

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA



UTILIZACIÓN DE ORUJO DE UVA PARA LA ELABORACIÓN DE
EXTRACTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA

CHRISTIAN ANDRÉS PALMA FERNÁNDEZ

HABILITACIÓN PROFESIONAL
PRESENTADA A LA FACULTAD DE
INGENIERÍA AGRÍCOLA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL

CHILLÁN-CHILE

2023

**UTILIZACIÓN DE ORUJO DE UVA PARA LA ELABORACIÓN DE
EXTRACTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA**

Christian Folch Cano
Profesor de Química y Cs. Naturales, Dr.
Profesor Asociado

Profesor Guía

Valeria Velasco Pizarro
Ingeniera en Alimentos, Ph. D.
Profesor Asociado

Profesor Asesor

Gastón Merlet Venturelli
Ingeniero Civil en Química, Dr.
Profesor Asistente

Profesor Asesor

Pedro Melín Marín
Ingeniero Agrónomo, M.S.
Profesor Asociado

Director de Departamento (I)

María Eugenia González Rodríguez
Ingeniera Agrónomo, Ph. D.
Profesor Asociado

Decana

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo general:	4
3.2. Objetivos específicos:.....	4
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
4.1. Producción en Chile	5
4.2. Valle del Itata y Valle del Maule	6
4.3. Proceso de vinificación del vino	7
4.4. Orujo de uva.....	8
4.5. Composición química del orujo de uva.....	9
4.5.1. Antioxidantes y radicales libres	9
4.6. Compuestos fenólicos	10
4.7. Compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva	12
4.8. Métodos de extracción de compuestos fenólicos	14
4.8.1. Extracción por maceración.....	14
4.8.2. Extracción por lixiviación	14
4.8.3. Extracción Soxhlet.....	14
4.9. Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos	15
4.9.1. Folin-Ciocalteu	15
4.9.2. Flavonoides totales	15
4.10. Métodos de determinación de capacidad antioxidante.....	16
4.10.1. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)	16
4.10.2. Inhibición del radical DPPH.....	16
4.10.3. ABTS.....	16
4.10.4. Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)	17
4.11. Actividad antimicrobiana.....	17
4.12. Estructura bacteriana	19

	Página
4.12.1. <i>Gramnegativas</i>	20
4.12.2. <i>Grampositivas</i>	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Acondicionamiento de la muestra y extracción de compuestos fenólicos	21
5.2. Determinación de Contenido de Compuestos fenólicos totales (CFT)	22
5.3. Determinación de Flavonoides totales.....	22
5.4. Determinación de la capacidad antioxidante	23
5.5. Determinación de la capacidad antimicrobiana	24
5.6. Estimación del impacto ambiental de la elaboración del extracto	25
5.7. Análisis estadístico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	26
6.2. Determinación de capacidad antioxidante	28
6.2.1. Método ORAC	28
6.2.2. Método DPPH	30
6.2.3. Método FRAP.....	31
6.3. Determinación de capacidad antimicrobiana.....	32
6.4. Impacto ambiental de la elaboración del extracto a escala piloto.....	34
6.4.1. Elaboración del extracto a escala piloto	34
6.4.2. Gastos económicos de la elaboración del extracto	38
6.4.3. Impacto ambiental del proceso de extracción	40
7. CONCLUSIÓN.....	43
8. LITERATURA CITADA	44
9. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción nacional vitícola por región en el año 2020 (Elaboración propia).....	5
Figura 2. Clasificación de los polifenoles y compuestos representativos (Modificado de Villamil, 2021).....	11
Figura 3. Estructura básica de 2-Fenil-Y-cromona. Adaptado de Luengo, 2002.....	12
Figura 4. Principales compuestos fenólicos que se encuentran en el orujo de uva (Modificado de Beres, et al., 2017).	13
Figura 5. Imagen de cada extracto obtenido por maceración etanol (60% - agua destilada (40%).....	22
Figura 6. Secadora de bandejas (PROCTOR).....	35
Figura 7. Molino de martillos.....	36
Figura 8. Marmita enchaquetada.....	37
Figura 9. Filtro prensa.....	38
Figura 10. Diagrama del proceso de elaboración del vino.....	57
Figura 11. Halos de inhibición de los resultados de la prueba de susceptibilidad a <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella</i> spp.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Ranking de países con mayor producción de uvas a nivel mundial en 2017. Adaptado de Khan, et al., (2020).	2
Tabla 2: Comparación de los resultados de la prueba de compuestos fenólicos totales y la prueba de flavonoides totales.	26
Tabla 3: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método ORAC – FL.	29
Tabla 4: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método DPPH expresado en mg de extracto necesario para inhibir el 50% de los radicales.	30
Tabla 5: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método FRAP.	31
Tabla 6: Longitud de los halos de inhibición en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.	33
Tabla 7: Consumo de energía de los equipos en Watts.	38

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Porcentaje de inhibición.....	23

**UTILIZACIÓN DE ORUJO DE UVA PARA LA ELABORACIÓN DE
EXTRACTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIMICROBIANA**

USE OF GRAPE POMACE FOR THE PREPARATION OF EXTRACTS WITH
POTENTIAL ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Palabras claves: Extracto, radicales libres, impacto ambiental.

RESUMEN

El orujo de uva es el principal subproducto de la producción de vino, el cual representa cerca del 25% de la uva y posee cerca del 70% de los antioxidantes presentes en el fruto. El objetivo de este trabajo es elaborar extractos ricos en compuestos fenólicos a partir del orujo de uva de cuatro cepas diferentes (*Merlot*, *Carmenere*, *Syrah* y *Cabernet Sauvignon*). Los extractos fueron evaluados determinando su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, su capacidad antioxidante, la capacidad antimicrobiana y el potencial impacto ambiental y económico de su desarrollo a escala piloto. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de los antioxidantes indican que los mejores extractos son los obtenidos a partir de *Merlot* y *Carmenere* que también presentaron zonas de inhibición para *S. aureus*, pero que no cumplieron con los requisitos para ser considerados como inhibitorios. Con respecto a la elaboración del extracto a escala piloto no representa impactos significativos al ambiente, sin embargo, su producción a una escala mayor no sería rentable por los gastos económicos que involucra su desarrollo.

USE OF GRAPE POMACE FOR THE PREPARATION OF EXTRACTS WITH POTENTIAL ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Keywords: Extract, free radicals, environmental impact.

SUMMARY

Grape pomace is the main by-product of wine production, which represents about 25% of the grape and possesses about 70% of the antioxidants present in the fruit. The main goal of this work was to elaborate extracts rich in phenolic compounds from grape pomace of four different grape varieties (*Merlot*, *Carmenere*, *Syrah* and *Cabernet Sauvignon*). The extracts were evaluated by determining their content of total phenolic compounds, total flavonoids, antioxidant capacity, antimicrobial capacity and the potential environmental and economic impact of their development on a pilot scale. The results obtained from the antioxidant tests indicate that the best extracts are those obtained from *Merlot* and *Carmenere*, which also presented zones of inhibition for *S. aureus*, but did not meet the requirements to be considered inhibitory. With respect to the preparation of the extract on a pilot scale, it does not represent significant impacts on the environment; however, its production on a larger scale would not be profitable due to the economic costs involved in its development.

1. INTRODUCCIÓN

La uva se compone de 81% de agua, 18% carbohidratos y 1% proteína. Su cultivo se remonta hacia el siglo VI y VIII en oriente, y por efecto de la levadura presente en la piel de la uva de forma natural provocando que esta se fermente, se descubrieron las bebidas alcohólicas como el vino (Khan, *et al.*, 2020). Actualmente, es utilizada mayormente en la producción de vinos (71%), como fruta fresca (27%) y como fruta seca (2%).

Durante el año 2017 los mayores productores de vino fueron China, Italia, Estados Unidos, Francia, España, Turquía, India, África del Sur, Chile y Argentina (Tabla 1). Además, las cepas más utilizadas para hacer vinos son la *Sultana* y la *Airén*, seguidas de *Cabernet Sauvignon*, *Sauvignon blanc*, *Cabernet Franc*, *Merlot*, *Garnacha*, *Tempranillo*, *Riesling* y *Chardonnay* (Khan, *et al.*, 2020).

El orujo de uva es el principal subproducto del proceso de vinificación, el cual posee alrededor del 70% aproximadamente de los compuestos fenólicos del fruto (Ky, Lorrain, Kolbas, Crozier, & Teissedre, 2014). Además, representa cerca del 25% de la masa total de la uva usada en la elaboración del vino (Beres *et al.*, 2017). En la actualidad el orujo de uva no se usa de una forma eficiente, ya que se utiliza comúnmente como fertilizante, alimento para animales o simplemente se incinera desaprovechando todos los compuestos de éste como los antioxidantes, así como también contribuyendo a la contaminación ambiental (Díaz, 2020).

Tabla 1: Ranking de países con mayor producción de uvas a nivel mundial en 2017. Adaptado de Khan, et al., (2020).

Puesto	País	Cantidad (Ton)
1	China	13.083.000
2	Italia	7.169.745
3	Estados Unidos	6.679.211
4	Francia	5.915.882
5	España	5.387.379
6	Turquía	4.200.000
7	India	2.922.000
8	África del Sur	2.032.582
9	Chile	2.000.000
10	Argentina	1.965.206

Según Beres *et al* (2017) se calcula que en nuestro país se generan 300 toneladas de orujo de uva al año, que se desperdician y contribuyen a la contaminación del suelo (exceso de fertilizantes) y del aire (incineración). En las regiones de Ñuble y del Maule se produjeron un total de 1.200.828 L de vino, de los cuales se estima que equivalen a 1.601.104 kg de uva y 400.276 kg de orujo de uva para Ñuble y un total de 363.179.382 L de vino, de los cuales se estima que equivalen a 485.572.509,3 kg de uva y 121.393.127,3 kg de orujo de uva para el Maule (ODEPA, 2021). En este sentido, una de las metas que se espera alcanzar es catalogar tales desechos como "subproductos", con el objetivo de reducir sus impactos negativos, así como

también para obtener materiales de alto valor agregado. Una alternativa es elaborar extractos que tengan compuestos antioxidantes a partir del orujo de uva, para evaluar su potencial actividad antioxidante y antimicrobiana. Por lo anterior, se busca obtener un extracto abundante en compuestos fenólicos y agregar valor a este subproducto que se subestima en estos días, ayudando a reducir la contaminación y aprovechar al máximo sus beneficios.

A través de esta investigación, se podrá obtener un extracto de materias primas de origen local, el cual se puede utilizar para diversos fines tales como; complemento funcional en la producción de alimentos (Rózek, *et al.*, 2010), pueden incorporarse en películas de quitosano, otorgando propiedades antioxidantes prolongando la vida útil (Ferreira, *et al.*, 2013). Además, se ha utilizado como preservante en carnes como cordero y hamburguesas de cerdo (Guerra-Rivas *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha establecido su aplicación cosmética al inhibir la actividad enzimática asociada al envejecimiento de la piel (Wittenauer, *et al.*, 2015).

También se describirán las estimaciones de costos operacionales, gastos energéticos, impactos ambientales a escala laboratorio para luego hacer un escalamiento teórico a escala piloto y tener una proyección de estos resultados para que sirva como base para otras investigaciones.

2. HIPÓTESIS

Se pueden obtener extractos de orujo de uva con potencial actividad antioxidante y antimicrobiana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Evaluar la elaboración de un extracto de orujo de uva con potencial actividad antioxidante y antimicrobiana.

3.2. Objetivos específicos:

- Seleccionar una metodología de extracción de antioxidantes a partir del orujo de uva.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del extracto.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto.
- Describir el impacto ambiental y costos operacionales de la elaboración del extracto a escala piloto.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Producción en Chile

En nuestro país se destinan aproximadamente 136.166,24 hectáreas de viñedos para la producción de vinos, de las cuales 35.717,13 hectáreas son para vino blanco y 100.449,11 hectáreas son para vino tinto. Su distribución a nivel regional se concentra mayormente en las regiones del Maule, del L.G.B. O'Higgins, Metropolitana y Ñuble (SAG, 2020) como se muestra en la Figura 1. También, existe una gran variedad de cepas que se utilizan en el país como son *Cabernet Sauvignon – Cabernet, Merlot, País - Mission, Criolla, Sauvignon Blanc y Moscatel De Alejandría - Blanca Italia*, entre otras.

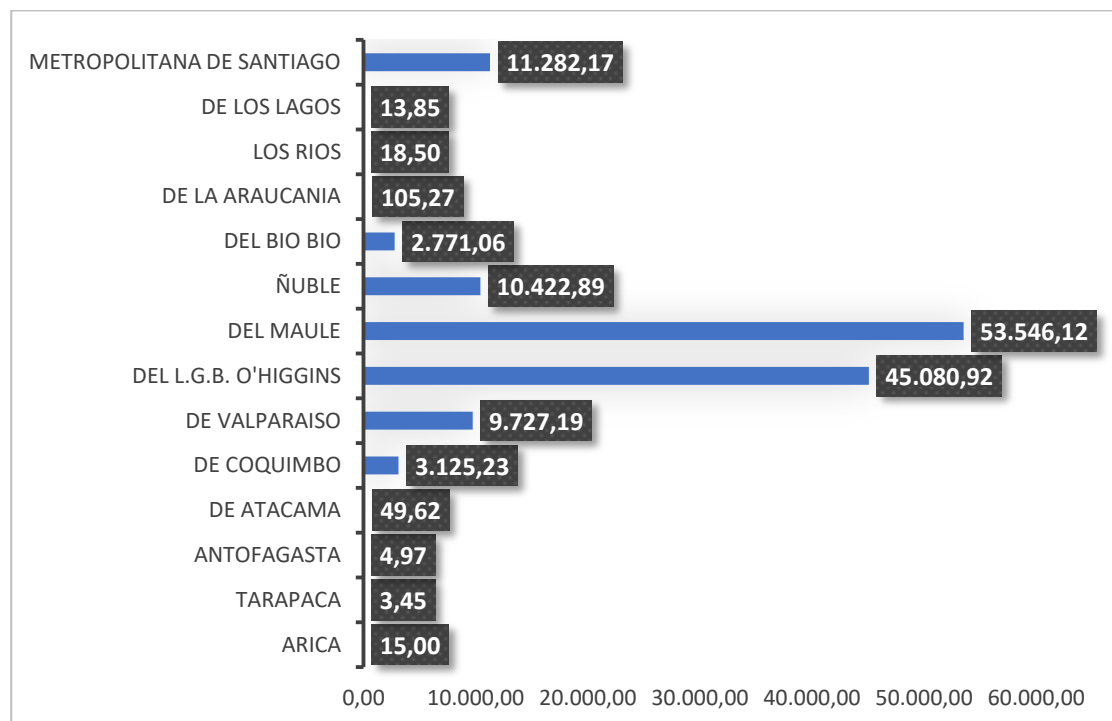


Figura 1. Producción nacional vitícola por región en el año 2020 (Elaboración propia).

4.2. Valle del Itata y Valle del Maule

Uno de los lugares más antiguos de producción de vinos en Chile es el Valle del Itata, que se encuentra principalmente en la región de Ñuble y se ubica en la zona vitícola del sur que comprende las comunas de Chillan, Coelemu, Ránquil, Quillón, Portezuelo, Ninhue, Trehuaco, Quirihue, San Nicolás, Bulnes, San Carlos y Florida que pertenece a la provincia de Concepción de la Región del Biobío (Ministerio de Agricultura, 1995). En este Valle se trabajan principalmente con las cepas *País - Mission Criolla*, *Moscatel De Alejandría - Blanca Italia* y *Cinsault* (SAG, 2020). Se estima que el 2021 se produjeron 34.733 kg de uva y 6.512,5 kg de orujo de uva en la región de Ñuble (Flaño, 2022).

El Valle del Maule se encuentra en la región del Maule y se conforma por la provincia de Talca, con excepción de la comuna de Río Claro, la provincia de Linares y la comuna de Cauquenes de la provincia del mismo nombre de la VII Región Administrativa del Maule y en él se encuentran las siguientes Zonas: Valle del Claro, Valle del Loncomilla y Valle del Tutuvén (Ministerio de Agricultura, 1995). Aquí se destacan las cepas *Chardonnay*, *Sauvignon Blanc*, *Cabernet Sauvignon Sauvignon* y *País - Mission Criolla* (SAG, 2020). Se estima que el 2021 se produjeron 831.169 kg de uva y 207.792,25 kg de orujo de uva (Flaño, 2022).

4.3. Proceso de vinificación del vino

El proceso de elaboración del vino empieza con la recolección de las uvas, acción también conocida como la vendimia, pero dependiendo del producto final que se quiera conseguir, la elaboración del vino puede cambiar. De manera habitual, se requiere 1 kg de uvas para obtener 0,75 L de vino tinto. Luego de la vendimia, viene el despallado, aquí la uva se limpia dejando solo las uvas sueltas. Posteriormente, se pasa al estrujado donde se pasan por una máquina estrujadora que se encarga de romper la piel dando como resultado una pulpa líquida o llamada mosto que se compone de jugo, hollejo y semillas. Antes de la fermentación, se le modifica su temperatura entre 26 a 30°C para pasarla por un proceso de maceración, que permite que el hollejo de la uva se ablande y así poder extraer los compuestos aromáticos y taninos de la piel, lo que es muy importante en el proceso de elaboración del vino tinto (Amienyo, Camilleri and Azapagic, 2014). En la fermentación del mosto, se hace fermentar el jugo y la piel con levaduras naturales presentes en la piel de la uva, pero comúnmente se utilizan *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* a aproximadamente 28 a 30 °C, con el fin de convertir los azúcares en alcohol y también obtener los pigmentos del hollejo como las antocianinas, las cuales se encargan de darle el color rojo al vino tinto, esta etapa dura entre una a dos semanas. Por otro lado, durante la fermentación del vino blanco solo se utiliza el jugo (Beres *et.al.*, 2017). Posteriormente, al cabo de las dos semanas, ocurre el prensado donde se extrae el jugo restante de la piel de la uva, dejando como residuos el orujo de

uva. Luego, se hace pasar el jugo del prensado, por una segunda fermentación con bacterias y levaduras para convertir el ácido málico en láctico y así mejorar el sabor del vino. Finalmente, el vino tinto se clarifica, se filtra y se deja añejando durante un tiempo que dependerá de cómo se quiera el vino, para luego embotellarse (Amienyo, Camilleri, Azapagic, 2014), el proceso de la elaboración del vino se ve resumido en el anexo A.

4.4. Orujo de uva

El orujo de uva es el residuo resultante del proceso de vinificación de la uva el cual se obtiene en la etapa de prensado. Poseen alrededor del 70% aproximadamente de los compuestos fenólicos luego del proceso de vinificación, además, este subproducto representa cerca del 25% del peso de la uva usada en la elaboración del vino y se compone de piel, tallo, pulpa residual y semillas. Las semillas de la uva poseen una gran cantidad de antioxidantes como los ácidos fenólicos, flavonoides y demás, también contienen entre un 13% y un 19% de aceite, que es rico en ácidos grasos esenciales, cerca de un 11% de proteínas y un 60-70% de carbohidratos no digeribles (Baydar and Akkurt, 2001), mientras que la piel tiene numerosas antocianinas. Los beneficios para la salud de los polifenoles del orujo de uva han llamado la atención de los investigadores, así como también algunas industrias como la alimentaria. Aparte de los antioxidantes fenólicos, también contiene una cantidad considerable de lípidos, proteínas, fibra no digerible y minerales (Baydar and Akkurt, 2001).

4.5. Composición química del orujo de uva

4.5.1. Antioxidantes y radicales libres

La oxidación es esencial para la obtención de energía en los organismos aerobios para realizar procesos biológicos. Sin embargo, la producción excesiva de radicales libres derivados del oxígeno puede dañar las células y sus funciones, lo que se conoce como estrés oxidativo (Ramírez, 2013). Cuando hay un desequilibrio entre sustancias oxidantes y mecanismos antioxidantes encargados de eliminarlas, puede deberse a una falta de antioxidantes, lo que puede reducir la capacidad de eliminar estas sustancias químicas (García, 2011).

El estrés oxidativo puede dañar y causar la muerte de las células al oxidar la membrana lipídica, proteínas, ADN y enzimas que participan en la respiración celular (Ramírez, 2013). Los radicales libres son partículas muy reactivas que tienen un electrón faltante y buscan estabilidad electroquímica al captar un electrón de otras moléculas. Una vez que un radical libre consigue un electrón, la molécula que lo donó se convierte también en un radical libre al quedarse sin un electrón y se inicia una reacción de oxidación en cadena (Maldonado et al., 2010).

El cuerpo produce radicales libres en cierta medida para luchar contra virus y bacterias, pero es necesario que haya una sustancia que controle su acción oxidante liberando electrones en la sangre, ya que estos son captados por los radicales libres, para evitar daños a las células y el ADN (Ramírez, 2020).

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en bajas concentraciones comparadas con los sustratos oxidables (como lípidos, proteínas y ADN) y retrasan o evitan la oxidación temprana de estos sustratos. En otras palabras, los antioxidantes contrarrestan los efectos de los radicales libres, previniendo el daño oxidativo (Ndhlala et al., 2010).

Según Emad, *et al.*, (2017) los antioxidantes se pueden definir como "sustancias que, en pequeñas cantidades, son capaces de prevenir o retrasar en gran medida la oxidación de compuestos fácilmente oxidables". Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos, los no enzimáticos y enzimáticos (Emad, Nawal y Ahmed, 2017).

- Antioxidantes no enzimáticos: Son aquellos que se adquieren de forma externa como por ejemplo las comidas o la dieta. En este grupo pueden encontrarse las vitaminas A, E y C, flavonoides y licopeno.
- Antioxidantes enzimáticos: Son proteínas (enzimas) aquellos que produce el cuerpo y que contrarrestan los efectos de los radicales libres.

4.6. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo. Dichos compuestos muestran una amplia variedad de actividades bioquímicas tales como: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antiviral, antiproliferativa, antimutagénica, anticarcinogénica, acciones

vasodilatadoras, y prevención de enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos (Villamil, 2021).

Se han clasificado los compuestos fenólicos en cinco grupos principales: taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, amidas polifenólicas, flavonoides y otros, como se muestra en la Figura 2 (Rong, 2010).

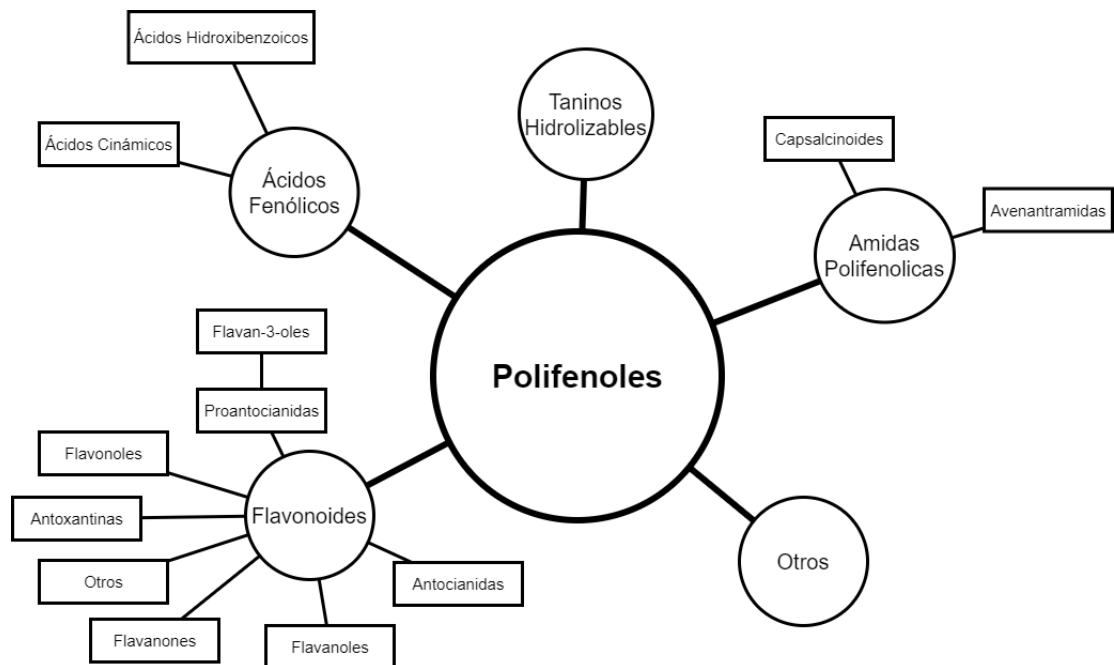


Figura 2. Clasificación de los polifenoles y compuestos representativos (Modificado de Villamil, 2021).

Los flavonoides, son el grupo predominante dentro de los polifenoles, estos se componen de siete subgrupos, además comparten la misma estructura base, que son dos anillos aromáticos (A y B), con distintas sustituciones de tipo hidroxilo, unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo piránico (C) (Andersen and Markham, 2005).

La estructura de estos compuestos fenólicos es del tipo $C_6-C_3-C_6$, la cual tiene dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada por un oxígeno (Figura 3). Se piensa que su estructura proviene de la cromona con un fenilo en posición 2 (Luengo, 2002).

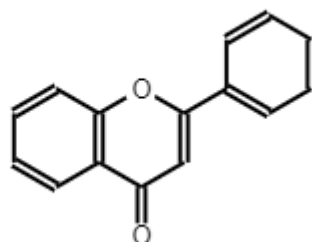


Figura 3. Estructura básica de 2-Fenil-Y-cromona. Adaptado de Luengo, 2002.

También, los flavonoides son la clase más abundante de los fenoles presentes en los alimentos, ya que abarcan un $2/3$ de los fenoles consumidos en la dieta, siendo sucedidos por los taninos, los cuales son una fuente importante de antioxidantes también (Paladino, 2008).

4.7. Compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva

Los fenoles presentes en el orujo se pueden clasificar en general en tres grupos principales, como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Figura 4).

Compuestos Fenólicos	Fenoles Simples	Acido Hidroxibenzoicos	Ácido Cafeico Ácido Ferúlico Ácido Gálico
		Acido Hidroxinamicos	Ácido Protocatecuico Ácido Sirinico Ácido Gentílico
		Polifenoles	Flavonoides
		Estilbenos	Resveratrol
		Taninos	Proantrocianidinas Galotaninos Elagitaninos

Figura 4. Principales compuestos fenólicos que se encuentran en el orujo de uva (Modificado de Beres, et al., 2017).

El orujo de uva es rico en compuestos fenólicos (CF) extraíbles, dependiendo de la variedad. Las pieles de la uva han demostrado contener una gran cantidad en antocianinas, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y glucósidos de flavonol, mientras que el ácido gálico y flavonoides se ubican en mayor medida en las semillas (Xia, *et al.*, 2010). La catequina es el más abundante de todos los flavonoides, esta se encuentra en semillas y piel de uva. También, los ácidos fenólicos, principalmente hidroxicinámico se encuentran en la piel y la pulpa, los flavonoles, derivados de estilbenos y antocianinas se encuentran solo en la piel (Brenes et al., 2016).

4.8. Métodos de extracción de compuestos fenólicos

La extracción es el proceso de separación de uno o más componentes de una mezcla compleja, su finalidad es conseguir un componente específico para agregar valor al producto. El proceso de separación puede ser clasificado según sea la naturaleza del material extraído o clasificado por el tipo de fases en contacto, como sólido-líquido, líquido-líquido, etcétera (Naranjo, 2016).

Según Ramírez (2020) las técnicas convencionales para extracción sólido - líquido son las que se señalan a continuación:

4.8.1. Extracción por maceración: es un proceso en el que se sumerge un material sólido en un líquido (como agua, alcohol o aceite) y se deja en reposo durante un período de tiempo para permitir que las sustancias solubles se liberen lentamente en el líquido.

4.8.2. Extracción por lixiviación: La extracción por lixiviación es un proceso en el cual se extraen sustancias solubles de un material sólido mediante el uso de un disolvente líquido que se filtra a través del material.

4.8.3. Extracción Soxhlet: Es un método de extracción química que se utiliza para separar un compuesto específico de una muestra sólida o semisólida. Se lleva a cabo por equipo llamado "Soxhlet", que consiste en un matraz redondo con fondo plano, un condensador, un tubo de desbordamiento y un calentador. El matraz se llena con un disolvente líquido

y se calienta para que el disolvente se evapore y ascienda hacia el condensador. El disolvente condensado vuelve a caer en el matraz y se filtra a través de la muestra sólida o semisólida contenida en el tubo de desbordamiento. Este proceso se repite varias veces, permitiendo que el disolvente extraiga el compuesto objetivo de la muestra.

4.9. Métodos de cuantificación de compuestos fenólicos

Numerosos métodos se han desarrollado para la cuantificación de compuestos fenólicos naturales. Estos ensayos se basan en diferentes principios y se utilizan para determinar grupos estructurales presentes (Ignat, *et al.*, 2011).

4.9.1. Folin-Ciocalteu: Este método mide la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT). Se fundamenta en el carácter reductor del reactivo conocido con el mismo nombre, y que en un medio básico se reduce al oxidar los compuestos fenólicos originando óxidos azules que son medidos en un espectrofotómetro a 765 nm (Gonzales, 2015).

4.9.2. Flavonoides totales: Método colorimétrico, que se basa en la reducción del tricloruro de aluminio (AlCl_3) al interaccionar con el acetato de sodio y que en presencia de los compuestos fenólicos origina una coloración amarilla la cual puede ser medida a una absorbancia de 415 nm por un espectrofotómetro. Este método solo cuantifica flavonas y flavonoles (Villamil, 2021).

4.10. Métodos de determinación de capacidad antioxidante

En general, la capacidad antioxidante se mide mediante la medición de la cantidad de radicales libres que se neutralizan o eliminan por la sustancia en cuestión. Por lo tanto, cuanto mayor sea la cantidad de radicales libres que una sustancia pueda neutralizar o eliminar, mayor será su capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante puede medirse de diversas formas, entre las más utilizadas son los métodos ORAC, DPPH, ABTS y FRAP.

4.10.1. Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

En el ensayo ORAC se mide la capacidad antioxidante de una muestra para inhibir los efectos de los radicales peroxilos. La eficacia de un antioxidante se evalúa a partir del área bajo la curva de intensidad de fluorescencia en el tiempo utilizando como patrón el compuesto trolox (Roger, 2008).

4.10.2. Inhibición del radical DPPH

Método que consiste en utilizar el compuesto sintético 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) el cual está formado por radicales libres estables. El método consiste en medir la disminución de su absorbancia a 515 nm por un efecto de un antioxidante (Brand-Williams, et al., 1995).

4.10.3. ABTS

El método de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) consiste en usar el compuesto ABTS el cual se oxida por la adición de un

agente oxidante, lo que resulta en la formación de un radical libre que cambia de color. Cuando se mezcla con un antioxidante, la cantidad de radical libre reducido se mide a una longitud de onda de 734 nm (Re, *et al.*, 1999).

4.10.4. Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP)

El ensayo FRAP determina la capacidad reductora del hierro de las muestras obtenidas. El complejo de tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) pasa a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por acción de un agente reductor a bajo pH. El Fe^{2+} -TPTZ tiene un color azul cuya intensidad está en relación directa con la capacidad reductora del antioxidante a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

4.11. Actividad antimicrobiana

La resistencia de las bacterias a los antibióticos, junto con la acumulación de residuos de estos compuestos en el medio ambiente, y la respuesta inmunitaria, son preocupaciones de alcance global. Ante esta situación, se hace necesario explorar compuestos de origen natural como potenciales antibacterianos para abordar este problema. (Palanisamy *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos son una clase de sustancias químicas que se encuentran en una amplia variedad de plantas y alimentos. Estos compuestos tienen actividad antimicrobiana, lo que significa que pueden matar o inhibir el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y virus (Lima, *et al.*, 2019).

Una de las principales formas en que los compuestos fenólicos ejercen su actividad antimicrobiana es a través de la inhibición de la síntesis de proteínas en las células microbianas. Los compuestos fenólicos pueden unirse a las enzimas que participan en la síntesis de proteínas y bloquear su actividad, lo que impide la producción de proteínas esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos (Sauceda, 2011).

Además, los compuestos fenólicos también pueden ejercer su actividad antimicrobiana al dañar la membrana celular de los microorganismos. Algunos compuestos fenólicos pueden penetrar en la membrana y alterar su estructura, lo que lleva a la pérdida de lípidos y proteínas esenciales y finalmente a la muerte de la célula. Además, los compuestos fenólicos también pueden tener un efecto antimicrobiano al inducir el estrés oxidativo en las células microbianas. Los radicales libres producidos durante el estrés oxidativo pueden dañar la membrana celular y otras moléculas esenciales para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos (Sauceda, 2011).

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos puede variar ampliamente, dependiendo de la clase de compuesto y de las condiciones del medio. Algunos compuestos fenólicos tienen una amplia actividad antimicrobiana, mientras que otros tienen una actividad más limitada. También es importante tener en cuenta que la actividad antimicrobiana de los

compuestos fenólicos puede variar dependiendo de la concentración y la duración del tratamiento (Sauceda, 2011).

4.12. Estructura bacteriana

La envoltura celular de las bacterias es una estructura compleja que tiene varias capas y funciona como una barrera protectora contra el entorno. Las envolturas celulares se dividen en dos tipos principales, las bacterias *gramnegativas* y las *grampositivas*. Las bacterias *gramnegativas* poseen una pared celular de peptidoglucano delgada rodeada por una membrana externa que contiene lipopolisacáridos. Por otro lado, las bacterias *grampositivas* carecen de una membrana externa, pero tienen capas de peptidoglucano mucho más gruesas que las bacterias *gramnegativas*. (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010).

Las bacterias poseen una membrana celular que separa el interior de la célula del exterior. La función principal de la membrana celular es actuar como barrera osmótica, además de permitir el ingreso de nutrientes y la salida de desechos a través de procesos de transporte activo y pasivo, gracias a su permeabilidad selectiva. Dentro de la membrana celular se llevan a cabo procesos como la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones para la producción de energía, así como la síntesis de lípidos para la pared celular. También contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio ambiente (República, 2006).

4.12.1. Gramnegativas

La estructura de la pared celular en bacterias *gramnegativas* es más compleja, compuesta por tres capas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico (que incluye una delgada capa de peptidoglicano de 2-7 nm de grosor) según Pankratova, Hederstedt y Gorton (2019) y la membrana externa, que es exclusiva de este tipo de bacterias. La membrana externa tiene una función protectora crucial, ya que actúa como barrera que impide o reduce la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían dañar o matar la bacteria. A pesar de esto, la membrana externa es más permeable que la plasmática y permite el paso de moléculas pequeñas, como glucosa y otros monosacáridos, tal como señala República (2006).

4.12.2. Grampositivas

La gruesa pared celular de las bacterias *grampositivas* tiene la función de proteger la integridad anatómica y fisiológica de la bacteria, además de soportar la elevada presión osmótica interna, que es mayor en comparación con las bacterias *gramnegativas*, según Calvo y Martínez-Martínez (2009). Esta pared celular está compuesta principalmente por peptidoglicano, que tiene un grosor de entre 30 y 100 nm, y se encuentra por fuera de la membrana plasmática, tal como lo señala Pankratova, Hederstedt y Gorton (2019). En la superficie externa del peptidoglicano, generalmente hay proteínas que lo recubren como indica República (2006).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Acondicionamiento de la muestra y extracción de compuestos fenólicos

El orujo de uva fue obtenido a partir de viñas de vino tinto del valle del Maule. Los orujos estaban almacenados en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agrícola en una cámara de frío a -20°C , las cepas de orujo disponibles fueron *Merlot*, *Carmenere*, *Syrah* y *Cabernet Sauvignon*. Posteriormente, se tomaron aproximadamente 80 g de cada una de las cepas para luego ser tratadas por un proceso de secado en una estufa a 60°C aproximadamente durante 24 horas. Finalmente, se redujo el tamaño de partícula con una procesadora de cuchillas para ser depositadas en bolsas herméticas rotuladas, almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta el momento de su uso.

Para realizar la extracción de compuestos fenólicos se utilizó el método propuesto por Díaz (2022) modificado, el cual consiste en una extracción sólido – líquido a una relación 1 g de masa de orujo y 75 mL etanol-agua destilada a equivalencia 60:40 v/v. La muestra fue macerada durante 24 horas a una temperatura de 21°C . Luego fue filtrada al vacío utilizando filtro Whatman de grado 42 para eliminar la materia sólida del extracto. Finalmente, fue trasvasiado a un frasco ámbar rotulado, almacenado a 4°C , protegido de la luz como se muestra en la figura 5.



Figura 5. Imagen de cada extracto obtenido por maceración etanol (60% - agua destilada (40%).

5.2. Determinación de Contenido de Compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de CFT se determinó por medio del método Folin – Ciocalteu propuesto por Singleton, *et al.*, (1999) modificado en el cual se utilizó el reactivo Folin – Ciocalteu y una solución de carbonato de sodio (20% m/v). Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 765 nm por medio de un multilector de microplacas. Finalmente, los resultados fueron expresados en equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto (EAG/g extracto).

5.3. Determinación de Flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se determinó utilizando los reactivos Cloruro de aluminio octa hidratado al 10% m/v ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Acetato de sodio (1M) (CH_3COONa) y Quercetina para la curva de calibración. La placa con las

muestras fue incubada durante 30 minutos a 25°C y medir la absorbancia a 415 nm por un multilector de microplacas.

5.4. Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó a través de tres métodos distintos, el primero de ellos es el método ORAC-FL propuesto por Folch-Cano, *et al.* (2010) para el que se necesita un buffer fosfato de sodio pH 7.4, fluoresceína (70 nM), AAPH (9 mM) y trolox (6 µM-72 µM) para la curva de calibración. La placa con las fue pre-incubada por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se adiciono AAPH y se midió la fluorescencia en el tiempo a una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 515 nm.

Para el registro del decrecimiento de la fluoresceína en el tiempo se utilizó un multilector de microplacas. El índice ORAC se determinó mediante interpolación gráfica posterior al cálculo del área bajo la curva.

El segundo método es el de DPPH a partir del cual se obtiene el valor de la concentración antioxidante necesaria para inhibir el 50% de la concentración inicial del radical (IC_{50}). Para esto se utilizó DPPH (0,2 mM), etanol absoluto (99,5% puro) y solvente de extracción que en este caso es etanol 60% y agua destilada 40%. La placa con las muestras se analizó la absorbancia a 515 nm en un multilector de microplacas luego de 10 minutos de incubación a 25°C. Para el cálculo de los resultados se determinó el porcentaje de inhibición de cada muestra con la ecuación 1 a diferentes concentraciones

del extracto. El valor del IC₅₀ fue determinado a partir de la interpolación de la relación lineal obtenida a partir de los porcentajes de inhibición a distintas concentraciones de extracto.

$$\%Inhibición = (1 - (AbsN\ muestra / AbsN\ control)) \times 100 \quad [1]$$

AbsN muestra: Absorbancia neta de la muestra

AbsN control: Absorbancia neta del control

El último método es el FRAP, en el cual se trabajó con un tampón a pH 3,6, HCl (40mM), FeCl₃ (20 mM), TPTZ (10nM), y se utilizó como patrón FeSO₄. La placa con las muestras se analizó durante 1 hora a una longitud de onda de 593 nm en un multilector de microplacas.

5.5. Determinación de la capacidad antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad de cepas *Staphylococcus aureus* y de *Salmonella ssp.* a estos extractos a través del método de difusión en disco de acuerdo con Rota et al. (2008). Se trabajó con 6 cepas bacterianas en total, de las cuales 3 cepas fueron extraídas de la cadena de producción de carne de cerdo resistente a antibióticos (PEN-KAN-ERY-CIP-TET-QDA) y 3 cepas de referencia: *S. aureus* (ATCC 43300 y ATCC 25923) y *Salmonella* (ATCC 13076), los análisis se realizaron en triplicado.

Las cepas se mantuvieron en un caldo cerebro corazón (BHI) al 20% glicerol para su preservación a -80°C . Luego, se activaron sembrándolas en placas de agar tripticasa soya (TSA) durante 24 h a $37 - 38^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se tomaron colonias de cada cepa para sembrarlas en caldo tripticasa soya (TSB) y nuevamente incubarlas por 24 h a $37 - 38^{\circ}\text{C}$. Después se midió la densidad óptica (OD_{600}) y se ajustó hasta 0,1, luego se realizó la inoculación de 0,1 mL en agar Muller–Hinton, seguido de la aplicación de los discos de papel estériles, a los cuales se les añadió 15 μL de cada extracto. Se incubó por 48 h aproximadamente a $37 - 38^{\circ}\text{C}$ para posteriormente medir el halo de inhibición. El criterio de inhibición utilizado para determinar la susceptibilidad fue: ≥ 20 mm la zona de inhibición es fuertemente inhibitoria, $< 20 - 12$ mm la zona de inhibición es moderadamente inhibitoria y < 12 mm la zona de inhibición no es inhibitoria (Rota *et al.* 2008). Los extractos fueron concentrados a 15 mg/mL (Corrêa *et al.* 2017).

5.6. Estimación del impacto ambiental de la elaboración del extracto

El impacto ambiental se estimó mediante un balance de masas de orujo de uva necesaria para obtener una cierta cantidad de extracto y a través de un análisis del proceso de elaboración del extracto a escala piloto con respecto a la ley 19.300. Además, de calcular los costos operacionales del desarrollo del extracto a escala piloto.

5.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron en triplicado, los cuales fueron presentados como la media \pm desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Tukey considerando un 5% de error, utilizando el software InfoStat.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

La determinación de los CFT se realizó por el método de Folin – Ciocalteu donde los resultados obtenidos se ven expresados en la Tabla 2. Se puede apreciar que el extracto *Cabernet Sauvignon* es el que tiene mayor contenido de CF, seguido de la cepa *Carmenere* y *Merlot* y finalmente la cepa *Syrah* la cual posee la menor cantidad.

Tabla 2: Comparación de los resultados de la prueba de compuestos fenólicos totales y de flavonoides totales.

Extractos	Compuestos fenólicos totales		Flavonoides totales	
	mg EAG/g de extracto	mg EAG/g de orujo	mg EQ/g de extracto	mg EQ/g de orujo
<i>Merlot</i>	259,75 \pm 5,74 ^b	22,4 \pm 2,27	21,37 \pm 1,74 ^b	0,14 \pm 0,01
<i>Carmenere</i>	280,31 \pm 8,84 ^b	26,43 \pm 0,83	30,29 \pm 2,79 ^c	0,21 \pm 0,02
<i>Syrah</i>	96,36 \pm 12,43 ^a	7,35 \pm 0,95	19,83 \pm 1,31 ^b	0,11 \pm 0,01
<i>Cabernet S</i>	316,97 \pm 22,57 ^c	31,86 \pm 2,27	9,35 \pm 0,69 ^a	0,07 \pm 0,01

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

Los resultados obtenidos son cercanos a los obtenidos por los autores Otero – Pareja, *et al.* (2015), los cuales son 254,6 \pm 1,0 mg EAG/g extracto para

Merlot, $186,3 \pm 1,3$ mg EAG/g extracto para *Syrah* y $228,4 \pm 0,9$ mg EAG/g extracto para *Cabernet Sauvignon*. En cambio, para otros autores como Díaz (2020) los valores fueron para *Carmenere* $60,86 \pm 7,49$ mg EAG/g extracto, *Cabernet Sauvignon* $57,03 \pm 4,78$ mg EAG/g extracto y *Merlot* $70,36 \pm 1,75$ mg EAG/g extracto, los cuales están muy por debajo en comparación con los obtenidos en el presente estudio.

Esta diferencia en los valores obtenidos se debe posiblemente a las características ambientales en las cuales se desarrollaron cada una de las cepas trabajadas por los autores, el lugar de procedencia de cada cepa, el proceso de vinificación y al método de medición (Rockenbach, *et al.*, 2011).

Los resultados de contenido de compuestos fenólicos totales pueden verse interferidos por componentes como polisacáridos, lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y pigmentos. En particular, los polisacáridos y las proteínas pueden reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu y producir un color de fondo que puede interferir con la medición. Los lípidos también pueden interferir, ya que pueden formar emulsiones que dificultan la separación de la fase acuosa en la que tiene lugar la reacción (De Freitas, V., Mateus, N., & Casassa, L. F., 2019).

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de flavonoides totales indican que la cepa con mayor cantidad de flavonoides totales corresponde a *Carmenere*, seguido de las cepas *Merlot* y *Syrah*, y finalmente la cepa

Cabernet Sauvignon que es la menor en comparación a las demás. Los resultados obtenidos de los flavonoides totales se muestran en la tabla 2.

Autores como Putnik *et al.* (2016) obtuvieron valores desde $18,03 \pm 1,29$ hasta $36,8 \pm 0,42$ mg quercetina/g de extracto, lo cual indica que los resultados obtenidos en este estudio son los esperados. Por el contrario, autores como Cotacallapa-Sucapuca, Vilca-Curo & Coaguila (2020) y Librán *et al.* (2013) mostraron resultados dentro de 0,03 y 4,98 mg quercetina/g muestra. Esto implica que el contenido y la cantidad de flavonoides están influenciados significativamente por el solvente utilizado, las condiciones del proceso de producción, la variedad de uva utilizada y la forma en que se obtiene el orujo.

6.2. Determinación de capacidad antioxidante

6.2.1. Método ORAC

En cuanto a la capacidad antioxidante de los extractos, los valores obtenidos por el método ORAC – FL se muestran en la Tabla 3. La capacidad antioxidante de los extractos de *Merlot* y *Carmenere* destacan por sobre los extractos *Syrah* y *Cabernet Sauvignon*. La diferencia de los valores entre cada extracto se debe a que cada una de las cepas contiene tipos de compuestos antioxidantes distintos, ya que algunos tienen mejor capacidad que otros (Rockenbach, *et al.*, 2011).

Tabla 3: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método ORAC – FL.

Extractos	Capacidad antioxidante	
	$\mu\text{mol ETx/g extracto}$	$\mu\text{mol ETx/g orujo}$
<i>Merlot</i>	$3.621,17 \pm 432,61^b$	$291,50 \pm 34,83$
<i>Carmenere</i>	$3.459,40 \pm 121,55^b$	$301,41 \pm 10,59$
<i>Syrah</i>	$2.294,35 \pm 179,12^a$	$163,36 \pm 12,75$
<i>Cabernet S</i>	$1.958,61 \pm 188,53^a$	$180,11 \pm 17,34$

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

Los valores obtenidos son superiores a los obtenidos por otros autores como Díaz (2020), el cual obtuvo $1.050,87 \pm 76,69 \mu\text{mol Tx/g extracto}$ para *Carmenere*, $821,48 \pm 108,30 \mu\text{mol Tx/g extracto}$ para *Cabernet Sauvignon* y $1.255,52 \pm 137,60 \mu\text{mol Tx/g extracto}$ para *Merlot*. El principal motivo por el cual los resultados difieren con los de Díaz son las características en las cuales se desarrollaron las cepas, la metodología de cálculo utilizada y el método de extracción. En cuanto al extracto *Syrah* los autores Mazza *et al.*, (2019) obtuvieron $230 \mu\text{mol trolox/g orujo}$, el cual es un 28,97% mayor en comparación a los obtenidos en el presente estudio. Esta diferencia se debe al método de extracción utilizado por estos últimos autores siendo una de las diferencias principales el solvente utilizado y el método de extracción.

6.2.2. Método DPPH

Los resultados obtenidos por el método de DPPH indican que el extracto que posee una mayor capacidad antioxidante es el de *Merlot*, ya que se requiere una menor cantidad de extracto para inhibir la mitad de los radicales, seguido de los extractos de *Carmenere*, *Cabernet Sauvignon* y finalmente *Syrah*, en el cual se requiere una mayor cantidad del extracto para inhibir los radicales, presentando una capacidad antioxidante significativamente menor. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método DPPH expresado en mg de extracto necesario para inhibir el 50% de los radicales.

Extractos	IC ₅₀ (mg de extracto)
<i>Merlot</i>	24,29 ± 3,25 ^a
<i>Carmenere</i>	27,04 ± 7,79 ^a
<i>Syrah</i>	59,55 ± 9,11 ^b
<i>Cabernet S</i>	31,06 ± 6,59 ^a

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

Los valores obtenidos por este método son mayores a los propuestos por Luchian *et al.* (2019) los cuales son $24,21 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ y $34,60 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ de *Merlot* y *Cabernet Sauvignon*, respectivamente necesarios para inhibir el 50% de los radicales, pero coincidiendo en que la cepa *Merlot* que posee la mayor capacidad antioxidante. Además, Human – Castilla *et al.* (2021)

obtuvieron un valor de 23,78 mg/mL para *Carmenere*, lo cual confirma que los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes.

6.2.3. Método FRAP

Los resultados obtenidos por el método FRAP muestran que los extractos de *Merlot* y *Carmenere* poseen capacidad antioxidante similar según la prueba de comparación ($p \geq 0,05$) destacando sobre el resto. Los extractos de *Cabernet Sauvignon* y *Syrah* son distintos entre sí ($p \leq 0,05$) siendo este último el que posee la menor capacidad antioxidante de los cuatro. Todo lo anterior se ve reflejado en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados obtenidos de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

Extractos	mmolFe ²⁺ /g de extracto	μmolFe ²⁺ / g de orujo
<i>Merlot</i>	4,53 ± 0,16 ^c	29,30 ± 1,06
<i>Carmenere</i>	4,49 ± 0,43 ^c	31,77 ± 3,04
<i>Syrah</i>	2,02 ± 0,06 ^a	11,58 ± 0,36
<i>Cabernet S</i>	3,24 ± 0,14 ^b	24,42 ± 1,04

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

Los valores obtenidos son similares a los propuestos por otros autores como Ky & Teissedre (2015) quienes reportaron valores de $1,45 \pm 0,16$ mmol Fe²⁺/g de materia seca para *Syrah*.

Si se analizan los resultados de los métodos de capacidad antioxidante, existe una relación entre la cantidad de flavonoides totales y la capacidad antioxidante ya que los extractos de *Merlot* y *Carmenere* presentaron una

mayor cantidad de flavonoides además presentaron la mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos no depende únicamente de la cantidad de flavonoides presentes, sino que también puede estar influenciada por otros factores, como la estructura química y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos (Cao, *et al.*, 2017).

6.3. Determinación de capacidad antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana indicó que los extractos presentaron capacidad antimicrobiana excepto para la cepa 13076 (*Salmonella spp.*). Los extractos de *Merlot*, *Carmenere* y *Cabernet Sauvignon* presentaron halos de inhibición, en cambio el extracto de *Syrah* no presentó halo de inhibición en ninguna cepa bacteriana (anexo B). Sin embargo, considerando el criterio de Rota *et al.* (2008) los halos de inhibición obtenidos (Tabla 8) no cumplen con los requisitos como para ser considerados inhibitorios ya que están por debajo a 12 mm. Por lo tanto, los extractos no presentaron capacidad antimicrobiana.

Tabla 6: Longitud de los halos de inhibición en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Halos de inhibición en milímetros						
Cepas\ Extractos	ATCC 25923	ATCC 43300	ATCC 13076	P128-1	C058-1	CM005-1
<i>Merlot</i>	6,6	5,99	-	6,25	7,12	6,43
<i>Carmenere</i>	6,36	6,2	-	6,42	6,59	6,47
<i>Syrah</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cabernet S</i>	6,53	6,96	-	6,33	6,62	6,57

*ATCC 25923: *S. aureus* (ref), ATCC 43300: *S. aureus* (ref), ATCC 13076: *Salmonella spp.* (ref), P128-1: *S. aureus* (Piel de cerdo criadero), C058-1: *S. aureus* (Canal de cerdo planta faenadora), CM005-1: *S. aureus* (Carne de cerdo no envasada supermercado).

Los resultados obtenidos se vieron influenciados probablemente con la concentración que presentaban los extractos, ya que la relación sólido – líquido era muy alta lo que provocó que los componentes antimicrobianos presentes estuvieran muy diluidos y que, por lo tanto, se debieran concentrar los extractos. También, puede deberse a que los compuestos fenólicos que presentan capacidad antimicrobiana no estuviesen lo suficientemente presentes en los extractos.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la *Salmonella spp.* es una bacteria *gramnegativa* por lo cual es más difícil inhibir su crecimiento gracias a la estructura de su pared celular la cual cuenta con una membrana externa que le da una protección adicional contra antimicrobianos. En cambio, la

bacteria *S. aureus* es una *grampositiva* la cual carece de esa membrana externa que posee la *gramnegativa* y por lo tanto es más fácil inhibir su crecimiento como muestran los resultados en la tabla 6.

Si se comparan los resultados de otros autores como Diaz (2020) quien tampoco obtuvo resultados inhibitorios para *S.aureus* y *Salmonella spp.* a mayores cantidades de extractos (100 - 200µL), por lo tanto, los resultados están dentro de lo esperado.

6.4. Impacto ambiental de la elaboración del extracto a escala piloto

6.4.1. Elaboración del extracto a escala piloto

Para realizar esta actividad es necesario hacer un planteamiento hipotético de las cantidades con las que se quiere trabajar a escala piloto, para esto se asumirá que se va a trabajar con 100 kg de orujo de uva.

Según con los valores obtenidos de la relación sólido-líquido se necesitarán 7.500 L de solvente (etanol 60% - agua destilada 40%) para los 100 kg de orujo de uva y se obtendrían aproximadamente 7.000 L de extracto.

Para realizar el proceso de elaboración del extracto a escala piloto es necesario identificar cuáles son los equipos que se requieren para realizar las etapas de acondicionamiento del orujo y posteriormente extracción de los componentes se necesitan.

Para la etapa de acondicionamiento se necesita secar la muestra, disminuir el tamaño de muestra y finalmente almacenarla protegida de la luz.

Para el secado de la muestra se puede utilizar una secadora de bandejas, en este tipo de secador discontinuo, el producto se coloca en bandejas donde se produce su deshidratación. Para calentarlo, se puede utilizar una corriente de aire que pasa por encima de las bandejas y conduce el calor a través de las bandejas o soportes calefactores, o bien, mediante radiación que proviene desde las superficies calientes. En general, la mayoría de los secadores de bandejas utilizan aire para calentar el producto a la temperatura que se necesite y, a la vez, eliminar el vapor generado (De Bruijn & Melin, 1999).



Figura 6. Secadora de bandejas (PROCTOR).

Para la disminución del tamaño de muestra se puede utilizar un molino de martillos, este equipo está formado por un rotor que contiene de cuatro a ocho martillos oscilantes. El rotor está montado en un eje central que se mueve a alta velocidad dentro de una carcasa resistente. La sustancia que

se quiere moler es triturada entre los martillos y la carcasa, y permanece dentro del molino hasta que se vuelve lo suficientemente fina como para pasar a través de un tamiz ubicado en la parte inferior de la carcasa (De Bruijn & Melin, 1999).



Figura 7. Molino de martillos.

Para el procedimiento de extracción se requiere poner en contacto la muestra con el solvente la muestra junto con el solvente para luego filtrar la solución y finalmente almacenar el extracto en frascos a temperatura baja (4°C) protegidos de la luz.

Para el proceso de maceración se puede utilizar una la marmita enchaquetada, la cual presenta un diseño cilíndrico con fondo semiesférico, con camisa o chaqueta de vapor incorporada en la semiesfera que rodea el recipiente en donde se coloca el material a calentar.

El proceso de calentamiento consiste en hacer circular el vapor a cierta presión por la cámara de calefacción, en cuyo caso el vapor es suministrado por una caldera. En este caso no se hace uso de la cámara de calefacción, ya que la extracción es a temperatura ambiente (21°C).

Puede estar prevista por agitadores mecánicos y un sistema de volteo para facilitar el producto, el proceso presenta un sistema abierto en donde el producto es calentado a presión atmosférica.

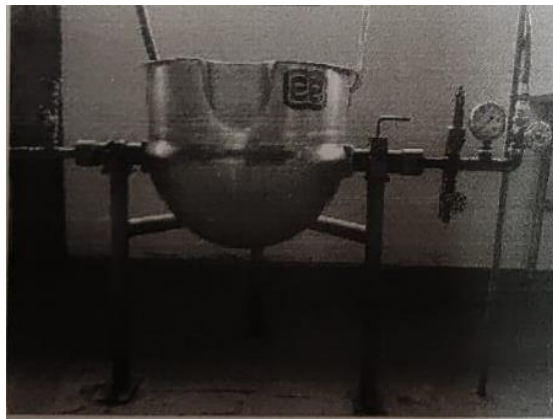


Figura 8. Marmita enchaquetada.

Para el proceso de filtrado se tiene el filtro prensa en el cual se cubren las placas con una tela de manera que los bordes sostengan la tela y se deja

suficiente espacio para que pase el filtrado. Las placas se colocan verticalmente en paralelo, pudiendo ser rectangulares o circulares. El queque se forma en la parte superior de la tela en el marco. Cuando se llena el espacio entre dos placas consecutivas con queque, es necesario desmontar el sistema, retirar el queque y limpiar antes de iniciar un nuevo ciclo de filtración (De Bruijn & Melin, 1999).

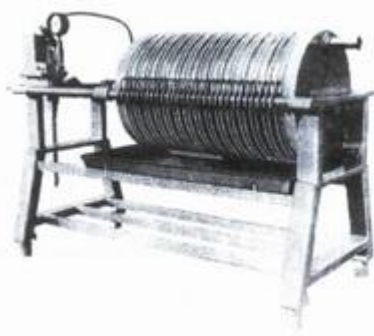


Figura 9. Filtro prensa.

Los gastos energéticos de cada equipo se presentan en la Tabla 7:

Tabla 7: Consumo de energía de los equipos en Watts.

Equipo	Gasto energético (W)
Secadora de bandejas	7.500
Molino de martillos	750
Marmita	No utiliza electricidad
Filtro prensa	1.050

6.4.2. Gastos económicos de la elaboración del extracto

Teniendo en cuenta la información anterior sobre la cantidad de solvente requerido y los gastos energéticos de cada equipo se tiene lo siguiente:

Se necesitan 4.500 litros de etanol de grado técnico y 3.000 litros de agua destilada. Pero para esta práctica no sería rentable utilizar agua destilada para el proceso a no ser que se disponga del producto, debido a que no se busca descartar todos los posibles factores en la determinación de compuestos fenólicos como en laboratorio, por lo que se puede reemplazar por agua potable. Para alcanzar los 4.500 litros de etanol se necesitan 23 barriles de 200 L (\$552.477), lo que tiene un costo de \$12.706.971.

Por otra parte, si se calculan los gastos del uso de cada equipo teniendo como referencia que el kW hora cuesta \$178.

La secadora de bandejas produce un gasto económico de \$64.080 si se utiliza durante 48 h, debido a que tiene una capacidad de 50 kg máximo.

El molino de martillo produce un gasto económico de \$1.335 ocupándolo durante 10 horas. Este equipo posee una capacidad de hasta 15 kg por hora, entonces se considera que en 10 horas estará listo el proceso.

Finalmente, el filtro prensa produce un gasto económico de \$1.869 si se utiliza durante 10 horas. Este equipo tiene una capacidad de filtrado máximo de 70 L/min, por lo tanto, un día es suficiente.

Teniendo en cuenta los elevados costos de la producción del extracto no es recomendable su producción a mayor escala. Una posible solución para reducir los costos de producción es reutilizar el solvente, ya que el solvente es uno de los principales productos y a la vez el más caro debido a la gran

cantidad que se necesita. Según Coupier, Penny & Fair (2011), Schweitzer (2014), Paul, Atiemo-Obeng & Kresta (2003) y Rydberg (2004) algunos de los equipos que pueden utilizarse para realizar el proceso de separación de solvente del extracto son: evaporador rotatorio, columna de destilación, membranas de ósmosis inversa, destilador de película delgada, destilador de reflujo, entre otros.

6.4.3. Impacto ambiental del proceso de extracción

La normativa ambiental chilena se basa en la Ley N°19.300, que establece las bases para la protección del medio ambiente. Entre las principales leyes ambientales en Chile se encuentran la Ley de Bases Generales del Medio Ambiente, la Ley de Fomento al Reciclaje, la Ley de Bosque Nativo, y la Ley de Humedales Urbanos. También existe una serie de regulaciones específicas para controlar la contaminación del aire, agua y suelo, así como para la gestión de residuos y la protección de la biodiversidad (Ley 19.300, 1994).

Para estimar el impacto ambiental del desarrollo de este extracto es necesario comprender que la normativa chilena está dirigida mayormente a la escala industrial, por lo tanto, es muy probable que el análisis a escala piloto indique que no existen impactos ambientales significativos. Por lo anterior, es mejor hacer un análisis del proceso de elaboración en el cual se identifiquen las etapas donde se produzcan desechos y como tratarlos que basarse en la normativa ambiental.

Si se analiza cada etapa del desarrollo del extracto, la etapa del filtrado es la única en la que se produce una salida de materia, que sería todo lo que no se disolvió en el extracto. Para este análisis se identifican cuáles serían los aspectos e impactos que pueden producir ese desecho.

Los aspectos ambientales se refieren a los elementos de las actividades, productos o servicios de una organización que pueden interactuar con el medio ambiente. En otras palabras, son las características de una actividad que pueden tener un impacto en el medio ambiente, ya sea positivo o negativo. Los aspectos ambientales pueden incluir emisiones atmosféricas, consumo de energía, emisiones de agua, generación de residuos, entre otros.

Por otro lado, los impactos ambientales son las consecuencias que se derivan de los aspectos ambientales. Estos pueden ser efectos negativos, como la contaminación del aire, el agua o el suelo, o efectos positivos, como la conservación de los recursos naturales o la promoción de la biodiversidad. Los impactos ambientales también pueden ser directos, como la contaminación de un río cercano, o indirectos, como el impacto de la producción de energía en el cambio climático.

En la etapa de filtrado del extracto se tiene como aspecto la generación de residuos sólidos los cuales pueden tener como impacto ambiental la contaminación del aire dependiendo como se desechen. La mejor alternativa sería reutilizarlos, teniendo en cuenta que estos residuos poseen un alto

contenido de fibra lo que le da diversos usos en las industrias. Para lograr su reutilización es necesario someter los residuos a un proceso de secado para eliminar el contenido de etanol en ellos, y luego de obtener los residuos secos, estos pueden ser destinados para usos como; compost, alimento de ganado, industria papelera, suplementos alimenticios, derivados de harina, biogás, entre otros como indican (Maner, *et al.*, 2017) (Guerra – Rivas, *et al.*, 2016) (Pascariu, *et al.*, 2017) (Arslan, *et al.*, 2018) (Gidenne, *et al.*, 2003) (Dinuccio, *et al.*, 2007) (Bustamante, *et al.*, 2008a, 2008b).

7. CONCLUSIÓN

Con la metodología de extracción seleccionada se obtuvieron cuatro extractos ricos en compuestos fenólicos, de los cuales destacan *Merlot* y *Carmenere* por su capacidad antioxidante y contenido de flavonoides totales.

Los extractos de *Merlot*, *Carmenere* y *Cabernet Sauvignon* presentaron halos de inhibición solo frente a *S. aureus*, sin embargo, no superaron un diámetro de 12 mm, por lo que no presentarían una capacidad inhibitoria relevante.

Finalmente, la elaboración del extracto a escala piloto no provocaría daños significativos al ambiente. Por otra parte, el gasto económico de la elaboración del extracto es alto, principalmente debido a que se necesitan grandes cantidades de etanol para obtener el extracto, por lo tanto, se recomienda buscar alternativas para reducir de costos como reutilización del solvente para hacerlo factible a una mayor escala.

8. LITERATURA CITADA

1. Andersen, O.M. and Markham, K.R. (2005). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press. (1) 271- 289.
2. Amienyo D., Camilleri C. and Azapagic A. (2014). Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK, *Journal of Cleaner Production*, 72: 110-119.
3. Arslan, G., Sönmez, A. Y., & Yan k, T. (2018). Effects of grape *Vitis vinifera* seed oil supplementation on growth, survival, fatty acid profiles, antioxidant contents and blood parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture research*,49(6), 2256-2266.
4. Atta, E. M., Mohamed, N. H., and Silaev, A. A. A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375.
5. Baydar, N.G. and Akkurt, M. (2001). Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turk Journal of Agricultural Forum*, 25, 163–168.
6. Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, A.P.G and Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581-594.

7. Bisby, R. H., Brooke R, and Navaratnam S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay, *Food Chemistry*, Volume 108(3): 1002-1007.
8. Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., and Arija, I. (2016). Use of polyphenol rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1-17.
9. Bustamante M A, Paredes C, Moral R, Agulló E, Pérez-Murcia M D & Abad M (2008a) Composts from distillery wastes as peat substitutes for transplant production. *Res. Conserv. Recycl.* 52(5): 792-799.
10. Bustamante M A, Paredes C, Marhuenda-Egea F C, PérezEspinosa A, Bernal M P & Moral R (2008b). Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere* 72(4): 551-557.
11. Cao, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zou, Y., Wu, Y., Wang, Q., and Jiao, L. (2017). Phenolic compounds from the leaves of *Artocarpus heterophyllus* and their antioxidant and anticancer activities. *Molecules*, 22(9), 1572-1587.
12. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). [Antimicrobial mechanisms of action]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(1), 44-52.

13. Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., and Chern J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* 10(3): 178-182.
14. Corrêa, R. C. G., Haminiuk, C. W. I., Barros, L., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Kato, C. G., Correa, V. G., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *Journal of Functional foods*, 36(1), 410-417.
15. Cotacallapa-Sucapuca, M, Vilca-Curo, R, & Coaguila, M. (2020). El orujo de uva Italia como fuente de compuestos bioactivos y su aprovechamiento en la obtención de etanol y compost. *Fave. Sección ciencias agrarias*, 19(1), 17-32.
16. Couper, J. R., Penney, W. R., & Fair, J. R. (2011). *Chemical Process Equipment: Selection and Design* (3rd ed.). Butterworth-Heinemann.
17. De Bruijn, Johannes P. F., and Pedro Santiago Melín Marín. 1999. *Operaciones Unitarias En La Agroindustria*. 1a ed. Proyecto de Desarrollo de La Docencia: 250.
18. De Freitas, V., Mateus, N., & Casassa, L. F. (2019). Interferences in the determination of total phenolic content in grape pomace extracts using the Folin-Ciocalteu assay. *Food Chemistry*, 272, 317-322.

19. Diaz, N., (2020). Propuesta de una línea de extracción para concentrar compuestos antioxidantes del orujo de uva utilizando filtros de PVPP como adsorbente. Tesis, para optar al grado de Magíster en Ingeniería Agrícola con Mención Agroindustrias. Universidad de Concepción, Facultad de ingeniería agrícola. Chillan, Chile.
20. Díaz, N.; Aqueveque, P.M.; Vallejos-Almirall, A.; Radrigán, R.; Zúñiga-López, M.C.; Folch-Cano, C. (2022). Antioxidant Compound Adsorption in Polyvinylpolypyrrolidone from Chilean Carménère, Cabernet Sauvignon Sauvignon, and Merlot Grape Pomaces as Potential By-Products. *Antioxidants*.
21. Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., & Menardo, S. (2010). Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource technology*, 101(10), 3780-3783.
22. Ferreira, F. d. R., Valentim, I. B., Ramones, E. L. C., Trevisan, M. T. S., Olea Azar, C., Perez-Cruz, F., de Abreu, F.C. & Goulart, M. O. F. (2013). Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with β -cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 129-134.
23. Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M., Arapitsas, P., and Bavaresco, L. (2013). Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651–19669.

24. Flaño, A. (2022). Boletín del vino: producción, precios y comercio exterior Avance a febrero 2022. [en línea]. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias.
<https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71550/BVino032022.pdf>. [Consulta: 11 agosto 2022].
25. Folch-Cano, C., et al. (2010). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables with β -cyclodextrins by ORAC assays." Food research international 43.8: 2039-2044.
26. García R. A. E. (2011). Evaluación in vitro/in vivo de propiedades antioxidantes de clones promisorios de papa criolla (*Solanum phureja*). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas. Bogotá.
27. Gidenne, T. (2003). Fibras in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science*, 81(2-3), 105-117.
28. Gonzales, P.A. (2015). Obtención de Extractos con Potencial Actividad Antioxidante a Partir de Madera de Poda de Olivo. Tesis, Magíster en Ingeniería Agrícola con Mención en Agroindustrias. Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería Agrícola. Chillan, Chile.

29. Guerra-Rivas, C., Vieira, C., Rubio, B., Martinez, B., Gallardo, B., Mantecon, A. R., Lavín, P. & Manso, T. (2016). Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin E and grape seed extract on meat shelf life. *Meat Sci*, 116, 221-229.
30. Huamán-Castilla, N. L., Campos, D., García-Ríos, D., Parada, J., Martínez-Cifuentes, M., Mariotti-Celis, M. S., & Pérez-Correa, J. R. (2021). Chemical Properties of *Vitis Vinifera* Carménère Pomace Extracts Obtained by Hot Pressurized Liquid Extraction, and Their Inhibitory Effect on Type 2 Diabetes Mellitus Related Enzymes. *Antioxidants*, 10(3), 472.
31. Ignat, I., I. Volf, and Popa V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
32. Iris F.F. Benzie, and J.J. Strain. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
33. Khan, N., Fahan, S., Naushad, M., Faisal, S., (2020). Grape Production Critical Review In The World. [en línea]. https://papers.ssrn.com/sol3/Papers.cfm?abstract_id=3595842. [Consulta: 25 Julio 2022].

34. Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., & Teissedre, P. L. (2014). Wine byproducts: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules*, 19(1), 482-506.
35. Ky, I., & Teissedre, P.-L. (2015). Characterisation of Mediterranean Grape Pomace Seed and Skin Extracts: Polyphenolic Content and Antioxidant Activity. *Molecules*, 20(2), 2190–2207.
36. Ley N°19.300. Ley sobre bases generales del medio ambiente. Diario Oficial de la República de Chile. 09 de marzo 1994. Santiago, Chile.
37. Lima M.C, Paiva de Sousa, C., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J.D., de Souza E.L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 130(1) 259-270.
38. Luchian, C.E., Cotea, V.V., Vlase, L., Toju, A.M., Colibaba, L.C., Răschip, I.E., Nadăș, G., Gheldiu, A.M., Tuchiluş, C. and Rotaru, L. (2019). Antioxidant and antimicrobial effects of grape pomace extracts. *BIO Web Conf.* (15) 6. 04006.
39. Luengo Maria Tránsito. (2022). *Flavonoides*. 21(4), 108-113.
40. Makris, D. P., Kallithraka, S., and Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.

41. Maldonado, O., E. Nahúm, y Bernabé M. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med. UV*, 10(2), 32-39.
42. Maner, S., Sharma, A. K., & Banerjee, K. (2017). Wheat flour replacement by wine grape pomace powder positively affects physical, functional and sensory properties of cookies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(1), 109-113.
43. Mazza, K.E.L., Santiago, M.C.P.A., do Nascimento, L.S.M., Godoy, R.L.O., Souza, E.F., Brígida, A.I.S., Borguini, R.G. and Tonon, R.V. (2019). Syrah grape skin valorisation using ultrasound-assisted extraction: Phenolic compounds recovery, antioxidant capacity and phenolic profile. *Int J Food Sci Technol*, 54(3): 641-650.
44. Ministerio de Agricultura. (1995). Establece zonificación vitícola y fija normas para su utilización, Decreto 464 modificada en 2020, Santiago, Chile.
45. Naranjo J. I. 2016. Evaluación de dos métodos para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de gulupa (*Passiflora edulis Sims*) con aplicación en productos mínimamente procesados. Tesis, grado de ingeniería en alimentos. Universidad de La Salle, Facultad de ingeniería. Bogotá, Colombia.

46. Ndhlala, A., M.Moyo, y Van Staden J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?. *Molecules*, 15(10), 6905-6930.
47. Oficinas de Estudios y Políticas Agrarias. (2021). Informe de existencia de vinos en 2021. [En Línea]. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiMmVmMjM1MmMtMzg1My00Mzc3LWJhN2YtZWE2N2JjOTIxMDJlIiwidCI6IjMzYjdmNzA3LTZINmYtNDJkMi04ZDZmLTk4YmZmOWZiNWZhMCIslmMiOjR9>. [Consulta: 29 diciembre 2022].
48. Otero-Pareja, M., Casas, L., Fernández-Ponce, M., Mantell, C., & Ossa, E. (2015). Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace. *Molecules*. 20(6), 9686–9702.
49. Paladino, S.C. (2008). Actividad Antioxidante De Los Compuestos Fenólicos Contenidos En Las Semillas De La Vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis, de Magister en Alimentos con mención en Ciencias. Universidades Nacionales de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. La Rioja, San Juan y San Luis.
50. Palanisamy, S., Vinosha, M., Rajasekar, P., Anjali, R., Sathiyaraj, G., Marudhupandi, T., Selvam, S., Prabhu, N.M. & You, S. (2019). Antibacterial efficacy of a fucoidan fraction (Fu-F2) extracted from *Sargassum polycystum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 485-495.

51. Pankratova, G., Hederstedt, L., & Gorton, L. (2019). Extracellular electron transfer features of Gram-positive bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 1076, 32- 47.
52. Pascariu, S. M., Pop, I. M., Simeanu, D., Pavel, G., & Solcan, C. (2017). Effects of Wine By-Products on Growth Performance, Complete Blood Count and Total Antioxidant Status in Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(2), 191-202.
53. Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., & Kresta, S. M. (2003). *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*. Wiley. (Paul, Atiemo-Obeng & Kresta, 2003)
54. Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Radojcin, M. & Verica, D.-U. (2016). Influence of Acidity and Extraction Time on the Recovery of Flavonoids from Grape Skin Pomace Optimized by Response Surface Methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 30, 455 - 464.
55. Ramírez, A., J, del P. (2013). Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta mediterránea. Memoria de título, Doctor en Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada. Departamento de Nutrición y Bromatología.

56. Ramírez Delgadillo, C.J. (2020). Evaluación de la extracción de flavonoides a partir de la cáscara de naranja. Tesis de grado para optar al título de ingeniería química. Universidad de las Américas, Facultad de ingenierías. Bogotá D.C., Colombia.
57. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
58. República, U. d. I. (2006). Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la República. Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene.
59. Rydberg, J. (2004). *Solvent Extraction Principles and Practice* (2nd ed.). CRC Press.
60. Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Gonçalves, A. E. d. S. S., Genovese, M. I., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44(4), 897- 901.
61. Rong, T. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2, 1231.

62. Rota, M., A. Herrera, R. Martinez, J. Sotomayor, M. Jordan. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 19:681-687.
63. Rózek, A., Achaerandio, I., Güell, C., López, F., & Ferrando, M. (2010). Use of commercial grape phenolic extracts to supplement solid foodstuff. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 623-631.
64. Saucedo, E. N. R. (2011). Natural antimicrobial agent use in the preservation of fruits and vegetables. *Ra Ximhai*, 7, 17.
65. Schweitzer, P. A. (2014). *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers* (3rd ed.). McGraw-Hill Education.
66. Servicio agrícola y ganadero. (2020). Catastro vitícola nacional 2020. [En línea]. [https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/catastro-viticola-nacional/1490/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=All&field_tipo_de_publicacion_tid=All&field_fecha_otros_value\[value\]=&title=&items_per_page=15](https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/catastro-viticola-nacional/1490/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=All&field_tipo_de_publicacion_tid=All&field_fecha_otros_value[value]=&title=&items_per_page=15). [Consulta: 23 junio de 2022].
67. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414.
68. Singleton, Vernon L., Rudolf Orthofer, and Rosa M. Lamuela-Raventós. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and

antioxidants by means of Folin – Ciocalteus reagent.” *Methods in enzymology*. Vol. 299. Academic press: 152-178.

69. Villamil, J.E. (2021). *Extracción De Compuestos Fenólicos A Partir Del Residuo Agroindustrial De Frutilla (Fragraria x Ananassa)*. Tesis, Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química. Santa fe, Argentina.
70. Williams W. B., M. E., Cuvelier, and C. Berset. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
71. Wittenauer, J., Mackle, S., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179-187.
72. Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., and Li, H.-B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622–646.

9. ANEXOS

Anexo A

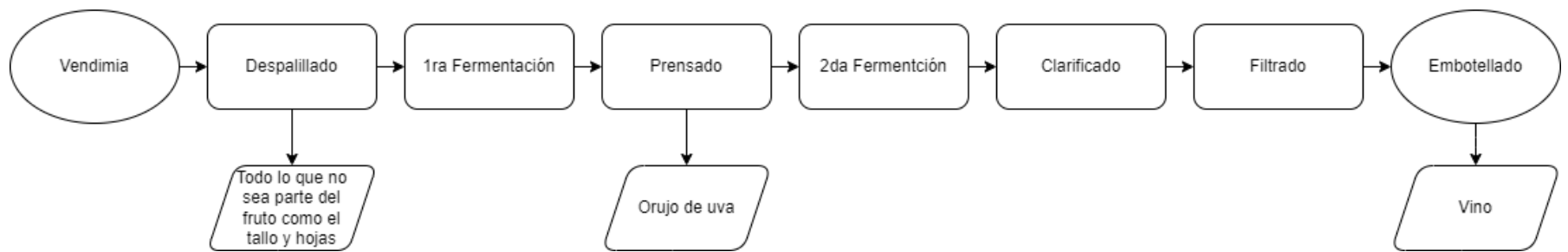


Figura 10. Diagrama del proceso de elaboración del vino.

Anexo B

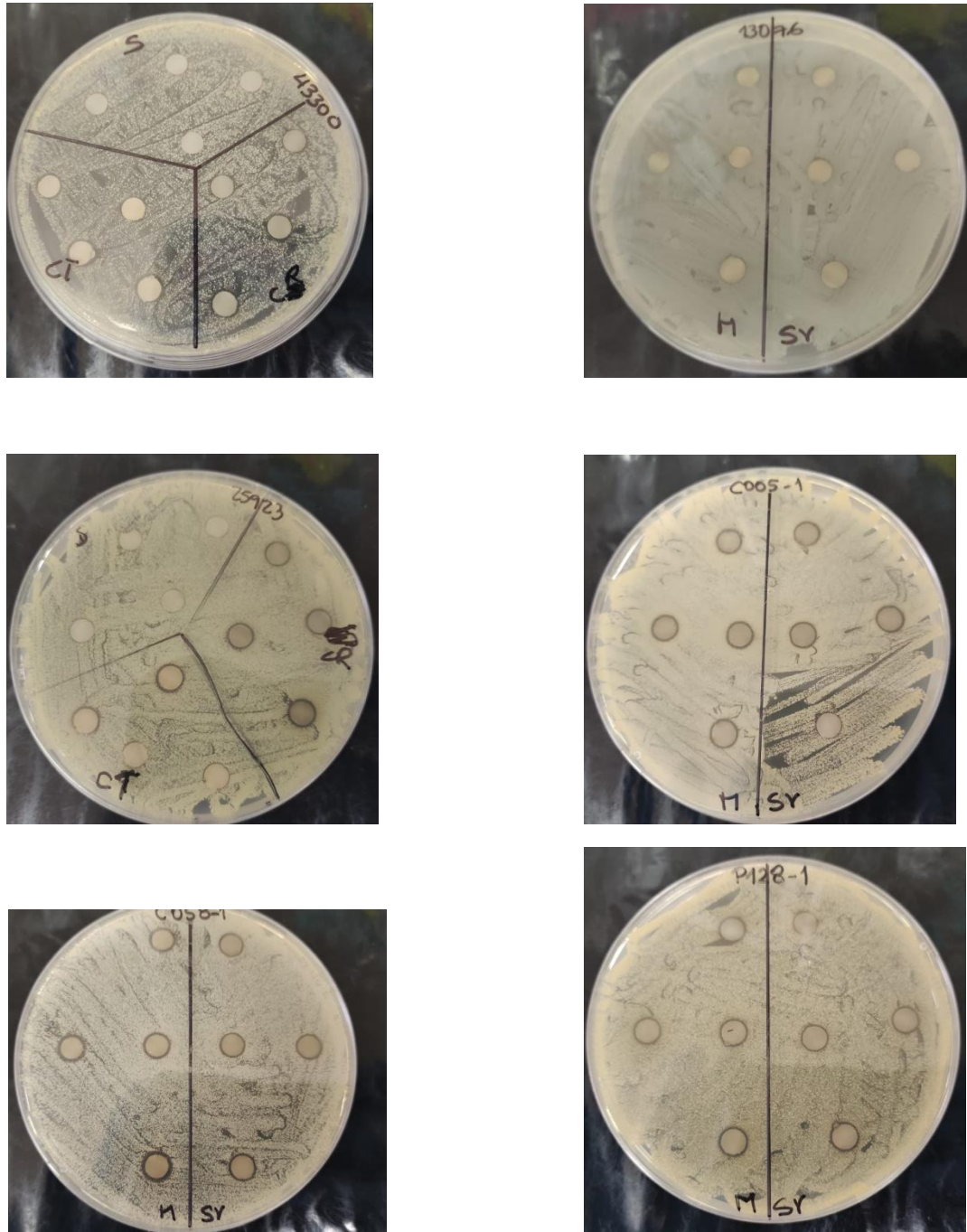


Figura 11. Halos de inhibición de los resultados de la prueba de susceptibilidad a *S. aureus* y *Salmonella* spp.