 μL de AAPH a cada muestra de jugo y de Trolox. El consumo de PGR se evaluó a partir de su absorbancia a 540 nm y los resultados se obtuvieron a través del área bajo la curva. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

2.11 Test de capacidad antioxidante ORAC-FL

La actividad antioxidante ORAC-FL (fluoresceína) fue realizada para las dos variedades que componen el producto final por separado y la mezcla de ambas (producto final). La metodología empleada corresponde al procedimiento interno del Laboratorio de Análisis de Antioxidantes (MME-Pro-002), el cual se basa en el método descrito por Wu *et al.* (2004). Se realizó a través del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Santiago, Chile, con la finalidad de validar el producto final.

2.12 Test de capacidad antioxidante CUPRAC

La metodología CUPRAC fue realizada en una microplaca de 96 pocillos. Para ello, 50 μL de cada solución se colocaron en cada pocillo en el siguiente orden: solución de cobre (II) (10 mM), solución de neocuproína (7,5 mM) y solución tampón (1000 mM, pH 7). La microplaca fue pre-incubada a 37 °C durante 15 minutos, para luego añadir 100 μL de solución antioxidante o muestra. El valor de absorbancia a 450 nm se obtuvo luego de 30 minutos de incubación bajo las mismas condiciones. Para evaluar la absorción intrínseca de las moléculas antioxidantes o muestras, se añadieron 100 μL de agua en lugar de la solución de cobre. Se evaluó un blanco mediante la sustitución de la solución antioxidante o de la muestra por 100 μL de agua destilada. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Ribeiro *et al.*, 2011).

2.13 Flavonoides totales

Se tomaron 0,5 mL de muestra y se introdujeron en un matraz de 10 mL. Luego se añadieron 0,3 mL de NaNO_2 5% p/v al matraz, después de 5 minutos 0,6 mL de AlCl_3 10% p/v, después de 6 minutos más se agregaron 2 mL de NaOH 1M para luego aforar con agua destilada. A continuación se determinó la absorbancia de la muestra a 510 nm (SPECORD 200 PLUS, Analytik Jena) contra el blanco (agua). Se generó una curva patrón utilizando un estándar de catequina en concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mg/L. El resultado se obtuvo a través de la curva de calibración y se expresó en mg/L de equivalentes de catequina (Zhishen *et al.*, 1999).

2.14 Polifenoles totales

Se introdujeron 0,5 mL de muestra, en un matraz aforado de 50 mL. Se agregaron 25 mL de agua destilada, 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 10 mL de solución de carbonato de sodio anhidro al 20%, para finalmente aforar con agua destilada, agitar para homogeneizar la mezcla y dejarla 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia de las muestras versus el blanco, preparado con agua destilada en lugar de la muestra a una longitud de onda de 750 nm (SPECORD 200 PLUS, Analytik Jena). Se repitió el ensayo con estándares de ácido gálico de concentraciones 0, 100, 150, 200, 300, 400, 500 y 600 mg/L y se generó una curva patrón donde los resultados se expresaron en mg/L de ácido gálico (Singleton *et al.*, 1999).

2.15 Antocianinas monoméricas

Para su determinación se preparó una solución tampón de cloruro de potasio, pH 1,0 y 0,025 M, y una solución tampón de acetato de sodio, pH 4,5 y concentración de 0,4 M. Luego se introdujo una alícuota de 0,1 mL de muestra en un matraz de 10 mL. Se aforó hasta 10 mL con la solución tampón de cloruro de potasio, pH 1,0 de 0,025 M y se midió la absorbancia de la solución anterior a 510 nm y 700 nm (SPECORD 200 PLUS, Analytik Jena). A continuación, se introdujo una alícuota de 0,1 mL de muestra en un matraz de 10 mL, se aforó hasta 10 mL con una solución tampón de acetato de sodio, pH 4,5 de 0,4 M y se midió la absorbancia de la solución anterior a 510 nm y 700 nm mediante espectrofotómetro (Lee *et al.*, 2005). Los resultados se expresaron en mg/L y se calcularon como malvidina-3-glucósido (mv-3-gl) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianinos} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \cdot (MW \cdot DF \cdot 10^3) \cdot (\epsilon \cdot l)^{-1}$$

Donde $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$

MW = peso molecular = 493,2 g mol⁻¹ para mv-3-gl.

DF = Factor de dilución.

l = Espesor de la cubeta en cm.

ϵ = 28000 coeficiente de extinción molar L mol⁻¹ cm⁻¹ para mv-3-glu.

10³ = Factor de conversión de g a mg.

2.16 Análisis de compuestos fenólicos específicos mediante HPLC

2.16.1 Purificación de los compuestos fenólicos en fase sólida

La etapa de purificación se realizó utilizando el método SPE modificado (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007) el cual fue adaptado para la eliminación de las antocianinas desde el extracto líquido. Se llevó a cabo usando cartuchos de 500 mg Oasis MCX (Waters Corp, Milford, Massachusetts, USA). Cinco mL de la muestra se diluyeron con 5 mL de ácido clorhídrico 0,1 N. Esta solución se cargó en un cartucho MCX previamente acondicionado con 5,0 mL de metanol y 5,0 mL de agua destilada. Se realizó además una etapa de aclarado usando 5,0 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y 5,0 mL de agua destilada. La fracción de interés se eluyó tres veces con 5,0 mL de metanol. Esta fracción contenía polifenoles neutros o ácidos (flavonoles, flavan-3-oles y derivados del ácido hidroxicinámico). Finalmente, el disolvente de esta fracción se evaporó y el concentrado se volvió a disolver en 5 mL de la fase móvil (Ruiz *et al.*, 2013).

2.16.2 Instrumentación

Los análisis cromatográficos de flavonoles y ácidos fenólicos en las muestras de jugo de uva se llevaron a cabo con un sistema Shimadzu HPLC Nexera (Kyoto, Japón), equipado con una bomba LC-

30AD cuaternaria, una unidad desgasificadora DGU-20A5R, horno de columna CTO-20AC, un automuestreador SIL -30AC, un sistema controlador CBM-20A y un detector de fotodiodos UV-VIS (DAD) SPD-M20A, acoplados en tándem con un detector QTrap LC/MS/MS 3200 Applied Biosystems MDS Sciex (California, EE.UU.). El sistema de control de instrumentos y la recolección de datos se realizó mediante el software CLASS-VP correspondiente al sistema colector de datos y análisis de cromatografía Shimadzu DAD (versión 1.5.2).

2.16.3 Método cromatográfico de antocianinas

El análisis de antocianinas se realizó en una columna C18 YMC 5 μm de 250 x 4,6 mm con un C18 Nova-Pak 22 x 3,9 mm y una precolumna de 4 μm (Waters, Milford, MA) a 30 ° C. El volumen de inyección fue de 50 μL . Las antocianinas fueron analizadas utilizando un gradiente de fase móvil de 0,1% v/v de TFA en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El caudal fue de 0,3 mL min^{-1} , y el programa de gradiente fue de 10% a 20% de disolvente B en 15 minutos, manteniendo este porcentaje durante 6 minutos. El disolvente B fue elevado a 27% en 5 minutos y se mantuvo durante 10 minutos, luego se elevó a 100% en 1 minuto, seguido por 10 minutos de estabilización a 10% de B.

2.16.4 Método cromatográfico para flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos

El análisis de flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos se realizó de acuerdo con el método descrito previamente con algunas modificaciones descritas por Ruiz y colaboradores (2013) con una columna y precolumna de núcleo sólido Kinetex C18 150 x 4,6 mm, 2,6 μm (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) y una fase móvil binaria de ácido fórmico al 0,1% en agua y acetonitrilo a un flujo de velocidad de 0,5 mL min^{-1} con un volumen de inyección de 10 μL . Para el análisis de flavonoles, el gradiente de fase móvil varió de 15% a 25% de acetonitrilo en 14 minutos, de 25% a 35% para 11 minutos, de 35% a 100% durante 1 minuto, de 100% a 15% durante 1 minuto y finalmente un período de estabilización de 10 minutos. La temperatura de la columna se fijó en 40 °C. Para los ácidos fenólicos y flavan-3-oles, el gradiente de acetonitrilo varió de 15% a 25% para 14 minutos, de 25% a 35% para 11 minutos, de 35% a 100% durante 1 minuto, de 100% a 15% durante 1 minuto y finalmente un periodo de estabilización de 10 minutos. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C.

2.16.5 Método cromatográfico para estilbenoides

La presencia de estilbenoides se analizó por HPLC (Gorena *et al.*, 2014) en una columna C18 Kromasil 5 μm , 250 x 4,6 mm (AKZO Nobel, Bohus, Suecia), con una precolumna C18 Nova-Pak Aguas, 22 x 3,9 mm, 4 μm (Milford, MA) a 30 °C. El volumen de inyección fue de 25 μL . Los estilbenoides se analizaron usando una fase móvil con un gradiente de 0,1% v/v de ácido fórmico en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El caudal fue de 0,5 mL min^{-1} , y el programa de gradiente fue del 15% a 20% de disolvente B en 5 minutos, de 20 a 44,5% en 45 minutos y el 44,5% a 100% en 1 minuto con un mantenimiento a 100% durante 9 minutos, seguido por 5 minutos de estabilización a 15% de B.

Para la asignación de identidad las condiciones MS/MS fueron modo negativo de ionización para flavonoles, flavan-3-oles, ácidos fenólicos y estilbenoides, y modo de ionización positivo para antocianinas, 5 V de energía de colisión, 4000 V de voltaje de ionización, temperatura del capilar de 450 °C y nebulizador de N_2 a 15 psi. La asignación de identidad de analitos se llevó a cabo por comparación de su tiempo de retención (t_R) con los de sus respectivos estándares disponibles comercialmente y también por comparación de características espectrales (MS/MS y UV). La cuantificación se realizó a través de un cromatograma DAD a 518 nm para antocianinas, a 360 nm para flavonoles y a 320 nm para ácidos fenólicos, 306 nm para estilbenoides y 280 nm para flavan-3-oles.

2.17 Evaluaciones sensoriales

La primera evaluación sensorial determinó el orden de preferencia de los tres extractos (hollejos, hojas y tallos) en las variedades País y Tintorera. Para ello se aplicó una prueba de ordenamiento en cada variedad, independiente de donde el juez determinó la mejor muestra en relación al sabor.

En la segunda evaluación sensorial, a la proporción de mezclado de extractos antes definida se decidió incorporar dos proporciones más para una mejor comprobación del resultado. Se realizó una prueba de preferencia, en la cual se le pidió al juez indicar por cada fila correspondiente a las variedades País (fila 1) y Tintorera (fila 2), cual es la muestra mejor evaluada en relación al sabor.

En la tercera evaluación sensorial la proporción para hollejos, hojas y tallos elegida fue aplicada a todas las variedades analizadas (Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, País, Moscatel de Alejandría y Tintorera) para determinar cuáles de ellas eran las preferidas por los jueces y evaluar si se realizarían mezclas de variedades en el producto final o se utilizarían variedades puras. Se realizó un test de ordenamiento para determinar el grado de preferencia en relación al sabor de las variedades en una escala de seis punto desde “me gusta” a “no me gusta”.

En la cuarta evaluación sensorial fue importante definir en qué proporción se mezclarían ambas variedades a utilizar, por lo que se realizó una prueba donde se analizaron tres mezclas cuyas razones fueron 1:1, 7:3 y 9:1 respectivamente.

2.18 Análisis estadísticos

Los resultados se analizaron a través del test ANOVA y prueba de Tukey para determinar el grado de diferencia existente entre los datos obtenidos, utilizando un nivel de significancia de 0,05. Los resultados de las evaluaciones sensoriales fueron analizados a través de la prueba de Kruskal Wallis. Las correlaciones fueron hechas a través de interpolaciones lineales ($\alpha=0,05$). Para todos ellos se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). La interpretación de los resultados obtenidos del diseño experimental de composición central giratoria fue hecha a través del software Design Expert (version 9.0.5) (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

3. Resultados y discusión

3.1 Proceso de extracción

En el proceso de extracción de polifenoles para distintos tipos de materias primas en función de tiempo y temperatura, se obtuvo como resultado para los hollejos, un proceso de 6 horas a 60 °C (Figura 1-A) logrando concentraciones de 1929 mg L⁻¹ y 3723 mg L⁻¹ de ácido gálico en País y Tintorera respectivamente, para las hojas 8 horas a 60°C (Figura 1-B) con concentraciones de 3825 mg L⁻¹ y 5395 mg L⁻¹ de ácido gálico para País y Tintorera, y en los tallos 4 horas y 60°C (Figura 1-C) logrando concentraciones de 528 mg L⁻¹ y 788 mg L⁻¹ en las mismas variedades, respectivamente. La mayor concentración de polifenoles en el jugo de uva se logra a través de un proceso de extracción a 60°C, utilizando la variedad Tintorera como materia prima.

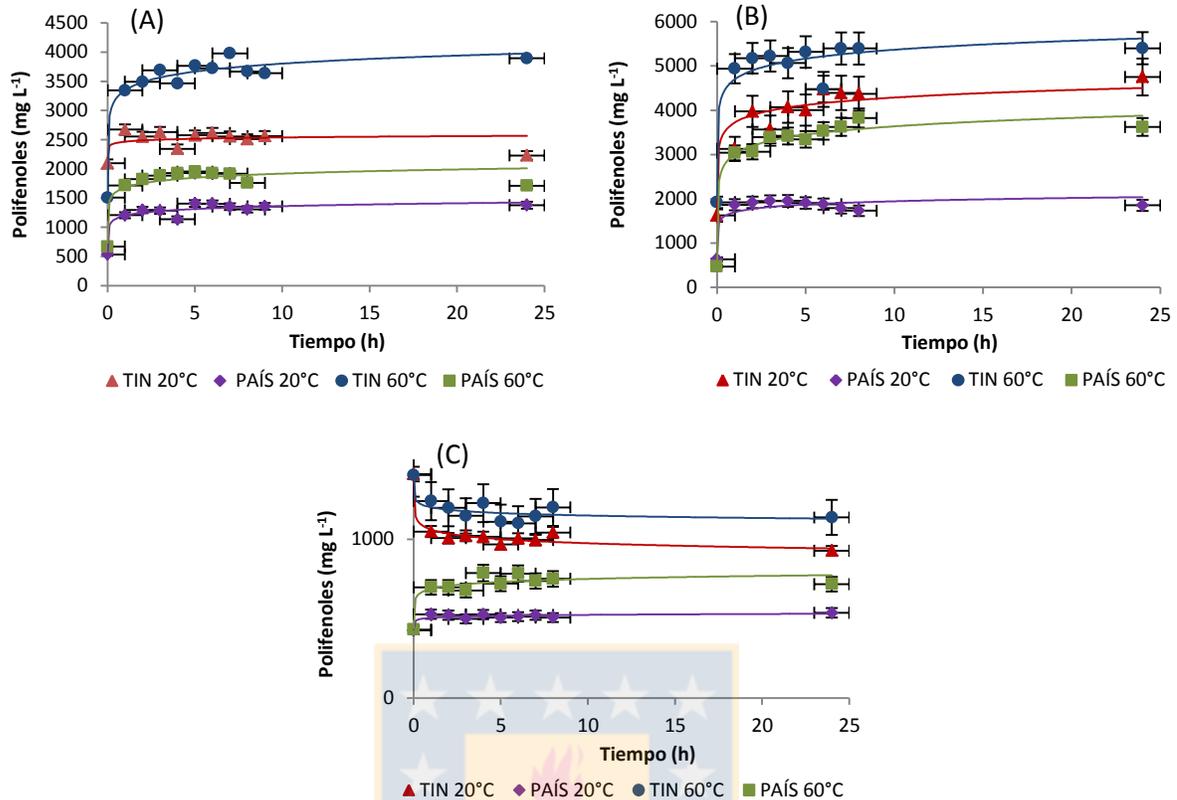


Figura 1: Extracción de polifenoles de los hollejos (A), hojas (B) y tallos (C) a 20 y 60 °C en el tiempo, utilizando uvas País y Tintorera (n=2).

La comparación efectuada entre jugos con hollejos y diferentes tipos de enzimas utilizadas (LF, GC y OE), jugo con hollejos pero sin enzima (s/enzima) y jugo solo (s/hollejos), muestra para Tintorera que la mejor tasa de extracción de polifenoles está dada por la temperatura de 50 °C en el jugo con hollejos y sin enzima con una concentración de 3358 mg L⁻¹ de ácido gálico (Tabla 2). En cambio para País, la mejor extracción es lograda a los 50 °C en presencia de la enzima Optizym Extracción (OE), con una concentración de 1362 mg L⁻¹ de ácido gálico (Tabla 2). La mejor acción de la enzima OE puede deberse a que ésta se enfoca en mejorar el rendimiento del prensado, logrando de esta forma romper más paredes celulares y produciendo así una mayor extracción de compuestos fenólicos. En cambio las enzimas LF y GC están principalmente enfocadas en mejorar el color del producto, por medio de la extracción de antocianinas y taninos unidos a polisacáridos.

Con la finalidad de evaluar otras concentraciones y tiempos de acción de las enzimas, se optó por utilizar la enzima LF que entregó la mayor concentración de polifenoles para las uvas Tintorera a 50 °C, para incrementar la tasa de extracción de polifenoles desde los hollejos a través de un diseño experimental de composición central giratoria.

La Tabla 3 muestra los valores experimentales y los niveles codificados de las dos variables de proceso independientes utilizadas y la concentración de polifenoles (mg L⁻¹) obtenida para cada experimento. El análisis del resultado por medio de la superficie de respuesta (Figura 2) arrojó una extracción máxima de polifenoles a una concentración de 4,0 g hL⁻¹ de enzima (LF) a un tiempo de 40 minutos, obteniendo una concentración de 3729 mg L⁻¹ de ácido gálico. Esto significa un valor similar (Tabla 2) en relación a la aplicación de calor (60 °C) por 6 horas (3723 mg L⁻¹ de ácido gálico) para los hollejos Tintorera (Figura 1-A).

Tabla 2: Extracción de polifenoles en función del tipo de enzima y de la temperatura (n=3).

		Polifenoles totales (mg L ⁻¹)				
		s/hollejos	s/enzima	LF	GC	OE
Tintorera	20 °C	2095,2 ± 17,0 ^{aB}	2661,3 ± 65,1 ^{cB}	2304,7 ± 32,2 ^{bA}	2591,3 ± 45,1 ^{cB}	2661,3 ± 50,3 ^{cA}
	30 °C	1601,5 ± 153,1 ^{aA}	1861,5 ± 308,3 ^{aA}	2074,8 ± 36,1 ^{aA}	2114,8 ± 81,9 ^{aA}	2088,1 ± 245,4 ^{aA}
	40 °C	1728,1 ± 20,8 ^{aA}	2691,5 ± 285,4 ^{bB}	2611,5 ± 195,0 ^{bAB}	2658,1 ± 200,1 ^{bB}	2534,8 ± 137,5 ^{bA}
	50 °C	1818,1 ± 179,0 ^{aAB}	3358,1 ± 176,2 ^{bC}	2884,8 ± 407,3 ^{bB}	2754,8 ± 96,4 ^{bB}	2581,5 ± 589,6 ^{abA}
	60 °C	1584,8 ± 55,7 ^{aA}	2748,1 ± 86,2 ^{bB}	3164,8 ± 81,9 ^{cB}	2934,8 ± 208,8 ^{bcb}	2884,8 ± 243,3 ^{bca}
Pais	20 °C	536,3 ± 16,3 ^{aA}	1102,8 ± 42,4 ^{bA}	1161,1 ± 116,5 ^{bA}	1208,5 ± 20,0 ^{bb}	1246,5 ± 94,0 ^{bc}
	30 °C	585,5 ± 82,6 ^{aAB}	1188,5 ± 172,7 ^{bA}	1091,1 ± 79,1 ^{bA}	974,8 ± 71,4 ^{bA}	935,5 ± 50,8 ^{bA}
	40 °C	738,5 ± 36,7 ^{aB}	1272,8 ± 97,7 ^{bA}	1211,8 ± 20,8 ^{bA}	1296,1 ± 41,2 ^{bb}	1181,5 ± 41,6 ^{bbc}
	50 °C	614,8 ± 26,5 ^{aAB}	1284,8 ± 98,5 ^{bA}	1234,8 ± 127,7 ^{bA}	1171,5 ± 112,4 ^{bb}	1361,5 ± 80,8 ^{bc}
	60 °C	574,8 ± 69,3 ^{aA}	1214,8 ± 175,2 ^{bA}	1278,1 ± 80,8 ^{bA}	1178,1 ± 41,6 ^{bb}	1008,1 ± 113,7 ^{bab}

Letras minúsculas diferentes en la misma fila y letras mayúsculas diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Tabla 3: Valores de polifenoles totales en Tintorera determinados para los puntos individuales del diseño experimental (n=3).

Experimento No.	Nivel para la concentración de enzima	Nivel para el tiempo	Polifenoles totales (mg L ⁻¹)
1	1	1	3118,0
2	1	-1	3091,3
3	-1	1	3634,7
4	-1	-1	3084,7
5	1,4	0	3714,7
6	-1,4	0	4201,3
7	0	1,4	3811,3
8	0	-1,4	4071,3
9	0	0	4131,3
10	0	0	3808,0
11	0	0	4301,3
12	0	0	3094,7
13	0	0	3654,7

Sin embargo, intentando conservar la naturalidad del producto, se optó por no incorporar la adición de enzimas en la formulación final del proceso de extracción.

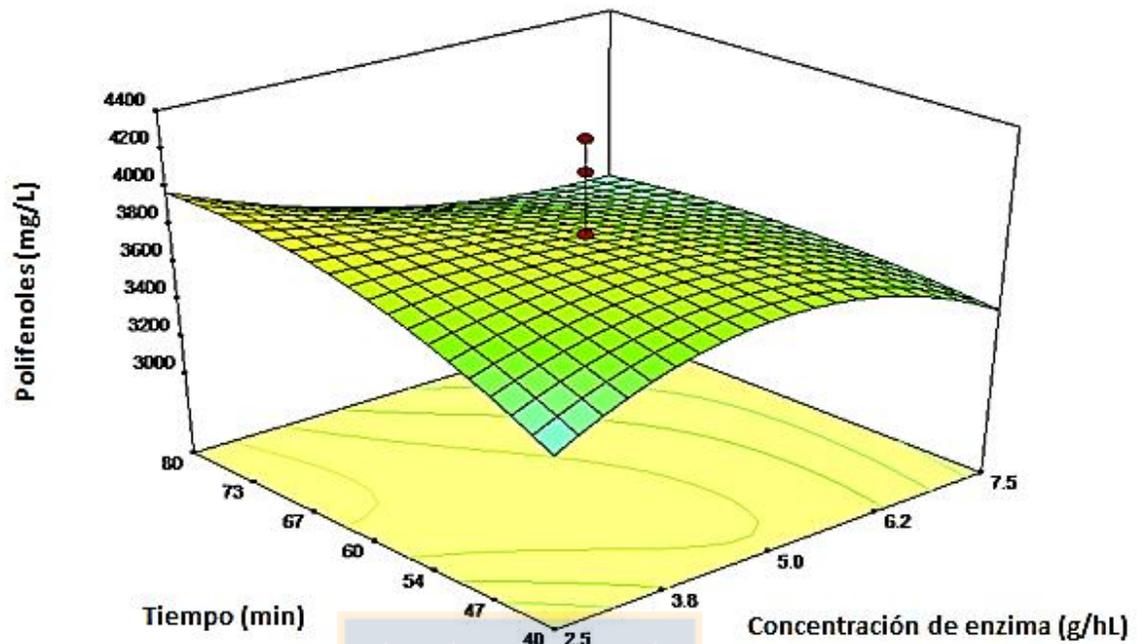


Figura 2: Superficie de respuesta del diseño experimental de composición central giratoria (n=3).

3.2 Caracterización fisicoquímica de los extractos

Los resultados anteriores de tiempo y temperatura de extracción para hollejos (6 horas y 60°C), hojas (8 horas y 60°C) y tallos (4 horas y 60°C) se aplicaron a cada una de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, País, Moscatel de Alejandría y Lachryma Christi para generar los correspondientes extractos. Al ser evaluados demostraron que entre variedades existen diferencias estadísticamente significativas para el contenido de SO_2 total, encontrando valores mínimos de $19,2 \text{ mg L}^{-1}$ en jugo País y máximos de 149 mg L^{-1} en extractos de hollejos de Merlot y Tintorera (Tabla 4). En el caso de SO_2 libre, la concentración más baja fue de $6,4 \text{ mg L}^{-1}$ en el jugo Moscatel de Alejandría y la más alta de 139 mg L^{-1} en el extracto de hollejos País (Tabla 4). El rango máximo de SO_2 libre permitido para jugos de uva es de 10 mg L^{-1} , por lo que solo los jugos sin enriquecer de Cabernet Sauvignon, País y Moscatel de Alejandría están dentro de la norma (CODEX STAN 247-2005). El gran aumento del contenido de SO_2 total y libre en los extractos de hollejos, hojas y tallos puede deberse a que el sulfuroso aplicado externamente a la vid, es absorbido y posteriormente almacenado en las partes mencionadas y no en la pulpa de la uva.

En relación al pH, el valor mínimo fue de 2,72 y el máximo de 4,16 en el jugo de Cabernet Sauvignon y extracto de hollejos País, respectivamente (Tabla 4). Del pH del jugo dependerá la actividad de enzimas vegetales como polifenoloxidasas, pectinasas y proteasas, y el metabolismo de levaduras y bacterias. Éste actúa sobre la extracción de componentes coloreados durante la maceración, e influye sobre la calidad del producto. Un pH elevado indica una pérdida de acidez que a su vez afecta negativamente la estabilidad organoléptica (Aguilar, 2012). El aumento del pH en los extractos de hollejos, hojas y tallos pudo deberse al calor aplicado (60°C), ya que a mayores temperaturas existe una mayor acción de las enzimas y bacterias responsables de la degradación de los ácidos (Galvis *et al.*, 2002) o una mayor extracción de compuestos alcalinos desde hollejos, hojas o tallos. Según Ruhl (1989), existe una correlación significativa y positiva entre el aumento de la concentración de potasio

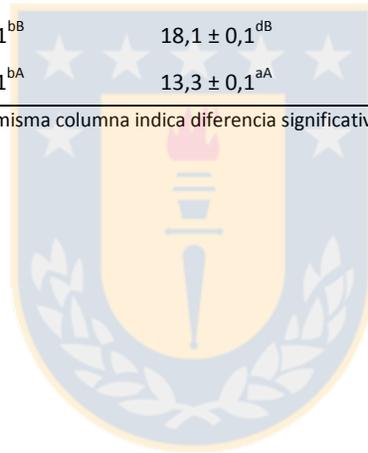
Tabla 4: Caracterización fisicoquímica de los extractos (n=3).

		Cabernet Sauvignon	Merlot	Syrah	País	Moscatel de Alejandría	Tintorera
SO ₂ total [mg L ⁻¹]	Jugo	32,0 ± 12,8 ^{abA}	23,5 ± 3,7 ^{abA}	21,3 ± 1,9 ^{abA}	19,2 ± 0,0 ^{aA}	20,3 ± 3,7 ^{aA}	41,6 ± 12,8 ^{bA}
	Hollejos	106,7 ± 18,5 ^{abB}	149,3 ± 37,0 ^{bbB}	85,3 ± 18,5 ^{abB}	106,7 ± 18,5 ^{abBC}	106,7 ± 18,5 ^{abC}	149,3 ± 18,5 ^{bC}
	Hojas	85,3 ± 18,5 ^{abB}	138,7 ± 18,5 ^{bbB}	106,7 ± 18,5 ^{abB}	138,7 ± 18,5 ^{bc}	85,3 ± 18,5 ^{abC}	128,0 ± 0,0 ^{abC}
	Tallos	74,7 ± 18,5 ^{aAB}	64,0 ± 0,0 ^{aA}	74,7 ± 18,5 ^{abB}	85,3 ± 18,5 ^{abB}	64,0 ± 0,0 ^{abB}	85,3 ± 18,5 ^{abB}
SO ₂ libre [mg L ⁻¹]	Jugo	8,5 ± 1,9 ^{abA}	10,7 ± 1,9 ^{abA}	11,7 ± 1,9 ^{bc}	9,6 ± 0,0 ^{abA}	6,4 ± 0,0 ^{aA}	25,6 ± 3,2 ^{cA}
	Hollejos	53,3 ± 18,5 ^{abB}	64,0 ± 0,0 ^{abB}	96,0 ± 0,0 ^{bA}	138,7 ± 18,5 ^{cC}	64,0 ± 0,0 ^{abB}	74,7 ± 18,5 ^{abBC}
	Hojas	96,0 ± 0,0 ^{bc}	74,7 ± 18,5 ^{abB}	96,0 ± 0,0 ^{bc}	96,0 ± 0,0 ^{cdD}	85,3 ± 18,5 ^{abB}	64,0 ± 0,0 ^{abB}
	Tallos	64,0 ± 0,0 ^{abB}	85,3 ± 18,5 ^{abB}	64,0 ± 0,0 ^{abB}	64,0 ± 0,0 ^{abB}	85,3 ± 18,5 ^{abB}	106,7 ± 18,5 ^{bC}
pH	Jugo	2,7 ± 0,0 ^{aA}	2,8 ± 0,0 ^{ba}	2,7 ± 0,0 ^{aA}	3,2 ± 0,0 ^{dA}	3,2 ± 0,0 ^{aA}	2,9 ± 0,0 ^{cA}
	Hollejos	3,1 ± 0,0 ^{ab}	3,5 ± 0,0 ^{cd}	3,1 ± 0,0 ^{ab}	4,2 ± 0,0 ^{dD}	3,5 ± 0,0 ^{cb}	3,2 ± 0,0 ^{bb}
	Hojas	3,2 ± 0,0 ^{bc}	3,4 ± 0,0 ^{cc}	3,2 ± 0,0 ^{ac}	4,0 ± 0,0 ^{eb}	3,5 ± 0,0 ^{db}	3,3 ± 0,0 ^{bb}
	Tallos	3,2 ± 0,0 ^{bc}	3,3 ± 0,0 ^{cb}	3,2 ± 0,0 ^{ac}	4,1 ± 0,0 ^{ec}	3,8 ± 0,0 ^{dc}	3,4 ± 0,0 ^{bC}
Acidez total [g L ⁻¹]	Jugo	4,4 ± 0,0 ^{cb}	4,6 ± 0,1 ^{dc}	5,3 ± 0,1 ^{fc}	2,5 ± 0,0 ^{bc}	2,2 ± 0,0 ^{aA}	4,8 ± 0,1 ^{eA}
	Hollejos	3,8 ± 0,0 ^{ba}	2,0 ± 0,2 ^{aA}	5,0 ± 0,2 ^{bb}	1,3 ± 0,1 ^{ab}	1,5 ± 0,0 ^{aA}	7,7 ± 1,3 ^{cb}
	Hojas	3,8 ± 0,2 ^{ba}	4,7 ± 0,1 ^{bc}	5,0 ± 0,1 ^{bb}	1,9 ± 0,1 ^{ac}	2,1 ± 0,0 ^{aA}	3,9 ± 0,0 ^{ba}
	Tallos	3,6 ± 0,0 ^{ca}	3,5 ± 0,1 ^{cb}	3,5 ± 0,1 ^{ca}	0,9 ± 0,1 ^{aA}	1,1 ± 0,0 ^{ba}	3,9 ± 0,0 ^{dA}
Color (IC)	Jugo	0,5 ± 0,0 ^{aA}	0,6 ± 0,0 ^{ba}	1,0 ± 0,0 ^{dA}	1,5 ± 0,0 ^{aA}	0,9 ± 0,1 ^{ca}	3,0 ± 0,0 ^{fa}
	Hollejos	1282,4 ± 1,5 ^{db}	943,1 ± 1,7 ^{cb}	549,1 ± 1,1 ^{bb}	967,1 ± 1,2 ^{cb}	2263,7 ± 30,0 ^{ec}	217,1 ± 2,2 ^{ab}
	Hojas	2078,0 ± 1,7 ^{fc}	1532,8 ± 1,8 ^{cc}	2015,1 ± 1,6 ^{ec}	1356,5 ± 14,2 ^{bc}	1965,4 ± 1,0 ^{db}	465,7 ± 7,6 ^{ac}
	Tallos	2565,7 ± 2,2 ^{bd}	2470,7 ± 0,5 ^{bd}	2526,1 ± 4,7 ^{bd}	2502,3 ± 24,7 ^{bd}	2556,4 ± 1,0 ^{bd}	1561,8 ± 82,7 ^{ad}

Letras minúsculas diferentes en la misma fila y letras mayúsculas diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

		Cabernet Sauvignon	Merlot	Syrah	País	Moscatel de Alejandría	Tintorera
Color (tonalidad)	Jugo	1,1 ± 0,2 ^{BB}	1,0 ± 0,0 ^{BC}	0,9 ± 0,0 ^{BB}	1,4 ± 0,0 ^{CD}	1,6 ± 0,1 ^{DC}	0,4 ± 0,0 ^{AA}
	Hollejos	20,1 ± 0,0 ^{BC}	8,9 ± 0,0 ^{AB}	28,5 ± 0,0 ^{CC}	5,7 ± 0,0 ^{AB}	8,4 ± 0,1 ^{AB}	331,1 ± 6,9 ^{DD}
	Hojas	7,1 ± 0,0 ^{BA}	4,5 ± 0,0 ^{AA}	8,1 ± 0,0 ^{CA}	4,8 ± 0,0 ^{AA}	6,7 ± 0,0 ^{AA}	36,2 ± 2,1 ^{DC}
	Tallos	9,5 ± 0,0 ^{AB}	9,0 ± 0,0 ^{AB}	9,0 ± 0,0 ^{AB}	8,6 ± 0,0 ^{AC}	8,7 ± 0,0 ^{AB}	16,2 ± 1,0 ^{BB}
Sólidos solubles [°Brix]	Jugo	14,9 ± 0,1 ^{BB}	12,2 ± 0,0 ^C	10,2 ± 0,0 ^{DB}	16,2 ± 0,0 ^{CC}	25,0 ± 0,0 ^{FB}	16,6 ± 0,0 ^{AC}
	Hollejos	17,4 ± 0,0 ^{CD}	13,8 ± 0,0 ^{AA}	18,1 ± 0,6 ^{DB}	17,2 ± 0,0 ^{CA}	22,6 ± 0,0 ^{EA}	15,2 ± 0,2 ^{BC}
	Hojas	15,9 ± 0,1 ^{CA}	14,7 ± 0,1 ^{BB}	18,1 ± 0,1 ^{DB}	17,5 ± 0,1 ^{DB}	27,1 ± 0,6 ^{EC}	13,9 ± 0,1 ^{AB}
	Tallos	17,9 ± 0,1 ^{CD}	13,7 ± 0,1 ^{BA}	13,3 ± 0,1 ^{AA}	19,0 ± 0,0 ^{DD}	26,5 ± 0,1 ^{EC}	13,4 ± 0,0 ^{AA}

Letras minúsculas diferentes en la misma fila y letras mayúsculas diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).



en peciolos de las variedades Chardonnay y Cabernet Ruby, y el aumento del pH obtenido en sus respectivos jugos.

El análisis de acidez total entregó un rango de 0,92-7,7 g L⁻¹ de ácido tartárico (Tabla 4), correspondientes a los extractos de tallos País y hollejos Tintorera, respectivamente. En los zumos de uva y vinos el contenido de ácidos es importante debido a que tienen influencia sobre las propiedades organolépticas como sabor, color y aroma.

La disminución de la acidez en los extractos de hollejos, hojas y tallos en comparación con el jugo, tiene relación con el aumento del pH en los mismos extractos, ya que un aumento del pH se refiere a la degradación de los ácidos con la consecuente pérdida de iones H⁺, que son liberados al medio. Esta tendencia no se observa en el extracto de hollejos Tintorera, donde ocurre un notorio aumento de la acidez (7,7 g L⁻¹), dejando en manifiesto que la mayor cantidad de ácidos orgánicos están contenidos en los hollejos de esta variedad de uva (Perestrelo *et al.*, 2012). Además de que los ácidos extraídos por ruptura celular (mecánica y por calor), no fueron significativamente degradados por las enzimas y bacterias, no logrando así contrarrestar la tasa de extracción. Una elevada acidez y un bajo pH es característico de las uvas Tintoreras (Gil y Pszczolkowski, 2007).

El índice de color (IC) y la tonalidad analizados a través de absorbancia muestran que para el primero, el resultado está dado entre 0,48 y 2566 en jugo y extracto de tallos de Cabernet Sauvignon. Los valores de la tonalidad están comprendidos entre 0,40 y 331 en jugo y en extracto de hollejos de Tintorera (Tabla 4). Si se analizan los datos por variedad se puede apreciar que en todas ellas menos Tintorera, los extractos de tallos arrojan un mayor índice de color. Según Suriano *et al.* (2015), quienes analizaron vinos tintos con presencia y sin presencia de tallos en la maceración, esto probablemente ocurre debido a una oxigenación del jugo favorecida por una mayor aireación en presencia de tallos. La oxigenación aumenta la fuerza de color y promueve procesos de condensación entre antocianinas-taninos-acetaldehído, los cuales son muy importantes para la estabilidad cromática. En relación a la tonalidad, los vinos tintos jóvenes, sitúan su máximo de absorbancia a 520 nm debido a las antocianinas, presentando un segundo máximo a 420 nm. A medida que el vino envejece pierde el contenido en estas sustancias y su color evoluciona hacia tonos anaranjados, desapareciendo el máximo a 520 nm y manteniéndose el correspondiente a los tonos amarillos (Íñiguez *et al.*, 1995). Lo mismo ocurre en la generación de los diferentes extractos ya que el uso de hollejos, hojas y tallos produce cambios, tornando los tonos más pardos, semejantes a un vino envejecido.

Los sólidos solubles presentan valores entre 10,2 °Brix en el jugo Syrah y 27,1 °Brix en el extracto de hojas de Moscatel de Alejandría (Tabla 4). El Ministerio de Salud a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos establece que el contenido mínimo de sólidos solubles debe ser al igual al presente naturalmente en la fruta con un valor establecido de 13% m/m y expresado en °Brix. El Codex Alimentario (CODEX STAN 247-2005) establece que para los jugos de frutas exprimidos directamente, el nivel de °Brix será el correspondiente al del jugo exprimido de la fruta y el contenido de sólidos solubles del jugo de concentración natural no se modificará salvo para mezclas del mismo tipo de jugo.

3.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

Los resultados de la concentración de polifenoles totales (Tabla 5) muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos de las distintas variedades, siendo la concentración más baja de 485 mg L⁻¹ y la más alta de 3169 mg L⁻¹ de ácido gálico en el jugo y en el extracto de hojas de Cabernet Sauvignon respectivamente. Si se comparan los diferentes extractos entre sí para cada variedad, se puede observar que el jugo presenta una concentración más baja con excepción de País y Tintorera, donde la concentración de polifenoles en los extractos de tallos es menor. Estadísticamente se puede observar que existe una mayor contribución por parte de los hollejos y las

hojas de todas las variedades a la concentración de polifenoles totales, en comparación con el jugo puro.

Otro estudio muestra un promedio de 2283 mg L⁻¹ de ácido gálico en jugos comerciales de *Vitis labrusca* variedad Bordo (Burin *et al.*, 2010). En contraste, los resultados de los extractos de hollejos de la presente investigación reflejan valores levemente superiores con excepción de las variedades País y Moscatel de Alejandría (Tabla 5).

El extracto de hojas variedad Bordo de un cultivo convencional, generado con hojas secas y 70% de etanol, entregó una concentración de 20200 mg/L de ácido gálico (Dani *et al.*, 2010), cifra que es relevantemente superior a los extractos generados en la presente investigación. La diferencia de este resultado se explicaría por el tipo de extracción utilizada y el estado de la materia prima; extracción etanólica y hojas secas por Dani y colaboradores, y extracción acuosa (jugo) y hojas frescas en el presente trabajo. Con ello se podría deducir que un grupo considerable de compuestos fenólicos tienen una mayor afinidad con los solventes orgánicos, generando una mejor extracción de ellos debido a que el tipo de disolvente utilizado, su polaridad, pH del medio, tiempo de extracción, temperatura, y la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente juegan un papel relevante (Mohammedi y Atik, 2011; Dent *et al.*, 2013). Además, en las hojas secas se puede encontrar una mayor concentración de compuestos activos en relación a la masa de las hojas frescas por la eliminación del agua presente.

Un estudio realizado en tallos de la variedad tinta Manto Negro que fueron congelados a -20 °C, deshidratados a 105 °C y posteriormente generado su extracto con etanol: agua (80/20, v/v), entregó una concentración de 29400 mg L⁻¹ de polifenoles (Llobera, 2012), valor considerablemente superior a los resultados obtenidos en esta investigación que van desde 628 mg L⁻¹ en la variedad Cabernet hasta 890 mg L⁻¹ en la variedad Syrah. La diferencia está dada por el estado de la materia prima y por el tipo de extracción utilizada.

Las antocianinas presentes en los diferentes extractos se encuentran en un rango de 0,705 mg L⁻¹ de malvidina-3-glucósido en el jugo País y 217,8 mg L⁻¹ en el jugo Tintorera (Tabla 5). Se puede apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las variedades utilizadas y entre los extractos generados a partir de cada variedad. En cuatro variedades ocurre un aumento considerable de las antocianinas presentes en el extracto de hollejos en comparación con el jugo, con la excepción de las variedades Tintorera y Moscatel de Alejandría.

En las vacuolas de la célula de la uva, donde el pH interno es neutro (pH=7.0), se observan intensas coloraciones azul/rojo las cuales son atribuidas a la copigmentación formada por las antocianinas y otros flavonoides, iones fenólicos y/o metálicos (Brouillard *et al.*, 1991), sin embargo esta copigmentación se ve afectada por el procesamiento. En el caso de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y País el calor y la ruptura celular por la molienda aplicada, produce un aumento del pH logrando en las antocianinas presentes una mayor estabilidad a un pH más neutro. En la variedad Lachryma Christi, que es reconocida por presentar un pH bajo en sus bayas (Gil y Pszczolkowski, 2007), un pH más neutro produciría el efecto contrario, degradando las antocianinas. Además el tratamiento térmico aplicado (60 °C) influye en la destrucción de algunas antocianinas, debido a que puede causar la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y la apertura de anillo pirano (Monagas *et al.*, 2005; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2010). Se ha demostrado también, que diferentes antocianinas presentan diferente estabilidad a un determinado pH, y una determinada antocianina se comporta diferente al variar el pH y la temperatura (Fossen *et al.*, 1998; Hillmann *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2014), por lo tanto la composición específica de antocianinas de cada variedad influye en el resultado.

En los flavonoides se observa un aumento significativo de la concentración presente en los extractos de hollejos y hojas en comparación con el jugo. Los valores mínimos y máximos son 384 mg L⁻¹ y 3442 mg L⁻¹ de equivalentes de catequina correspondientes al extracto de tallos Cabernet Sauvignon y el extracto de hojas de Tintorera, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5: Cuantificación de los compuestos antioxidantes de los extractos (n=3).

		Cabernet Sauvignon	Merlot	Syrah	País	Moscatel de Alejandría	Tintorera
Polifenoles [mg L ⁻¹]	Jugo	484,5 ± 117,0 ^{aA}	611,8 ± 60,1 ^{abA}	529,8 ± 15,4 ^{abA}	762,5 ± 17,4 ^{bA}	486,1 ± 13,650 ^{aA}	2014,8 ± 170,6 ^{CB}
	Hollejos	2608,1 ± 83,3 ^{dB}	2351,5 ± 15,3 ^{CB}	2184,8 ± 43,6 ^{CC}	1894,8 ± 98,5 ^{BB}	1668,1 ± 109,697 ^{aC}	2854,8 ± 60,8 ^{EC}
	Hojas	3168,5 ± 174,9 ^{CC}	3057,5 ± 39,0 ^{CC}	3025,5 ± 55,7 ^{CD}	2049,8 ± 113,9 ^{AB}	2630,1 ± 85,757 ^{BD}	2263,1 ± 32,7 ^{AB}
	Tallos	627,5 ± 23,6 ^{aA}	673,1 ± 15,5 ^{aA}	890,1 ± 59,1 ^{BB}	663,8 ± 35,6 ^{aA}	864,8 ± 88,899 ^{BB}	700,5 ± 60,5 ^{aA}
Antocianinas [mg L ⁻¹]	Jugo	1,2 ± 0,4 ^{aA}	3,4 ± 0,4 ^{AB}	8,1 ± 0,6 ^{AB}	0,7 ± 0,0 ^{aA}	-	217,8 ± 8,8 ^{CD}
	Hollejos	52,7 ± 3,9 ^{dB}	38,1 ± 0,7 ^{CC}	53,1 ± 0,9 ^{DC}	12,7 ± 1,5 ^{BB}	0,3 ± 0,1 ^a	192,4 ± 0,4 ^{EC}
	Hojas	2,3 ± 0,2 ^{aA}	1,8 ± 0,8 ^{aA}	4,4 ± 1,0 ^{aA}	1,6 ± 1,1 ^{aA}	-	93,8 ± 5,6 ^{BB}
	Tallos	1,7 ± 0,3 ^{abA}	1,7 ± 0,1 ^{abA}	3,0 ± 0,2 ^{bA}	1,1 ± 0,1 ^{abA}	-	63,9 ± 1,9 ^{CA}
Flavonoides [mg L ⁻¹]	Jugo	187,1 ± 18,7 ^{aA}	528,6 ± 14,1 ^{abA}	564,8 ± 3,6 ^{abA}	711,4 ± 65,6 ^{bcA}	411,9 ± 3,299 ^{abA}	995,2 ± 351,2 ^{CA}
	Hollejos	2219,1 ± 311,1 ^{abB}	2879,1 ± 99,6 ^{BB}	1987,3 ± 181,4 ^{AB}	2211,9 ± 181,0 ^{abB}	1880,5 ± 207,007 ^{AB}	1971,9 ± 41,8 ^{AB}
	Hojas	2200,5 ± 16,7 ^{abB}	2791,4 ± 37,1 ^{CB}	2214,8 ± 40,3 ^{BB}	1965,7 ± 26,5 ^{AB}	2952,4 ± 28,583 ^{CC}	3442,4 ± 201,0 ^{DD}
	Tallos	384,3 ± 18,2 ^{aA}	443,3 ± 10,1 ^{bA}	719,1 ± 17,3 ^{dA}	637,6 ± 27,3 ^{CA}	485,2 ± 11,635 ^{bA}	1089,6 ± 6,4 ^{EA}
ABTS [mmol L ⁻¹]	Jugo	8,1 ± 3,1 ^{aA}	5,3 ± 0,5 ^{aA}	5,5 ± 0,7 ^{aA}	9,6 ± 1,0 ^{aA}	4,0 ± 0,6 ^{aA}	21,5 ± 4,6 ^{bA}
	Hollejos	50,7 ± 9,3 ^{abB}	50,0 ± 7,2 ^{abB}	55,7 ± 6,2 ^{BC}	50,8 ± 3,3 ^{abB}	35,5 ± 2,9 ^{aC}	64,1 ± 2,6 ^{BB}
	Hojas	48,3 ± 15,4 ^{AB}	49,2 ± 9,5 ^{AB}	58,3 ± 5,3 ^{aC}	55,0 ± 3,3 ^{AB}	66,8 ± 1,9 ^{aD}	93,5 ± 12,6 ^{BC}
	Tallos	12,6 ± 0,6 ^{aA}	12,6 ± 2,6 ^{aA}	18,3 ± 1,1 ^{bcB}	11,6 ± 1,4 ^{aA}	16,7 ± 1,0 ^{abB}	22,0 ± 3,2 ^{CA}

Letras minúsculas diferentes en la misma fila y letras mayúsculas diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Según Martínez-Flórez *et al.* (2002), los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, y según Katalinic *et al.* (2009) en un extracto de hojas otoñales generado con medio alcohólico, se encontró una concentración de 1580 mg L⁻¹ de flavonoides, valor que fue ampliamente superado por el extracto de hojas de Tintorera.

El análisis de la capacidad antioxidante por medio del radical ABTS muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas y entre sus respectivos extractos, donde el valor mínimo lo entrega el jugo Moscatel de Alejandría con 4,0 mmol L⁻¹ y el máximo el extracto de hojas de Tintorera con 93,5 mmol L⁻¹ de equivalentes de Trolox (Tabla 5). Se observan valores notoriamente más altos en los extractos de hollejos y hojas en relación a los de tallos y el jugo para todas las variedades. Si se comparan los resultados obtenidos con un estudio anterior realizado en vinos de las variedades Cabernet Sauvignon (24,5 mmol L⁻¹), Syrah (16,3 mmol L⁻¹) y País (16,2 mmol L⁻¹) producidos con materia prima del mismo predio (Aguilar, 2012), se puede observar que existe un notorio aumento (dos y tres veces más) en la concentración de antioxidantes por la acción del calor aplicado en la maceración. Un estudio realizado por Apostolou *et al.* (2013) en tallos de diferentes variedades, arroja una concentración promedio de 5 mmol L⁻¹, resultado que en algunas variedades es cuadruplicado por los extractos de tallos generados en el presente trabajo.

3.4 Identificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

Mediante análisis por HPLC-MS de jugos y extractos de hollejos, hojas y tallos para todas las variedades, se logró identificar varios compuestos fenólicos, tanto flavonoides pertenecientes a antocianinas, flavonoles y flavan-3-oles como no flavonoides (ácidos fenólicos)(Tabla 6).

En las antocianinas se detectaron formas glucosiladas, acetyl-glucosiladas y cumaroyl-glucosiladas de delphinidina, cianidina, petunidina y malvidina. Todas estas antocianinas han sido observadas también en estudios anteriores en vinos (Monagas *et al.*, 2005; Castillo-Muñoz *et al.*, 2009b) y son las responsables del color en uvas tintas. Se encuentran ubicadas principalmente en el hollejo, como se comprobó en el presente trabajo, donde se identificó una mayor presencia de antocianinas en los extractos de hollejos de las diferentes variedades (Tabla 5), siendo Tintorera la variedad que presentó una concentración más alta con 2995 mg L⁻¹, seguida por el jugo de Tintorera sin tratamiento con 2294 mg L⁻¹ de malvidina-3-glucósido (mv-3-gl) que fue la antocianina mayoritaria presente en las muestras (Figura 3-A). Un estudio realizado con la variedad tinta Carignan aplicando un calentamiento rápido de las uvas a alta temperatura (> 95 °C) con vapor biológico (es decir, vapor producido a partir del agua presente en la uva, sin dilución) a presión atmosférica y luego colocándolas bajo vacío (60 hPa) para provocar la vaporización instantánea, logró una concentración de 210,3 mg L⁻¹ de antocianinas contra 161,4 mg L⁻¹ de la uva control (Morel-Salmi *et al.*, 2006), obteniendo un incremento similar al observado en la variedad Tintorera, pero en un rango de concentraciones significativamente mayor en este último caso. El extracto de hollejos de Cabernet Sauvignon fue el único dónde se encontraron todos los compuestos identificados con una concentración total de 771 mg L⁻¹ de mv-3-gl (Figura 3-A).

Los extractos de hojas de las variedades Merlot, Syrah y Moscatel de Alejandría; los extractos de tallos Merlot, Syrah, Moscatel de Alejandría y Cabernet Sauvignon y los jugos Moscatel de Alejandría y País no mostraron presencia de antocianinas evidenciando que su síntesis y concentración se realiza exclusivamente en el hollejo de la uva con excepción de la variedad Tintorera que también concentra compuestos fenólicos en su pulpa (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009b; Figueiredo-González *et al.*, 2013).

Los flavonoles son pigmentos amarillos ubicados principalmente en las vacuolas de los tejidos epidérmicos. Se ha identificado la presencia de ellos en hollejos de uva y vino (Monagas *et al.*, 2005; Castillo-Muñoz *et al.*, 2010), sin embargo en este estudio la mayor presencia de flavonoles se encontró en los extractos de hojas, de los cuales la concentración más alta se observó en Tintorera con 1888 mg L⁻¹ (Figura 3-B) expresados como equivalentes del quercetina-3-glucósido (que-3-gl).

Tabla 6: Compuestos fenólicos específicos detectados mediante HPLC-DAD-MS/MS.

Nombre	tR (DAD)	λ máx	[M-H] ⁺	Fragmentos
Antocianinas				
Delfinidina-3-glucósido	16,86	524, 277, 343	465	303
Cianidina-3-glucósido	19,10	517, 279	449	287
Petunidina-3-glucósido	20,23	525, 277	479	317, 302
Peonidina-3-glucósido	22,54	517, 279	463	301, 286
Malvidina-3-glucósido	23,36	527, 277, 346	493	331, 315, 287
Delfinidina-acetil-glucósido	25,26	525, 278	505	303
Petunidina-3-acetil-glucósido	30,82	529, 525	521	317
Malvidina-acetil-glucósido	34,30	529, 525	535	331, 315, 287
Malvidina-cumaroil-glucósido	39,88	532	639	331
Flavonoles				
			[M-H] ⁻	
Miricetina-3-hexósido	7,04	556	493	317, 179, 299, 151, 271
Quercetina-3-rutinósido	8,02	354	609	301, 271, 255,5; 279, 151
Quercetina-3-hexósido	8,75	357	463	300, 271, 255, 179, 151
Quercetina-3-glucurónido	8,93	354	477	301, 151, 179, 273,5; 283,4
Kaempferol-3-glucósido	10,7	346	447,5	284,2; 205; 227; 183; 135; 197
Kaempferol-3-hexósido	11,7	346	447,3	284; 255; 227,4; 153; 179,3; 241
isorharmetina-3-hexósido	12,6	354	477	315; 285; 271; 299; 243; 151;179
isorharmetina-3-glucurónido	13,3	353	491	315, 300, 271, 255, 179, 151
Ácidos fenólicos				
Hexósido de ácido gálico	6,76	276	331	271, 211, 169, 151, 125
Hexósido de ácido protocatechuico	7,38	278	315	153, 123
Hexósido de ácido ferúlico	8,09	275	355	193, 165
Ácido clorogénico	8,55	320	353	191, 179, 161, 135
Ácido caftárico	10,17	328, 300(h)	311	179; 149; 135
Derivado de ácido cafeico	13,06	314	431	296, 179, 113
Ácido coutárico	13,47	311, 300(h)	295	163, 149, 119
Flavan-3-ol				
Dímero de catequina	9,01	280	577	451, 425, 407, 289.
Catequina	11,93	280	289	245; 203; 179, 161, 125; 137
Epicatequina	14,4	279	289	245; 203, 203, 179, 151, 137, 123, 109

El resto de las variedades presentan niveles similares entre que sí, que van desde 1142 mg L⁻¹ en la variedad País a 1232 mg L⁻¹ de que-3-gl en la variedad Syrah. Los compuestos encontrados corresponden a miricetina, quercetina, kaempferol y isorharmetina en forma de glucosidos y hexósidos (Tabla 6), siendo el extracto de hoja de Tintorera el que presentó la totalidad de estos compuestos. Los flavonoles miricetina e isorharmetina son considerados exclusivos de uvas tintas (Cheynier *et al.*, 2003 citado por Castillo-Muñoz *et al.*, 2010). Un estudio que analizó la eficacia del

medicamento AS195 (Antistax®; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Germany) que contiene extractos de hojas de uvas tintas, demostró ser beneficioso contra la insuficiencia venosa crónica, logrando disminuirla en contraste con un medicamento placebo. Este efecto es atribuido al contenido de flavonoles como quercetina glucósido, kaempferol glucosido y quercetina glucurónido (Rabe *et al.*, 2011). Los extractos de tallos de Merlot, Cabernet Sauvignon, País y los jugos de todas las variedades no revelaron presencia de flavonoles.

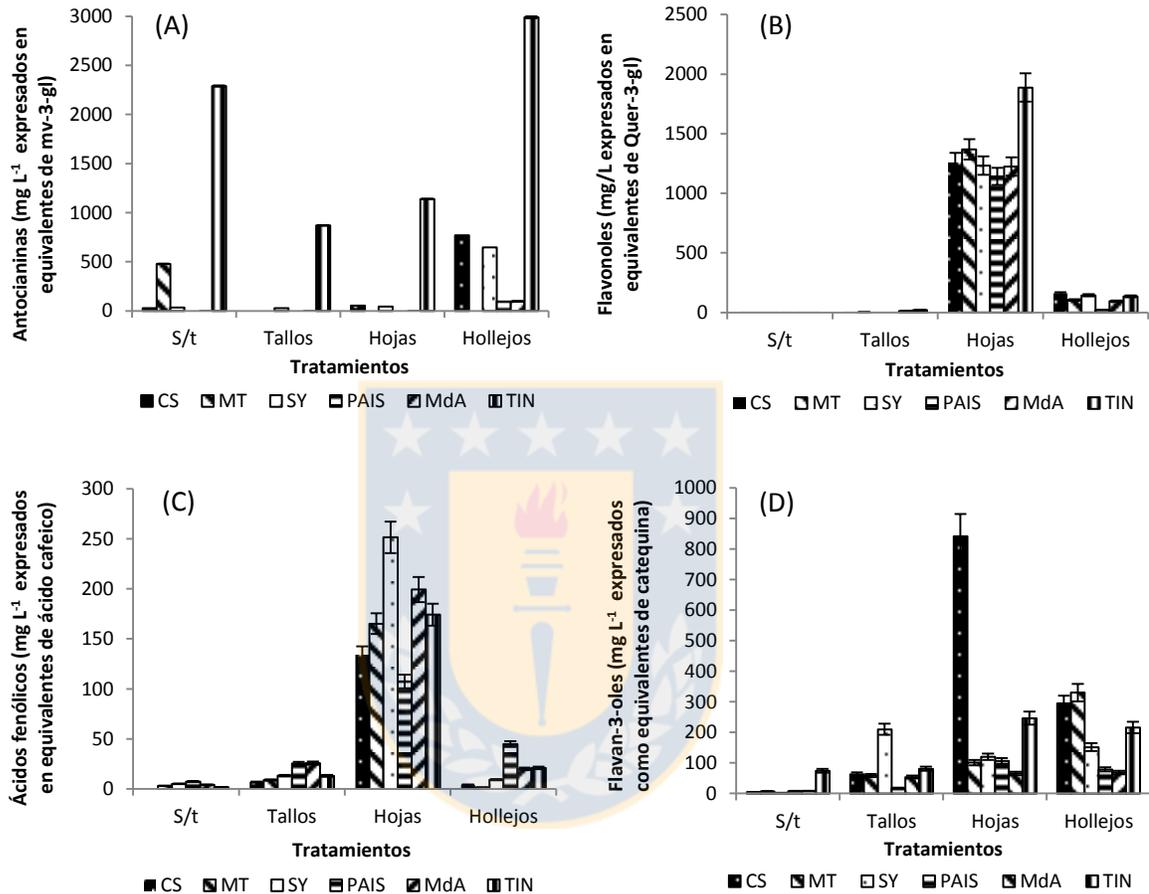


Figura 3: Cuantificación de antocianinas, flavonoles, ácidos fenólicos y flavan-3-oles para cada variedad según el tipo de extracto mediante HPLC (n=2).

S/t= jugo sin tratamiento, CS = Cabernet Sauvignon, MT= Merlot, SY=Syrah, PAIS= País, MdA= Moscatel de Alejandría, TIN=Tintorera.

La mayor presencia de ácidos fenólicos se observó en el extracto de hojas de Syrah con 252 mg L⁻¹ expresados en equivalentes de ácido cafeico (Figura 3-C). En general, se puede apreciar que las hojas entregan un mayor aporte de éstos. Se ha reportado que los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico) y los ácidos benzoicos (protocatechuico, gálico) están localizados en la vacuolas del hollejo y células de la pulpa (Monagas *et al.*, 2007), sin embargo los extractos de hojas de berries son estudiados con interés por ser una buena fuente de ácidos fenólicos (Amarowicz *et al.*, 2008; Xiaoyong and Luming, 2014). Un estudio realizado en 9 jugos de uva tinta comerciales, arrojó una concentración de 4,93 mg L⁻¹ de ácidos fenólicos (Moreno-Montoro *et al.*, 2015), valor cercano al jugo sin enriquecer. Se han reportado concentraciones de 556 - 618 mg kg⁻¹ de materia seca, equivalentes a 77 - 86 mg L⁻¹ de ácido caftárico en hojas de la variedad tinta Saint Laurent (Balik *et al.*, 2008),

cercanos al valor inferior encontrado en la presente investigación, donde se identificaron valores entre 107,4 mg L⁻¹ en extracto de hojas País y 215 mg L⁻¹ en extracto de hojas Syrah.

Los flavan-3-oles identificados corresponden a dímeros de catequina y de epicatequina. Se ha demostrado que las proantocianidinas, en este caso epicatequina, ejercen una gran influencia en la inhibición de la enzima angiotensina I-convertidora, responsable del aumento de la presión arterial (Godoy *et al.*, 2012; Fernández and Labra, 2013; Eriz *et al.*, 2010). La mayor concentración de flavan-3-oles se encontró en el extracto de hojas de Cabernet Sauvignon con 842 mg L⁻¹ expresados como equivalentes de catequina. Se han reportado valores de 1,64 mg L⁻¹ de catequina y 1,93 mg L⁻¹ de epicatequina en jugos comerciales (Moreno-Montoro *et al.*, 2015) y valores entre 4,7 – 24,8 mg L⁻¹ de catequina y 0,6 - 22,2 mg L⁻¹ de epicatequina en jugos producidos para su análisis (Pereira *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2014). En la presente investigación el jugo de Cabernet Sauvignon no presentó epicatequina y el jugo País ni catequina ni epicatequina. En el otro extremo, la concentración máxima para catequina fue dada por el extracto de hojas de Cabernet Sauvignon con 749 mg L⁻¹ y el extracto de hollejos Merlot con 123 mg L⁻¹ de epicatequina.

No se reportó la presencia de estilbenos en ninguna de las muestras. Sin embargo, en extractos realizados con etanol y metanol en tallos de diferentes variedades si se han encontrado diferentes concentraciones (Amalfitano *et al.*, 2011; Vergara *et al.*, 2012). Una posible explicación es que los estilbenos son compuestos relativamente no reactivos, incoloros y prácticamente insolubles en agua (Likhthenshtein, 2010), lo que explicaría la nula extracción en los jugos enriquecidos. Las uvas son una de las principales fuentes dietéticas de estilbenos, pero su concentración es relativamente baja en comparación con otros compuestos fenólicos. Los estilbenos se encuentran en la piel de la uva y en bajas cantidades en las semillas, pero es en los tallos donde se puede encontrar una cantidad sustancial de estos compuestos. En el jugo o vino no se encuentran abundantemente, debido a sus pobres propiedades de difusión (Ali *et al.*, 2010).

3.5 Formulación del producto final

Para la formulación del producto final se realizaron evaluaciones sensoriales con el fin de establecer las posibles combinaciones de extractos y variedades. La primera evaluación sensorial realizada para determinar las combinaciones de los extractos de hollejos: hojas: tallos entregó como resultado que para la variedad País no existe diferencia estadísticamente significativa en relación al sabor. En la uva Tintorera el extracto de hojas presentó una menor preferencia, en cambio los extractos de hollejos y tallos no presentaron diferencia entre sí (Tabla 7).

Se observa que la mejor proporción de mezclado de los tres extractos en relación al sabor, sería 1:2:2 para hojas: tallos: hollejos, según el análisis estadístico de la mediana (Tabla 7).

En la segunda evaluación sensorial, la proporción elegida de 1:2:2 para hojas: tallos: hollejos en conjunto con las proporciones agregadas de 1:2:1 y 1:2:3 arrojaron como resultados que para la variedad País no hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres proporciones de mezcla. En cambio, en la variedad Tintorera sí existe diferencia significativa entre la proporción 1:2:1 y 1:2:2, y no existe entre la proporción 1:2:3 con 1:2:1 y 1:2:2. Sin embargo, a través de la mediana se puede observar que la proporción mejor evaluada es la 1:2:2, comprobando lo predicho en los resultados de la primera evaluación sensorial.

En la tercera evaluación sensorial, la proporción 1:2:2 para hojas:hollejos:tallos fue aplicada en todas las variedades. La prueba de Kruskal Wallis arrojó que no existen diferencias significativas entre las seis variedades analizadas en relación al sabor y según las observaciones recibidas, todas las variedades tienen una buena aceptación por parte de los jueces. Finalmente, la decisión fue basada en la capacidad antioxidante presente en cada jugo de uva enriquecido y en la demanda de las variedades utilizadas para la producción de vino, con la finalidad de promover o dar un valor agregado a las variedades menos cotizadas comercialmente, pero con gran potencial en relación a

compuestos bioactivos. Las variedades elegidas fueron País y Tintorera, ya que la mezcla de ambas produciría un equilibrio en relación al sabor y color, debido a que la variedad País es muy dulce y presenta un color oxidado, y la variedad Tintorera es más ácida y con un color marrón brillante, además de poseer concentraciones altas de antioxidantes.

En la cuarta evaluación sensorial el análisis estadístico arrojó que existen diferencias significativas entre el sabor de las proporciones de mezcla País y Tintorera 9:1 y 1:1, pero no entre 7:3 con 9:1 y 7:3 con 1:1 (Tabla 7). Por lo tanto, la decisión fue tomada a través de la mediana, dónde el valor más alto corresponde a la proporción 1:1 de País y Tintorera.

Tabla 7: Análisis de las evaluaciones sensoriales (n=30).

N° evaluación sensorial	Lugar	Muestra	Mediana
1	Menor	Hojas	182,8 ^a
	Intermedio	Hollejos	658,2 ^b
	Mayor	Tallos	743,0 ^b
2	-	1:2:1	0,1 ^a
	-	1:2:3	0,2 ^{ab}
	-	1:2:2	0,7 ^b
4	-	9:1	0,1 ^a
	-	7:3	0,4 ^{ab}
	-	1:1	0,5 ^b

Letras diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Finalmente se elaboró el diagrama de proceso del producto final rico en compuestos bioactivos (Figura 4), el cual está compuesto por la elaboración de jugo de uva no enriquecido en antioxidantes, seguido de la generación de los extractos de hollejos, hojas y tallos por medio de agitación continua (500 rpm), calentamiento a 60 °C, por 6, 8 y 4 horas respectivamente, obteniéndose como resultado jugos enriquecidos en antioxidantes. Por la mezcla de los mismos en proporción 1:2:2 (hojas: tallos: hollejos) para cada variedad (País y Tintorera), seguido de la mezcla de ambas cepas en proporción 1:1, y finalmente una clarificación y pasteurización del jugo enriquecido en antioxidantes a 63 ± 2 °C por 30 minutos.

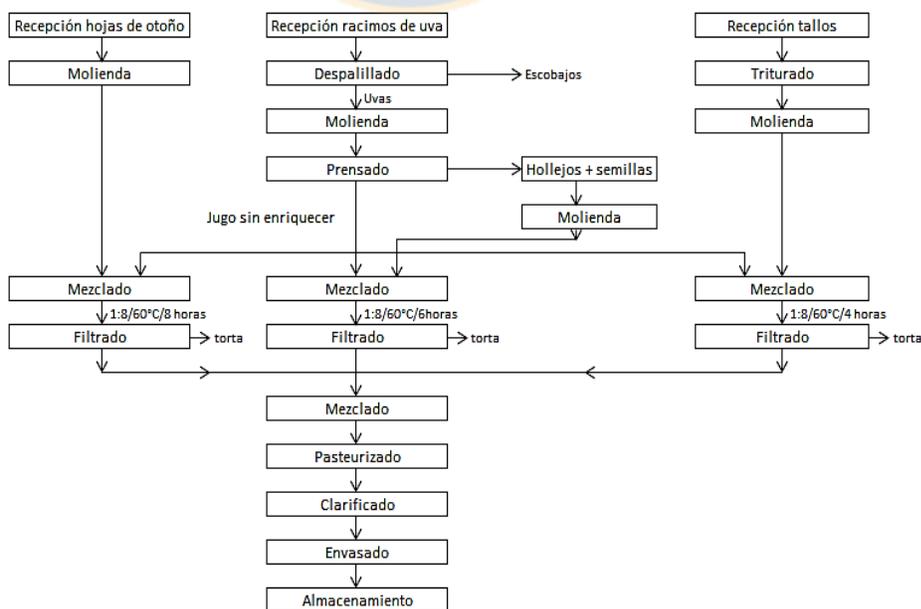


Figura 4: Diagrama final del proceso productivo del jugo de uva enriquecido con antioxidantes.

3.6 Caracterización del producto final

En el producto final sin pasteurizar se produjo un equilibrio en las propiedades (Tabla 8) al mezclar los diferentes extractos de las variedades País y Tintorera, obteniéndose valores intermedios a los encontrados en las variedades por separado.

Tabla 8: Características de calidad y composición fenólica del producto final.

Caracterización del producto final	
SO ₂ total [mg L ⁻¹]	1,7 ± 0,3
SO ₂ libre [mg L ⁻¹]	1,5 ± 0,0
pH	3,4 ± 0,0
Color (IC)	800,0 ± 1,0
Color (tonalidad)	17,9 ± 0,0
Acidez total [mg L ⁻¹]	0,6 ± 0,0
Sólidos solubles [°Brix]	17,5 ± 0,1
Polifenoles totales [mg L ⁻¹]	1559,3 ± 59,9
Antocianinas [mg L ⁻¹]	63,2 ± 3,9
Flavonoides [mg L ⁻¹]	1326,1 ± 32,4
Capacidad antioxidante (ABTS*) [mmol L ⁻¹]	77,2 ± 11,1

A modo de comparación, extractos generados con 150 mL de agua destilada a 100 °C y 2 g de muestras deshidratadas de té verde, té negro y té blanco entregaron concentraciones de polifenoles totales de 517, 677 y 445 mg L⁻¹, respectivamente (Alarcón *et al.*, 2008). Por otro lado, jugo de granada, jugo de arándano y jugo de cranberry arrojaron concentraciones de 3800, 2300 y 1700 mg L⁻¹ de ácido gálico (Seeram *et al.*, 2008). El resultado obtenido de polifenoles para el producto final, es un valor intermedio (1559 mg L⁻¹) a las referencias dadas y menor a los resultados obtenidos en vinos de la variedad País (3189 mg L⁻¹), Cabernet Sauvignon (1885 mg L⁻¹) y Syrah (2317 mg L⁻¹), provenientes del mismo predio analizados en una investigación anterior (Aguilar, 2012). En la misma investigación se identificaron además concentraciones para antocianinas y flavonoides de 97,4 y 1262 mg L⁻¹ en vino País, 179 y 1729 mg L⁻¹ en vino Cabernet Sauvignon y 59,6 y 4156 mg L⁻¹ en vino Syrah, valores en su mayoría superiores a los presentes en el producto final (63,2 y 1326 mg L⁻¹, respectivamente).

La capacidad antioxidantes determinada a través del radical ABTS entrega un resultado de 77,2 mmol L⁻¹ valor superior a los 27,1 mmol L⁻¹ encontrados en jugo tinto y los 50 mmol L⁻¹ en vino tinto (Moreno-Montoro *et al.*, 2015). El radical ABTS presenta una mayor afinidad en los solventes acuosos aunque igual puede ser soluble en un solvente orgánico, y es capaz de actuar en un amplio rango de pH (Prior *et al.*, 2005; Niki, 2010).

3.7 Capacidad antioxidante del producto final y sus componentes

Los resultados de ORAC-FL (19,6 mmol L⁻¹) y ORAC-PGR (13,7 ± 0,1 mmol L⁻¹) del producto final (Tabla 9) son considerablemente más altos que los valores encontrados en extractos de arándanos (7,37 ± 0,37 y 1,74 ± 0,07 mmol L⁻¹ ORAC-FL y ORAC-PGR respectivamente), moras (8,65 ± 0,20 y 3,27 ± 0,17 mmol L⁻¹ ORAC-FL y ORAC-PGR respectivamente), y frambuesas (2,87 ± 0,70 y 1,45 ± 0,13 mmol L⁻¹ ORAC-FL y ORAC-PGR respectivamente) generados con solvente 75/25 v/v, acetona/agua (Atala *et al.*, 2009). Un jugo comercial, elaborado a partir de uvas tintas prensadas entregó valores de 18,9 ± 0,4

mmol L⁻¹ para ORAC-FL (Dávalos *et al.*, 2005) y en vinos tintos valores entre 38 y 56 mmol L⁻¹ para ORAC-FL y entre 18 y 25 mmol L⁻¹ para ORAC-PGR (López-Alarcón *et al.*, 2011). Las diferencias encontradas en los valores ORAC-FL y ORAC-PGR muestran que los resultados son extremadamente dependientes de la molécula empleada (Atala *et al.*, 2009). En relación a la metodología de análisis ORAC-PGR presenta una ventaja al poder usar un espectrofotómetro de espectro visible para la determinación y al eliminar el tiempo de retardo (lag time) que presenta al inicio de la reacción, sin embargo ORAC-FL tiene la capacidad de poder detectar un rango más amplio de antioxidantes (López-Alarcón and Lissi, 2006; Ortiz *et al.*, 2011). Tanto ORAC-FL como ORAC-PGR se relacionan bien con componentes hidrofílicos, por lo que no existen diferencias en ese aspecto (Niki, 2010).

Tabla 9: Capacidad antioxidante del producto final y las mezclas que lo componen.

Muestra	ORAC-FL [mmol L ⁻¹]	ORAC-PGR [mmol L ⁻¹]	CUPRAC [mmol L ⁻¹]
Mezcla País	12,85 ± 0,0 ^a	9,08 ± 0,5 ^a	2,72 ± 0,3 ^a
Mezcla Tintorera	27,46 ± 0,0 ^c	14,23 ± 0,4 ^b	3,50 ± 0,3 ^b
Producto final (País + Tintorera)	19,64 ± 0,0 ^b	13,72 ± 0,1 ^b	3,62 ± 0,2 ^c

Letras diferentes en la misma columna indica diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Se puede observar que las muestras analizadas siguen una misma tendencia en los resultados; mezcla País < producto final < mezcla Tintorera (Tabla 9) para los análisis de ORAC-FL y ORAC-PGR. No ocurre así en el análisis CUPRAC, donde el producto final presenta un valor más alto, cercano al resultado obtenido en la mezcla Tintorera, lo que hace pensar que es éste cultivar el que tiene un mayor aporte a la capacidad antioxidante total. El resultado del producto final obtenido en ORAC-PGR también se ve influenciado mayormente por la mezcla Tintorera, no así en ORAC-FL, donde el resultado es aproximadamente un promedio de ambas mezclas.

Todo esto puede ser explicado a través de los diferentes mecanismos de reacción que presentan los distintos métodos. Los ensayos CUPRAC y ORAC-PGR se basan en la reducción del compuesto por la acción combinada de los antioxidantes (agentes reductores) por medio del mecanismo de reacción SET (single electron transfer), el cual se refiere a la habilidad del antioxidante para transferir algún electrón y reducir algún compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales. Por otro lado, el ensayo ORAC-FL se basa en el mecanismo de reacción HAT (hydrogen atom transfer), el cual mide la capacidad antioxidante por medio de la neutralización de los radicales libres por la donación de hidrógeno. Finalmente, cualquiera sea el método empleado el resultado final es el mismo, independientemente del mecanismo, pero la cinética y las reacciones secundarias difieren (Prior *et al.*, 2005; Ndhlala *et al.*, 2010; Apak *et al.*, 2013).

Es posible correlacionar los resultados para establecer si existe una relación entre éstos y la influencia de los mecanismos de reacción asociados. Los resultados de ORAC-FL/ORAC-PGR demostraron una correlación significativa con un valor $r=0,6428$ ($p=0,0094$, para un $\alpha = 0,05$). A pesar de existir esta correlación, ésta no es perfecta, quedando de manifiesto el hecho de que ambos métodos actúan por mecanismos diferentes. En ORAC-FL/PT (polifenoles totales) el valor $r=0,9652$ arrojó una correlación significativa ($p<0,0001$), ocurriendo lo mismo para ORAC-PGR/PT que obtuvo un $r=0,7602$ ($p=0,0022$). Los polifenoles totales (PT) analizados por medio del reactivo Folin-Ciocalteu y utilizando ácido gálico como antioxidante estándar han demostrado actuar por medio del mecanismo SET (Singleton *et al.*, 1999; Ndhlala *et al.*, 2010; Apak *et al.*, 2013). Considerando esto, debería haberse encontrado una mejor correlación entre ORAC-PGR/PT que entre ORAC-FL/PT, sin embargo ocurre todo lo contrario. Según Prior y colaboradores (2005), si bien el análisis realizado por Folin-Ciocalteu actúa preferentemente por el mecanismo SET, también puede actuar por medio de HAT. Adicionalmente, es importante considerar que los ensayos que demuestran el mecanismo SET han sido realizados utilizando ácido gálico como estándar, el cual es un antioxidante puro, en cambio las

muestras normalmente analizadas están compuestas por una matriz compleja donde se pueden encontrar sustancias que interfieren en la reacción como azúcares, aminos aromáticos, dióxido sulfuroso, ácido ascórbico, entre otras, además de sustancias orgánicas no fenólicas que reaccionan con Folin-Ciocalteu como adenina, adenosina, alanina y sustancias inorgánicas como hidracina, fosfato de sodio, nitrito de potasio, entre otras (Prior *et al.*, 2005; Ndhlala *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible entender que la reacción obtenida en el análisis de polifenoles en el jugo de uva se ha dado por medio del mecanismo HAT. Resultados obtenidos por Prior y colaboradores (2005) en extractos de arándanos y moras demuestran la misma tendencia, no así en extractos de porotos, lo que hace pensar que los polifenoles contenidos en berries tenderían a actuar por medio del mecanismo HAT.

4. Conclusiones

La metodología óptima de extracción de compuestos fenólicos desde el hollejo y semillas de la uva, hojas y tallos de la vid, se ve más favorecida por medio de la aplicación de calor en vez de la utilización de enzimas.

Los procesos de extracción con hollejos, hojas y tallos mejoraron las cualidades antioxidantes de todas las variedades utilizadas en comparación con sus respectivos jugos solos.

En general los extractos de hollejos y hojas presentaron mejores resultados en relación a polifenoles totales, antocianinas totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos específicos.

La mejor proporción de mezcla de los diferentes extractos para el producto final está dada por la razón 1:2:2 para hojas: hollejos: tallos. Las variedades que pueden aumentar significativamente su valor comercial por los compuestos antioxidantes son: País y Tintorera. La mejor aceptación sensorial por parte de los jueces está dada por una mezcla de 50:50 de ambas variedades.

El producto final presentó una capacidad antioxidante mayor que vinos analizados anteriormente a través del método de ABTS.

Los ensayos ORAC-FL y ORAC-PGR entregaron valores concordantes en tendencia. Se demostró que existe correlación lineal para ORAC-FL/ORAC-PGR, ORAC-FL/PT y ORAC-PGR/PT, sin embargo la mejor de éstas está dada por ORAC-FL/PT, demostrando que la actividad antioxidante de polifenoles de la vid actúa por medio del mecanismo HAT.

5. Agradecimientos

Agradecimientos a los proyectos FONDEF VIU 120010 y CD UCO 1201 por el financiamiento entregado. A Sociedad Viña Zamora Ltda. por la donación de materia prima e información relevante. A Cristina Loyola, Carola Vergara y Luis Bustamante por la ayuda otorgada. A Christian Folch Cano por la orientación dada. A los funcionarios de la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agrícola por el uso de su infraestructura.

6. Nota

Los resultados de esta investigación se encuentran protegidos bajo la solicitud de patente chilena de invención n°2014-02597.

7. Referencias

Abramovic, H., Terpinc, P., Generalic, I., Skroza, D., Klancnik, A., Katalinic, V., & Smole Možina, S. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 4(1), 1-8.

- Aguilar, T. (2012). Evaluación de la capacidad antioxidante en vinos tintos y sus respectivos mostos. Tesis de pregrado. Universidad de Concepción, Chile.
- Alarcón, E., Campos, A., Edwards, A., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2008). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*, *107*, 1114–1119.
- Alcalde-Eon, C., García-Estévez, I., Martín-Baz, A., Rivas-Gonzalo, J.C., & Escribano-Bailón, M. (2014). Anthocyanin and flavonol profiles of *Vitis vinifera* L. cv Rufete grapes. *Biochemical Systematics and Ecology*, *53*, 76-80.
- Ali, K., Maltese, F., Hae Choi, Y., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem Reviews*, *9*(3), 357–378.
- Amalfitano, C., Agrelli, D., Arrigo, A., Mugnai, L., Surico, G., & Evidente, A. (2011). Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by "esca proper". *Phytopathologia Mediterranea*, *50*, S224–S235.
- Amarowicz, R., Narolewska, O., Karamać, M., Kosińska, A., & Weidner, S. (2008). Grapevine leaves as a source of natural antioxidants. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, *58*(1), 73-78.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, *85*(5), 957–998.
- Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N., Trizoglou, I., Hayes, A., Tsatsakis, A., & Kouretas, D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food and Chemical Toxicology*, *61*, 60–68.
- Atala, E., Vásquez, L., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2009). Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry*, *113*, 331-335.
- Balik, J., Kyselakova, M., Vrchotova, N., Trista, J., Kumsta, M., Veverka, J., Hic, P., Totusek, J., & Lefnerova, D. (2008). Relations between polyphenols content and antioxidant activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, *26*, S25-S32.
- Barcia, M., Pertuzatti, P., Gómez-Alonso, S., Godoy, H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2014). Phenolic composition of grape and winemaking by-products of brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry*, *159*, 95–105.
- Bordeu, E. & J. Scarpa. (2000). Análisis químico del vino. (2a. ed.). Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Brouillard, R., Wigand, M., Dangles, O., & Cheminat, A. (1991). pH and solvent effect on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions II*, *2*, 1235-1241.

- Burin, V., Falcão, L., Gonzaga, L., Fett, R., Rosier, J., Bordignon-Luiz M. (2010). Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1027-1032.
- Burin, V., Ferreira-Lima, N., Panceri, C., & Bordignon-Luiz, M. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155–163.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I., (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 992–1002.
- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009a). Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 57, 7883–7891.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009b). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 57, 209–219.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 699–705.
- Cheynier, V., Moutounet, M., & Sarni-Manchado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. In: Flanzy, C. (Ed.), *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2nd ed. AMV, Ediciones/Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 120–121.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2005). Codex Stan 247-2005. Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. Roma, Italia.
- Dani, C., Oliboni, L., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Henriques, J., & Salvador, M. (2010). Phenol content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 24, 148-153.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93, 325–330.
- Dent, M., Dragovi-Uzelac, V., Peni, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84–91.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. 2015. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Eriz, G., Sanhueza, V., Roeckel, M., & Fernández, K. (2010). Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinifera* L. cv. País. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 860-865.

Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentão, P., Andrade, P., Bento, A., & Pereira, J. (2013). *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 43, 434–440.

Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139, 196–202.

Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J., Rivas-Gonzalo, J., & Escribano-Bailón, M. (2012). Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. *Analytica Chimica Acta*, 732, 73–77.

Figueiredo-González, M., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara J. (2013). Garnacha Tintorera-based sweet wines: Chromatic properties and global phenolic composition by means of UV–Vis spectrophotometry. *Food Chemistry*, 140, 217–224.

Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, O. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63(4), 435–440.

Galvis, J., Arjona, H., Fischer, G., Landwehr, T., & Martinez, R. (2002). Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la conservación del fruto de mango (*Manifera índiga* L) variety Van Dike. *Agronomía Colombiana*, 19(1-2), 23-25.

Gil, G., & Pszczolkowski, P. (2007). VitiCultura. Fundamentos para optimizar producción y calidad. (1ra ed.) Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Godoy, S., Roeckel, M., & Fernández, K. (2012). Influence of the structure and composition of the País grape proanthocyanidins on the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Food Chemistry*, 134, 346–350.

Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2014) Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*, 155, 256–263.

Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (2013). Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (*Solana melonera* L.). *Información Tecnológica*, 24(5), 93-102.

Hillmann, M., Burin, V., & Bordignon-Luiz, M. (2011). Thermal degradation kinetics of anthocyanins in grape juice and concentrate. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1997–2000.

Íñiguez M., Ortega, A. P., Rosales, A., Ayala, R., & Puras, P. (1995). Estudio del color de los vinos tintos de la D. O. C. Rioja. *Zubía monográfico*, 7, 167-186.

JMP®, Version 10.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007.

Karvela, E., Makris, D. P., Kalogeropoulos, N., & Karathanos, V. (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79, 1311–1321.

- Katalinic, V., Generalic, I., Skaroza, D., Ljuvenkov, I., Teskera, A., Konta, I., & Boban, M. (2009). Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, *1*(2), 7-15.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(3), 217–233.
- Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, *88*(5), 1269-1278.
- Ley Nº18445. Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Diario Oficial de la República de Chile. 11 nov. 1985. Santiago, Chile.
- Likhtenshtein, G. (2010). Stilbenes. Applications in chemistry, life sciences and material science. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 337-348.
- Lima, M., Silani, I., Toaldo, I., Corrêa, L., Telles Biasoto, A., Pereira, G., Bordignon-Luiz, M., & Ninow, J. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, *161*, 94–103.
- Llobera, A. (2012). Study on the Antioxidant Activity of Grape Stems (*Vitis vinifera*). A Preliminary Assessment of Crude Extracts. *Food and Nutrition Sciences*, *3*, 500-504.
- López-Alarcón, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radical Research*, *40*(9), 979–985.
- López-Alarcón, C., Ortíz, R., Benavides, J., Mura, E., & Lissi, E. (2011). Use of the ORAC-pyrogallol red/ORAC-fluorescein ratio to assess the quality of antioxidants in Chilean wines. *Journal of the Chilean Chemical Society*, *56*(3), 764-767.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, *17*(6), 271–278.
- Ministerio de salud. (2011). Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto N° 977/96. Santiago, Chile.
- Mohammedi, Z., & Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *2*, 610-611.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*, 85–118.

- Monagas, M., 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.
- Monagas, M., Garrido, I., Lebrón-Aguilar, R., Bartolome, B., & Gomez-Cordoves, C. (2007). Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 8498– 8507.
- Morel-Salmi, C., Souquet, J., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4270-4276.
- Moreno-Montoro, M., Olalla-Herrera, M., Gimenez-Martinez, R., Navarro-Alarcon, M., & Rufián-Henares, J. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, *38*, 19–26.
- Ndhkala, A., Moyo, M., & Van Staden, J. 2010. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?. *Molecules*, *15*, 6905-6930.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, *49*, 503–515.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Cáceres-Mella, A., Toledo-Araya, H., & López-Rivera, A. (2013). Phenolic composition of skins from four Carmenere grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT – Food Science and Technology*, *54*, 404–413.
- Orhan, E., Esitken A., Ercisli S., Turan M., & Sahin F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, *111*, 38–43.
- Ortiz, R., Antilén, M., Speisky, H., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. 2011. Analytical parameters of the microplate-based ORAC-Pyrogallol Red assay. *Journal of AOAC International*, *94*(5), 1562- 1566.
- Pereira, M., Corrêa, L., Carvalho de Souza, S., Pereira, G., & de Oliveira, L. (2013). Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal*, *110*, 665–674.
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S., Silvestre, A., Neto, C., Câmara, J., & Rocha, S. (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSn: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry*, *135*, 94–104.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 4290-4302.

- Rabe, E., Stücker, M., Esperester, A., Schäfer, E., & Ottillinger, B. (2011). Efficacy and tolerability of a red-vine-leaf extract in patients suffering from chronic venous insufficiency results of a double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, *41*, 540-547.
- Rebolo, S. (2007). Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Ribeiro, J., Magalhães, L., Reis, S., Lima, J., & Segundo, M. (2011). High-throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Analytical Sciences*, *27*, 483-488.
- Río, S., Pace, C., Torchio, F., Giacosa, S., Gerbi, V., & Rolle, L. (2015). Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. *Food Research International*, *71*, 50–57.
- Rodríguez-Pérez C., Muros, J., & López, H. (2010). Relación entre las temperaturas máximas y los distintos parámetros de calidad en vinos. *ARS Pharmaceutica*, *51*(3), 31-39.
- Ruhl, E. (1989). Uptake and distribution of potassium by grapevine rootstocks and its implication for grape juice pH of scion varieties. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *29*, 707-712.
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodriguez, R., Arribillag, D., & Dominguez, E. (2013). Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, *1281*, 38–45.
- Seeram, N., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S., Feng, L., Dreher, M., & Heber, D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 1415–1422.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.
- Sui,X., Dong, X., & Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, *163*, 163–170.
- Sun, Y., Wang, Z., Wu, J., Chen, F., Liao, X., & Hu, X. (2006). Optimising enzymatic maceration in pretreatment of carrot juice concentrate by response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, *41*, 1082–1089.
- Suriano, S., Alba, V., Tarricone, L., & di Gennaro, D. (2015). Maceration with stems contact fermentation: Effect on proanthocyanidins compounds and color in Primitivo red wines. *Food Chemistry*, *177*, 382–389.
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., & Winterhalter, P. (2011). Stilbene Levels in grape cane of different cultivars in southern Chile:

Determination by HPLC-DAD-MS/MS. *Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 929–933.

Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

Xiaoyong, S., & Luming, C. (2014). Phenolic constituents, antimicrobial and antioxidant properties of blueberry leaves (V5). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(12), 973-979.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.



Anexo I: Concentraciones individuales y total (mg L⁻¹) de antocianinas para cada extracto (n=2).

	Delfinidina- 3-glucosido	Cianidina -3- glucosido	Petunidina- 3-glucosido	Peonidin a-3- glucosido	Malvidina- 3- glucosido	Delfinidina- acetil- glucosido	Petunidina-3- acetil- glucosido	Malvidina- acetil- glucosido	Malvidina- cumaroil- glucosido	Total [mg L ⁻¹]	D.S.	
tR(DAD)	16,86	19,10	20,23	22,54	23,36	25,26	30,82	34,30	39,88			
Hollejos	Cabernet Sauvignon	100,5	26,8	72,5	63,2	298,9	25,0	24,9	135,7	23,7	771,3	1,2
	Merlot	56,4		68,9	69,6	323,7	-	-	75,0	52,0	645,6	1,4
	Syrah	62,5	47,6	54,5	74,8	186,7	-	-	52,9	-	479,0	6,2
	País	-	-	-	-	97,5	-	-	-	-	97,5	0,0
	Moscatel de Alejandría	-	-	-	-	97,7	-	-	-	-	97,7	0,0
	Tintorera	231,9	-	271,6	532,9	1562,5	-	-	396,4	-	2995,2	0,3
Hojas	Cabernet Sauvignon	53,3	-	-	-	-	-	-	-	53,3	1,8	
	Merlot	-	-	-	-	45,2	-	-	-	45,2	0,1	
	Syrah	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	País	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Moscatel de Alejandría	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tintorera	-	-	-	426,0	716,6	-	-	-	-	1142,6	0,1
Tallos	Cabernet Sauvignon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Merlot	-	-	-	-	28,2	-	-	-	28,2	0,1	
	Syrah	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	País	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Moscatel de Alejandría	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tintorera	-	-	-	234,8	638,1	-	-	-	-	872,9	0,2
Jugo	Cabernet Sauvignon	-	-	-	-	26,6	-	-	-	26,6	0,3	
	Merlot	-	-	-	-	36,1	-	-	-	36,1	0,0	
	Syrah	-	-	-	-	26,4	-	-	-	26,4	0,0	
	País	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Moscatel de Alejandría	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tintorera	-	-	-	527,0	1418,5	-	-	348,2	-	2293,7	0,4

Anexo III: Concentraciones individuales y total (mg L⁻¹) de ácidos fenólicos para cada extracto (n=2).

	Hexóxido de ácido gálico	Hexóxido de ácido protocatecuico	Hexóxido de ácido ferúlico	Ácido clorogénico	Ácido caftárico	Desconocido	Ácido coutárico	Total (mg L ⁻¹)	D. S.	
tR(DAD)	6,76	7,38	8,09	8,55	10,17	13,06	13,47			
Hollejos	Cabernet Sauvignon	-	-	-	-	1,9	-	2,2	4,1	0,0
	Merlot	-	-	-	-	1,6	4,4	3,1	9,1	0,0
	Syrah	-	-	-	-	-	1,6	-	1,6	0,0
	País	-	-	-	-	36,6	-	8,3	44,9	0,6
	Moscatel de Alejandría	2,3	2,3	-	-	12,4	-	3,0	20,1	0,0
	Tintorera	2,1	2,0	4,2	-	4,0	6,0	2,6	20,9	0,1
Hojas	Cabernet Sauvignon	6,1	5,5	3,4	3,4	103,5	-	12,2	134,1	0,1
	Merlot	7,3	4,7	2,4	1,9	130,3	-	18,6	165,2	9,9
	Syrah	4,0	6,4	4,0	-	214,9	-	22,4	251,5	0,4
	País	4,5	4,6	3,9	-	76,8	-	17,5	107,4	1,4
	Moscatel de Alejandría	5,8	8,4	4,5	1,7	161,3	-	17,7	199,4	0,2
	Tintorera	6,3	6,6	3,3	10,4	124,9	1,8	20,9	174,2	0,1
Tallos	Cabernet Sauvignon	2,5	1,5	-	-	3,0	-	-	6,9	0,4
	Merlot	2,3	1,5	-	-	6,1	-	3,3	13,2	0,7
	Syrah	3,0	-	-	-	4,3	-	1,6	8,9	1,9
	País	1,5	1,5	-	-	16,2	-	6,2	25,4	13,2
	Moscatel de Alejandría	3,1	3,4	-	-	15,6	-	3,6	25,7	1,3
	Tintorera	1,7	2,0	-	-	5,3	1,8	2,2	13,0	0,4
Jugos	Cabernet Sauvignon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Merlot	5,0	-	-	-	-	-	-	5,0	0,0
	Syrah	3,0	-	-	-	-	-	-	3,0	0,6
	País	1,7	-	-	1,7	4,0	-	-	7,3	1,6
	Moscatel de Alejandría	2,3	1,8	-	-	-	-	-	4,2	0,2
	Tintorera	-	-	-	-	-	1,7	-	1,7	0,0

Anexo IV: Concentraciones individuales y total (mg L⁻¹) de flavan-3-oles para cada extracto (n=2).

		Dimero de catequina	Catequina	Epicatequina	Total [mg L ⁻¹]	D.S.
		tR(DAD)	9,01	11,93	14,08	
Hollejos	Cabernet Sauvignon	20,3	195,8	78,7	294,8	5,5
	Merlot	23,7	77,7	50,6	152,0	0,7
	Syrah	7,9	50,5	14,5	72,9	5,6
	País	10,9	42,3	25,5	78,7	5,5
	Moscatel de Alejandría	8,5	199,1	122,7	330,3	0,5
	Tintorera	26,7	96,6	92,4	215,8	0,5
Hojas	Cabernet Sauvignon	25,7	749,4	66,5	841,7	36,9
	Merlot	61,7	18,8	40,1	120,6	2,5
	Syrah	24,1	34,4	42,7	101,1	7,4
	País	22,2	48,5	36,1	106,9	7,6
	Moscatel de Alejandría	29,6	2,7	48,3	80,7	23,4
	Tintorera	54,0	110,1	82,4	246,6	1,6
Tallos	Cabernet Sauvignon	8,7	43,3	11,3	63,3	1,9
	Merlot	16,4	146,8	47,0	210,2	33,1
	Syrah	2,8	41,0	15,5	59,2	0,2
	País	2,9	6,76	8,0	17,7	1,9
	Moscatel de Alejandría	8,7	39,8	5,3	53,7	5,1
	Tintorera	24,0	45,5	11,6	81,2	16,4
Jugo	Cabernet Sauvignon	2,7	1,8	0,0	4,4	1,7
	Merlot	1,0	0,2	0,8	2,0	0,0
	Syrah	1,4	3,2	2,2	6,8	0,2
	País	7,9	-	-	7,9	0,0
	Moscatel de Alejandría	6,5	1,9	0,2	8,6	1,6
	Tintorera	11,8	54,2	14,4	80,4	8,2