

Tesis de Maestría

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS
FENÓLICOS CONTENIDOS EN LAS SEMILLAS DE LA
VID (*Vitis vinifera* L.)**

Maestrando: Ing. Agr. Silvia Cristina Paladino

Director: Dr. Carlos A. Zuritz

Tesis presentada para acceder al grado académico de **Magister en Alimentos (Mención en Ciencias)** del Posgrado Regional Cooperativo en Alimentos.
Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
Sede Mendoza: Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo

RESUMEN

El propósito de este trabajo es obtener un antioxidante natural a partir de las semillas de uva (*Vitis vinifera* L.), para emplear en alimentos.

Para ello se compararon distintos solventes para la extracción de fenoles de las semillas de la uva, de modo de obtener el extracto más concentrado en compuestos activos con la mínima degradación de su poder antioxidante durante el proceso de obtención. La concentración de fenoles totales de los extractos se determinó por el método Folin Ciocalteu. El poder reductor de los extractos se midió empleando el método de Oyaizu.

Una vez seleccionado el solvente más adecuado para la extracción, se analizó la cinética de extracción, optimizando el tiempo de tratamiento.

El extracto fue concentrado al vacío, y se verificó la conservación del poder reductor en el extracto concentrado, por el método de Oyaizu.

El extracto de semillas concentrado y sin concentrar se empleó en un sistema real sujeto a oxidación, tal como el jugo de manzanas. El grado de oxidación del jugo se midió por el método de Özoglu.

El extracto concentrado fue deshidratado por secado en lecho de espuma y por liofilizado. En ambos casos se verificó el efecto del tratamiento de secado sobre el poder reductor.

Finalmente, se evaluó la actividad antioxidante del extracto líquido concentrado de semillas de vid, respecto de otros antioxidantes comerciales como ácido ascórbico y dióxido de azufre. El sustrato oxidable fue el jugo de manzanas, y el grado de oxidación se midió por el método de Özoglu.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza; cuando no fue posible emplear el mencionado análisis, debido a que no se verificaban los supuestos básicos para su aplicación, se empleó la prueba de Kruskal -Wallis. En todos los casos, se utilizó el programa Statgraphics plus[®]4.0.

Para obtener un extracto antioxidante a partir de semillas de vid se utilizó una extracción con agua a 90°C, durante 4 horas. La relación sólido- líquido empleada fue de 1g de semillas enteras por 10 ml de solvente. El extracto obtenido presentaba una concentración de 12,587 mg de fenoles totales por gramo de semillas de uva extraídas y un poder reductor de 1,290 unidades.

Como consecuencia del análisis de la cinética de extracción, el tiempo de tratamiento se redujo de 4 horas a 3 horas.

La concentración del extracto se realizó al vacío a 60°C, verificándose un aumento del poder reductor en el extracto concentrado, comprobado sobre jugo de manzanas. Comparando el extracto concentrado y el extracto sin concentrar se observa que la concentración de fenoles totales aumentó 29,57 veces, mientras que el poder reductor aumentó 37,39 veces.

El deshidratado del extracto por medio del lecho de espuma permitió conservar el poder reductor del mismo, no ocurrió lo mismo en el deshidratado por liofilizado, donde se produjo un deterioro del poder reductor.

Para un mismo contenido de fenoles totales agregado al jugo de manzanas, el extracto líquido sin concentrar produjo un 28,4% de inhibición de la oxidación, mientras que el de extracto líquido concentrado produjo un 51,5 % de inhibición de la oxidación del jugo de manzanas.

El extracto de semillas de vid, aplicado como antioxidante en jugo de manzanas, inhibió el desarrollo de la oxidación en un 31,51%, considerando 24 horas el tiempo de tratamiento. Este desempeño supera al ácido ascórbico, que en iguales condiciones, inhibió el desarrollo de la oxidación en un 2,6%. Pero en las condiciones de trabajo, el dióxido de azufre resulta mejor antioxidante que ambos, ya que logró inhibir el desarrollo de la oxidación en un 97,40 %.

Summary

The purpose of this study was to obtain a natural antioxidant extract from grape seeds (*Vitis vinifera* L.), for food use.

Different solvents were compared for the extraction of phenolic compounds from grape seeds, in order to obtain extracts with the maximum concentration of active compounds, with the least degradation of antioxidant activity. Total phenolic concentration in grape seeds extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method. The reducing power of grape seed extracts was determined using the method of Oyaizu.

Once the most appropriate solvent was selected, the extraction kinetics was analyzed in order to optimize the extraction time.

The grape seed extract was vacuum concentrated and its reducing power was measured using the method of Oyaizu.

Both the single strength and concentrated grape seed extracts were added to apple juice. The degree of juice oxidation was assessed using the Özoglu's method.

The concentrated grape seeds extract was foam-mat and freeze dried. In both products, the effect of the drying process on reducing power was verified.

Finally, the antioxidant activity of the concentrated grape seeds extract was compared in relation to commercial antioxidants such as ascorbic acid and sulfur dioxide. These products were added to apple juice, and the degree of juice oxidation was measured with the Oyaizu's method.

Statistical analysis of the data was done by one way variance (ANOVA). When ANOVA was not appropriated for data analysis, Kruskal-Wallis test was employed. All the statistical analyses were performed using Statgraphics plus[®] 4.0 software.

In order to obtain an antioxidant extract from grape seeds, water at 90°C for 4 hours was used. The solid-liquid relation was 1 g seeds per 10 ml solvent. The concentration in the extract was 12,587 mg total phenol/g grape seed extracted, with a reducing power of 1,290 units.

As a result of the extraction kinetics analysis, the extraction time was reduced from 4 to 3 hours.

The extract was vacuum concentrated at 60°C. The concentration process increased the reducing power in the concentrated extract, as compared with the single strength grape seeds extract. This was verified by measuring apple juice oxidation. Total phenol concentration increased 29,57 fold, while reducing power increased 37,39 fold.

The foam mat dried extract maintained the reducing power of the original extract, while the freeze dried extract presented loss of reducing power.

For the same concentration of total phenols added to the apple juice, the single strength grape seeds extract produced a 28,4 % inhibition of oxidation. On the other hand, the concentrated grape seeds extract inhibited apple juice oxidation in 51,5 %.

Concentrated grape seeds extract added to apple juice as antioxidant, inhibited juice oxidation in 31,51 % in a 24 hour period. It presented a better antioxidant behavior than ascorbic acid, which only inhibited oxidation in 2,6 %. However, under the same operating conditions, sulfur dioxide is better antioxidant, as it inhibited apple juice oxidation in 97,40 %.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a las siguientes personas e instituciones por la colaboración brindada para realizar este trabajo:

Dr Carlos Zuritz, Director de tesis.

Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo.

Ing. Agr. Humberto A. Frigerio y Eduardo A. Díaz Peralta.

Bodega Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y al Ing. Agr. Francisco Gómez.

Cátedra de Microbiología de la FCA – UNC y a sus docentes.

Ing. Agr. Alejandro Gascón

Pasante de investigación Srta Andrea Andrelucci

M. Sc. Ing. Agr. Hernán F. Vila

Todos mis compañeros de trabajo de las cátedras de Enología I y II de la FCA-UNC

INDICE GENERAL

Resumen.....	2
Summary.....	4
Agradecimientos.....	6
Indice de capítulos.....	7
CAPÍTULO 1: CONSIDERACIONES GENERALES (ESTADO DEL ARTE).....	11
1.1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1.1. Los compuestos fenólicos en las plantas.....	12
1.1.2. Estructuras de los compuestos fenólicos.....	12
1.1.3. Actividad biológica de los compuestos fenólicos.....	13
1.1.3.1. Actividad antioxidante de los fenoles de los alimentos.....	15
1.1.3.2. Actividad biológica de los compuestos fenólicos de uvas y vinos.....	18
1.1.3.3. Los compuestos fenólicos en las semillas de uva.....	21
1.1.3.4. Los efectos biológicos de extractos de semillas de uva.....	23
1.1.3.4.1. In vitro.....	23
1.1.3.4.1.1. Actividad antioxidante.....	23
1.1.3.4.1.2. Actividad antirradicales libres.....	23
1.1.3.4.1.3. Otras Actividades.....	24
1.1.3.4.2. In vivo.....	24
1.1.3.4.2.1. Actividades antioxidantes.....	24
1.1.3.4.2.2. Actividad de captura de radicales libres.....	25
1.1.3.4.2.3. Otras Actividades.....	25
1.1.3.5. Los efectos antioxidantes de los extractos de semillas de uva en alimentos.....	28
1.1.3.6. La toxicidad y digestibilidad del extracto de semillas de uva.....	28
1.1.4. Los procesos de extracción y los distintos solventes.....	28
1.1.4.1. Procesos de obtención de extractos de semillas de vid para evaluar su poder antioxidante.....	29
1.1.4.2. Procesos de obtención de extractos de otros vegetales con poder antioxidante.....	30
1.1.5. Las distintas formas de medir la concentración en polifenoles.....	31
1.1.6. Las distintas formas de medir la capacidad antioxidante.....	32
1.1.7. Relación actividad antioxidante-poder reductor.....	33
1.1.8. Relación concentración fenólica, actividad antioxidante y poder reductor...	34
1.2. PLANTEO DEL PROBLEMA.....	36
1.3. HIPÓTESIS.....	36
1.3.1. Hipótesis General.....	36
1.3.2. Hipótesis Particulares.....	36
1.4. OBJETIVOS.....	36
1.4.1. Objetivo General.....	36
1.4.2. Objetivos Particulares.....	37
CAPÍTULO 2: OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO SEMILLAS DE UVA.....	38
2.1. Hipótesis.....	39
2.2. Objetivos.....	39
2.3. Materiales y Métodos.....	39
2.3.1. Técnicas Analíticas.....	39
2.3.2. Análisis estadístico de los datos.....	40
2.4. Resultados y Discusión.....	40
2.4.1. Calibración del método.....	40
2.4.2. Adaptación y calibración de un micrométodo.....	42
2.4.3. Comparación entre el método original de Folin Ciocalteu y el micrométodo propuesto.....	43

2.4.4. Efecto de lípidos en la determinación de polifenoles.....	44
2.4.5. Selección del solvente según su capacidad extractiva.....	44
2.4.6. Determinación del poder reductor de los extractos.....	46
2.5. Conclusiones.....	48
CAPÍTULO 3: CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE FENOLES TOTALES A DISTINTAS TEMPERATURAS.	
SELECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE TRATAMIENTO.....	50
3.1. Hipótesis.....	51
3.2. Objetivos.....	51
3.3. Materiales y métodos.....	51
3.4. Resultados y Discusión.....	51
3.5. Conclusiones.....	60
CAPÍTULO 4: CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO.....	61
4.1. Hipótesis.....	62
4.2. Objetivos.....	62
4.3. Materiales y métodos.....	62
4.4. Resultados y Discusión.....	62
4.5. Conclusiones.....	64
CAPÍTULO 5: EMPLEO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS EN UN SISTEMA REAL SUJETO A OXIDACIÓN.....	65
5.1. Hipótesis.....	66
5.2. Introducción.....	66
5.3. Objetivos.....	66
5.4. Materiales y métodos.....	66
5.5. Resultados y Discusión.....	67
5.6. Conclusiones.....	68
CAPÍTULO 6: PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO CONCENTRADO: SECADO EN LECHO DE ESPUMA Y LIOFILIZADO.....	69
6.1. Hipótesis.....	70
6.2. Objetivos.....	70
6.3. Materiales y métodos.....	70
6.3.1. Secado en lecho de espuma.....	70
6.3.2. Liofilización.....	71
6.4. Resultados y Discusión.....	71
6.4.1. Secado en lecho de espuma.....	71
6.4.2. Secado por Liofilización.....	72
6.5. Conclusiones.....	74
CAPÍTULO 7: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO LÍQUIDO CONCENTRADO DE SEMILLAS DE VID. INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL JUGO DE MANZANAS EN COMPARACIÓN CON ANTIOXIDANTES COMERCIALES.....	75
7.1. Hipótesis.....	76
7.2. Objetivos.....	76
7.3. Materiales y métodos.....	76
7.4. Resultados y Discusión.....	76
7.5. Conclusiones.....	78
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	79

8.1. Conclusiones generales.....	80
8.2. Aporte de la tesis.....	80
8.3. Futuras líneas de investigación.....	81
Capítulo 9: BIBLIOGRAFIA.....	82
Capítulo 10: APÉNDICE.....	91
10.1. Método Folin Ciocalteu.....	92
10.2. Micrométodo Folin Ciocalteu.....	95
10.3. Poder reductor: Método de Oyaizu.....	97
10.4. Determinación del color del jugo de manzanas. Estimación del grado de oxidación. Método de Özoglu.....	98
10.5 Determinación de la densidad del extracto. Mét.del picnómetro.....	99
10.6. Cálculo de la dosis de extracto secado en lecho de espuma a emplear.....	100

Índice de Figuras

Figura 1. Fenol.....	12
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.....	12
Figura 3. Taninos.....	13
Figura 4. Catequina y epicatequina.....	22
Figura 5. Epicatequin galato.....	23
Figura 6. Curva de calibración para el método Folin Ciocalteu de determinación de Fenoles Totales.....	42
Figura 7. Curva de calibración para el micrométodo Folin Ciocalteu de determinación de Fenoles Totales.....	43
Figura 8. Comparación entre diferentes solventes. Fenoles totales Extractados.....	45
Figura 9. Comparación entre diferentes solventes. Poder reductor.....	46
Figura 10. Cinética de extracción de Fenoles Totales. Tratamiento a 90°C y 60°C	52
Figura 11. Cinética de extracción de Fenoles Totales. Tratamiento a 90°C y 60°C. Ajuste de líneas de tendencia.....	53
Figura 12. Velocidad de extracción de compuestos fenólicos a 90°C y a 60°C	55
Figura 13. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor. para una temperatura de 60°C, tiempo de tratamiento: 120 minutos.....	57
Figura 14. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor para una temperatura de 60°C, tiempo de tratamiento: 140 a 300 minutos.....	58
Figura 15. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor para una temperatura de 90°C.....	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Curva de calibración del método Folin Ciocalteu.....	41
Tabla 2. Curva de calibración del micrométodo Folin Ciocalteu.....	42
Tabla 3. Comparación entre el método original Folin Ciocalteu y el micrométodo...	43
Tabla 4. Comparación entre extractos desgrasados y no desgrasados en la determinación de fenoles totales.....	44
Tabla 5. Comparación entre diferentes solventes. Concentración de fenoles totales extractados	45
Tabla 6. Poder reductor de los extractos obtenidos con distintos solventes.....	46

Tabla 7. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 90°C y a 60°C.....	51
Tabla 8. Velocidad de extracción para los tratamientos a 90°C y a 60°C.....	54
Tabla 9. Poder reductor de los compuestos fenólicos durante la extracción con agua a 90°C y a 60°C.....	55
Tabla 10. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos.....	56
Tabla 11. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos, durante 120 minutos de extracción.....	56
Tabla 12. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos, entre 140 y 300 minutos de extracción.....	58
Tabla 13. Fenoles totales y Poder reductor en los extractos concentrados y sin concentrar.....	62
Tabla 14. Medianas de las relaciones entre extracto concentrado y sin concentrar.....	63
Tabla 15. Actividad antioxidante del extracto de semillas en jugo de manzanas.....	67
Tabla 16. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Efecto del extracto concentrado líquido y del extracto concentrado secado en lecho de espuma.....	71
Tabla 17. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Efecto del extracto concentrado líquido y del extracto liofilizado.....	72
Tabla 18. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Comparación entre el extracto de semillas de vid y otros antioxidantes comerciales.....	76

**CAPÍTULO 1:
CONSIDERACIONES GENERALES (ESTADO DEL ARTE)**

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Los compuestos fenólicos en las plantas.

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Robbins, 2003; Kähkönen et al, 2001).

1.1.2. Estructuras de los compuestos fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.

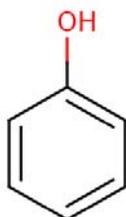


Figura 1. Fenol

Los flavonoides son los polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Robbins, 2003).

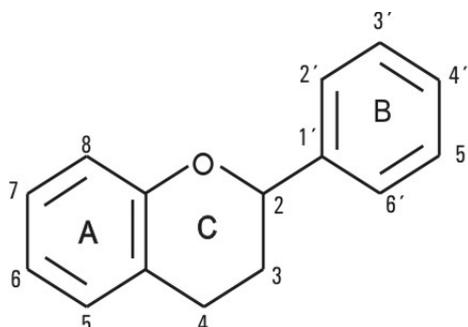


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo

pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres (Vinson et al, 1995).

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 - oxo en los anillos A y C (Velioglu et al,1998).

Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples (Hagerman et al, 1998).

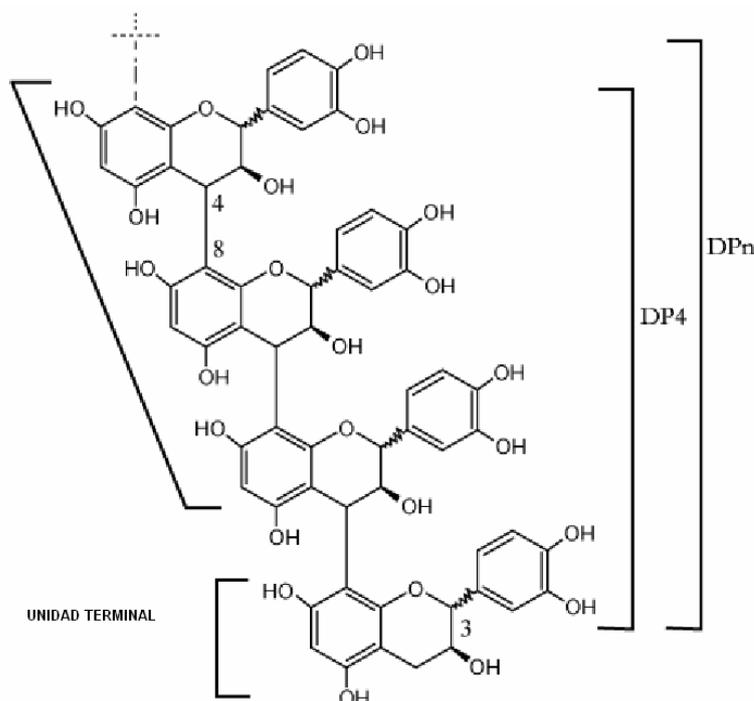


Figura 3. Taninos (Polímeros de catequina)

1.1.3. Actividad biológica de los compuestos fenólicos

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlcera, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del Streptococcus mutans (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu et al, 1998; Proestos et al, 2005).

Los flavonoides, en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora (Yen et al, 1993; Siddhuraju y Becker, 2003).

Existe evidencia epidemiológica acerca de los beneficios para la salud del consumo abundante de frutas y verduras en la dieta.

Altas ingestas de frutas y verduras están asociadas con el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. El pensamiento vigente vincula el alto contenido de antioxidantes con la inhibición de las enfermedades provocadas por el daño oxidativo, tales como la enfermedad cardíaca, las hemiplejias y el cáncer (Robbins, 2003).

Se ha probado, tanto epidemiológica, así como experimentalmente, la relación existente entre una ingesta aumentada de antioxidantes en la dieta, así como de vitaminas C y E, y β caroteno y la prevención de la enfermedad coronaria. Hertog (1993) determinó que la ingesta de flavonoides en la dieta, la mayoría a partir de té, se asoció con una reducción de las muertes por enfermedades coronarias. Los flavonoides de las plantas, específicamente los del té, son poderosos antioxidantes, comprobados in vitro en un sistema de oxidación de lipoproteínas (LDL) simulando lo que ocurre en el cuerpo humano (Vinson et al, 1995).

Las hierbas utilizadas para realzar y complementar los sabores de los alimentos son fuentes de compuestos fenólicos; el consumo de hierbas está asociado con una baja incidencia de cáncer y baja mortalidad por esta misma enfermedad (Wei-Zheng and Wang, 2001).

Los flavonoides y otros compuestos fenólicos actúan en forma preventiva en el desarrollo del cáncer y de la enfermedad coronaria. La ingestión de vino tinto desalcoholizado ó de una mezcla de compuestos fenólicos extraída del vino tinto mejora el status antioxidante del plasma en humanos. El consumo de dietas controladas altas en frutas y verduras incrementa significativamente la capacidad antioxidante del plasma en humanos. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación negativa significativa entre la ingesta de frutas y verduras y la mortalidad debida a la enfermedad cardíaca (Käkhönen et al, 1999).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayor expectativa de vida. Estas propiedades incluyen actividad anticáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, trombosis y carcinogénesis. Sus propiedades conocidas incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria (Siddhuraju et al, 2003).

Los flavonoides provenientes de verduras y frutas consumidos en la dieta están inversamente relacionados con la mortalidad causada por la enfermedad coronaria. Los flavonoides del vino tinto han demostrado fuerte actividad de inhibición de la oxidación de las LDL; in vitro e in vivo reducen la agregación de las plaquetas y esto se asocia con la reducción de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. La (+) catequina ha demostrado prevenir la oxidación del plasma humano e inhibir la oxidación de las LDL. Los flavonoides pueden explicar los efectos protectores de la dieta mediterránea (rica en vegetales, frutas y vino) contra las enfermedades cardiovasculares. La mayor concentración de (+) catequina en el plasma se observó en sujetos que consumieron frutas, verduras y vino. Su acción antioxidante y antiagregación de las plaquetas puede explicar parcialmente la protección relativa contra la enfermedad coronaria (Ruidavets et al, 2000).

1.1.3.1. Actividad antioxidante de los fenoles de los alimentos

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente $\frac{2}{3}$ de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (Robbins, 2003; Hagerman et al, 1998).

Existen numerosos estudios sobre la actividad antioxidante de los alimentos de consumo corriente en las diferentes culturas: las frutas, las hierbas, el té, el cacao, las verduras, los cereales, entre otros.

Las frutas, especialmente las agrupadas en lengua inglesa bajo el nombre de berries -*Vaccinium myrtillus* (arándanos), *Ribes nigrum* (cassis ó corintos negros), *Ribes grossularia* (uvaespina ó grosella), *Rubus idaeus* (frambuesa), *Ribes rubrum* (corintos rojos) y *Fragaria ananassa* (frutilla)- son una fuente importante de antioxidantes en la dieta. En estas frutas se encuentran presentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, antocianos, flavonoles, catequinas y taninos (hidrolizables y condensados). Muchos de estos compuestos exhiben una variedad de efectos biológicos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y acciones vasodilatadoras. Los extractos de las frutas antes mencionadas resultaron altamente antioxidantes, inhibieron la formación de hidroperóxidos en metil linoleato y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de los liposomas. También tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente (Kähkönen et al, 2001).

Las frutas en general, y en particular, las frutas pequeñas ó berries, contienen una amplia gama de flavonoides y ácidos fenólicos que muestran actividad antioxidante. Los principales subgrupos en berries y frutas son los antocianos, proantocianidinas, flavonoles y catequinas. Los estudios sobre la actividad antioxidante han sido enfocados principalmente en uvas, en las cuales se ha verificado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humanas (LDL) en un nivel comparable con el del vino. El extracto de frutillas frescas ha actuado como un antioxidante 5 veces más activo que el trolox, en un sistema artificial que genera peroxilo. Los extractos de blackberries, corintos rojos y negros, blueberries, frambuesas negras y rojas poseen una alta actividad como captores de radicales superóxido. Los ácidos hidroxinámicos típicamente presentes en las frutas han demostrado inhibir la oxidación en las LDL in vitro. Los extractos fenólicos de berries (blackberries, frambuesas, cerezas, blueberries, y frutillas) inhiben la oxidación de las LDL humanas y la oxidación de los liposomas (Kähkönen et al, 1999).

El té se ha usado como bebida de consumo diario y como medicina por cientos de años en China. Posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anticáncer, así como también capacidad para capturar los radicales libres y el oxígeno activo. Previene el daño oxidativo sobre el DNA e inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ingesta regular de té mejora el status antioxidante in vivo, y por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades coronarias. Los antioxidantes del té protegen contra fuertes mutágenos en modelos animales. Por otra parte, en estudios epidemiológicos se ha comprobado una disminución de la incidencia de cáncer en asociación a altos consumos de té. El poder antioxidante del té se correlaciona fuertemente con el contenido de polifenoles totales, en particular epicatequina. La actividad antioxidante se incre-

menta con el incremento de los sustituyentes del tipo orto dihidroxi. El epigalocatequin-galato tiene 4 de estos grupos, y es el compuesto que mayor actividad presenta. Las propiedades antioxidantes y antimutagénicas del extracto de té varían con la intensidad de la fermentación del té durante el proceso de manufactura. Durante la fermentación, los flavonoles de las hojas verdes del té, principalmente catequinas y sus ésteres gálicos, sufren una polimerización oxidativa catalizada por la polifenoloxidadasa, que vuelve negras las hojas. El contenido inicial de catequina, se convierte en tearubingenina y teaflavinas, que dan al té negro su característica astringencia. El té verde contiene 30 a 42% de catequinas sobre la masa total seca, mientras que el té negro contiene 3 al 10% y el té Oolong, semifermentado, contiene 8 al 20% de catequina. Los extractos de té verde tienen fuerte acción antioxidante, debida a los compuestos activos catequina, epigalocatequin-galato, epicatequin-galato, epigalocatequina y epicatequina. El extracto crudo de té verde tiene mayor actividad antioxidante que una mezcla de catequina reconstituida. La actividad antioxidante de estas catequinas ha sido demostrada en aceites calentados, en emulsiones de β caroteno/ lino-leato, en ensayos de actividad de captura de radicales con iniciadores de radicales, en tests de captura de superóxido, en oxidaciones aceleradas por el calor y suministro de oxígeno, y en reacciones catalizadas por enzimas. Las propiedades antioxidantes parecen explicar la acción antimutagénica. El té verde no fermentado tiene un poder antioxidante superior al del té negro fermentado (Roedig-Penman and Gordon, 1997; Vinson et al, 1995; Gow-Chin Yen and Hui-Yin Chen, 1995; Benzie and Szeto, 1999).

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, los cuales comprenden 12 al 18% del peso seco total del grano entero. Los polifenoles presentes son catequinas, procianidinas y antocianidinas. Luego de la fermentación y el secado, los flavonoides sufren una variedad de reacciones de oxidación y polimerización que originan taninos. Los fenoles del cacao tienen propiedades antioxidantes in vitro. El café verde tiene alto contenido de polifenoles, entre ellos el ácido ferúlico y cafeico, cuya actividad antioxidante ha sido demostrada in vitro e in vivo. El grado de tostado disminuye la concentración en polifenoles. El café descafeinado no presenta diferencias con el café sin descafeinar respecto de su poder antioxidante. La protección contra la oxidación de las LDL no se debe a un solo compuesto, sino que es el resultado de la acción de varios compuestos fenólicos. La composición química de las bebidas varía grandemente: consiste en epicatequinas en el té verde, epicatequinas y taninos en el té negro, catequinas, procianidinas y antocianinas en el cacao, y en el café hay ácido clorogénico, ácido cafeico y melanoidinas. Café, cacao y té contienen polifenoles con altas actividades antioxidantes (Ricchelle et al, 2001).

Existe relación entre el contenido de procianidinas de las muestras de cacao y su potencial antioxidante. Las muestras que han fermentado más intensamente tienen menor poder antioxidante, y menor contenido de procianidina. El contenido de procianidina es un indicador del potencial antioxidante, ya que se correlaciona en forma directa con el poder antioxidante (Adamson et al, 1999).

En hierbas aromáticas tales como Salvia, tomillo, Ginkgo biloba, menta, artemisia, aloe, valeriana, ciboulette, diente de león, dill, lavanda, hinojo, orégano, mejorana, melisa, perejil, romero, albahaca, laurel, sauco, coriandro, perejil, azafrán, diente de león, manzanilla, tilo, tomillo, y vinca se estudió el poder antioxidante y la composición polifenólica. Cada hierba tiene una composición fenólica diferente, y el poder antioxidante de cada uno de estos compuestos también es diferente. La actividad antioxidante de los flavonoides se incrementa con el N° de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el C-3'. Existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, en consecuencia, las hierbas son una buena fuente potencial de antioxidantes naturales. Romero y tomillo

presentaron mayor concentración polifenólica y mayor poder antioxidante (Proestos et al, 2005).

Se ha determinado actividad antioxidante en porotos, remolacha, maíz tierno, brócoli, ajo, cebolla, espárragos, papas, romero, salvia, orégano, tomillo, nuez moscada, avena, hojas de pino (el pignogenol se obtiene del *Pinus marítima* y actúa como captor de radicales libres hidroxilo y superóxido) y corteza de abedul. No se encontró correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de plantas en los grupos estudiados trabajando sobre la oxidación del metil linoleato. En los berries si se encontró relación entre alto contenido de polifenoles y alta actividad antioxidante. Las verduras ensayadas mostraron baja concentración de fenoles respecto a las berries. Pero la piel de remolacha, la piel de papas color púrpura y la piel de la remolacha azucarera mostraron actividad antioxidante interesante. En los cereales, la concentración de fenoles es aún más baja que en las verduras, y el poder antioxidante es bajo. Entre las hierbas, el tomillo posee fuerte acción antioxidante (Käkhönen et al, 1999).

Las semillas y cáscaras de trigo sarraceno, lino, semillas y cáscaras de girasol, raíces de ginseng, raíces y flores de *Echinacea*, papas de carne blanca y púrpura, arándanos, cerezas, pieles de cebolla morada, raíces y aceite de rábano picante y trigo fueron estudiadas en cuanto a su actividad antioxidante. Se encontró correlación directa entre concentración fenólica y actividad antioxidante (Velioglu et al, 1998).

Los cítricos contienen flavonoides en forma de flavonas polimetoxiladas y flavanonas glicosiladas. Tienen propiedades anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias, efectos sobre la fragilidad capilar y capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Las cáscaras y las semillas de los cítricos tienen capacidad antioxidante con respecto a la oxidación del citronelal, debida a estos compuestos fenólicos. Sus extractos pueden ser útiles para evitar la oxidación de los jugos de frutas y aceites esenciales. Generalmente, las semillas poseen mayor actividad antioxidante que las cáscaras. No siempre se verifica una relación directa entre mayor concentración fenólica y mayor actividad antioxidante en los cítricos (Bocco et al, 1998).

Moringa oleifera es un árbol nativo del NO de la India, se cultiva como cerco verde. Sus frutos verdes se consumen como una verdura, se comen también las flores y las hojas jóvenes. Una pasta de hojas se emplea como emplasto para heridas. El extracto metabólico ha demostrado tener actividad antiúlceras gástrica en ratas. El jugo de hojas frescas posee acción antibacteriana contra *Micrococcus pyogenes* var. *Aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En un ensayo en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas adicionada de jugo fresco de *Moringa oleifera*, se observó un descenso del nivel de colesterol en el suero, en el hígado y en el riñón. Tradicionalmente, el ghee o manteca clarificada de leche de vaca o búfala se ha preparado con hojas de *Moringa*, lo cual retarda el deterioro oxidativo del ghee, por actuar como antioxidante natural. El poder reductor o antioxidante de los extractos de *Moringa* aumenta con el aumento de concentración de polifenoles de estos extractos. Los flavonoides están entre los más potentes antioxidantes de las plantas debido a que poseen uno ó más de los siguientes componentes estructurales que están involucrados en la actividad antiradical o antioxidante: un grupo orto-difenol en el anillo B, un doble enlace conjugado en 2-3, con una función oxo en el C₄ y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 (Siddhuraju and Becker, 2003).

Los extractos crudos de frutas, hierbas, verduras, cereales y otros materiales vegetales ricos en fenoles están generando interés en la industria de los alimentos debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos, y por lo tanto mejoran la

calidad y el valor nutricional de los alimentos. La importancia de los constituyentes antioxidantes de los materiales vegetales en el mantenimiento de la salud y la protección contra la enfermedad coronaria y el cáncer aumenta el interés de los elaboradores de alimentos y de los consumidores. La tendencia se encamina hacia la preparación de alimentos con valores específicos para la salud (Käkhönen et al, 1999).

1.1.3.2. Actividad biológica de los compuestos fenólicos de uvas y vinos

Si bien el vino ha sido consumido por el hombre desde la antigüedad, sólo a fines de la década del 70 surge la relación entre el consumo moderado de vino y la conservación de la salud. En 1978, Genevois analizó los resultados de encuestas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre las causas de mortalidad en 23 países europeos y notó que el infarto de miocardio era una de las causas principales de muerte para los hombres entre 55 y 64 años. Esta tasa de mortalidad variaba en los distintos países, de modo que los 23 países se podían agrupar en tres clases: los países vitivinícolas, Europa central y Europa del norte. Los países vitivinícolas presentaban la tasa de mortalidad debida a infarto de miocardio más baja, luego se ubicaba Europa central y, finalmente con la tasa más elevada, Europa del norte. En 1979, St-Léger realizó una encuesta en 18 países desarrollados sobre los factores asociados a la mortalidad cardíaca, considerando unos 16 parámetros, entre ellos el consumo de vinos. Encontró una asociación negativa entre la tasa de mortalidad por infarto de miocardio y el consumo habitual de vino. En Francia e Italia la tasa de mortalidad fue 3 a 5 veces más baja que en Escocia e Irlanda. Los países como Bélgica ó Alemania, que consumen vino, pero también cerveza y destilados, se ubicaron entre los extremos. Esto permitió concluir que el efecto protector del vino ante el infarto de miocardio proviene de algún constituyente diferente del alcohol. En 1982, Masquelier atribuyó los efectos benéficos de los vinos a los procianidoles (taninos) y catequinas (Bourzeix et al, 1986).

En 1992, Renaud analizó estudios epidemiológicos sobre mortalidad cardiovascular, tratando de establecer la causa de las diferencias entre Francia y el resto de los países. En el caso general, una alta ingesta de grasas saturadas se relaciona positivamente con la alta mortalidad causada por la enfermedad coronaria. Sin embargo, la situación de Francia resulta paradójica, ya que existe una alta ingesta de grasas saturadas pero una baja mortalidad por enfermedades coronarias. Esta paradoja se atribuye en parte al consumo de vino. Estudios epidemiológicos indican que el consumo de alcohol, en el nivel de ingesta de Francia (20 a 30 g por día), puede reducir el riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias en un 40%. El alcohol inhibe la agregación de las plaquetas, y este fenómeno se asocia a la enfermedad cardiovascular (Renaud and de Lorgeril, 1992).

Finalmente, Frankel estableció en 1993 en estudios in vitro, que el vino tinto inhibe la oxidación, catalizada por el cobre, de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL). Los compuestos fenólicos del vino tinto son los responsables de la acción antioxidante, y por lo tanto del efecto protector ante la enfermedad cardiovascular (Frankel et al, 1993).

El alcohol altera el balance de lípidos de la sangre disminuyendo el nivel total de colesterol, y aumentando los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o colesterol "bueno" (Waterhouse, 1995).

Kanner, en 1994, estudió tres variedades de uvas y dos vinos actuando como antioxidantes en la peroxidación de lípidos (LDL humana) in vitro ante la presencia de catalizadores biológicos tales como mioglobina, citocromo C, ascorbato de hierro y

iones Cu^{+2} (como catalizador inorgánico). Se estableció que el vino tinto inhibía la oxidación en forma más eficiente que el α tocoferol. Los componentes polifenólicos del vino tinto son los responsables de la "paradoja francesa", por medio de la prevención de la oxidación de las LDL (Kanner et al, 1994).

Frankel determinó la actividad antioxidante de 20 vinos californianos, en la inhibición de la oxidación de las LDL humanas catalizada por el cobre in vitro. Se determinó una asociación directa entre la concentración de polifenoles totales y la inhibición relativa de la oxidación de la LDL; el ácido gálico y la catequina fueron los compuestos fenólicos individuales que presentaron mayor coeficiente de correlación (mayor asociación) con la inhibición de la oxidación de las LDL. También se concluyó que la actividad antioxidante no depende de un solo compuesto fenólico, sino que está distribuida entre distintos compuestos. El resveratrol no presenta relación con la actividad antioxidante (Frankel et al, 1995).

Las propiedades antioxidantes del vino tinto reducen la capacidad de oxidación del suero de la sangre y la oxidabilidad de las LDL, así como inhiben el pasaje de monocitos (un tipo de leucocitos o glob. Blancos) de la sangre dentro de la pared arterial, retardando el inicio de la aterosclerosis (Estruch, 2000).

La inhibición de la oxidación de las LDL humanas fue demostrada por la adición de una mezcla de polifenoles de vino. El vino tinto diluido 1000 veces inhibió in vitro la oxidación de las LDL humanas en forma más eficiente que el α tocoferol. La (+) catequina y la (-) epicatequina son las unidades básicas del grupo de las catequinas. Las procianidinas están formadas por la asociación de varias unidades monoméricas: 2 a 5 unidades para los oligómeros de catequina y más de 5 unidades para los polímeros. Estas moléculas poseen una estructura que les confiere propiedades antioxidantes. Los flavonoides son las moléculas más lipofílicas dentro de los antioxidantes naturales, pero son menos que el α tocoferol. El α tocoferol parece estar localizado en los lípidos de la membrana, dentro de la doble capa de fosfolípidos, mientras que los flavonoides están probablemente situados en la superficie polar de la doble capa. Los radicales libres, transportados en el plasma en forma acuosa, serán capturados más fácilmente por los flavonoides, que por el α tocoferol que se encuentra menos disponible. Por lo tanto, los flavonoides pueden concentrarse cerca de la superficie membrana de las partículas de LDL, y así capturar los radicales libres acuosos. De esta forma previenen el consumo del α tocoferol lipofílico, y por lo tanto, la oxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Se encontró alta correlación entre fenoles totales y capacidad antioxidante. Entre los fenoles individuales, los que mejor correlacionaron con la actividad antioxidante fueron el ácido gálico, la procianidina B_3 , la catequina, la epicatequina, el ácido caftarico y las procianidinas B_1 y B_2 . Otro grupo, con menor correlación fue compuesto por procianidina B_4 y ácido cafeico. La menor correlación estuvo dada por los antocianos. Esto demuestra que los fenoles contenidos en el vino en diferentes concentraciones son activos en la actividad antioxidante. Al ensayar 54 vinos franceses se concluye que la mayor capacidad antioxidante se encuentra en los vinos tintos en la variedad Pinot noir; en los vinos blancos, Chardonnay elaborado con maceración, llega a valores semejantes a los vinos tintos. Los vinos dulces de la variedad semillón tienen mayor poder antioxidante que los vinos secos. La ingesta de catequina es 6 veces mayor al consumir vinos Pinot noir que al consumir vinos variedad Chardonnay elaborados del modo clásico (Landrault et al, 2001).

Teissedre probó que la catequina se encuentra en la sangre de los humanos luego del consumo de vino. Esta molécula presenta actividad antioxidante y protege a las LDL de la oxidación in vivo, cuando se tiene un consumo regular de unos 300 ml diarios de vino tinto. En un modelo animal se verificó la capacidad de los compuestos

fenólicos para retardar la aparición de tumores cancerosos. Las mayores actividades de inhibición relativa de la oxidación de las LDL se deben a los vinos tintos provenientes de maceraciones largas (Teissedre et al, 1996).

Se ha probado la actividad de los compuestos fenólicos del vino para inhibir la agregación de las plaquetas, así como la actividad antioxidante. Estas características reducen el desarrollo de la placa oclusiva en las arterias del corazón (Ruf, 1999).

Entre los polifenoles del vino se encuentra la catequina. Este compuesto se ha probado in vivo, en ratas, como parte de la dieta, verificándose un retardo en el desarrollo de tumores en ratones transgénicos, que normalmente generan tumores (Ebeler et al, 2002).

El vino tiene una alta capacidad antioxidante, que es función de su contenido en polifenoles. La contribución de cada componente depende de su calidad como antioxidante, concentración e interacción con su microambiente. Estudios in vitro demuestran su capacidad de proteger las LDL de la oxidación. Leighton realizó estudios in vivo con voluntarios demuestran que la ingestión de vino tinto está asociada a un aumento de la capacidad antioxidante del plasma, además de un aumento de algunos compuestos polifenólicos en el plasma (Leighton et al, 1998).

En alimentos que contienen emulsiones de aceite de maíz se ha verificado la acción antioxidante de los vinos, así como en lípidos de pescado y en pescado congelado se ha comprobado la acción de polifenoles provenientes de uvas. Los vinos presentan acción antioxidante sobre aceite de maíz libre de tocoferoles naturales emulsionado con lecitina de soja. Este tipo de emulsión es frecuente en alimentos. Se ensayaron vinos blancos, rosados y tintos; se determinaron dienos conjugados hidroperóxidos y hexanal, productos originados por la oxidación. La actividad antioxidante resultó asociada al contenido de fenoles totales. Por lo tanto el vino tinto resultó más efectivo que el rosado, y este, a su vez, mejor que el vino blanco (Sánchez Moreno et al, 2000).

Se ha establecido que la capacidad antioxidante está asociada a la concentración de polifenoles totales. Los vinos tintos tienen mayor concentración en polifenoles debido a la maceración, y por lo tanto, mayor actividad antioxidante. Vinson estudió en forma comparativa la eficiencia antioxidante de los vinos tintos y blancos. Trabajó in vitro sobre LDL de hamsters. Determinó que los vinos tintos tienen un mayor índice de fenoles antioxidantes que los vinos blancos (Vinson and Hontz, 1995).

En 13 vinos italianos típicos se estudió la composición fenólica en relación con su actividad antioxidante total. Existe una alta correlación entre el contenido fenólico de los vinos y la actividad antioxidante total, siendo los vinos tintos más antioxidantes que los blancos. Parece ser que la absorción de los polifenoles es limitada, y que se produce una extensa degradación en el tracto digestivo. En consecuencia, los polifenoles pueden actuar en el tracto digestivo limitando la formación de especies reactivas del oxígeno o bien capturándolas debido a su gran potencial de reducción. Por lo tanto, las vitaminas C, E y β caroteno son protegidas del ataque de los radicales libres, y debido a su buena biodisponibilidad pueden ser absorbidas por los tejidos, aumentando así el status antioxidante del cuerpo (Simonetti et al, 1997).

Se ha determinado que la actividad antioxidante de los jugos de uva y de vinos parece basarse en su capacidad para capturar radicales libres. Los vinos tintos, debido al proceso de maceración, tienen mayor actividad antioxidante que los jugos de uva que los originan (Sánchez Moreno et al, 1999).

Se verifica que a mayor concentración de fenoles totales, mayor es la actividad antioxidante (Baderschneider et al, 1999).

El vino tinto es una buena fuente de polifenoles y puede contener de 1000 a 4000 mg/L de estos compuestos. Las propiedades antioxidantes de los vinos tintos han sido correlacionadas con su contenido en flavanoles, antocianos y ácido tánico, pero estas propiedades se correlacionan mejor con los fenoles totales que con los compuestos individuales. El contenido de flavanoles totales (flavanoles monoméricos: catequina y epicatequina y poliméricos: proantocianidinas) está fuertemente relacionado con las propiedades antioxidantes de los vinos y con la captura de radicales libres hidroxilo (Anis Arnous et al, 2001).

No todos los fenoles presentes en el vino poseen la misma capacidad antioxidante, algunas moléculas son más eficaces que otras. En 26 vinos blancos griegos se evaluó el poder antioxidante, antirradical y reductor. El poder antioxidante de los vinos se correlacionó con los fenoles totales, si bien es menor que en los vinos tintos. La act. Antirradical se correlacionó con los fenoles totales y con los hidroxicinamatos (ésteres del ácido tartárico con ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico). Los no hidroxicinamatos (catequina, epicatequina y ácido gálico) se correlacionaron con el poder reductor (Makris et al, 2003).

Los compuestos fenólicos de los vinos pueden dividirse en dos categorías: los no flavonoides (comprenden los hidroxibenzoatos y los hidroxicinamatos) y los flavonoides, que incluyen los flavonoles (quercetina, miricetina), los flavan 3 oles (catequina y epicatequina), los polímeros de la catequina o procianidinas, y los antocianos. Colectivamente, son 20 veces más abundantes en vinos tintos que en vinos blancos. En este estudio se obtuvo una correlación positiva entre el potencial antioxidante total del vino y el ácido gálico, la catequina y la epicatequina, así como los polifenoles totales (Minussi et al, 2003).

En un modelo de resistencia a la insulina asociado con hipertensión, como son las ratas alimentadas con fructosa, se probó que un extracto de polifenoles de vino tinto (100 mg/kg), etanol (1 mL/kg), o la combinación de ambos previno el desarrollo de alta presión. Por otra parte, se probó que los polifenoles del vino, el etanol o la asociación de ambos, previno la hipertrofia cardíaca y la superproducción de especies reactivas del oxígeno por el corazón o la aorta, mientras que el etanol corrigió la resistencia a la insulina, pero no fue capaz de reducir la hipertrofia cardíaca (Najim et al, 2004).

Estudios in vivo en 8 voluntarios humanos acerca de la modificación de la capacidad antioxidante del plasma han permitido conocer que el máximo aumento de la capacidad antioxidante ocurre 55 minutos después de la ingesta de 300 ml de vino tinto. Existieron diferencias significativas en la capacidad antioxidante del plasma medida antes y después de la ingesta de vino (Fernández- Pachón et al, 2005).

1.1.3.3. Los compuestos fenólicos en las semillas de uva

Las semillas de uva contienen además de un 7% de fenoles complejos, 40% de fibra, 16% de aceite, 11% de proteínas, azúcares y sales minerales (Murga et al, 2000). El 63% de los fenoles totales de las vides de variedades tintas se encuentra en las semillas, el 34% en las pieles y el 3% en el jugo (Meyer and Hernández, 1970, Bourzeix et al, 1986)

Entre los compuestos fenólicos presentes en las semillas de uva se incluyen varios flavonoides, tales como flavan-3-ol monoméricos: (+) catequina, (-) epicatequina) y epicatequin-3- o galato, dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros de hasta 15-16 unidades (procianidinas poliméricas) y ácidos fenólicos (gálico y elágico). Pueden existir también pequeñas cantidades de galocatequinas. Los polifenoles procianidínicos son los oligómeros de las unidades flavan -3-oles, especialmente catequina y epicatequina. Las procianidinas dímeras son las más simples y tienen uniones de tipo C₄ – C₈ entre los monómeros. Los dímeros procianidínicos más comunes son B₁, B₂, B₃ y B₄. Estos están seguidos de los isómeros con uniones C₄ – C₆, tales como B₅, B₆, B₇ y B₈. (Castillo et al, 2000; Yusuf Yilmaz and Toledo, 2004). Todas las procianidinas aciladas encontradas en semillas de uva son ésteres del ácido gálico. En las semillas de uva también existen cantidades substanciales de procianidinas altamente polimerizadas; más del 55% de las procianidinas en semillas de uva consisten en polímeros de más de 5 unidades (Saito et al, 1998; Koga et al, 1999; Kennedy et al, 2000; Jayaprakasha et al ,2001; Yusuf Yilmaz et al, 2004).

En general, las semillas de las variedades tintas tienen más compuestos fenólicos que las semillas de las variedades blancas (Fuleki and Ricardo da Silva, 1997).

Los flavan 3 oles monoméricos y poliméricos de las semillas de uva se encuentran localizados en las células del parénquima más externo de la semilla (capa soft o capa blanda), el endosperma contiene muy pocos flavan 3 oles o puede carecer de ellos. Las procianidinas se localizan en su mayoría en la cubierta marrón de la semilla (Thorngate and Singleton, 1994).

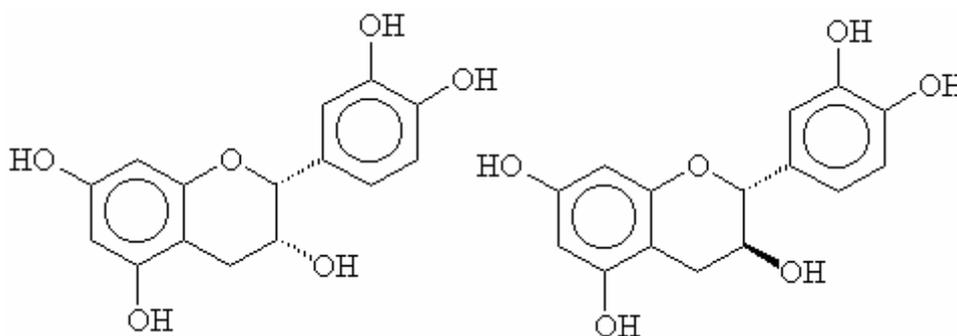


Fig 4. Catequina y epicatequina

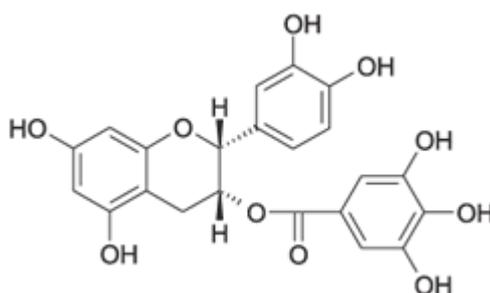


Fig 5. Epicatequin - galato

1.1.3.4. Los efectos biológicos de extractos de semillas de uva

Los extractos de semillas de uva poseen una variedad de efectos biológicos, algunos comprobados in vitro y otros in vivo, algunos en animales y otros verificados en seres humanos.

1.1.3.4.1. In vitro

El extracto de semillas de uva (que contiene distintos compuestos fenólicos, entre ellos, catequina y procianidinas), posee diferentes propiedades verificadas in vitro.

1.1.3.4.1.1. Actividad antioxidante:

El extracto de semillas de uva (ES) se comporta como inhibidor de la oxidación in vitro de las LDL humanas (Jayaprakasha et al, 2001); actúa como antioxidante efectivo en un sistema de emulsiones de aceite en agua estabilizado con proteínas aisladas de suero de leche (Min Hu et al, 2004); previene la formación de lesiones del DNA en hepatocitos causadas por el stress oxidativo (Llopiz et al, 2004). La (+) catequina muestra actividad antioxidante en el plasma humano, debido a dos acciones diferentes: 1) Una disminución de la velocidad de degradación del α tocoferol y el β caroteno y 2) Una inhibición de la oxidación de los lípidos del plasma. (Yusuf Yilmaz y R. Toledo, 2004). Por otra parte, las procianidinas son más efectivas que los monómeros en la prevención de las lesiones del DNA en hepatocitos causadas por el stress oxidativo (Llopiz et al, 2004). Los compuestos fenólicos provenientes del extracto de semillas son antioxidantes debido a su capacidad como donadores de hidrógeno (Bagchi D. et al, 2000).

1.1.3.4.1.2. Actividad antirradicales libres:

Existe correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad de captura de radicales libres. El extracto de semillas presenta mayor capacidad de captura de radicales libres in vitro que el extracto obtenido a partir de granos enteros de uva. La polaridad de los compuestos fenólicos es determinante en cuanto a la capacidad de capturar radicales libres. Los compuestos fenólicos que poseen mayor cantidad de sustituyentes hidroxilados (polihidroxilados) tienen una polaridad mayor que los otros fenoles (Caillet et al, 2006).

Los compuestos fenólicos capturan las especies reactivas del oxígeno, tales como radicales anión superóxido y radicales lípidos peroxi (de Freitas et al, 1998). Las procianidinas tienen actividad de captura de radicales libres (Yamakoshi et al, 1999; Koga et al, 1999) y de oxígeno singulete (Bagchi D. et al, 2000).

Las procianidinas (específicamente la procianidina B₂ - 3'- O galato), son efectivas como captoras del radical oxígeno. Los dímeros son más activos que los monómeros. La presencia de esterificaciones con el ácido gálico en los monómeros incrementa la capacidad de captura de radicales oxígeno (Ricardo Da Silva et al, 1991).

La (+) catequina muestra también actividad de captura de los siguientes radicales libres: hidroxilo, peroxilo y superóxido. La (+) catequina y la epicatequina capturan al radical peroxilo con una eficiencia 10 veces superior a la que presentan el L - ascorbato y el β caroteno (Yusuf Yilmaz y R. Toledo, 2004).

1.1.3.4.1.3. Otras Actividades:

Las procianidinas de semillas de *Vitis vinifera* son valoradas como agentes terapéuticos en el tratamiento de desórdenes vasculares, tales como la inestabilidad del colágeno en la pared arterial, la localización arterial de la formación de la histamina y la oxidación del colesterol. Poseen actividad antiinflamatoria y antihipertensiva (Castillo et al. 2000). Además estabilizan el colágeno de la pared de las arterias, inhiben la formación localizada de la histamina en las arterias y aceleran la remoción del colesterol. (Fuleki et al, 1997). Por otra parte, las procianidinas inhiben la agregación de las plaquetas (Saito et al, 1998).

Los compuestos fenólicos de las semillas de uva son antimutagénicos (Jayaprakasha et al, 2001) y antineoplásicos (Murga et al, 2000). También son antivirales (Jayaprakasha et al, 2001) y antibacterianos, inhibiendo con mayor facilidad a las bacterias Gram (+) que a las bacterias Gram (-) (Jayaprakasha et al, 2003). Asimismo, son inhibidores de la fosfolipasa A, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Bagchi D. et al, 2000).

1.1.3.4.2. In vivo

1.1.3.4.2.1. Actividades antioxidantes:

La ingesta de procianidinas aumenta la resistencia del plasma sanguíneo contra el stress oxidativo. Se investigó el efecto antioxidante in vivo (en ratas) de un extracto de semillas de uva, rico en procianidinas, midiendo la capacidad antioxidante del plasma después de la ingestión del extracto GSPE. Se verificó que las procianidinas actúan como antioxidantes en la circulación de la sangre aún después de su absorción. En este trabajo se demuestra por primera vez la actividad antioxidante de las procianidinas in vivo en ratas. En el análisis del plasma luego de la ingesta de proantocianidinas aparecen metabolitos originados por hidrólisis de proantocianidinas en el tracto digestivo de las ratas tales como ácido gálico, (+) Catequina y (-) epicatequina (Koga et al, 1999).

Los extractos de semillas (GSPE) tienen actividades antioxidantes in vivo, ensayadas en ratas. Pueden ser tan importantes como la vitamina E en la prevención del daño oxidativo de los tejidos, por reducción de la oxidación de los lípidos y/o inhibición de la producción de radicales libres (Yilmaz Y.y R Toledo, 2006).

La alimentación con proantocianidinas inhibe la progresión de la aterosclerosis en conejos alimentados con colesterol (Koga et al ,1999).

La ingestión de un extracto de semillas en dosis de 600 mg incrementó la actividad antioxidante total del suero en humanos (Nuttall et al, 1998).

Las procianidinas de semillas de uva suministradas en la dieta de seres humanos, ejercen su protección antioxidante, ahorrando o economizando vitamina E liposoluble y reduciendo el daño oxidativo al DNA. El consumo de GSPE resulta en un ahorro de α -tocoferol en las membranas de los glóbulos rojos, una considerable reducción del daño oxidativo del DNA y un pequeño aumento de los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de las membranas de los glóbulos rojos (Simonetti et al, 2002; Castillo et al, 2000).

No todos los compuestos fenólicos de las semillas tienen la misma actividad antioxidante. Las procianidinas se consideran antioxidantes superiores a los monómeros. Los extractos de semillas tienen mayor capacidad antioxidante que los extractos de hollejos. La capacidad antioxidante del GSPE se debe a la presencia de pigmentos poliméricos (procianidinas dímeros, trímeros y oligómeros) sumados a los monómeros. Las semillas y los hollejos obtenidos como subproductos de fermentación son buenas fuentes de antioxidantes, aún después de haber sido sometidos a un proceso de secado con aire caliente (Yilmaz Y. R. Toledo, 2004).

1.1.3.4.2.2. Actividad de captura de radicales libres:

El extracto de semillas provee protección contra la acción de los radicales libres y la oxidación de los lípidos, inducida por los radicales libres, así como del daño al DNA. (Bagchi D. et al, 2000).

El extracto de semillas demostró potente actividad supresora del radical superóxido, débil actividad supresora del radical hidroxilo y muy pequeña actividad inhibidora del radical metilo, en pH alcalino, no en pH fisiológico (7,4). Los flavonoides en el extracto son una mezcla de distintas clases de oligómeros procianidínicos, con distinto grado de polimerización. No hay un antioxidante que capture toda clase de radicales. Generalmente se emplea una combinación de distintos antioxidantes. El extracto de semillas puede actuar como un potente captor de radical superóxido y como un sinérgico para el ácido ascórbico, α tocoferol y β caroteno (Yamaguchi et al, 1999).

Las procianidinas actúan como captores de radicales libres, actúan sinérgicamente con la vitamina E (Nuttall et al, 1998; Saito et al 1998; Fuleki et al, 1997).

1.1.3.4.2.3. Otras Actividades:

El extracto de semillas de uva presenta actividad antiúlceras estomacal en ratas, (Saito et al, 1998, Yamaguchi et al, 1999, Yilmaz Y. y R. Toledo, 2006). Se ensayaron dos extractos de semillas diferentes GSE I (40,9% flavonoides totales) y GSE II (81,3% flavonoides totales) respecto de su actividad protectora de las lesiones de la mucosa gástrica y la actividad antiúlceras de tales extractos sobre daños en la mucosa estomacal. GSE I mostró fuerte actividad de protección de la mucosa gástrica contra el daño causado por una solución de ClH/EtOH. Se redujo el índice de lesiones en un 82%. GSE II tuvo un efecto aún mayor. Se empleó la catequina como droga pura en este sistema y no mostró actividad antiúlceras en estas condiciones. Estos resultados sugieren que los oligómeros y polímeros de procianidinas pueden contribuir a la protección de la mucosa ante las lesiones inducidas. La actividad antiúlceras de una serie de procianidinas se incrementa a medida que se incrementa el grado de polimerización de unidades catequina. Estos polímeros también mostraron un fuerte grado de unión con la BSA (sueroalbúmina bovina). La catequina y los dímeros y trímeros extractados de las semillas de uva poseen significativa actividad antioxidante en la oxidación de las lipoproteínas in vitro. En este trabajo GSE en dosis de 200 mg/kg previene, in vivo, las lesiones macroscópicas agudas en la mucosa gástrica de las ratas inducidas por la ingestión de una solución de etanol 60%, conteniendo 150 mM ClH. Las procianidinas cubren la superficie del estómago, cuando este sufre una herida. La capacidad de unirse a las proteínas fue ensayada con BSA, comprobándose que las procianidinas de mayor tamaño, tales como pentámeros y hexámeros se unen fuertemente a la BSA. Las procianidinas, especialmente los oligómeros mayores son potentes antioxidantes; los radicales libres están involucrados en la formación de lesiones ulcerosas en la mucosa gástrica. Aparentemente, las procianidinas inhiben el daño

a la mucosa estomacal debido a que capturan los radicales libres derivados del oxígeno o los de tipo peróxido generados. Las procianidinas presentan actividad antiúlcera (debido a que se unen fuertemente a las proteínas) y también poseen actividad antioxidante (Saito et al, 1998).

Extracto de semillas de vid conteniendo procianidinas oligómeras y poliméricas mostró actividad antitumoral en epidermis de ratones (Yilmaz Y. y R. Toledo, 2004).

La aplicación tópica de extracto de semillas aumenta el factor de protección solar en humanos (Bagchi D. et al, 2000).

La aplicación tópica de extractos de semillas en heridas de la piel acelera la cicatrización, en ratas. El extracto mejora de manera destacada la contracción de la herida y contribuye a la reorganización histológica del tejido regenerado (Khanna et al, 2002).

El extracto de semillas de vid induce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular en los keratinocytos (células de la epidermis), y esto estimula la angiogénesis (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos) en las heridas en curación (Yilmaz, Y. y R. Toledo, 2006).

El extracto de semillas de uva tiene un efecto antihiper glucémico en animales diabéticos, presenta propiedades anabólicas que se mimetizan con la insulina y activa la síntesis de glicógeno y lípidos (Pinent et al, 2005).

El extracto de semillas de uva (ES) presenta actividad anticáncer (Fuleki et al, 1997; Yamaguchi et al, 1999). Se ha demostrado que el extracto resultó tóxico para las células del adenocarcinoma de mama, de pulmón y gástrico, mientras que estimuló el crecimiento y la viabilidad de las células normales de la mucosa gástrica (Bagchi D. et al, 2000).

Otros estudios han probado que el ES presenta actividad contra el cáncer de mama y de piel (actuando sobre la apoptosis o muerte programada de las células) (Yilmaz, Y. y R. Toledo, 2004).

Las procianidinas de extracto de semillas de vid ejercen un efecto cardioprotector en ratas ante el daño por reperfusión después de una isquemia. Una isquemia es una restricción del suministro de sangre, generalmente causado por problemas en los vasos sanguíneos, debido a daño o disfunción del tejido. Se denomina daño por reperfusión al daño del tejido causado cuando el suministro de sangre retorna al tejido tras un periodo de isquemia. La ausencia de O₂ y nutrientes de la sangre crea una condición en la cual, la restauración de la circulación causa inflamación y daño oxidativo por causa del oxígeno, más que la restauración de la función normal (Sato et al, 1999).

Se verificó en conejos una reducción de las tasas de infarto de miocardio por medio de una suplementación de la alimentación con extracto de semillas de vid. La adición de 1% en peso de ES a la dieta redujo la aterosclerosis de la aorta sin influenciar los perfiles de lípidos del suero en conejos (Yilmaz, Y. y R. Toledo, 2006).

La alimentación con proantocianidinas inhibe la progresión de la aterosclerosis en conejos alimentados con colesterol (Yamaguchi et al, 1999; Koga et al, 1999)

Las proantocianidinas exhiben actividades vasodilatadoras, antiinflamatorias y cardioprotectoras; el extracto de semillas de vid demostró actividad protectora contra la enfermedad cardiovascular y el infarto de miocardio en ratas (Bagchi, D. et al 2000).

El extracto de semillas de vid disminuye significativamente el dolor en pacientes con pancreatitis crónica, asociado con una marcada reducción de los niveles de marcadores bioquímicos del stress oxidativo. En esta enfermedad se observa una actividad aumentada de radicales libres y un aumento de la concentración de peróxidos en el plasma y los tejidos, tanto en seres humanos, como en animales. Los pacientes con pancreatitis crónica presentan bajos niveles en sangre de muchos factores antioxidantes, incluyendo vitaminas E y A, selenio y plasma glutatión peroxidasa (Bhaskar y Bagchi, 2001).

La suplementación con extracto de semillas de vid mejora los síntomas de pancreatitis crónica en humanos. Disminuye significativamente el dolor, así como la incidencia de vómitos en estos pacientes (Bagchi et al, 2000).

Los extractos de semillas de vid (ES) se absorben en el torrente sanguíneo humano, y actúan como antihepatotóxicos (Fuleki et al, 1997).

El extracto de semillas de vid demostró actividad protectora en ratas, contra las sobredosis de acetaminophen (que inducen daño en el hígado y riñón), contra el daño causado en el DNA y también redujo el stress oxidativo. El ES protege al riñón y a la función renal en ratas de la toxicidad causada por acetamidophen (Bagchi et al 2000).

Los rayos X causan un alto grado de generación de radicales hidroxilo por rotura hemolítica del agua del cuerpo o por H₂O₂ endógeno, formado por la reducción del anión superóxido. El radical hidroxilo es el más citotóxico de los descritos, con una vida media estimada de 10⁻⁹ segundos. En los pequeños roedores sometidos a los efectos de rayos X en todo el cuerpo, el GSE inyectado o ingerido previamente a la exposición a los rayos X, presenta un efecto protector ante los daños causados por la irradiación. El efecto radioprotector y, en consecuencia, la actividad anticlastogénica o antimutagénica de los distintos tratamientos empleados se establece de acuerdo al incremento de eritrocitos policromáticos micronucleados (MnPCE) en animales después de la irradiación (Castillo et al, 2000; Fuleki et al, 1997; Saito et al, 1998).

Las proantocianidinas exhiben actividades antialérgicas (Bagchi, D. et al, 2000) y estimulantes del sistema inmune (Bagchi, D. et al, 2000). También se comportan como agentes estrogénicos o antiestrogénicos (Yilmaz, Y. y R. Toledo, 2004; Bagchi D. et al, 2000).

Las procianidinas inhiben el crecimiento del cariogénico *Streptococcus mutans* (Saito et al, 1998).

El extracto de semillas de uva presenta actividad anticataratas oculares (Yamaguchi et al, 1999).

1.1.3.5. Los efectos antioxidantes de los extractos de semillas de uva en alimentos

Existen antecedentes sobre el empleo de procianidinas de semillas de vid como antioxidante en distintos productos alimentarios, tales como carne de vaca, carne de pavo, pescado azul y aceites de algas.

El extracto de semillas de uva agregado a carne de vaca molida cocida retardó la oxidación durante el almacenamiento en frío luego de la cocción, el extracto de semillas redujo la formación de hexanal respecto del testigo en un 97%, luego de 3 días de refrigeración. Agregado al 0,02% no afectaron el aroma ni el sabor (Ahn et al, 2002).

La carne de pavo es particularmente propensa a la oxidación debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), su alta concentración en hierro libre y su escasa capacidad de acumular vitamina E, a partir de la dieta. El extracto de semillas agregado a la carne de pavo retardó la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento en frío (Mielnik et al, 2005). El agregado de extracto de semillas a carne de pavo, ya sea por ingestión o por adición post mortem redujo el nivel de oxidación en hamburguesas preparadas con carne de pavo (Lau y King, 2003).

El extracto de semillas de uva ha sido empleado para prolongar la vida útil del pescado azul (*Trachurus trachurus*). Los análisis sensoriales revelaron que los testigos pierden su calidad sensorial de frescura al tercer día de conservación a 4°C; los panelistas identificaron claramente el olor a rancio. El pescado suplementado con procianidinas conservó el olor a pescado fresco durante 7 días en las muestras tratadas con una dosis de 50 ppm, y durante 10 días en los tratamientos con 100 ppm (Medina et al, 2006).

Los aceites de algas producidos por tecnologías de fermentación tienen muchos beneficios como alimentos funcionales por su alto contenido en ácidos grasos del tipo ω 3. Estos ácidos se enrancian fácilmente. Las proteínas aisladas de suero de leche crean emulsiones físicamente estables e incrementan la estabilidad ante la oxidación de estas emulsiones. El extracto de semillas de uva agregado a una emulsión de aceite de algas estabilizada con proteínas aisladas de suero de leche inhibió la formación de propanal y de lípidos hidroxiperóxidos a pH 3 y a pH 7 (Min Hu et al, 2004).

Si bien existen antecedentes sobre la acción antioxidante de los ácidos cinámicos sobre el pardeamiento enzimático del jugo de uva (Özoglu y Bayindirli, 2002); no existen antecedentes sobre la actividad antioxidante de un extracto de semillas de vid en productos vegetales.

1.1.3.6. La toxicidad y digestibilidad del extracto de semillas de uva

Debido al interés creciente sobre el consumo de flavonoides como suplemento dietario, con ingestas diarias entre 50 y 150 mg, la seguridad de estas sustancias debe ser establecida. La ingestión de un extracto de semillas en un nivel del 2% de la dieta fue bien tolerado por ratas Sprague-Dawley machos y hembras, por un periodo de 90 días (Wren et al, 2002)

1.1.4. Los procesos de extracción y los distintos solventes

Para evaluar el poder antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid es necesario realizar un procedimiento de extracción de estos compuestos. Cada procedimiento de extracción combina diferentes parámetros en cuanto a temperatura, tiempo de tratamiento, grado de molienda, solventes, agitación y rela-

ción sólido – líquido. Se han analizado las condiciones de extracción en semillas de vid y en otros productos vegetales con características antioxidantes encontradas en la bibliografía.

1.1.4.1. Procesos de obtención de extractos de semillas de vid para evaluar su poder antioxidante

Darné y Madero Tamargo, 1979, trabajaron con semillas secas, luego las liofilizaron a -45°C . Las semillas liofilizadas fueron molidas. La extracción se realizó empleando un gramo de polvo, al cual le fue adicionado 10 ml de etanol y 10 ml de agua destilada. El líquido obtenido en esta primera extracción fue tratado con 20 ml de cloroformo. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se separaron dos fases: la fase superior contiene agua, etanol, glúcidos y compuestos fenólicos. La fase inferior contiene cloroformo, lípidos y pigmentos. No se define la temperatura de tratamiento.

Fuleki y Ricardo da Silva, 1997, obtuvieron el extracto tratando 12 g de semillas pulverizadas con metanol durante 16 horas bajo atmósfera de CO_2 , a -24°C . Otras extracciones se llevaron a cabo empleando metanol al 80% y luego metanol al 50%, con 4 horas de tratamiento cada una, a -24°C . Luego el residuo fue tratado con acetona al 75% durante una hora, sin definir la temperatura de trabajo.

De Freitas et al., 1998, realizaron la extracción empleando etanol al 50% en agua. No se establece temperatura ni tiempo de tratamiento.

Saito et al., 1998, emplearon dos extractos de semillas: GSE I fue obtenido extrayendo las semillas con etanol al 20% (no se informa acerca de la temperatura y tiempo de extracción); GSE II fue obtenido con agua, efectuando previamente un lavado de 2 horas a 60°C y luego una extracción de 2 horas a 90°C .

Yamaguchi et al, 1999, emplearon como extractante una solución con 20% de etanol y 80% agua. No mencionan tiempo ni temperatura a la que se realizó la extracción.

Bagchi et al, 2000, trabajaron con un extracto estandarizado realizado a partir de semillas de uva empleando como solvente agua y etanol, pero no mencionan la concentración de la mezcla hidroalcohólica, ni el tiempo y la temperatura de tratamiento.

Kennedy et al, 2000, emplearon como extractante una mezcla de dos partes de acetona y una parte de agua, a 20°C , por 24 horas.

Castillo et al, 2000, obtuvieron el extracto a partir de semillas molidas tratadas con metanol al 75% en una relación de 100 g de semillas por litro de solvente, bajo corriente de nitrógeno durante 1 hora. No se menciona la temperatura de trabajo. El solvente se eliminó por vacío a 40°C y el producto fue desgrasado con *n* hexano a 40°C .

Jayaprakasha et al, 2001, realizaron la extracción a partir de semillas secas, molidas y desgrasadas en un extractor soxhlet, empleando hexano a $60 - 80^{\circ}\text{C}$, durante 6 horas. El polvo desgrasado fue extractado en un extractor soxhlet por 10 horas empleando 150 ml de extractantes tales como acetona, acetato de etilo y metanol a $60-70^{\circ}\text{C}$. El extracto fue concentrado al vacío.

Wren et al, 2002, realizaron la extracción a partir de semillas secas, empleando como solvente el agua a 82°C, durante 40 minutos.

Jayaprakasha et al, 2003, trabajaron con semillas secas, éstas se transformaron en polvo y fueron extractadas con éter de petróleo a 60 – 80°C por 6 horas en un extractor soxhlet para desgrasar. Las semillas desgrasadas fueron extractadas con una mezcla acetona: agua: ácido acético (90:9,5:0,5) y metanol: agua: ácido acético (90: 9,5:0,5), durante 8 horas. No se menciona la temperatura de trabajo.

Yilmaz y Toledo, 2004, trataron el polvo de semillas de uva con hexano para desgrasar. El polvo fue mezclado con metanol al 70% en agua, una parte de polvo y 10 partes de solvente. La mezcla fue sonicada por 15 minutos y agitada a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego fue centrifugada a 4°C a 26000 g. El extracto fue concentrado al vacío. Yilmaz y Toledo, 2006, trabajaron de manera semejante: las semillas fueron secadas y reducidas a polvo. La relación peso de semillas a volumen de solvente fue de 1:10. La mezcla fue sonicada por 15 minutos, luego fue agitada por 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugada a 5000g por 20 minutos a 4°C. Como solventes se emplearon etanol, metanol y acetona. Etanol al 50, 60 ó 70% en agua extrajo 28 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de polvo de semillas; 60 a 70% de metanol en agua lograron un extracto de 30 mg GAE/g de semillas; acetona al 50% mostró una extracción de 40 mg GAE/g.

1.1.4.2. Procesos de obtención de extractos de otros vegetales con poder antioxidante

Velioglu et al, 1998, ensayaron 28 productos vegetales respecto a su poder antioxidante (entre otros: lino, cebollas girasol, cerezas, papas, Echinacea sp, ginseng, trigo). Los extractos se obtuvieron a partir de 1g de muestra seca y molida tratada con 25 ml de metanol al 80% en agua, el tiempo de tratamiento fue 2 horas a 70°C, con agitación.

Ali Yildirim et al, 2000, emplearon flores de tilo (*Tilia argentea*), hojas de salvia (*Salvia triloba* L.) y té negro. La extracción se realizó con agua a 100° C, con agitación durante 30 minutos. La relación sólido- líquido fue 15 g de muestra seca: 300 ml de agua.

Kähkönen et al, 2001, efectuaron extracciones de bayas empleando distintos solventes: acetona al 70% en agua, metanol al 60%, hexano, agua a temperatura ambiente y agua a ebullición; las muestras se agitaron durante un minuto y luego fueron centrifugadas.

Siddhuraju, 2002 et al, estudiaron una leguminosa poco conocida llamada comúnmente Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.). Los extractos se realizaron a partir de corteza, hojas, flores y frutos. El material fue liofilizado y molido. Las extracciones fueron realizadas con metanol al 90% en un extractor soxhlet durante 16 horas en el caso de corteza, flores y frutos. En los extractos de hojas se trabajó con etanol al 90% durante 12 horas. No se menciona la temperatura de trabajo.

Zaporozhets et al, 2004, obtuvieron extractos de té negro y verde (1-2 g de té cada 100 ml de agua hirviendo, durante 5 minutos), así como de Echinacea (Extracto hidroalcohólico).

Siddhuraju y Becker, 2003, efectuaron un extracto a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. Se realizaron con 5 g de polvo de hojas y 300 ml de distintos solventes:

agua, metanol 80%, etanol 70% durante 3 horas, no se define la temperatura de trabajo.

Yen y Chen, 2000, efectuaron extractos de té verde, pouchong, oolong y té negro, empleando agua hirviendo (20g de té + 400 ml de agua). No especifican tiempo.

1.1.5. Las distintas formas de medir la concentración en polifenoles

Darné y Madero Tamargo, 1979, emplearon el método de Ribereau Gayon y Stonestreet que determina taninos fácilmente extraíbles (3-4 flavanodiolos).

Fuleki y Ricardo da Silva, 1997, determinaron 11 flavan-3-oles (catequina, epicatequina y 9 procianidinas diferentes) por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

De Freitas et al, 1998, midieron estructuras derivadas de los flavan-3-oles por medio de espectrometría líquida secundaria iónica de masa (LSIMS) y cromatografía líquida de alta presión HPLC.

Saito et al, 1998, determinaron flavanoles totales por medio del método de la vainillina, empleando la (+) catequina como referencia. El contenido de flavanos monoméricos se determinó por HPLC.

Kennedy et al, 2000, determinaron flavan-3-oles por medio de HPLC en fase reversa, y procianidinas por HPLC en fase normal.

Castillo et al, 2000, determinaron ácido gálico, (+) catequina, (-) epicatequina, y procianidinas dimeras, trimeras y tetrameras por medio de HPLC.

Jayaprakasha et al, 2001, determinaron flavonoles monoméricos por medio de HPLC y flavonoides totales colorimétricamente por el método de la vainillina.

Wren et al, 2002, determinaron polifenoles oligoméricos y proantocianidinas monoméricas por HPLC en fase reversa.

Jayaprakasha et al, 2003, determinaron Fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu; y procianidinas por medio de HPLC.

Yilmaz y Toledo, 2004, determinaron fenoles monoméricos por medio de HPLC, con arreglo de diodos y detector de fluorescencia.

Yilmaz y Toledo, 2006, determinaron fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu y absorbancia a 280nm, con espectrofotómetro UV.

Velioglu et al, 1998, determinaron fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu.

Kähkönen et al, 2001, determinaron fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu, y los perfiles fenólicos fueron determinados por medio de HPLC.

Siddhuraju et al, 2002, determinaron fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu.

Siddhuraju y Becker, 2003, determinaron fenoles totales por medio de Folin Ciocalteu y flavonoides por medio de HPLC.

Zaporozhets et al, 2004, determinaron flavonoides totales empleando el método espectrofotométrico basado en la formación de complejos con Aluminio III.

1.1.6. Las distintas formas de medir la capacidad antioxidante

Castillo et al, 2000, midieron la capacidad antioxidante por medio del método de Miller que se basa en la capacidad de diferentes sustancias para capturar el catión radical ABTS^{•+} (2,2' -azinobis- 3-etil benzotiazolina-6- ácido sulfónico, sal diamonio), comparado con un antioxidante conocido, tal como Trolox.

Jayaprakasha et al, 2001, determinaron la actividad antioxidante por medio de un sistema modelo de β caroteno- linoleato, el blanqueo del β caroteno indica la actividad antioxidante. También determinaron la actividad antioxidante por otra vía, empleando el método del tiocianato peroxidando ácido linoleico, y el poder reductor por el método de Yen y Duh.

Jayaprakasha et al, 2003, evaluaron la capacidad antioxidante de dos formas: por el método del fosfomolibdeno y por la medida de la capacidad de capturar radicales por el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

Yilmaz y Toledo, en sus trabajos publicados en 2004 y 2006, midieron la actividad antioxidante por el método que determina capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC).

Velioglu et al, 1998, midieron la capacidad antioxidante por medio del método de la decoloración del β caroteno modificado por Marco.

Ali Yildirim et al, 2000, midieron la actividad antioxidante por medio del método del tiocianato, y el poder reductor por el método de Yen y Chen.

Kähkönen et al, 2001, midieron la actividad antioxidante por medio de la autooxidación del metil linoleato, determinando dienos conjugados.

Siddhuraju et al, 2002, midieron la actividad antioxidante empleando el método del tiocianato; la oxidación de liposomas por medio de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS); el poder reductor según Yen; y la capacidad de capturar radicales superóxido y DPPH($\alpha\alpha$ - difenil β picril hidracilo).

Siddhuraju y Becker, 2003, determinaron la actividad antioxidante por medio del método de la decoloración del β caroteno, la oxidación de liposomas por medio de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el poder reductor por el método de Yen, y la capacidad de capturar radicales superóxido y DPPH($\alpha\alpha$ - difenil β picril hidracilo).

Zaporozhets et al, 2004, determinaron la actividad antioxidante por medio del empleo de la reacción con CuTAAB-SG (complejo tetrabenzotetra azo ciclohexadecina cobre inmovilizado en sílica gel).

Yen y Chen, 1995, determinaron poder reductor empleando el método de Oyaizu, por medio de la reducción de hierro III a hierro II.

Yen et al, 2000, midieron la actividad antioxidante sobre un sistema de ácido linoleico, formado por la muestra, una solución de emulsión de ácido linoleico y buffer fosfato. La mezcla de reacción fue incubada a 37°C en la oscuridad, y el grado de oxidación fue medido por el método del tiocianato (empleando etanol, tiocianato de amonio, la muestra y cloruro ferroso). La mezcla fue homogeneizada y el valor de peróxidos fue determinado por lectura a 500 nm. El porcentaje de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico fue calculado como (%) = $[1 - (\text{absorbancia de la muestra a 500 nm}) / (\text{absorbancia del control a 500 nm})] \times 100$. También se determinó el poder reductor del extracto.

1.1.7. Relación actividad antioxidante-poder reductor

Meir et al (1995) trabajando con hojas de berro de agua (*Rorippa nasturtium aquaticum*) y salvia (*Salvia officinalis* L.) mencionan la existencia de una correlación positiva entre poder reductor total (medido por medio de la reducción de hierro III a hierro II) y capacidad antioxidante, medida como tiempo de inducción requerido para la oxidación del β caroteno, en un sistema de peroxidación de lípidos. Por lo tanto, la capacidad reductora de un compuesto puede servir como un indicador de su potencial actividad antioxidante.

Yen et al (2000) citan la asociación existente entre poder reductor y actividad antioxidante. Estos autores comprobaron que el poder reductor del anthrone y la alizarina (son polifenoles del tipo de las antraquinonas) aumentó con un aumento en la concentración. Determinaron que el gran poder reductor del anthrone y la alizarina se correlaciona bien con su marcada acción antioxidante, indicando que su poder reductor contribuye a su actividad antioxidante.

Siddhuraju et al (2002) trabajaron sobre *Cassia fistula* L., determinando que el poder reductor está asociado con la actividad antioxidante.

Benzie y Szeto (1999) encontraron una correlación lineal entre la concentración de té (*Camellia sinensis*) y el test de poder reductor del hierro/antioxidante (FRAP test), así como también una alta correlación entre el valor FRAP y la concentración de fenoles totales.

Yen y Chen (1995) trabajaron en distintos tipos de té: verde (no fermentado), semifermentado y fermentado (negro). Concluyeron que los extractos de té presentaban fuerte actividad antimutagénica, actividad antioxidante, poder reductor y capacidad de capturar radicales libres y oxígeno. En el té semifermentado (Oolong) se presentó la mayor actividad antimutagénica, actividad antioxidante, poder reductor y capacidad de capturar radicales libres y oxígeno, respecto del té verde y el fermentado.

El poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador importante de su potencial actividad antioxidante (Meir et al, 1995), aunque otros autores sostienen que no siempre existe una correlación lineal entre la actividad antioxidante total y el poder reductor (Yildirim et al, 2000). En trabajos posteriores de Yildirim et al, se descarta esta hipótesis. Estos autores trabajaron sobre hojas y semillas de *Rumex crispus* L., verificando que el poder reductor de los extractos aumenta con la concentración de los mismos, presentando una correlación estadísticamente significativa ($r = 0,99$) entre los compuestos fenólicos totales y el poder reductor. También establecieron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de capturar radicales libres por DPPH, así como entre el poder reductor y capacidad de capturar radicales libres por DPPH. Finalmente, su conclusión fue: dado que a medida que el contenido de fenoles totales aumenta, el poder reductor aumenta; que

el poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto; por lo tanto, el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante (Yildirim et al, 2001).

Alma et al, 2003, concluyeron que el poder reductor y la capacidad de capturar radicales de una sustancia pueden ser indicadores de su actividad antioxidante.

1.1.8. Relación concentración fenólica, actividad antioxidante y poder reductor

Fuhrman et al (2001) sostienen que la capacidad antioxidante de los vinos blancos fue directamente proporcional a su contenido en polifenoles.

Yen et al (2000) comprobaron que el poder reductor del anthrone y la alizarina (son polifenoles del tipo de las antraquinonas) aumentó con un aumento en la concentración de estos productos.

Zheng y Wang (2001) comprobaron que los flavonoides, que contienen múltiples grupos hidroxilo, tienen mayor actividad antioxidante contra los grupos peroxilo, que los ácidos fenólicos. También establecieron una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de distintas hierbas culinarias y medicinales.

Yen et al (1993) trabajaron sobre cáscara de maní, y encontraron actividad antioxidante en los extractos metabólicos de las mismas. Por otra parte, verificaron que al diluir el extracto, la actividad antioxidante disminuyó.

Kähkönen et al (2001) determinaron la existencia de correlación estadísticamente significativa entre el contenido de flavonoles y la actividad antioxidante, así como entre el contenido de ácidos hidroxicinámicos y la actividad antioxidante.

Pero Kähkönen et al (1999) sostienen que no encontraron correlaciones significativas entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de diferentes extractos de plantas, empleando el método de oxidación del metil linoleato.

Benzie y Szeto (1999) encontraron que el poder antioxidante de distintos tipos de té se correlaciona fuertemente con el contenido de fenoles totales.

Velioglu et al (1998) trabajaron con diferentes materiales vegetales, determinando concentraciones fenólicas entre 169 y 10.548 mg/100 g de producto seco. Cuando todos los materiales vegetales fueron incluidos en el análisis estadístico, existió una correlación lineal positiva entre los fenoles totales y la actividad antioxidante. Sin embargo, cuando la correlación fue realizada entre vegetales ricos en antocianos y la actividad antioxidante, esta resultó no significativa.

Yildirim et al (2000) trabajaron sobre extractos de *Tilia argentea*, y encontraron que el poder reductor del extracto acuoso de *T. argentea*, fue dependiente de la concentración, del mismo modo que la actividad antioxidante. A mayor concentración del extracto, mayor poder reductor. Pero estos autores concluyeron en este trabajo, que no siempre existe una correlación lineal entre la actividad antioxidante total y el poder reductor. En un trabajo posterior, los mismos autores llegan a diferentes conclusiones. Trabajaron sobre hojas y semillas de *Rumex crispus* L., verificando que el poder reductor de los extractos aumenta con la concentración de los mismos, presen-

tando una correlación estadísticamente significativa ($r = 0,99$) entre los compuestos fenólicos totales y el poder reductor. También establecieron correlaciones estadísticamente significativas entre el contenido de fenoles totales y la capacidad de capturar radicales libres por DPPH, así como entre el poder reductor y capacidad de capturar radicales libres por DPPH. Finalmente, su conclusión fue: dado que a medida que el contenido de fenoles totales aumenta, el poder reductor aumenta; que el poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto; por lo tanto, el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante (Yildirim et al, 2001).

Alma et al, 2003, trabajando sobre aceites esenciales de *Origanum syriacum*, determinaron que el poder reductor del aceite esencial de hojas de orégano aumentó a medida que la concentración de aceite empleada fue mayor. La actividad antioxidante, el poder reductor y la capacidad de capturar radicales dependieron de la concentración del aceite esencial, o sea del contenido de compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial. Estos autores concluyeron que el poder reductor y la capacidad de capturar radicales de una sustancia pueden ser indicadores de su actividad antioxidante.

El poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador importante de su potencial actividad antioxidante (Meir et al, 1995), aunque otros autores sostienen que no siempre existe una correlación lineal entre la actividad antioxidante total y el poder reductor (Yildirim et al, 2000). Esta afirmación puede justificarse si se analizan los distintos compuestos fenólicos que pueden existir en un extracto. Para un mismo tenor de fenoles totales, en un extracto pueden existir grandes concentraciones de antocianos, que según Landrault et al, 2001, correlacionan pobremente con la actividad antioxidante ($r = 0,30$); mientras que en otro extracto de igual concentración de fenoles totales, el grupo fenólico mayoritario puede ser ácido gálico y procianidinas que correlacionan más fuertemente con la actividad antioxidante, por lo tanto con el poder reductor ($r = 0,83$ y $r = 0,73$, respectivamente).

Distintos autores han determinado que existe una correlación lineal positiva entre el contenido de fenoles totales y el poder reductor. Este hecho ha sido observado en distintos productos vegetales, como extractos de hierbas (Zheng y Wang, 2001); en té, se ha verificado que el poder antioxidante se correlaciona fuertemente con el contenido de fenoles totales (Benzie y Szeto, 1999). En vainas de maní se ha verificado también que la actividad antioxidante aumenta a medida que aumenta el contenido fenólico de los extractos (Yen et al, 1993). Asimismo, en vinos, se ha comprobado que la capacidad antioxidante es directamente proporcional a la concentración fenólica de los mismos (Fuhrman et al, 2001). Si bien, otros autores sostienen que la actividad antioxidante de un extracto no puede predecirse en base a su concentración fenólica (Kähkönen et al, 1999).

Al comparar los resultados de los distintos autores, debe considerarse que la eficiencia de los antioxidantes depende fuertemente de las condiciones de oxidación y del sustrato oxidable presente. Kähkönen et al, 1999, trabajaron empleando el método del metil linoleato, mientras que Siddhuraju et al (2003) empleó el método del tiocianato y además utilizó la oxidación de liposomas, midiendo sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Yen y Chen (1995), Yen et al (2000), Yildirim et al (2000), emplearon el método del tiocianato. Zheng y Wang (2001) emplearon para determinar la actividad antioxidante el método de la capacidad de absorber radicales oxígeno (ORAC). Benzie y Szeto (1999), desarrollaron un método para medir la capacidad de reducir el hierro férrico del plasma (FRAP test) como medida del poder antioxidante. Fuhrman et al (2001) emplearon la capacidad de capturar radicales libres

empleando el análisis de 1,1 difenil 2 picrilhidracilo (DPPH) y la oxidación de las LDL (Lipoproteínas de baja densidad) humanas como medida de la capacidad antioxidante.

La concentración de compuestos fenólicos (excepto en los trabajos de Yen y Chen, 1995 y Yildirim et al, 2000, que no midieron la concentración de compuestos fenólicos), fue medida por el método de Folin Ciocalteu.

1.2. PLANTEO DEL PROBLEMA

Existen experiencias sobre la actividad biológica in vivo e in vitro del extracto de semillas de uva. Como así también estudios sobre el uso de extracto de semillas de uva como antioxidante en alimentos de origen animal. Sin embargo, no existen antecedentes sobre el uso del extracto de semillas de uva como antioxidante en alimentos de origen vegetal.

Asimismo, si bien existen estudios sobre distintas formas de extracción de antioxidantes a partir de semillas de uva, no se han realizado comparaciones entre el poder extractivo de solventes diferentes.

No se han realizado estudios de la cinética de extracción de compuestos fenólicos a partir de semillas de uvas, a diferentes temperaturas, para diferentes solventes. Tampoco hay datos sobre formas de procesar el extracto, tales como secado por lecho de espuma o liofilizado.

En Mendoza, Argentina no existen antecedentes de estudios realizados en relación al poder antioxidante de vinos, uvas o semillas de uva.

Puesto que los compuestos responsables de la actividad biológica de las uvas y los vinos son los polifenoles, y dado que el 63% de los fenoles totales de las variedades tintas se encuentran en las semillas, se seleccionó como objeto de estudio la semilla de la vid.

Las semillas de vid son un subproducto de la elaboración de vino tinto, cuyo destino final suele ser la obtención de aceite ó bien su derivación, junto con los orujos, al proceso de extracción de ácido tartárico y destilación para la obtención de alcohol etílico.

Por todo lo expuesto, se propone investigar la factibilidad de obtener un extracto de semillas de vid con características antioxidantes, y evaluar su empleo como antioxidante en la elaboración de alimentos de origen vegetal.

1.3. HIPÓTESIS

1.3.1. Hipótesis General

Es factible obtener un extracto de semillas de vid con características antioxidantes, que puede ser empleado como antioxidante en la elaboración de alimentos.

1.3.2. Hipótesis particulares

Las hipótesis particulares se presentan al comienzo de cada capítulo.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Obtener un extracto de semillas de vid de elevada actividad antioxidante, para su aplicación en productos alimentarios de origen vegetal.

1.4.2. Objetivos particulares

Seleccionar el solvente que permita una mayor extracción de fenoles, conservando las características reductoras del extracto.

Verificar la presencia de poder reductor en el extracto obtenido.

Obtener altas concentraciones de fenoles totales en el menor tiempo y a la menor temperatura de tratamiento posible.

Concentrar el extracto acuoso obtenido por medio de un evaporador al vacío, con el objeto de trabajar con un producto concentrado, que permita su posterior desecación.

Verificar que el tratamiento de concentración no altera el poder reductor del extracto.

Verificar el poder antioxidante del extracto de semillas de vid (sin concentrar y concentrado) sobre el jugo de manzanas recién obtenido.

Convertir el extracto acuoso concentrado al vacío en polvo, para su mejor conservación y uso.

Comparar dos sistemas de deshidratación del extracto concentrado: secado en lecho de espuma y liofilizado.

Verificar la persistencia del poder reductor luego de los tratamientos de deshidratación.

Comparar la actividad antioxidante del extracto de semillas de vid con antioxidantes comerciales de uso frecuente en jugo de manzanas.

**CAPÍTULO 2:
OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE UVA**

2.1. Hipótesis

El agua es un solvente adecuado para la obtención de un extracto de semillas de vid con características reductoras.

2.2. Objetivos

Seleccionar el solvente que permita una mayor extracción de fenoles, conservando las características reductoras del extracto.

Verificar la presencia de poder reductor en el extracto obtenido.

2.3. Materiales y Métodos

Se emplearon semillas de vid cv Cabernet Sauvignon provenientes de vinificaciones realizadas en la Bodega Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Chacras de Coria, Mendoza, Argentina. Las vides que originaron estas uvas fueron cultivadas en la Finca "San Antonio", propiedad de la Facultad de Ciencias Agrarias, situada en la misma localidad que la bodega antes mencionada.

Las semillas fueron obtenidas al momento de realizar el descube de los vinos tintos, por lo tanto, fueron sometidas a los procesos de maceración y fermentación alcohólica, en forma previa a su utilización.

Se obtuvieron semillas de aproximadamente 20 vasijas, alrededor de 20 kg por vasija. Una vez obtenidas, éstas fueron secadas en estufa a 40° C, hasta constancia de peso, siendo posteriormente almacenadas en la oscuridad, en envases de vidrio cerrados y a temperatura ambiente.

A partir de esta población, se extrajeron al azar las diferentes muestras, sobre las que se realizó la extracción. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado; esto es, se extrajeron 4 muestras para cada solvente estudiado.

Los solventes ensayados y las temperaturas de tratamiento fueron los siguientes: agua destilada a 90 °C, alcohol metílico al 70% a 30°C, acetona al 75% a 30°C y alcohol etílico al 20% a 30°C. La relación sólido-líquido empleada fue 1 + 10 (1 g de semillas cada 10 mL del solvente). Los solventes fueron agregados a la temperatura de tratamiento seleccionada. El tiempo de tratamiento fue 4 horas.

2.3.1. Técnicas Analíticas

La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu, empleando ácido gálico para la calibración (Zoecklein, 1994). El método se detalla en el Apéndice.

Con el objeto de economizar drogas y así poder realizar un mayor número de determinaciones, se adaptó un micrométodo. Para ello se compararon los datos de fenoles totales obtenidos por el método original, con el mismo método empleando la cuarta parte de todos los reactivos. El método se detalla en el Apéndice.

También se analizó la posibilidad de la existencia de interferencias en el método Folin Ciocalteu debido a la presencia de lípidos en el extracto. Para ello se compararon

muestras de extractos desgrasadas y sin desgrasar. El proceso de remoción de las sustancias liposolubles se realizó empleando n-hexano; la proporción empleada fue de 2,5 ml de n-hexano cada 5 ml de extracto acuoso de semillas (Castillo et al, 2000). Los ensayos se hicieron por cuadruplicado, empleando tubos de vidrio con tapa, de 10 ml de capacidad.

El poder reductor fue determinado por el método de Oyaizu, empleando ferricianuro de potasio, que por acción del agente reductor, se transforma en ferrocianuro de potasio. Este compuesto reacciona con cloruro férrico, originándose ferrocianuro férrico, de color azul. La intensidad del color azul se lee a 700 nm, (Yen y Chen, 1995). El método se detalla en el Apéndice.

2.3.2. Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron procesados estadísticamente con el programa Statgraphics plus[®] 4.0. Si los datos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas, se aplicará el análisis de la varianza; si los datos no responden a una distribución normal ó las varianzas no son homogéneas, se aplicará estadística no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal – Wallis.

El análisis de la varianza compara las medias de los tratamientos, y establece que si hay diferencias entre las medias, los tratamientos son estadísticamente diferentes. Si no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos tratamientos, los tratamientos no son diferentes en cuanto a sus resultados.

El análisis de la varianza sólo puede ser utilizado si se cumplen ciertos supuestos básicos: 1) los datos provienen de una distribución normal y 2) existe homogeneidad de varianzas entre los distintos tratamientos. El análisis de la varianza es un análisis paramétrico, ya que se calculan los parámetros de la población: media y varianza.

Si se ha decidido efectuar un análisis de la varianza, debe verificarse que los datos provienen de una distribución normal. Para ello se analizarán los coeficientes de asimetría y curtosis, así como la prueba de F para verificar la homogeneidad de varianzas. La asimetría es una medida del sesgo de la curva en relación a la curva normal, mientras que la curtosis indica el aplastamiento o esbeltez de la curva. La curva normal es simétrica y mesocúrtica (con una curtosis media).

Cuando los valores de asimetría y curtosis son menores de -2 ó mayores de +2, los datos no provienen de una distribución normal; F es un estadígrafo que surge de la distribución F de Fischer, y es un cociente de varianzas, si este cociente es mayor de 4, las varianzas no son iguales, por lo tanto, los datos no provienen de una distribución normal; en consecuencia, no es correcto emplear el análisis de la varianza. Deben aplicarse pruebas no paramétricas, que comparan las medianas en lugar de las medias, como lo hacen las pruebas estadísticas paramétricas.

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Calibración del método

Se calibró el método de determinación de polifenoles totales por medio del reactivo de Folin Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón.

En la Tabla N° 1 se presentan los valores de Densidad Óptica a 765 nm correspondientes a las distintas concentraciones de ácido gálico, las mediciones se realizaron por cuadruplicado. Cada valor representa la media aritmética de 4 repeticiones.

Tabla N° 1. Curva de Calibración del método de Folin Ciocalteu.
Patrón: ácido gálico

Ácido gálico mg/L	DO a 765 nm ⁽¹⁾
0	0,0486 ± 0,00018
50	0,0970 ± 0,00026
100	0,2016 ± 0,00016
150	0,2801 ± 0,00018
250	0,4216 ± 0,00019
500	0,7878 ± 0,00081
750	1,1538 ± 0,00057
1000	1,4266 ± 0,00052

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

Los datos de la Tabla N° 1 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincula las dos variables. El análisis de regresión permite obtener un modelo que relacione una variable dependiente “y” (Densidad óptica a 765 nm) con una variable independiente “x” (concentración de ácido gálico mg/L). El coeficiente de determinación simple R² indica cuál es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.

Como resultado del mencionado análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste:

Y = Concentración de polifenoles totales en mg por litro de ácido gálico

$$Y = - 39,6406 + (706,463 * DO 765 \text{ nm})$$

$$R^2 = 99,8\% \text{ (coeficiente de determinación).}$$

Esto significa que el 99,8% de la variabilidad de la variable concentración puede ser explicada por la variable densidad óptica a 765 nm.

En la figura 1 se representa la recta de regresión obtenida en color azul, las líneas de color naranja representan el intervalo para un 95% de confianza para las mediciones, y las líneas en violeta representan las estimaciones futuras, en forma de predicciones empleando la recta de regresión obtenida.

Curva de calibración para el método Folin Ciocalteu

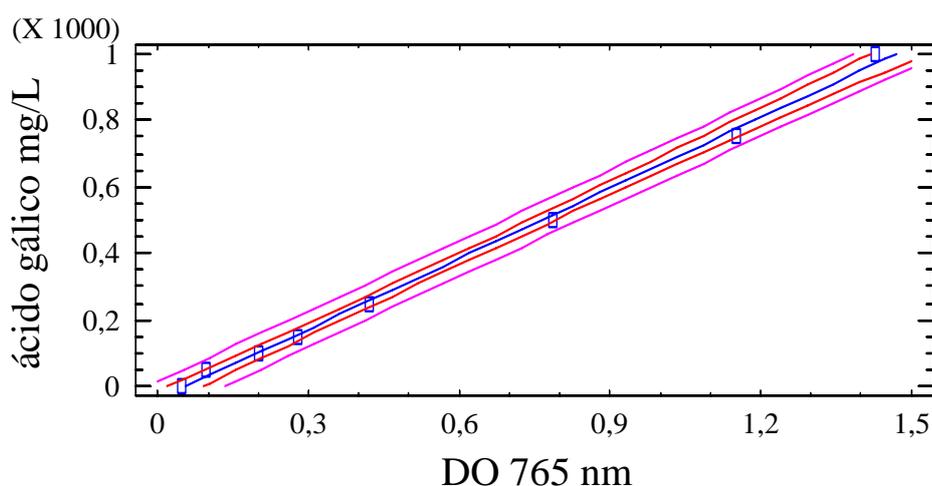


Figura 6. Curva de calibración para el método Folin Ciocalteu de determinación de fenoles totales. La concentración se expresa en mg/L de ácido gálico.

2.4.2. Adaptación y calibración de un micrométodo

Se calibró el micrométodo de determinación de polifenoles totales por medio del reactivo de Folin Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón. En este caso se empleó la cuarta parte de las cantidades empleadas en el método original. El micrométodo se detalla en el apéndice.

En la Tabla N° 2 se presentan los valores de Densidad Óptica a 765 nm correspondientes a las distintas concentraciones de ácido gálico, las mediciones se realizaron por cuadruplicado. Cada valor representa la media aritmética de 4 repeticiones.

Tabla N° 2. Curva de Calibración del micrométodo de Folin Ciocalteu.
Patrón: ácido gálico

Ácido gálico mg/L	DO a 765 nm ⁽¹⁾
0	0,0475 ± 0,00029
50	0,0967 ± 0,00016
100	0,2008 ± 0,00034
150	0,2796 ± 0,00026
250	0,4213 ± 0,00029
500	0,7863 ± 0,00035
750	1,1528 ± 0,00048
1000	1,4273 ± 0,00052

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

Los datos de la Tabla N° 2 fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple lineal, con el objeto de obtener una curva de calibración del método y la ecuación que vincula las dos variables. El análisis de regresión permite obtener un modelo que relacione una variable dependiente “y” (Densidad óptica a 765 nm) con una variable independiente “x” (concentración de Ácido gálico mg/L). El coeficiente de determinación simple R^2 indica cuál es el porcentaje de variabilidad en que la variable “y” puede ser explicada por la variable independiente “x”.

Como resultado del mencionado análisis se obtuvo la siguiente curva de ajuste:

Y = Concentración de polifenoles totales en mg por litro de ácido gálico

$$Y = - 40,2137 + (706,733 * DO 765 \text{ nm})$$

$R^2 = 99,7 \%$ coeficiente de determinación

En la figura 2 se representa la recta de regresión obtenida en color azul, las líneas de color naranja representan el intervalo para un 95% de confianza para las mediciones, y las líneas en violeta representan las estimaciones futuras, en forma de predicciones empleando la recta de regresión obtenida.

Curva de calibración del micrométodo Folin Ciocalteu

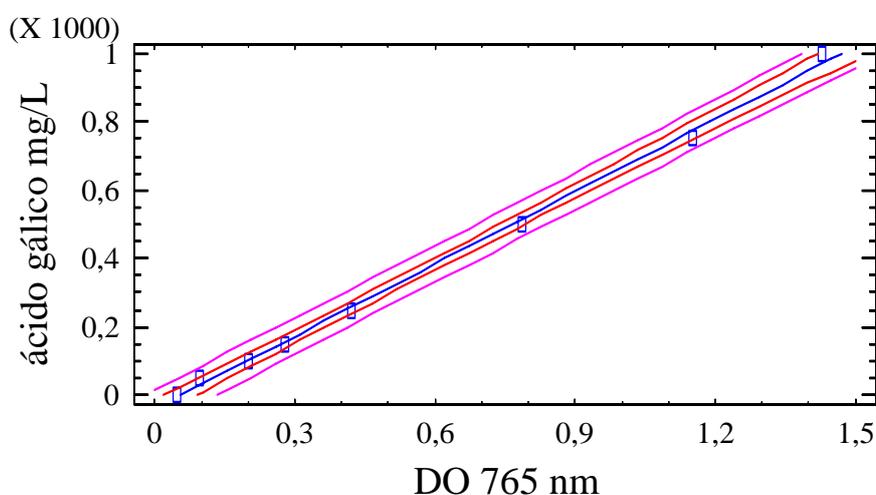


Figura 7. Curva de calibración para el micrométodo Folin Ciocalteu de determinación de fenoles totales. La concentración se expresa en mg/L de ácido gálico.

2.4.3. Comparación entre el método original de Folin Ciocalteu y el micrométodo propuesto

Con el objeto de probar la posibilidad de reemplazar el método original de Folin Ciocalteu con el micrométodo propuesto, se analizaron polifenoles totales en una muestra empleando los dos métodos antes citados, las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza, verificándose previamente que estos datos provenían de una distribución normal, y que existía homogeneidad de varianzas. En la tabla N° 3 se presentan los resultados de este ensayo.

Tabla N° 3. Comparación entre el método original Folin Ciocalteu y el micrométodo para la determinación de Fenoles Totales

Tratamientos	DO a 765 nm ⁽¹⁾
Macrométodo	1,3407 a ⁽²⁾ ± 0,179
Micrométodo	1,3435 a ± 0,156

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

⁽²⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

El análisis de la varianza indicó que no existen diferencias significativas (Prueba de Tukey, para un nivel de confianza del 95%) entre el análisis de Polifenoles totales por medio del reactivo de Folin Ciocalteu en forma de macrométodo, respecto del mismo método, empleando micro volúmenes. Por lo tanto, pueden emplearse en forma indistinta el macro o el micro método Folin Ciocalteu. Esto permite emplear menor volumen de reactivo, resultando más económico el análisis, lo que permite mayor número de repeticiones.

2.4.4. Efecto de lípidos en la determinación de polifenoles

Para descartar posibles interferencias en la determinación de polifenoles debidas a lípidos extractados, se realizó un análisis de polifenoles totales sobre el extracto de semillas desgrasado con n-hexano, empleando como testigo el extracto sin desgrasar. Las determinaciones de polifenoles totales se realizaron empleando el micrométodo Folin Ciocalteu, por cuadruplicado. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza, verificándose previamente que estos datos provenían de una distribución normal, y que existía homogeneidad de varianzas.

En la tabla N° 4 se presentan los resultados de este ensayo.

Tabla N° 4. Comparación entre extractos desgrasados y no desgrasados en la determinación de Fenoles Totales

Tratamientos	DO a 765 nm ⁽¹⁾
Ext. No Desgrasado	0,7497 a ⁽²⁾ ± 0,028
Ext. Desgrasado	0,7488 a ± 0,033

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

⁽²⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

El análisis de la varianza realizado indica que no existen diferencias significativas entre ambas determinaciones, por lo que se puede concluir que los lípidos posiblemente extractados de la semilla de la vid no constituyen interferencia para la determinación de polifenoles totales por medio del reactivo de Folin Ciocalteu.

2.4.5. Selección del solvente según su capacidad extractiva

Se ensayaron 4 tratamientos: Agua a 90°C, Metanol 70% a 30°C, Acetona 75% a 30°C y Etanol 20% a 30°C. El tiempo de tratamiento fue 4 horas. Los solventes se agregaron a la temperatura de tratamiento. La relación sólido: solvente fue de 1:10, un gramo de semillas secas y 10 ml de solvente. Finalizado el tiempo de tratamiento, se determinó polifenoles totales en el extracto obtenido, empleando el micrométodo Folin Ciocalteu. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente.

Las concentraciones de fenoles totales se expresan, de acuerdo a la calibración del método, en mg de ácido gálico por litro de extracto. Puesto que en 10 mL de extracto hay 1 g de semillas secas, en 1000 mL de extracto hay 100g de semillas secas. Por lo tanto, la expresión mg/L es equivalente a mg/100 g de semillas ó mg/100 g de materia seca. Para simplificar la expresión de las unidades, se convierten a mg/g de materia seca.

En la tabla N° 5 se presentan los resultados de este ensayo.

Tabla N° 5. Comparación entre diferentes solventes. Concentración de Fenoles totales extractados

Tratamientos ⁽¹⁾	Fenoles totales mg/g de materia seca ⁽²⁾
Agua a 90°C	12,587 a ⁽³⁾ ± 0,880
Metanol 70% a 30°C	0,963 c ± 0,109
Acetona 75% a 30°C	7,268 b ± 0,860
Etanol 20% a 30°C	0,799 c ± 0,127

⁽¹⁾Tiempo de tratamiento 4 horas

⁽²⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

⁽³⁾Letras distintas indican diferencias entre las medianas en la prueba de Kruskal-Wallis

En la figura 8 se grafican los datos obtenidos en este ensayo.

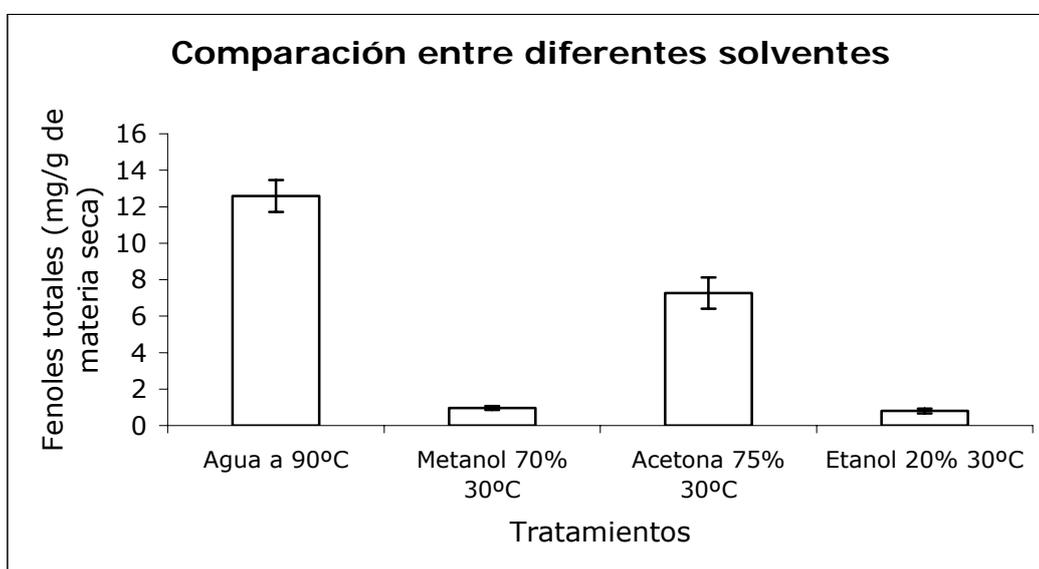


Figura 8. Comparación entre diferentes solventes. Fenoles totales extractados (mg/g de materia seca)

Analizados los datos, se observó que no provienen de una distribución normal; en consecuencia, no es correcto emplear el análisis de la varianza. Por lo tanto, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, que compara medianas, en lugar del análisis de la varianza, que compara las medias.

La prueba de Kruskal-Wallis permite concluir que existen diferencias significativas entre las extracciones realizadas con agua a 90°C y acetona 75% a 30°C. Las extracciones realizadas con metanol al 70% y etanol al 20%, ambas a 30°C, no presentan diferencias significativas entre sí, pero son significativamente diferentes de los tratamientos que emplean como solventes agua y acetona. El tratamiento que logró mayor extracción de fenoles totales fue el agua a 90°C, con una concentración de 12,5875 mg equivalentes de ácido gálico cada 1g de materia seca.

Por lo tanto se selecciona agua a 90°C como solvente de extracción de polifenoles de las semillas de la uva, siendo el tiempo de tratamiento 4 horas. Si bien los solven-

tes que mayores extracciones lograron fueron el agua y la acetona, se prefiere el empleo de agua como extractante por ser más económico, y porque su uso futuro será como aditivo para alimentos. Si el solvente seleccionado fuese acetona, debería eliminarse posteriormente del extracto.

2.4.6. Determinación del poder reductor de los extractos

Una vez obtenidos los extractos provenientes de los distintos tratamientos de extracción, y conocida su concentración fenólica, se procedió a determinar el poder reductor de los extractos. El poder reductor es un indicio de la capacidad antioxidante del extracto (Yildirim et al, 2001; Alma et al, 2003).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, por medio de la prueba de Kruskal- Wallis. En la tabla N° 6 se presentan los resultados de este ensayo.

Tabla N° 6. Poder reductor de los extractos obtenidos con distintos solventes.

Tratamientos ⁽¹⁾	Poder reductor (DO 700 nm) ⁽²⁾
Agua a 90°C	1,290 a ⁽³⁾ ± 0,015
Metanol 70% a 30°C	0,818 b ± 0,053
Acetona 75% a 30°C	1,399 a ± 0,019
Etanol 20% a 30°C	0,584 c ± 0,034

⁽¹⁾Tiempo de tratamiento 4 horas

⁽²⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

⁽³⁾Letras distintas indican diferencias entre las medianas en la prueba de Kruskal-Wallis

En la figura 9 se grafican los datos obtenidos en este ensayo.

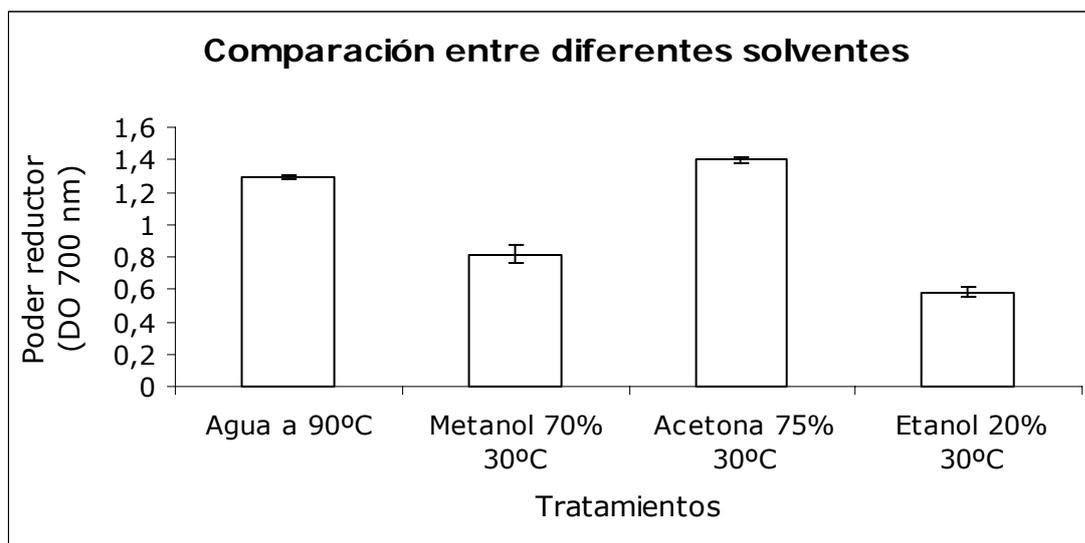


Figura 9. Comparación entre diferentes solventes. Poder reductor (DO 700 nm)

En cuanto al poder reductor, el análisis de la varianza determina que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con agua a 90°C y con acetona 75% a 30°C; pero existen diferencias significativas entre estos tratamientos y las extracciones realizadas con metanol al 70% y etanol al 20%, ambas a 30°C.

El método analítico empleado determina polifenoles totales, pero no es capaz de discriminar dentro de este gran grupo de compuestos. Para una misma concentración de fenoles totales, pueden existir distintas concentraciones de ácidos cinámicos y benzoicos, antocianos, catequinas, taninos y flavanoides. Cada uno de estos grupos fenólicos se comporta en forma diferente respecto a su poder reductor. Landrault et al (2001), establecieron una relación entre la capacidad antioxidante (determinada por el método Randox, que se basa en la producción de un radical coloreado a partir del 2,2' azino-di-3 etil- benzotiazoline sulfonato ATBS) y el contenido de fenoles totales en vinos, con un coeficiente de correlación $r = 0,959$. La concentración de los compuestos fenólicos en forma individual también fue correlacionada con la actividad antioxidante. El coeficiente de correlación más alto que encontraron estos autores fue $r=0,83$, para el ácido gálico; procianidina B₃ $r=0,73$; epicatequina + catequina $r=0,705$; epicatequina $r= 0,67$; catequina $r=0,66$; ácido caftárico $r=0,64$; procianidina B₁ y B₂ $r = 0,63 - 0,61$; procianidina B₄ y ácido cafeico $r= 0,36-0,35$ y antocianos $r=< 0,30$. Frankel et al, 1995, estudiaron la actividad antioxidante de los vinos sobre la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad humanas. Estos autores encontraron que la actividad antioxidante se correlaciona con el contenido de polifenoles totales en el vino $r= 0,94$; en cuanto a los fenoles individuales, ácido gálico ($r= 0,92$), catequina ($r= 0,76$), miricetina ($r= 0,70$), quercetina ($r= 0,68$), ácido cafeico ($r= 0,63$), rutina($r= 0,50$), epicatequina($r= 0,45$), cianidina($r= 0,43$), y malvidina 3 glucósido($r= 0,38$). Fuhrman et al (2001), sostienen que los distintos polifenoles poseen diferentes capacidades antioxidantes, las cuales están relacionadas con sus estructuras químicas.

Por lo tanto, para una misma concentración de fenoles totales, pueden obtenerse diferentes valores de poder reductor en un extracto, dependiendo de cuáles grupos fenólicos se han extraído. Esta situación puede observarse cuando se comparan los extractos obtenidos empleando como solventes agua y acetona. El agua extrae mayor cantidad de polifenoles totales que la acetona, pero el poder reductor del extracto logrado con acetona es mayor que el poder reductor del extracto acuoso.

En consecuencia, considerando que el antioxidante se desea aplicar en alimentos, se prefiere emplear agua a 90°C como solvente, aunque este extracto presente un poder reductor levemente menor que el extracto con acetona. Esta pequeña diferencia en el poder reductor no justifica el empleo de un solvente como acetona, cuyas características inflamables y tóxicas complican el manejo de este producto. Debe notarse que, si bien el extracto acuoso presenta un poder reductor menor que el extracto obtenido con acetona, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por lo tanto, y a los fines estadísticos, las medianas de los tratamientos agua y acetona son iguales.

Por tal motivo, el tratamiento más adecuado para el objetivo buscado es el agua a 90°C. Se verifica la relación que existe entre poder reductor y concentración de polifenoles (Yen et al, 1993; Yen et al, 2000; Benzie y Szeto, 1999; Yildirim et al, 2000; Yildirim et al, 2001; Alma et al, 2003). Los extractos que presentaron menor concentración fenólica, también registraron bajos poderes reductores, mientras que los tratamientos que generaron extractos más concentrados en fenoles totales, presentaron mayor poder reductor.

La cesión de compuestos fenólicos de las semillas al solvente es consecuencia de dos fenómenos que ocurren durante la maceración: 1) una disolución de cada compuesto fenólico a nivel celular en las semillas y 2) su difusión hacia el medio líquido exterior (Ribéreau- Gayon et al, 2003).

Analizando los resultados experimentales obtenidos, se observa que los métodos de extracción de fenoles de las semillas afectan significativamente tanto la concentración fenólica, como el poder antioxidante o reductor del extracto. Esto coincide con lo observado por otros autores en diferentes materiales vegetales. Ki Won Lee et al (2003) trabajando sobre polvo de cacao, lograron extractos de compuestos fenólicos más concentrados empleando como solvente al metanol, que empleando agua como extractante. Kähkönen et al (2001), utilizaron diferentes solventes con manzanas y bayas. Estos autores encontraron que la extracción de fenoles empleando solución acuosa de acetona es superior a la lograda por la solución acuosa de metanol. Los extractos de bayas y manzanas empleando mezclas de acetona-agua y de metanol-agua como solventes muestran alta actividad antioxidante, pero los extractos de bayas obtenidos empleando solamente agua, eran también antioxidantes muy activos, a pesar de su menor contenido en fenoles totales. Cabe mencionar que ellos emplearon agua a temperatura ambiente 20°C y a temperatura de ebullición. Kähkönen et al (2001) explican esta situación considerando la actividad enzimática de la polifenoloxidasas. Sostienen que la actividad de hidroxilación de la polifenoloxidasas probablemente perdura durante la extracción con agua a 20°C, lo cual puede reducir el contenido fenólico en el extracto. El tratamiento de extracción con agua a ebullición es mucho más drástico para muchos fenoles lábiles, pero la temperatura inactiva las enzimas, y por lo tanto genera extractos altamente activos como antioxidantes. Los resultados en los extractos de bayas y manzanas producidos empleando agua caliente demuestran que es posible preparar extractos muy activos, con altos contenidos fenólicos sin el empleo de solventes orgánicos, los cuáles pueden ser problemáticos en las industrias de los alimentos y de los medicamentos.

Los datos de extracción conseguidos en este ensayo también son coincidentes con los de otros investigadores, en cuanto al escaso efecto del alcohol etílico sobre la extracción de los compuestos fenólicos de las semillas, así como también al efecto de las mayores temperaturas en la mayor intensidad de extracción (Oszmianski et al., 1986). Experimentando con polvo de semillas de *Vitis rotundifolia*, cv Muscadinea, Yilmaz et al (2006) encontraron que la extracción de fenoles con una mezcla acuosa de 50 o 75% de acetona fue superior a la extracción realizada con mezclas acuosas de etanol al 60% ó metanol al 70%.

Respecto al poder reductor, los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con los de Siddhuraju et al (2003) y de Yen et al (2000), quienes establecieron que el poder reductor de los componentes bioactivos está relacionado con la actividad antioxidante. El poder reductor de los extractos aumenta con el aumento de la concentración fenólica (Yen et al, 2000; Benzie y Szeto, 1999; Yildirim et al, 2001; Alma et al, 2003). Sin embargo, cuando se comparan los extractos acuosos y los provenientes de solventes orgánicos, los extractos acuosos parecen ser menos efectivos en cuanto a su poder antioxidante. Esta situación se verifica al comparar las extracciones con agua y acetona (Tabla N° 6): si bien el extracto en acetona tiene menos fenoles totales que el extracto acuoso, no existen diferencias significativas en el poder reductor de ambos extractos.

2.5. Conclusiones

Es posible emplear el método de Folin Ciocalteu en forma de micrométodo, ya que se estableció la correspondencia entre el método original y el micrométodo.

Los lípidos extractados no interfieren en la determinación de Fenoles totales por Folin Ciocalteu.

El Agua a 90°C es el solvente que proporcionó una mayor extracción de polifenoles, por lo tanto se empleará para la obtención compuestos fenólicos a partir de semillas de vid.

Si bien durante 4 horas de extracción, el agua a 90°C produjo una mayor extracción de fenoles que la acetona al 75% a 30°C, el poder reductor de ambos extractos no presentó diferencias estadísticamente significativas. Esto permitiría concluir que no todos los fenoles extractados con el agua a 90°C presentan poder reductor.

**CAPÍTULO 3:
CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE FENOLES TOTALES A DISTINTAS
TEMPERATURAS.
SELECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE TRATAMIENTO**

3.1. Hipótesis

El procedimiento de extracción de antioxidantes a partir de semillas de vid puede ser optimizado, variando temperaturas y tiempos de tratamiento.

3.2. Objetivos

Obtener altas concentraciones de Fenoles totales en el menor tiempo y a la menor temperatura de tratamiento posibles.

3.3. Materiales y métodos

Se realizaron dos ensayos de cinética de extracción de compuestos fenólicos, empleando agua destilada como solvente. Las temperaturas de tratamiento fueron 60°C y 90 °C. Ambos ensayos se realizaron por cuadruplicado, con extracción de muestras cada 20 minutos, durante 5 horas. Se colocó 1 g de semilla y 10 mL de solvente en tubo de ensayo de 15 ml de capacidad, con tapa a rosca. Se prepararon 120 tubos para realizar el muestreo mencionado. La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu modificado (micro-método, ver Apéndice) empleando ácido gálico como estándar. La expresión de la concentración es mg/g de materia seca. También se determinó el poder reductor en los mismos extractos, por medio del método de Oyaizu (Yen y Chen, 1995), expresándose en densidad óptica a 700 nm (ver Apéndice).

3.4. Resultados y Discusión

En la tabla N° 7 se presentan las concentraciones de fenoles totales extraídos durante 5 horas de tratamiento, a 60°C y 90°C.

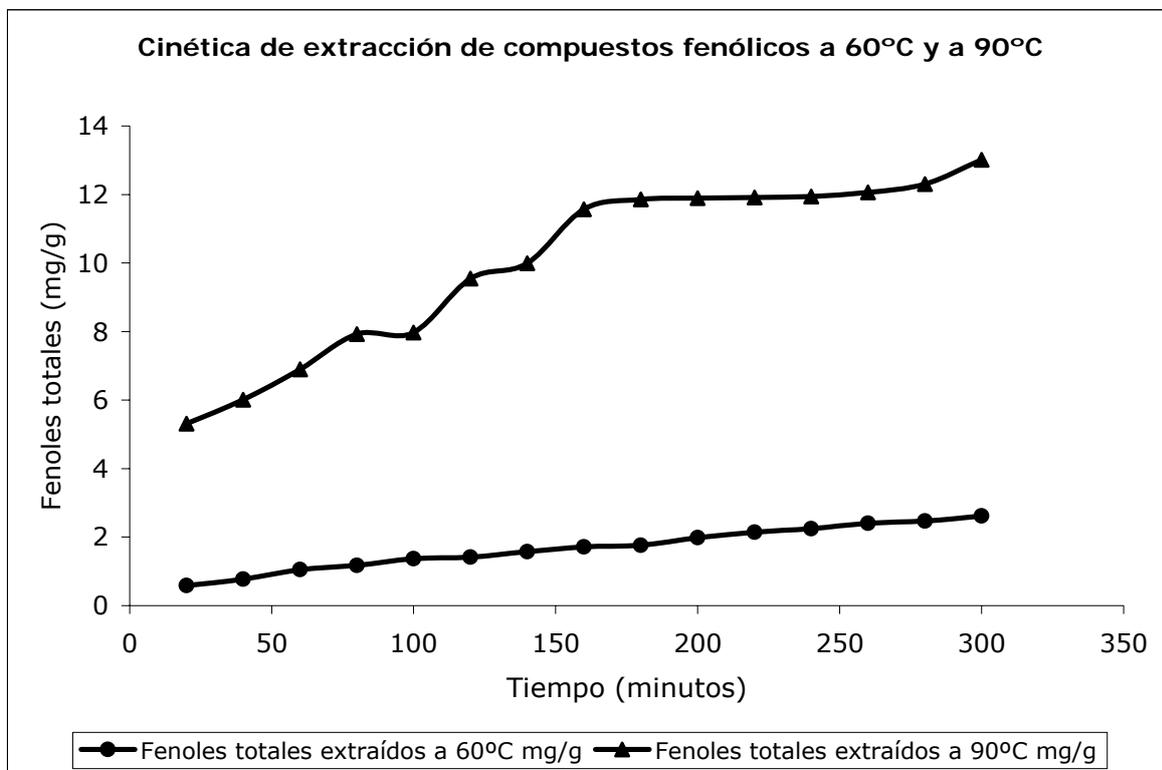
Tabla N° 7. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y 90°C

Tiempo (minutos)	Fenoles totales extractados a 60°C (mg/g de materia seca) ⁽¹⁾	Fenoles totales extractados a 90°C (mg/ g de materia seca) ⁽¹⁾
20	0,589 ± 0,124	5,315 ± 0,312
40	0,778 ± 0,114	6,008 ± 0,193
60	1,050 ± 0,118	6,898 ± 0,531
80	1,177 ± 0,257	7,923 ± 0,209
100	1,366 ± 0,191	7,973 ± 0,230
120	1,417 ± 0,265	9,542 ± 0,159
140	1,575 ± 0,004	9,994 ± 0,224
160	1,714 ± 0,289	11,563 ± 0,218
180	1,757 ± 0,187	11,860 ± 0,241
200	1,990 ± 0,117	11,895 ± 0,183
220	2,146 ± 0,121	11,909 ± 0,233
240	2,242 ± 0,218	11,937 ± 0,128
260	2,402 ± 0,181	12,058 ± 0,324
280	2,474 ± 0,205	12,305 ± 0,189
300	2,615 ± 0,156	13,012 ± 0,267

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

En la Figura 10 se representa la cinética de extracción de fenoles a 60°C y 90°C

Figura 10. Cinética de extracción de fenoles totales. Tratamiento a 90°C y a 60°C. Las concentraciones de fenoles totales se expresan en mg/g de materia seca.



En el tratamiento a 60°C, durante los primeros 100 minutos se extraen 1,366 mg de fenoles totales/g de materia seca (MS). Entre los 100 y 200 minutos de tratamiento, la extracción es de 0,624 mg/g de MS. Entre los 200 y los 300 minutos se extraen 0,625 mg de fenoles por g de MS.

En el tratamiento a 90°C, durante los primeros 100 minutos se extraen 7,973 mg de fenoles totales/g de materia seca (MS). Entre los 100 y 200 minutos de tratamiento, la extracción es de 3,922 mg/g de MS. Entre los 200 y los 300 minutos se extraen 1,117 mg de fenoles por g de MS.

Los datos de fenoles totales obtenidos en los ensayos de cinética a 60°C y a 90°C mostraron que la extracción a 90°C resulta siempre más eficiente, aún cuando se consideren los tiempos mínimos. Por ejemplo, considerando la extracción lograda en los primeros 20 minutos de tratamiento: a 60°C, se obtienen 0,589 mg de fenoles totales/g de materia seca; mientras que a temperatura de 90°C, se extraen 5,315 mg de fenoles totales/g de materia seca.

Las cantidades extraídas en el tiempo de 300 minutos son: 13,012 mg/g de materia seca para el tratamiento a 90°C y 2,615 mg/g de materia seca para el tratamiento a 60°C, lo que representa sólo un 20,09% de la concentración lograda con el tratamiento a 90°C.

Los resultados obtenidos indican que una mayor temperatura favorece una mayor extracción fenólica. Otros autores obtuvieron resultados análogos. Oszmianski et al, en 1986, trabajó con maceraciones de semillas de vid en soluciones acuosas

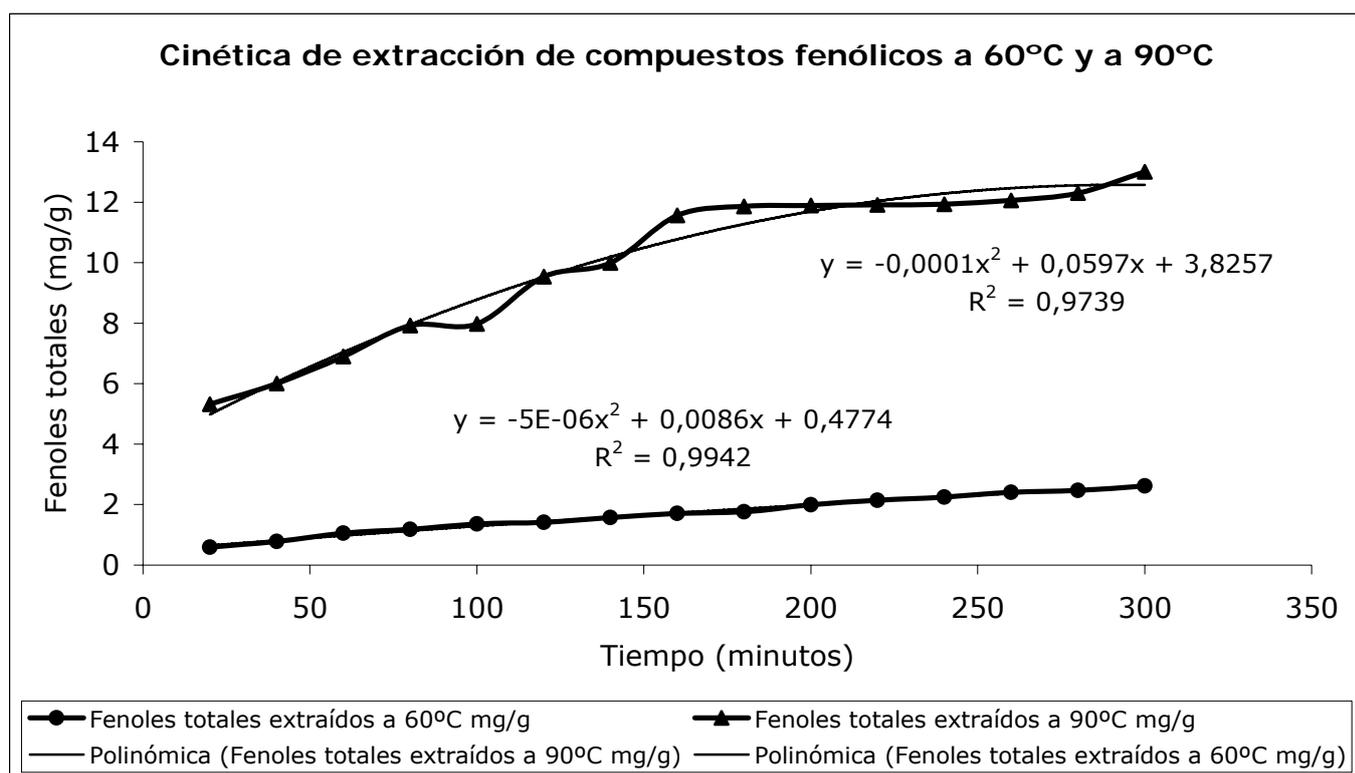
ácidas. Se trató de asimilar las condiciones de trabajo a las de una vinificación industrial, por eso las temperaturas empleadas fueron 20°C y 35°C. La extracción fenólica fue más intensa a 35°C que a 20°C.

Analizando la cinética de extracción a 90°C, se puede observar que después de las 3 horas (180 minutos), los incrementos producidos en la concentración de fenoles extraídos ya no son significativos, como para justificar un mayor tiempo de tratamiento y el consiguiente gasto de energía.

Si bien, la extracción total fue de 13,012 mg de fenoles totales/g de materia seca a los 300 minutos, a los 180 minutos ya se habían extractado 11,860 mg/g de materia seca, que representan el 91% de la extracción total. En dos horas más de tratamiento solo se obtiene un incremento de 9 % de fenoles totales.

A las curvas obtenidas durante el proceso de extracción, se le ajustaron líneas de tendencia polinómicas de 2º orden. Estas se muestran en la Figura 11.

Figura 11. Cinética de extracción de fenoles totales. Tratamiento a 90°C y a 60°C. Ajuste de líneas de tendencia. Las concentraciones de fenoles totales se expresan en mg/g de materia seca.



Para el tratamiento a 90°C se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 3,8257 + 0,0597 X - 0,0001 X^2$$

$$R^2 = 0,9739$$

Donde:

Y = mg de fenoles totales/ g de materia seca

X = tiempo de extracción en minutos

Si se aplica derivada respecto del tiempo se obtiene la velocidad, que está dada por la siguiente ecuación:

$$dY/dX = \text{Velocidad de extracción} = 0,0597 - 0,0002 X$$

En el caso del tratamiento a 60°C, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 0,4774 + 0,0086 X - 0,000006 X^2$$

$$R^2 = 0,9942$$

Si se aplica derivada respecto del tiempo se obtiene la velocidad, que estará dada por la siguiente ecuación:

$$dY/dX = 0,0086 - 0,000012 X$$

Las velocidades de extracción a los distintos tiempos de tratamiento, se muestran en la Tabla N° 8:

Tabla N° 8. Velocidad de extracción para los tratamientos a 90°C y a 60°C
La velocidad está expresada como mg de fenoles totales por gramo de materia seca por minuto

Tiempo (minutos)	Velocidad a 90°C	Velocidad a 60°C
20	0,0557	0,0083
40	0,0517	0,0081
60	0,0477	0,0078
80	0,0437	0,0076
100	0,0397	0,0074
120	0,0357	0,0071
140	0,0317	0,0069
160	0,0277	0,0066
180	0,0237	0,0064
200	0,0197	0,0062
220	0,0157	0,0059
240	0,0117	0,0057
260	0,0077	0,0054
280	0,0037	0,0052
300	-0,0003	0,0050

Del análisis de la Tabla N° 8 surge que: la velocidad de extracción de fenoles totales es notablemente mayor en el tratamiento de extracción a 90°C que en el tratamiento a 60°C. A los 20 minutos de tratamiento, la extracción obtenida a 90°C es 6,7 veces mayor que la lograda a 60°C. En la extracción a 60°C, la velocidad es pequeña y se mantiene prácticamente constante. Mientras que en la extracción a 90°C, a los 180 minutos de tratamiento, la velocidad de extracción se ha reducido a un 42,6 % de la velocidad inicial.

En la Figura 12, se grafican las velocidades a 60°C y a 90°C.

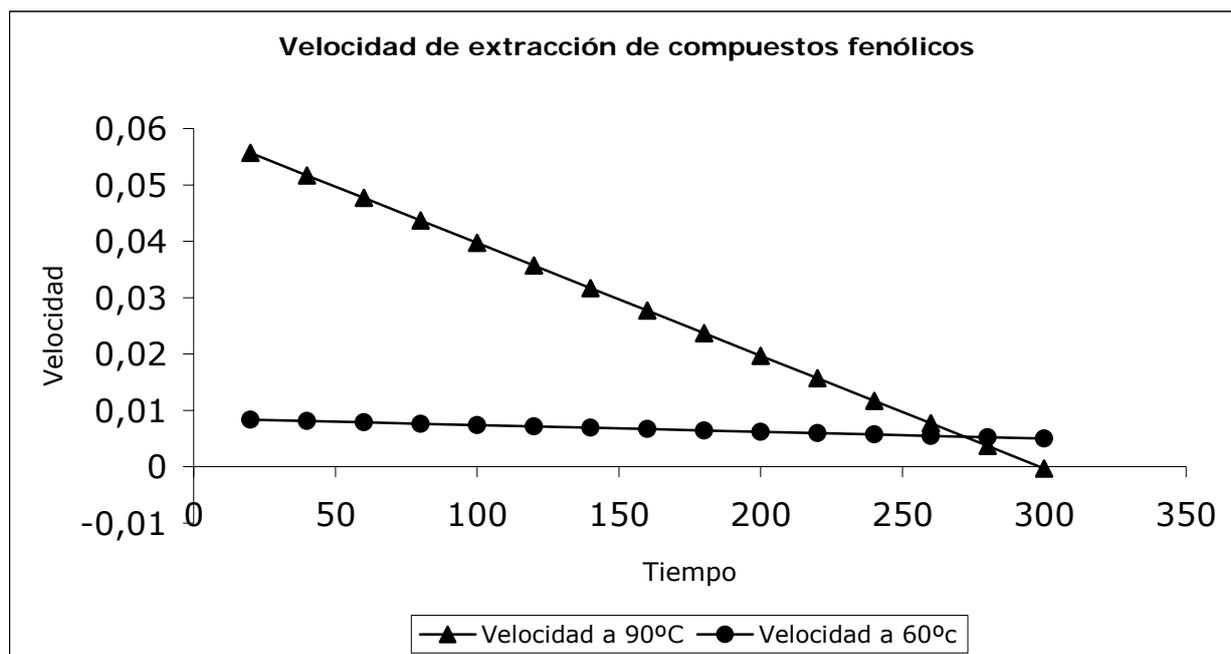


Figura 12. Velocidad de extracción de compuestos fenólicos a 90°C y a 60°C

En forma paralela al estudio de la variación de la composición fenólica en el tiempo, se analizó la variación del poder reductor de los extractos a medida que aumenta el tiempo de extracción.

En la tabla N° 9 se presentan los datos correspondientes al poder reductor de los compuestos fenólicos, determinados en los tratamientos de extracción a 60°C y a 90°C.

Tabla N° 9. Poder Reductor de compuestos fenólicos durante la extracción con agua a 60°C y 90°C

Tiempo (minutos)	Poder reductor para extracción a 60°C (DO 700 nm) ⁽¹⁾	Poder reductor para extracción a 90°C (DO 700 nm) ⁽¹⁾
20	0,630 ± 0,053	0,809 ± 0,044
40	0,738 ± 0,114	0,907 ± 0,027
60	0,811 ± 0,016	1,033 ± 0,076
80	0,823 ± 0,028	1,178 ± 0,072
100	0,847 ± 0,015	1,185 ± 0,070
120	0,900 ± 0,041	1,407 ± 0,064
140	0,894 ± 0,047	1,471 ± 0,025
160	0,823 ± 0,082	1,693 ± 0,058
180	0,822 ± 0,046	1,735 ± 0,092
200	0,610 ± 0,038	1,741 ± 0,081
220	0,474 ± 0,014	1,742 ± 0,061
240	0,463 ± 0,033	1,746 ± 0,037
260	0,446 ± 0,024	1,763 ± 0,095
280	0,430 ± 0,037	1,798 ± 0,112
300	0,423 ± 0,031	1,898 ± 0,137

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

Analizando el poder reductor de los extractos obtenidos a 60°C y a 90°C, se observan dos comportamientos diferentes: En la extracción a 60°C, el máximo poder reductor se obtiene a los 120 minutos de tratamiento. A partir de este punto el poder reductor disminuye, si bien la concentración fenólica sigue aumentando. En la extracción a 90°C, el poder reductor aumenta en forma continua a medida que aumenta la concentración fenólica.

Los datos obtenidos en la extracción a 60°C se van a analizar en dos etapas: Considerando el tiempo de 0 a 120 minutos (etapa en la cual el poder reductor crece hasta llegar al máximo a los 120 minutos) y de 120 a 300 minutos (etapa en la cual el poder reductor disminuye, a pesar del aumento de la concentración de los fenoles totales).

En la tabla N° 10 se presentan los datos de fenoles totales y poder reductor para la extracción a 60°C, considerando el tiempo total de tratamiento.

Tabla N° 10. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos

Tiempo (minutos)	Fenoles totales extractados a 60°C (mg/g de materia seca) ⁽¹⁾	Poder reductor a 60°C (DO 700 nm) ⁽¹⁾
20	0,589	0,630
40	0,778	0,738
60	1,050	0,811
80	1,177	0,823
100	1,366	0,847
120	1,417	0,900
140	1,575	0,894
160	1,714	0,823
180	1,757	0,822
200	1,990	0,610
220	2,146	0,474
240	2,242	0,463
260	2,402	0,446
280	2,474	0,430
300	2,615	0,423

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones

En la tabla N°11 se presentan los datos de fenoles totales y poder reductor fraccionados para los primeros 120 minutos de extracción con agua a 60°C.

Tabla N° 11. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos, durante 120 minutos de extracción.

Tiempo (minutos)	Fenoles totales extractados a 60°C (mg/g de materia seca) ⁽¹⁾	Poder reductor a 60°C (DO 700 nm) ⁽¹⁾
20	0,589	0,630
40	0,778	0,738
60	1,050	0,811
80	1,177	0,823
100	1,366	0,847
120	1,417	0,900

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones

En la figura 13 se grafican los datos de la tabla N° 11, y se presenta la función que vincula las variables fenoles totales y poder reductor para los 120 minutos de extracción a 60°C.

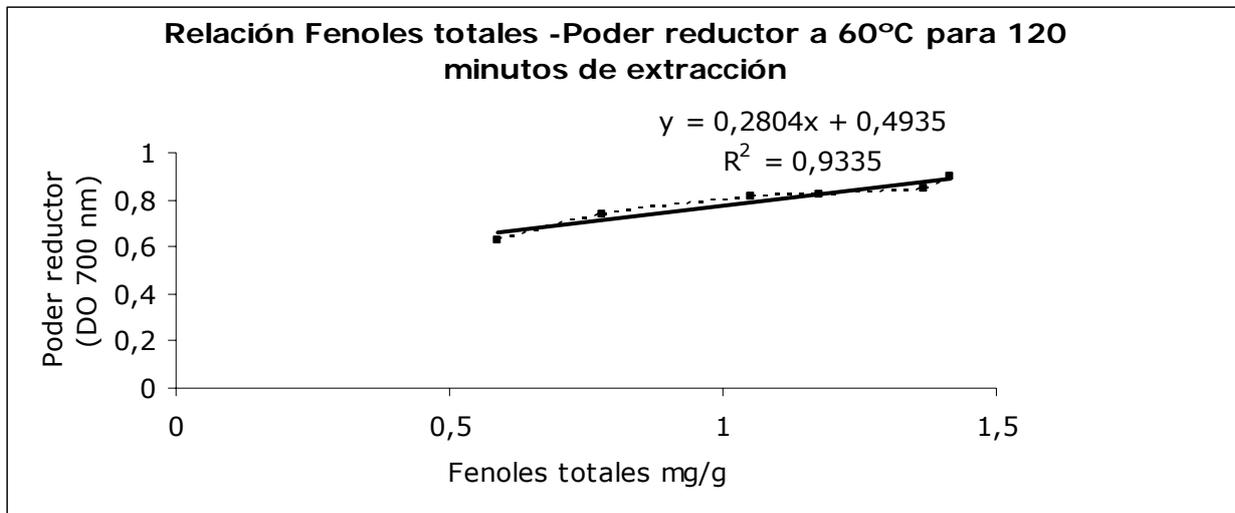


Figura 13. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor para una temperatura de extracción de 60°C, tiempo de tratamiento 120 minutos.

Para los primeros 120 minutos de extracción a 60°C se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 0,4935 + 0,2804 X$$

$$R^2 = 0,9335$$

Donde:

Y = Poder reductor (DO 700 nm)

X = Fenoles totales (mg / g de materia seca)

En este primer periodo de extracción, se puede explicar en un 93% la variabilidad del poder reductor a través de la concentración fenólica. A medida que aumenta la concentración fenólica, aumenta el poder reductor. La pendiente de la curva es positiva.

En la tabla N° 12 se presentan los datos de fenoles totales y poder reductor para los tiempos de extracción entre 140 y 300 minutos, empleando como solvente agua a 60°C.

Tabla N° 12. Cinética de extracción de compuestos fenólicos con agua a 60°C y poder reductor de los extractos obtenidos, para los tiempos de extracción entre 140 y 300 minutos.

Tiempo (minutos)	Fenoles totales extraídos a 60°C (mg/g de materia seca) ⁽¹⁾	Poder reductor a 60°C (DO 700 nm) ⁽¹⁾
140	1,575	0,894
160	1,714	0,823
180	1,757	0,822
200	1,990	0,610
220	2,146	0,474
240	2,242	0,463
260	2,402	0,446
280	2,474	0,430
300	2,615	0,423

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones

En la figura 14 se grafican los datos de la tabla N° 12, y se presenta la función que vincula las variables fenoles totales y poder reductor entre 140 a 300 minutos de extracción a 60°C.

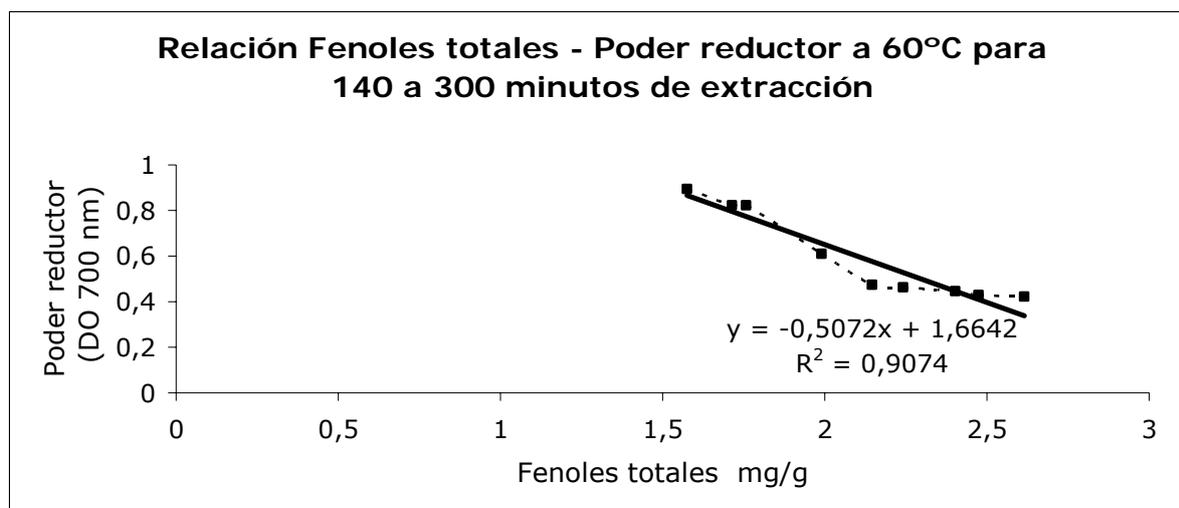


Figura 14. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor para una temperatura de extracción de 60°C, tiempo de tratamiento: 140 minutos a 300 minutos.

Para tiempo de extracción entre 140 y 300 minutos de extracción a 60°C se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 1,6642 - 0,5072 X$$

$$R^2 = 0,9074$$

Donde:

Y = Poder reductor (DO 700 nm)

X = Fenoles totales (mg / g de materia seca)

En este segundo periodo de extracción, se puede explicar en un 90% la variabilidad del poder reductor a través de la concentración fenólica. A medida que aumenta la concentración fenólica, disminuye el poder reductor. La pendiente de la curva es negativa. Puede suponerse que coexisten dos fenómenos: si bien la concentración de fenoles sigue aumentando en forma leve pero sostenida, se está produciendo simultáneamente una modificación química de los fenoles extraídos, que se refleja en una pérdida del poder reductor.

Kähkönen et al (2001) trabajaron con extractos de manzanas y bayas, empleando como solventes: acetona al 70%, metanol al 60%, hexano, agua (todos estos solventes a 20°C) y agua a ebullición. Estos autores explican esta situación considerando la actividad enzimática de la polifenoloxidasas. Sostienen que la actividad de hidroxilación de la polifenoloxidasas probablemente perdura durante la extracción con agua a 20°C, lo cual puede modificar el contenido fenólico en el extracto. El tratamiento de extracción con agua en ebullición es mucho más drástico para muchos fenoles lábiles, pero la temperatura inactiva las enzimas, y por lo tanto genera extractos altamente activos como antioxidantes. Los resultados en los extractos de bayas y manzanas producidos empleando agua caliente demuestran que es posible preparar extractos muy activos, con altos contenidos fenólicos sin el empleo de solventes orgánicos, los cuáles pueden ser problemáticos en las industrias de los alimentos y de los medicamentos.

Sánchez Ferrer et al (1988), determinaron que el rango de temperatura óptimo para la actividad cresolasa de la polifenoloxidasas es de 40-60°C. La actividad cresolasa de esta enzima produce la hidroxilación de monofenoles ubicados en posición orto, generando orto-di-fenoles. Estos autores trabajaron sobre polifenoloxidasas EC 1.14.18.1 obtenida de *Vitis vinifera* cultivar Monastrell. Por otra parte, Mchedlishvili et al, 2005, trabajaron sobre la termoestabilidad de fenoloxidasas y peroxidasas provenientes de té (*Camellia sinensis*), manzanas (*Malus domestica*), nueces (*Juglans regia*) y (*Armoracia lapathifolia*). Estos autores demostraron que ambas enzimas retienen un 10% de actividad residual, luego de 20 minutos de incubación a 80°C. No se encontraron datos sobre termoestabilidad de polifenoloxidasas provenientes de uvas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento, puede suponerse que, en el tratamiento a 90°C: el aumento de temperatura favorece la extracción, porque incrementa la solubilidad del soluto y también el coeficiente de difusión (Pirelo et al, 2005). Por otra parte, las polifenoloxidasas son inactivadas por la temperatura, de modo que los compuestos fenólicos no son degradados enzimáticamente. En consecuencia, se obtiene mayor concentración de compuestos fenólicos y mayor poder reductor que en la extracción a 60°C.

En el tratamiento a 60°C, la extracción de fenoles totales es menor. La actividad enzimática cresolasa de la polifenoloxidasas se encuentra en su temperatura óptima, los monofenoles son transformados a orto-di-fenoles, son oxidados, por lo tanto pierden su poder antioxidante. De modo que el tratamiento a 60°C no sólo extrae menor cantidad de fenoles que la extracción a 90°C, si no que además estos fenoles son degradados enzimáticamente durante la misma extracción, determinándose un poder antioxidante menor que en la extracción a 90°C.

Los datos obtenidos en la cinética a 90°C (fenoles totales y poder reductor, Tablas N°7 y N°9) fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión simple li-

nal, con el objeto de obtener la ecuación que vincula las dos variables. Esta función se grafica en la figura 15.

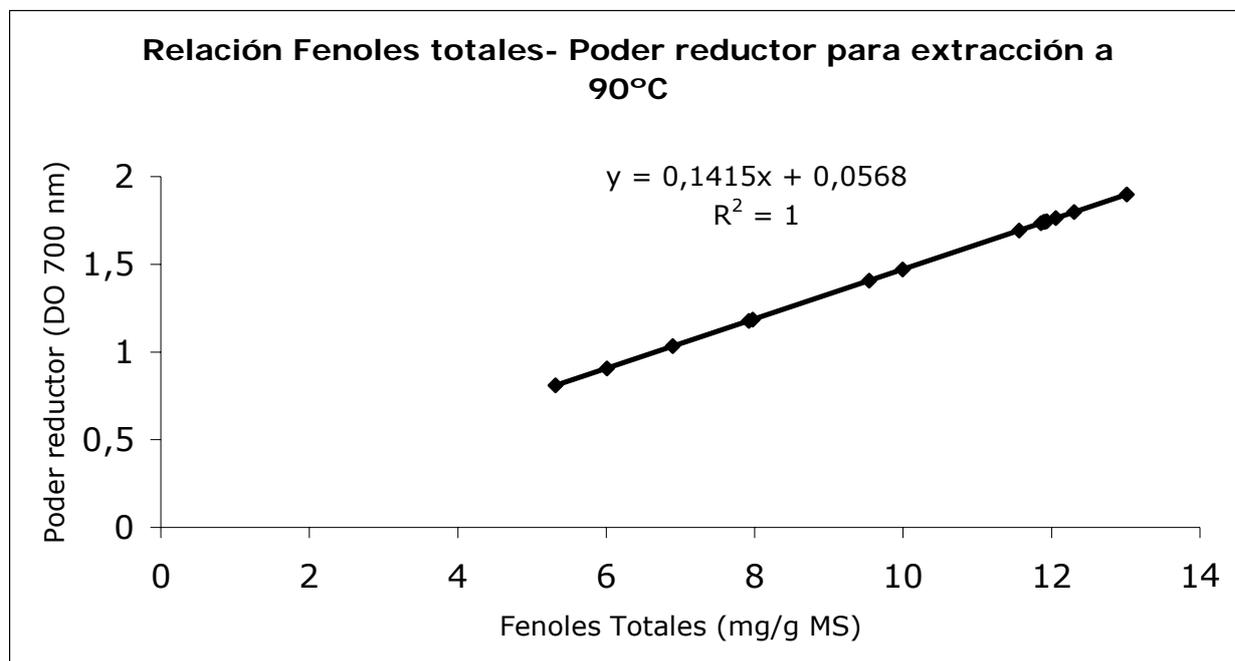


Figura 15. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor para una temperatura de extracción de 90°C

$$\text{Poder reductor} = 0,0568 + (0,1415 * \text{Fenoles Totales})$$
$$R^2 = 100\%$$

La variable fenoles totales permite explicar en un 100%, completamente, la variable poder reductor del extracto. A medida que aumenta la concentración fenólica, aumenta el poder reductor del extracto.

Los resultados obtenidos (concentración de compuestos fenólicos y poder reductor) no permiten sustituir la temperatura de extracción de 90 °C, empleada en el agua, por 60°C.

3.5. Conclusiones

Es posible reducir el tiempo de tratamiento, pero no es conveniente reducir la temperatura de tratamiento.

En base a los resultados obtenidos, se decide seleccionar como temperatura de extracción 90°C, empleando como solvente el agua. Se establece como tiempo de tratamiento 3 horas, ya que el incremento en la extracción de fenoles no es significativo luego de este lapso de tiempo. Se establece una relación directa entre la concentración fenólica y el poder reductor.

**CAPÍTULO 4:
CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO**

4.1. Hipótesis

El extracto obtenido conserva sus características antioxidantes después de ser sometido a un proceso de concentración al vacío.

4.2. Objetivos

Concentrar el extracto acuoso obtenido por medio de un evaporador al vacío, con el objeto de trabajar con un producto concentrado, que permita su posterior desecación.

Verificar que el tratamiento de concentración no altera el poder reductor del extracto.

4.3. Materiales y métodos

El extracto a concentrar fue obtenido por medio de una extracción acuosa a 90°C, durante 3 horas. La concentración se llevó a cabo en un evaporador rotativo al vacío marca Decalab, trabajando a una temperatura de 60°C. En los extractos concentrados y sin concentrar se determinaron Fenoles Totales por método de Folin Ciocalteu modificado (Apéndice), y el poder reductor por el método de Oyaizu (Apéndice). El ensayo se realizó con 4 repeticiones.

Los datos fueron procesados por medio del análisis de la varianza, con el programa Statgraphics plus 4.0[®]. Si los datos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas, se aplicará el análisis de la varianza; si los datos no responden a una distribución normal ó las varianzas no son homogéneas, se aplicará estadística no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal – Wallis.

4.4. Resultados y Discusión

En la tabla N° 13 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de concentración; el testigo es el extracto sin concentrar. Las variables medidas fueron fenoles totales y poder reductor.

Tabla N° 13. Fenoles totales (mg/L de extracto) y poder reductor (DO a 700 nm) en los extractos sin concentrar y concentrado

Tratamientos	Fenoles totales ⁽¹⁾ (mg/L de extracto)	Poder reductor ⁽¹⁾ (DO a 700 nm)
Extracto sin concentrar	1143,2 a ⁽²⁾ ± 49,96	1,756 a ⁽²⁾ ± 0,058
Extracto concentrado	36.370,7 b ± 2883,56	68,200 b ± 2,050

⁽¹⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación standard

⁽²⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

Se estudió la normalidad de los datos obtenidos en este ensayo, con el objeto de aplicar el análisis de la varianza. Se verificó que los datos no provenían de una distribución normal, porque las varianzas de los tratamientos no eran homogéneas. En

consecuencia, se aplicó la prueba de Kruskal- Wallis, que es no paramétrica y compara las medianas de los tratamientos en lugar de las medias (cómo lo hace el análisis de la varianza).

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis indican que existen diferencias significativas en las concentraciones de fenoles totales entre los tratamientos efectuados, para un nivel de confianza de 95 %, y también existen diferencias significativas en el poder reductor entre los tratamientos efectuados, para un nivel de confianza de 95 %.

Considerando los polifenoles totales, se produjo una concentración de aproximadamente 31,8 veces (36.370,7 / 1143,2). Pero el poder reductor del extracto aumentó unas 38,8 veces (68,200 / 1,756) respecto del extracto sin concentrar. Se realizó el análisis estadístico de la relación entre el contenido de fenoles totales del extracto concentrado y del extracto no concentrado, y del poder reductor entre extracto concentrado y extracto no concentrado, con el objeto de verificar si esta diferencia es estadísticamente significativa.

Se estudió la normalidad de los datos obtenidos en este ensayo, con el objeto de aplicar el análisis de la varianza. Se verificó que los datos no provenían de una distribución normal, porque las varianzas de los tratamientos no eran homogéneas. En consecuencia, se aplicó la prueba de Kruskal- Wallis, que es no paramétrica y compara las medianas de los tratamientos en lugar de las medias (cómo lo hace el análisis de la varianza).

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis indican que existen diferencias significativas entre las medianas de la relación entre el contenido de fenoles totales entre extracto concentrado y extracto no concentrado, y de los poder reductor entre extracto concentrado y extracto no concentrado.

En la tabla N° 14 se presentan los resultados de este análisis.

Tabla N° 14: Medianas de las relaciones entre extracto concentrado y extracto sin concentrar

Tratamientos	Fenoles totales ⁽¹⁾ (mg/L de extracto)	Poder reductor ⁽¹⁾ (DO a 700 nm)
Relación entre extracto concentrado y extracto sin concentrar	29,57 ⁽²⁾ a	37,39 ⁽²⁾ b

⁽¹⁾Cada valor representa la mediana de 4 repeticiones

⁽²⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

Este análisis permite concluir que el tratamiento de concentración del extracto provocó un aumento del poder reductor del mismo, superior al aumento causado por la concentración del extracto.

Una explicación para este fenómeno puede encontrarse en los trabajos de Arnous et al, 2001; Yamaguchi et al, 1999; Saito et al, 1998 y Rice-Evans et al, 1995. Según Arnous et al, 2001, la actividad antioxidante (reductora) de los proantocianidinas depende del largo de la cadena de oligómeros; los monómeros y los dímeros

inhiben la oxidación de las LDL(lipoproteínas de baja densidad) de forma más eficiente que los hexámeros, mientras que la inhibición del anión superóxido tiende a incrementarse a medida que el grado de polimerización aumenta.

De acuerdo con Yamaguchi et al, 1999, la capacidad de capturar anión superóxido es mayor a medida que el grado de polimerización de los flavanoles aumenta. También la actividad antiúlcera de una serie de procianidinas aumenta a medida que crece el grado de polimerización de la unidad catequina.

Saito et al, 1998, verificaron que el monómero (+) catequina no inhibe la formación de úlceras, pero los oligómeros de más de tres unidades de (+) catequina presentan una fuerte actividad de protección ante la agresión a la mucosa estomacal. La capacidad de inhibir la formación de úlceras se ha ensayado en ratas provocando las lesiones con solución de CIH / Etanol.

Rice-Evans et al, 1995, establecieron que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades redox, debido a que ellos actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno y captores del oxígeno singulete. Se emplearon etanol, metanol y agua como solventes, pero en todos los casos la extracción fue más intensa a mayor temperatura. Estos autores sostienen que el aumento de temperatura favorece la extracción, porque incrementa la solubilidad del soluto y también el coeficiente de difusión. Por otra parte, las muestras que fueron sujetas a destilación lograron concentraciones mayores de fenoles, así como mayor efecto antirradical que aquellas muestras que solo fueron prensadas. Durante el proceso de destilación, las muestras pueden alcanzar temperaturas de 120 y 130°C. Estas diferencias pueden explicarse por la tendencia que tienen los fenoles de combinarse entre sí a través de reacciones de polimerización, los oligómeros tienen mayor actividad antirradical que los monómeros.

En base a todo lo expuesto, es posible que la temperatura a la que fue sometido el extracto durante el proceso de concentración, haya actuado favoreciendo la polimerización, explicando de este modo el aumento relativo del poder reductor del extracto concentrado.

4.5. Conclusiones

El proceso de concentración por medio de evaporador rotativo al vacío no deteriora las características reductoras del extracto de semillas. Aparentemente este proceso mejora la condición reductora del extracto.

**CAPÍTULO 5:
EMPLEO DEL EXTRACTO DE SEMILLAS EN UN SISTEMA REAL SUJETO A
OXIDACIÓN**

5.1. Hipótesis

El extracto obtenido tiene actividad antioxidante, que puede ser medida en un sistema real sujeto a oxidación.

5.2. Objetivos

Verificar el poder antioxidante del extracto de semillas de vid (sin concentrar y concentrado) sobre la oxidación del jugo de manzanas recién obtenido.

5.3. Introducción

Se seleccionó jugo de manzanas para ensayar el extracto como antioxidante, porque el pardeamiento oxidativo debido a la oxidación de los polifenoles, es muy importante en la industria de los alimentos. En las frutas y vegetales, este fenómeno deteriora la calidad, causando la formación de pigmentos amarillos y marrones, que provocan aspecto desagradable (Le Bourvellec et al, 2004). El proceso de pardeamiento se debe a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos endógenos, catalizados por la enzima polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) propia de los tejidos vegetales. La PPO es una enzima que cataliza, en presencia de oxígeno, la oxidación de los difenoles a o-quinonas, lo que conduce posteriormente a la formación de pigmentos polimerizados marrones (Mi Soon Jang et al, 2002). Generalmente, la oxidación de los polifenoles ocurre cuando las frutas y vegetales sufren daños físicos durante la cosecha y almacenaje.

La concentración fenólica del jugo de manzanas es de aproximadamente 7 g /L. Los compuestos fenólicos presentes son procianidinas, catequinas monómeras, ácidos hidroxicinámicos, dihidrocalconas y flavonoles. En manzanas, el grado medio de polimerización de las proantocianidinas, oscila entre 4 y 7 unidades. Los sustratos preferidos para la oxidación, por efecto de la PPO, son el ácido cafeoilquínico y las catequinas monómeras (Le Bourvellec et al, 2004). En la obtención del jugo de manzanas, al poner en contacto enzima, sustrato y oxígeno se produce la oxidación del producto. Esto resulta evidente por el aumento de la intensidad del color del jugo, que pasa de amarillo dorado a marrón (Mi Soon Jang et al, 2002).

Dada la facilidad de la ocurrencia de la oxidación en el jugo de manzanas, y la sencillez de la medida del proceso oxidativo, se seleccionó este producto para ensayar la acción antioxidante del extracto de semillas de vid.

5.4. Materiales y métodos

Se empleó jugo de manzanas obtenido en forma previa a la realización del ensayo. El jugo de manzanas se obtuvo de manzanas frescas, cv red delicious. Las manzanas fueron peladas, y luego ralladas con una multiprocesadora de uso culinario. Las manzanas ralladas se colocaron en un lienzo y se prensaron en forma manual para obtener el jugo.

El nivel de oxidación del jugo de manzanas fue determinado por lectura de la absorbancia a 420 nm sobre muestras centrifugadas (3000 rpm, durante 10 minutos) y diluidas 1:5. Se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación (Özoglu et al, 2002, Apéndice).

Al jugo de manzanas obtenido se le hizo una lectura de densidad óptica a 420 nm en forma inmediata, de modo de conocer el color inicial del jugo, antes del desarrollo de la oxidación.

Los tratamientos efectuados fueron tres: testigo (jugo de manzanas sin agregados), extracto no concentrado y extracto concentrado.

Las dosis de fenoles totales contenidas en el extracto a emplear se seleccionaron en base a ensayos previos. La dosis de extracto a emplear se determinó por volumen; se decidió agregar 20 mL de extracto no concentrado a 80 mL de jugo, o sea un 20% de extracto no concentrado. Dado que el extracto contenía 1143,2 mg de fenoles totales por litro de extracto, en 20 mL de extracto, había 22,86 mg de fenoles totales. El extracto concentrado tenía una concentración de 36370,7 mg de fenoles totales por litro. Por lo tanto, 22,86 mg de fenoles totales se encuentran en 0,6286 mL (aprox. 629µL). El extracto concentrado fue reconstituido con agua destilada al volumen empleado de extracto sin concentrar (20 mL). Al testigo (ó tratamiento sin antioxidante) le fueron agregados 20 ml de agua.

En todos los casos se empleó 80 ml de jugo de manzanas. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Las concentraciones empleadas fueron de 22,86 mg de fenoles totales cada 80 ml de jugo.

Se consideró un tiempo de tratamiento de 24 horas.

Los datos fueron procesados por medio del análisis de la varianza, con el programa Statgraphics plus 4.0®

5.5. Resultados y Discusión

La lectura inicial de densidad óptica del jugo de manzana fue 1,659.

En la tabla N° 15 se presentan los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla N° 15. Actividad antioxidante del extracto de semillas en jugo de manzanas

Tratamientos ⁽¹⁾	DO 420 nm ⁽²⁾
Testigo	3,977 a ⁽³⁾ ± 0,107
Extracto sin concentrar	3,486 b ± 0,069
Extracto concentrado	2,783 c ± 0,041

⁽¹⁾Tiempo de tratamiento: 24 horas

⁽²⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

⁽³⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

Verificada la normalidad de los datos, fue realizado el análisis de la varianza (prueba de Tukey, 99% de confianza). Se observa que existen diferencias significativas para los tres tratamientos. El tratamiento realizado con el extracto concentrado es el que presenta mejor comportamiento, produciendo menor intensidad de oxidación en el jugo.

Se calculó la inhibición de la oxidación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm tratamiento}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

Donde $\Delta A_{420 \text{ nm}}$ = diferencia entre lectura final e inicial

Para el tratamiento con extracto sin concentrar, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(3,977 - 1,659) - (3,486 - 1,659)] \times 100\} / (3,977 - 1,659)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 28,4 \%$$

Para el tratamiento con extracto concentrado, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(3,977 - 1,659) - (2,783 - 1,659)] \times 100\} / (3,977 - 1,659)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 51,5\%$$

Para un mismo contenido de fenoles totales agregado al jugo de manzanas, el extracto líquido sin concentrar produce un 28,4% de inhibición de la oxidación, mientras que el de extracto líquido concentrado produce un 51,5 % de inhibición de la oxidación del jugo de manzanas.

Cuando se agrega el extracto de semillas de vid al jugo de manzanas recién obtenido, se verifica una inhibición de la oxidación. Pero, a igualdad de concentración de fenoles agregada, los fenoles provenientes del extracto concentrado poseen una actividad inhibidora de la oxidación superior a la del extracto sin concentrar.

Esto coincide con lo observado durante la concentración del extracto. Al medir el poder reductor del extracto concentrado, se comprueba que el aumento del poder reductor es superior al esperado como consecuencia de la concentración del extracto. Esto sugiere la posibilidad de un aumento de la polimerización debida a la temperatura a la cual ha sido sometido el extracto, durante la concentración.

Esta situación se verifica en el sistema real de jugo de manzanas sometido a la oxidación, lo cual coincide con lo observado por Le Bourvellec et al (2004).

Estos autores han demostrado que la velocidad del consumo de oxígeno del jugo de manzanas no se correlaciona con la actividad de la polifenoloxidasas del mismo. La velocidad de reacción decrece más rápido que la concentración del sustrato fenólico. Estas observaciones llevaron a demostrar que la PPO es inhibida por las procianidinas naturales del jugo y oxidadas, así como por los productos de la oxidación del ácido cafeoilquínico y de la (-) epicatequina. El porcentaje de inhibición de la PPO aumenta con el peso molecular de las procianidinas (Le Bourvellec et al, 2004).

La PPO es inhibida por las procianidinas del jugo de manzanas, y esta inhibición es mayor a medida que el polímero de catequina es más grande. Por lo tanto, al agregar el extracto de semillas se están agregando más procianidinas (si bien son de distinto origen vegetal), por tanto se está actuando sobre la PPO. Por otra parte, el extracto concentrado contendría polímeros de mayor peso molecular que el extracto no concentrado. Por ello, la inhibición de la oxidación debida al extracto líquido sin concentrar es de un 28,4%, mientras que la inhibición de la oxidación del jugo de manzanas debida al extracto líquido concentrado es de un 51,5 %, para una misma concentración de fenoles totales adicionados.

5.6. Conclusiones

El extracto de semillas de vid actúa como reductor en un sistema real sujeto a oxidación, tal como es el jugo de manzanas. A igual concentración fenólica, el extracto concentrado de semillas, presenta mayor capacidad para disminuir la intensidad de la oxidación que el extracto sin concentrar.

**CAPÍTULO 6:
PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO CONCENTRADO: SECADO EN LECHO DE
ESPUMA Y LIOFILIZADO**

6.1. Hipótesis

El extracto obtenido conserva sus características antioxidantes después de ser sometido a un proceso de secado en lecho de espuma.

El extracto obtenido conserva sus características antioxidantes después de ser sometido a un proceso de secado por liofilizado.

6.2. Objetivos

Convertir el extracto acuoso concentrado al vacío, en polvo para su mejor conservación y uso.

Comparar dos sistemas de deshidratación del extracto concentrado: secado en lecho de espuma y liofilizado.

Verificar la persistencia del poder reductor luego de los tratamientos de deshidratación.

6.3. Materiales y métodos

Para realizar este ensayo se realizó una concentración más intensa del extracto de modo de obtener 186.254,6 mg /L de fenoles totales.

6.3.1. Secado en lecho de espuma

Se preparó una mezcla con 25 ml de agua destilada, 2,5g de ovoalbúmina, 0,5 g de Carboximetilcelulosa y 0,5g de $(PO_4)_2 Ca_3$. La mezcla fue batida con una batidora doméstica hasta lograr una espuma consistente. Posteriormente se agregó a dicha espuma 10 g de extracto concentrado (186.254,6 mg /L de fenoles totales y densidad= 1,059. Apéndice). Este modo de preparación se justifica porque las proteínas precipitan con los taninos. Colocando todos los ingredientes simultáneamente no se conseguía formar una espuma, debido a esta reacción química. Este preparado fue colocado sobre bandejas de madera con tela de malla inoxidable, y fue secado por medio de flujo de aire a 65°C, durante 90 minutos (Yerdeo, 2001). Se partió de 38,5 g de mezcla total, donde 10 g correspondían al extracto fenólico. Luego del secado, se obtuvieron 4,709 g de polvo.

La dosis de fenoles totales empleada en este ensayo fue de 22,86 mg de fenoles totales por cada 100 ml de muestra. La muestra estuvo integrada por 80 ml de jugo de manzana + 20 ml de agua. Los 22,86 mg de fenoles totales estuvieron contenidos en 123 µL de extracto líquido concentrado; y en 58 mg de extracto secado en lecho de espuma (ver apéndice). Estas dosis fueron las empleadas por muestra.

Finalmente se preparó el ensayo del siguiente modo: el testigo estuvo formado por 80 ml de jugo de manzana + 20 ml de agua destilada; el tratamiento con el extracto concentrado se formó con 80 ml de jugo de manzana + 123 µL de extracto concentrado + 20 mL de agua destilada y el tratamiento con extracto concentrado secado se formó con 80 ml de jugo + 58 mg del extracto secado en lecho de espuma + 20 mL de agua destilada.

Se determinó el poder antioxidante del extracto secado en lecho de espuma en comparación con el extracto concentrado, sobre jugo de manzanas, evaluándose la

densidad óptica a 420 nm (ver Apéndice). El tiempo de tratamiento fue 24 horas, a 20°C de temperatura.

6.3.2. Liofilización

El extracto fue liofilizado en liofilizador Thermovac, a -50°C, en ampollas de vidrio conteniendo 123 µL de extracto.

El ensayo se realizó del siguiente modo: el testigo estuvo formado por 80 ml de jugo de manzana + 20 ml de agua destilada; el tratamiento con el extracto concentrado se formó con 80 ml de jugo de manzana + 123 µL de extracto concentrado + 20 mL de agua destilada y el tratamiento con extracto concentrado secado se formó con 80 ml de jugo + una ampolla de extracto liofilizado (123 µL) + 20 mL de agua destilada. De modo que las dosis empleadas fueron de 22,86 mg de fenoles totales cada 100 ml de muestra (80 mL de jugo + 20 mL de agua destilada).

Se determinó el poder antioxidante del extracto liofilizado en comparación con el extracto concentrado, sobre jugo de manzanas, evaluándose la densidad óptica a 420 nm (ver Apéndice). El tiempo de tratamiento fue 24 horas, a 20°C de temperatura.

En ambos ensayos, el jugo de manzanas se obtuvo de manzanas frescas, cv red delicious, en forma previa al inicio del ensayo. Las manzanas fueron peladas, y luego ralladas con una multiprocesadora de uso culinario. Las manzanas ralladas se colocaron en un lienzo y se prensaron en forma manual para obtener el jugo.

Los datos fueron procesados por medio del análisis de la varianza, con el programa Statgraphics plus 4.0[®]

6.4. Resultados y Discusión

6.4.1. Secado en lecho de espuma

Este ensayo se realizó sobre jugo fresco de manzanas. El color inicial del jugo de manzanas recién obtenido fue 1,26.

En la tabla N° 16 se presentan los datos obtenidos en este ensayo.

Tabla N °16. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Efecto del extracto concentrado líquido y el extracto secado en lecho de espuma.

Tratamientos(1)	DO 420 nm(2)
Testigo	4,528 a ⁽³⁾ ± 0,076
Extracto líquido concentrado	3,512 b ± 0,063
Extracto secado en lecho de espuma	3,501 b ± 0,054

(1)Tiempo de tratamiento: 24 horas

(2)Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

(3)Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

Realizado el análisis de la varianza, No existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos extracto líquido y secado en lecho de espuma, empleando la prueba de Tukey al 99% de confianza. Existen diferencias significativas entre el testigo y extracto líquido, así como entre el testigo y el extracto seco en lecho de espuma.

Se calculó la inhibición de la oxidación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm tratamiento}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

Donde $\Delta A_{420 \text{ nm}}$ = diferencia entre lectura final e inicial

Para el tratamiento con extracto líquido concentrado, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(4,528 - 1,26) - (3,512 - 1,26)] \times 100\} / (4,528 - 1,26)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 31,08 \%$$

Para el tratamiento con extracto secado en lecho de espuma, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(4,528 - 1,26) - (3,501 - 1,26)] \times 100\} / (4,528 - 1,26)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 31,42 \%$$

Para un mismo contenido de fenoles totales agregado al jugo de manzanas, el extracto líquido produce un 31,08% de inhibición de la oxidación, mientras que el de extracto secado en lecho de espuma produce un 31,42 % de inhibición de la oxidación del jugo de manzanas.

6.4.2. Secado por liofilización

Este ensayo se realizó sobre jugo fresco de manzanas. El color inicial del jugo de manzanas recién obtenido fue 1,587.

En la tabla N° 17 se presentan los datos obtenidos en este ensayo.

Tabla N° 17. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Efecto del extracto concentrado líquido y del extracto liofilizado

Tratamientos ⁽¹⁾	DO 420 nm ⁽²⁾
Testigo	4,208 a ⁽³⁾ ± 0,086
Extracto líquido concentrado	3,396 b ± 0,051
Extracto liofilizado	3,841 c ± 0,126

⁽¹⁾Tiempo de tratamiento: 24 horas

⁽²⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

⁽³⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

Realizado el análisis de la varianza, se comprueba que existen diferencias significativas entre las medias de los tres tratamientos, empleando la prueba de Tukey, para un nivel de confianza del 99%. El tratamiento con extracto líquido concentrado presenta el mejor comportamiento, logrando una mayor inhibición de la oxidación que el tratamiento con extracto liofilizado. Por lo tanto, existe una pérdida del poder antioxidante del extracto concentrado durante el proceso de liofilización.

Se calculó la inhibición de la oxidación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm tratamiento}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

Para el tratamiento con extracto líquido concentrado, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm Extracto líquido cc}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(4,208 - 1,587) - (3,396 - 1,587)] \times 100\} / (4,208 - 1,587)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 30,98 \%$$

Para el tratamiento con extracto liofilizado, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm Ext. liofilizado}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(4,208 - 1,587) - (3,841 - 1,587)] \times 100\} / (4,208 - 1,587)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 14,00 \%$$

Para un mismo contenido de fenoles totales agregado al jugo de manzanas, el extracto líquido concentrado produce un 30,98% de inhibición de la oxidación, mientras que el de extracto secado liofilizado produce un 14 % de inhibición de la oxidación del jugo de manzanas.

La diferencia entre los dos tratamientos de deshidratación del extracto es el empleo de temperaturas diferentes, 65°C en el caso del secado en lecho de espuma y -50°C en el caso del liofilizado. En el caso del extracto secado en lecho de espuma no hay diferencias estadísticamente significativas entre dicho extracto y el extracto líquido concentrado. Por lo tanto el tratamiento de secado en lecho de espuma, incluyendo el agregado de ovoalbúmina, carboximetilcelulosa y $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, no modifica la actividad antioxidante del extracto.

Si bien se emplearon jugos obtenidos de manzanas de igual origen, en cada ensayo el color inicial del jugo fue diferente, por lo tanto fueron diferentes las lecturas de color en los jugos una vez transcurrido el tiempo de tratamiento. Esto se debe a que se realizaron en forma sucesiva en el tiempo. Pero el porcentaje de inhibición de la oxidación logrado por el extracto concentrado se mantuvo dentro de valores similares en ambos casos.

De acuerdo a lo observado, el tratamiento de liofilizado del extracto concentrado deterioró las propiedades antioxidantes de este extracto.

Esta pérdida de poder antioxidante puede explicarse considerando los trabajos de King et al (2001) y Chang et al (2006). En ellos se evalúa el efecto de la mayor superficie expuesta al oxígeno y el efecto de la temperatura sobre la inactivación de enzimas que degradan fenoles.

King et al (2001) sostienen que la porosidad y la superficie de los productos sometidos a liofilizado son mayores que en el mismo producto deshidratado por otros métodos de secado. Esto conduce a un incremento en la oxidación del producto liofilizado debido a una mayor superficie expuesta que permite mayor contacto con el oxígeno. Estos autores trabajaron sobre espinaca, y midieron la estabilidad de la clorofila y la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, sometiendo la materia prima a liofilizado y a secado a baja temperatura ($1 \pm 4^\circ\text{C}$) y al vacío. Ellos observaron que la degradación de la clorofila fue menor en el método de secado a baja temperatura y vacío que en el producto liofilizado; esta diferencia se adjudica a la mayor superficie expuesta en el producto liofilizado debido a su porosidad mayor. La clorofila es susceptible a la oxidación, por lo tanto en el producto más poroso hay mayor contacto con el oxígeno, y mayor intensidad de oxidación en consecuencia. El

nivel de lípidos peroxidados fue mayor en el producto liofilizado que en el deshidratado a baja temperatura y vacío.

Chang et al (2006) trabajaron comparando las propiedades antioxidantes de tomates frescos, deshidratados con aire caliente (80°C 2 horas + 60°C 6 horas) y liofilizados a -50°C. Los fenoles totales fueron incrementados en los dos tratamientos de secado respecto del testigo: en el tomate liofilizado aumentaron en un rango de 2,6% a 5,9%, mientras que en el producto secado por aire caliente el incremento fue de 13% a 29%. Esto lo explican debido a que a la temperatura de tratamiento, se inactivan las enzimas oxidativas e hidrolíticas, que provocarían una pérdida de compuestos fenólicos.

6.5. Conclusiones

De acuerdo al proceso aplicado al extracto líquido concentrado para transformarlo en polvo se han obtenido diferentes resultados. El extracto secado en lecho de espuma ha conservado sus propiedades antioxidantes en relación al extracto líquido concentrado. El extracto liofilizado ha sufrido un deterioro de su capacidad antioxidante durante el proceso de secado. Por lo tanto, se selecciona el proceso de secado en lecho de espuma para deshidratar el extracto líquido concentrado.

**CAPÍTULO 7:
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO
LÍQUIDO CONCENTRADO DE SEMILLAS DE VID.
INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DEL JUGO DE MANZANAS EN COMPARA-
CIÓN CON ANTIOXIDANTES COMERCIALES.**

7.1. Hipótesis

El extracto obtenido puede actuar como antioxidante en un sistema real sujeto a oxidación, presentando mayor actividad antioxidante que otros antioxidantes naturales.

7.2. Objetivos

Comparar la actividad antioxidante del extracto de semillas de vid con antioxidantes comerciales de uso frecuente en jugo de manzanas.

7.3. Materiales y métodos

Se diseñó un experimento con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Los tratamientos fueron: Testigo, Extracto líquido concentrado de semillas de vid (22,86 mg de fenoles totales cada 100 mL de jugo), ácido ascórbico (0,18 mM cada 100 mL de jugo) y dióxido de azufre (4 mg cada 100 mL de jugo). Las dosis empleadas de fenoles totales surgen de ensayos previos. La dosis de ácido ascórbico es 1,8 mM (esto significa 1,8 milimoles de soluto por litro de solución; en consecuencia: 0,18 mM cada 100 mL de jugo), equivalente a 317,016 mg de ácido ascórbico, dado que el mol es 176.120 mg; esta es la dosis de ácido ascórbico empleado como antioxidante en jugo de manzanas (Özoglu y Bayindirli, 2002). La dosis de dióxido de azufre se obtuvo del Código Alimentario Argentino (Capítulo XII, art.996 Bebidas analcohólicas, resolución GMC N° 141/96, incorporada por Res. MS y AS N° 587/97), permite una concentración máxima de 0,004 g/100 mL. Esta es la dosis que se usó.

Cada tratamiento se realizó sobre jugo de manzanas cv. Red Delicious recién obtenido. El jugo de manzanas se obtuvo de manzanas frescas, cv Red Delicious. Las manzanas fueron peladas, y luego ralladas con una multiprocesadora de uso culinario. Las manzanas ralladas se colocaron en un lienzo y se prensaron en forma manual para obtener el jugo.

El nivel de oxidación del jugo de manzanas fue determinado por lectura de la absorbancia a 420 nm sobre muestras centrifugadas (3000 rpm, durante 10 minutos) y diluidas 1:5 (ver Apéndice). Se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación (Özoglu y Bayindirli, 2002).

El tiempo de tratamiento fue 24 horas, a 20°C de temperatura.

Los datos fueron procesados por medio del análisis de la varianza, con el programa Statgraphics plus 4.0[®]

7.4. Resultados y Discusión

El color inicial del jugo de manzanas recién obtenido fue 1,587.

En la tabla N° 18 se presentan los resultados obtenidos en este ensayo.

Tabla N° 18. Inhibición de la oxidación del jugo de manzanas. Comparación entre el extracto de semillas de vid y otros antioxidantes comerciales

Tratamientos ⁽¹⁾	DO 420 nm ⁽²⁾
Testigo	6,388 a ⁽³⁾ ± 0,011
Extracto líquido concentrado	4,875 b ± 0,181
Ácido ascórbico	6,263 a ± 0,171
Dióxido de azufre	1,712 c ± 0,163

⁽¹⁾Tiempo de tratamiento: 24 horas

⁽²⁾Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica

⁽³⁾Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes

No fue posible usar el análisis de la varianza, debido a que no se cumple el supuesto que obliga a la homogeneidad de varianzas de los distintos tratamientos, los datos no responden a una distribución normal, y por lo tanto, no es correcto emplear el análisis de la Varianza.

Los datos fueron evaluados por medio de pruebas no paramétricas, comparando las medianas de los tratamientos.

Realizado el análisis estadístico por medio de la prueba de Kruskal Wallis se concluye que existen diferencias significativas entre las medianas de los tratamientos testigo, extracto concentrado y dióxido de azufre. No existen diferencias significativas entre los tratamientos testigo y ácido ascórbico.

El antioxidante que presentó mejor comportamiento es el dióxido de azufre, seguido por el extracto concentrado de semillas de vid. El ácido ascórbico se comportó de igual modo que el testigo, a las 24 horas de tratamiento.

Se calculó la inhibición de la oxidación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm tratamiento}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

Para el tratamiento con extracto líquido concentrado, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(6,388 - 1,587) - (4,875 - 1,587)] \times 100\} / (6,388 - 1,587)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 31,51 \%$$

Para el tratamiento con ácido ascórbico, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(6,388 - 1,587) - (6,263 - 1,587)] \times 100\} / (6,388 - 1,587)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 2,60 \%$$

Para el tratamiento con dióxido de azufre, resulta:

$$\text{Inhibición (\%)} = \{[(6,388 - 1,587) - (1,712 - 1,587)] \times 100\} / (6,388 - 1,587)$$

$$\text{Inhibición (\%)} = 97,40 \%$$

El extracto de semillas de vid, aplicado como antioxidante en jugo de manzanas, inhibió el desarrollo de la oxidación en un 31,51%, considerando 24 horas el tiempo de tratamiento. Este desempeño supera al ácido ascórbico, que en iguales condiciones, inhibió el desarrollo de la oxidación en un 2,6%. Pero en las condiciones de trabajo, el dióxido de azufre resulta mejor antioxidante que ambos, ya que logró inhibir el desarrollo de la oxidación en un 97,40 %.

Los resultados obtenidos demuestran que, en las condiciones experimentales, el producto que tiene mejor desempeño como antioxidante en jugo de manzanas es el dióxido de azufre. La inhibición de la oxidación medida es de 97,40%. Este producto inhibe la oxidación, pero además actúa decolorando el jugo. Esta actividad decolorante se pone de manifiesto en forma inmediata a su agregado al jugo, cuando se observó una disminución del color en el jugo tratado, con respecto al jugo testigo. Dado que la incidencia de la oxidación se mide por el aumento de color, este efecto

favorece especialmente al tratamiento con dióxido de azufre. Esta actividad decolorante del producto agregado como antioxidante ha sido observada también por Özoğlu y Bayindirli (2002), empleando L- Cisteína. Pero debe agregarse que, si bien el dióxido de azufre y sus derivados son compuestos altamente efectivos para prevenir el pardeamiento, pueden ser negativos para la salud humana, especialmente en las personas asmáticas (Mi Soon Jang et al, 2002).

El extracto concentrado de semillas de uva produce un 31,51% de inhibición de la oxidación del jugo de uva, cuando el tiempo de tratamiento es de 24 horas.

El ácido ascórbico solo produce una inhibición de la oxidación del 2,60%, no presentando diferencias estadísticamente significativas con el testigo. El ácido ascórbico ha sido superado por el extracto de semillas de vid en cuanto a su comportamiento antioxidante. Esto coincide con los trabajos de Siddhuraju et al (2003), quienes encontraron que el extracto fenólico de hojas de Moringa oleifera Lam inhibió la peroxidación en un sistema de ácido linoleico de forma más eficaz que el ácido ascórbico. Esto puede deberse a que, dependiendo de las condiciones, el ácido ascórbico puede actuar como antioxidante o prooxidante. También puede ocurrir que el efecto del ácido ascórbico es temporario, ya que en dosis de 1,8 mM (1,8 mM por litro de solución, en consecuencia 0,18 mM por 100 ml de muestra) el efecto dura alrededor de 4 horas, según Özoğlu et al (2002). En este ensayo, el tiempo de tratamiento fue de 24 horas.

7.5. Conclusiones

El extracto de semillas de vid puede actuar como un antioxidante más efectivo que el ácido ascórbico en jugo de manzanas. Si bien el dióxido de azufre tiene mayor poder antioxidante, su empleo puede traer problemas de salud a las personas asmáticas.

**CAPÍTULO 8:
CONCLUSIONES GENERALES.
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**

8.1. Conclusiones generales

El agua es un solvente adecuado para la extracción de compuestos reductores contenidos en las semillas de *Vitis vinifera*, trabajando en las siguientes condiciones de extracción: 10 ml de solvente por gramo de semilla utilizada, temperatura: 90° C y 3 horas de tratamiento.

El poder reductor de los extractos de semillas de vid depende de la concentración fenólica de los mismos. Cuanto mayor es la concentración fenólica, mayor es el poder reductor observado.

El proceso de concentración al vacío del extracto acuoso no deteriora la capacidad reductora del mismo. Por el contrario, este método de concentración mejora la condición reductora del extracto concentrado, en comparación con el extracto simple.

El extracto de semillas de vid actúa como reductor en un sistema real sujeto a oxidación, tal como es el jugo de manzanas. A igual concentración fenólica, el extracto concentrado de semillas, presenta mayor capacidad para disminuir la intensidad de la oxidación que el extracto sin concentrar.

El método de secado en lecho de espuma del extracto de semillas (65°C durante 90 minutos) resulta adecuado para convertir el líquido concentrado en polvo. El poder reductor del extracto concentrado no se deteriora por efecto de este proceso.

El método de secado por liofilizado es apto para convertir el líquido concentrado en polvo, pero se determinó que deteriora la capacidad antioxidante del extracto de semillas.

El extracto de semillas de vid es un antioxidante más efectivo que el ácido ascórbico, cuando el sustrato oxidable es jugo de manzanas.

8.2. Aportes de la tesis

Esta tesis ha generado conocimiento que permite obtener un nuevo producto antioxidante, apto para ser empleado en alimentos ó en consumo humano, en forma directa. El empleo del agua como solvente evita tener que eliminar solventes orgánicos, de características tóxicas, que complicarían el proceso de extracción.

Este trabajo es el primer estudio sobre las semillas de la vid que se realiza en Argentina, que comprende su composición fenólica y sus posibilidades como origen de agentes antioxidantes.

El desarrollo de este producto permitiría agregar valor a la industria vitivinícola, ya que las semillas son un residuo, que actualmente se dedica a la producción de aceite, ó se exportan a Japón, donde se utilizan para obtener antioxidantes.

A nivel de laboratorio, se ha puesto a punto un micrométodo para la determinación de fenoles totales, así como los métodos de Oyaizu (determinación del poder reductor) y Özoglu (determinación del color en jugo de manzanas) que resultan útiles para emplear en diferentes trabajos vinculados al área de fenoles y antioxidantes.

Debe agregarse que, como producto de esta tesis, se ha iniciado el trámite P - 070104751, con fecha 26/10/07 ante el INPI (Instituto Nacional de la Propiedad Industrial) para la obtención de la patente de invención correspondiente.

8.3. Futuras líneas de Investigación

A partir del conocimiento originado en esta tesis, quedan abiertas diferentes opciones de investigación.

Con respecto al proceso de obtención del extracto, pueden explorarse diferentes solventes, tiempos de contacto con las semillas, temperaturas de tratamiento y relaciones entre el sólido y los líquidos, así como el grado de molienda de las semillas.

Con respecto al proceso de secado y conservación del extracto, es necesario investigar el secado por el método spray, así como la conservación por medio de la microencapsulación. Debe estudiarse la duración en el tiempo del efecto reductor, en diferentes condiciones de conservación.

Con respecto a las actividades biológicas del extracto, debe evaluarse la presencia de actividad antimicrobiana del extracto, ante diferentes grupos bacterianos y virales de interés. También es posible explorar los efectos terapéuticos en el ser humano de este extracto, ya sea desde un punto de vista general, empleándolo como suplemento dietario, o bien desde un punto de vista específico, como enjuague bucal ó bien como crema cicatrizante.

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

Adamson, G. E.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Prior, R. L.; Guohua Cau; Jacobs, P.H.; Kremers; B.G.; Hammerstone, J.F.; Rucker, R.; Ritter, K. and H. Schmitz. 1999. HPLC method for the Quantification of procyanidins in cocoa and Chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem., Vol. 47, 4184 - 4188.

Ahn, J. ; Grün, L. U. and L. N. Fernando. 2002. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. Journal of Food Science. Vol. 67, N° 4, 1364-1369.

Ali Yildirim, Ahmet Mavi, Münir Oktay, Ayse Aydan Kara, Ömer Faruk Algur and Vahit Bilaloglu. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea Desf Ex DC*), Sage (*Salvia triloba* L.) and Black Tea (*Camellia sinensis*) extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 48, 5030-5034.

Alma, M.H.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Digrak, M. and T. Hirata. 2003. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Biol. Pharm. Bull. 26(12), 1725-1729 .

Arnous, A.; Makris, D. and P. Fekalas. 2001. Effect of principal polyphenolics components in relation to antioxidant Characteristics of aged red wines. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 5736-5742.

Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S., Das, D.; Ray, S.; Kuszyinski, C; Joshi, S. and Pruess, H. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology, 148, 187-197.

Baderschneider, B.; Luthria, D.; Waterhouse, A.L and P. Winterhalter. 1999. Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. comparison of different testing methods for antioxidant activity. Vitis, 38 n°3 (127-131).

Benzie, Iris and Y.T. Szeto. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. Vol. 47, 633-636.

Bhaskar Banerjee, Debasis Bagchi. Beneficial Effects of a novel IH 636 grape seed proanthocyanidin extract in the treatment of chronic Pancreatitis. 2001. Digestion, Vol. 63, 203-206.

Bocco, A., Cuvelier, M.E.; Richard, H. y Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 2123-2129.

Bourzeix, M.; Weyland, D., N. Heredia. 1986. Etude des catéquinaes et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. Bulletin de L'OIV, N°669-670, 1171-1253.

Castillo, J.; Benavente-García, O.; Lorente, J.; Alcaraz, M.; Redondo, A.; Ortuño, A. and J.A. Del Río. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. J. Agric. Food Chem. Vol. 48, 1738-1745.

Caillet, S.; Salmieri, S.; M. Lacroix. 2006. Evaluation of free radical- scavenging properties of commercial grape phenol extracts by fast colorimetric method. Food Chemistry. Vol. 95, 1-8.

Chang, Ching-Hui; Hsing-Yu Lin; Chi-Yue Chang and Yung- Chuan Liu. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. Journal of food engineering. Vol. 77, 478-485.

Código Alimentario Argentino www.anmat.gov.ar Capítulo XII, art.996 Bebidas alcohólicas, resolución GMC N° 141/96, incorporada por Res. MS y AS N° 587 /97

Darné, G. et J. Madero – Tamargo.1979. Mise au point d'une methode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. Vitis. Vol.18, 221-228.

De Freitas, V.; Glories, Y.; Laguerre, M.1998. Incidente of molecular structure in oxidation of grape seed procyanidins. J. Agric. Food Chem. Vol. 46, 376- 382.

Ebeler, S.; Brenneman, C.; Gap-Soon Kim; Jewell, W.; Webb, M.; Chacón Rodríguez, L.; Mac Donald, E.; Cramer, A.; Levi, A.; Ebeler, J.; Islas-Trejo, A.; Kraus,A.; Hinrichs,S. anf A. Clifford. 2002. Dietary catechin delays tumor onset in a transgenic mouse model. Am. Journal of Clinical nutrition. Vol.76, nº4 (865-872).

Estruch, R. 2000. Wine and cardiovascular disease. Food Research International. Vol. 33, 219-226.

Fernández- Pachón, M.S., D. Villaño; A. M. Troncoso and M.C. García Parrilla. 2005. Antioxidant capacity of plasma alter red wine intake in human volunteers. J. Agric. Food Chem. Vol. 53, 5024-5029.

Fuhrman, B.; Volkova, N.; Suraski, A. and M. Aviram. 2001. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 3164 - 3168.

Fuleki, T. and J. Ricardo da Silva. 1997. Catechin and Procyanidin composition of seed from grape cultivars grown in Ontario. J. Agric.Food Chem. Vol. 45, 1156-1160.

Frankel. E; German, J.; Kinsella, J. Parks, E. and J. Kanner. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. The Lancet. Vol. 341, N°8843, 454-457.

Frankel, E.; Waterhouse, A. and P. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem. Vol. 43, 890-894.

Goñi, I.; Martín, N.; Saura – Calixto, F. 2005. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. Food Chemistry. Vol. 90, nº1-2, 281 -286.

Gow-Chin Yen and Hui-Yin Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. Vol. 43, 27-32.

Hagerman, A.; Riedl, K.; Alexander Jones, G.; Sovik, K.; Ritchard, N.; Hartzfeld, P. and T. Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 1887-1892.

Jayaprakasha, G.K.; Singh, R.P.; K.K. Sakariah. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry.* Vol. 73, 285-290.

Jayaprakasha, G.K.; Tamil Selvi, K.K. Sakariah. 2003. Antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International.* Vol. 36, 117-122.

Kähkönen, Marja; Anu I. Copia; Heikki J. Vuorela; Jussi- Pekka Rauha; Kalevi Pihajala; Tutti S. Kujala and Marina Heinonen. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, 3954 – 3962.

Kähkönen, Marja; Anu I. Copia and Marina Heinonen. 2001. Berry phenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 4076 – 4082.

Kanner, J.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B. and J. Kinsella. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines, *J. Agric. Food Chem.* Vol. 42, 64-69

Kennedy, J.; Troup, G.; Pilbrow, J.; Hutton, D.; Hewitt, D.; Hunter, C.; Ristic, R.; Iland, P.; Jones, G. 2000. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian journal of grape and wine research.* Vol. 6, 244-254.

Khanna, Savita, Venojarvi, M.; Roy, S.; Sharma, N.; Trikha, P.; Bagchi, D.; Bagchi, M. and C. Sen. 2002. Dermal wound properties of redox- active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology & Medicine,* Vol. 33, N°8, 1089-1096.

Ki Won Lee ; Kim, Young Jun; Lee, Hyong Joo and Chang Yong Lee. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 7292-7295.

King, V. An-Erl, Chia- Fang Liu and Yi-Ling Liu. 2001. Chlorophyll stability in spinach dehydrated by freeze-drying and controlled low temperature vacuum dehydration. *Food research International.* Vol. 34, 167-175.

Koga Takuro, Keiko Mori, Kaoru Nakamori, Jun Yamakoshi, Hiroshi, Hosoyama, Shigehiro Kataoka and Toshiaki Ariga. 1999. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin – rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, 1892 – 1897.

Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G. and P. Teissedre. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 3341 – 3348.

Lau, D. and A. King. 2003. Pre and post-mortem use of grape seed extract in dark poultry meat to inhibit development of thiobarbituric acid reactive substances. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 1602 – 1607.

Le Bourvellec, C.; Le Quéré, J. M.; Sanoner, P.; Drilleau, J.F. and S. Guyot. 2004. Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52, 122-130.

Leighton, F.; Urquiaga, I. y M. Diez.1998. Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes. Bulletin de L'OIV. Vol 807-808 (463-490).

Llópiz Niurka; Francesc Puiggrós; Ela Céspedes; Lluís Arola; Anna Ardévol, Cinta Bladé and M. Josepa Salvadó.2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidins extract in FAO cells submitted to oxidative stress. J. Agric. Food Chem. Vol. 52 (5): 1083-1087.

Makris, D.; Psarra, E.; Stamatina Kallithraka and Panagiotis Kefalas. 2003. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. Food research International. Vol. 36, 805-814.

Mchedlishvili, N.I.; Omiadze, N.T.; Gulua, L.K.; Sadunishvili, T.A.; Zamtaradze, R.K.; Bendeliani, E.G. and Kvesitadze G.I. 2005. Thermostabilities of plant phenol oxidase and peroxidase, determining the technology of their use in food industry. Prikl. Biokhim. Mikrobiol, mar-Apr- 41(2): 165-170.

Medina, I.; Lois, S.; Lizárraga, D.; Pazos, M. ; Touriño, S.; Cascante, M. and J.L. Torres. 2006. Functional Fatty fish supplemented with grape procyanidins and proapoptotic properties on Colon cell Lines. J. Agric. Food Chem. Vol.54 , 3598 – 3603.

Meir,S.; Kanner, J.; Akiri, B.; Hadas, S.P. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. J. Agric. Food Chem. Vol. 43, 1813-1819.

Meyer, Justin and R, Hernández.1970. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. Am. Journal of Enology and Viticulture. Vol. 21, nº4, 184-188.

Mielnik,M.; Olsen, E.; Vogt, G.; Adeline, D. and G. Skrede. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. LWT- Food science and technology. Vol. 39, nº3, april, 191-198.

Min Hu, D.; Julian Mc Clements and Eric Decker. 2004. Antioxidant activity of a proanthocyanidin – rich extract from grape seed in Whey Protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions. J. Agric. Food. Chem. Vol. 52, 5272-5276.

Minussi, R.;Rossi, M. ; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G. and N. Durán. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potencial of comercial wines. Food Chemistry. Vol. 82, 409-416.

Mi Soon Jang, AiKo Sanada, Hideki Ushio, Munchiko Tanaka and Toshiaki Ohshima. 2002. Inhibitory effects of "Enokitake mushroom Extracts on Polyphenol oxidase and prevention of apple browning. Lebensm. Wiss. U-technol. Vol. 35, 697-702.

Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J. 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. J. Agric. Food Chem. Vol. 48, 3408-3412.

Najim A. Al- Awwadi; Aurélie Bornet, Jacqueline Azay; Caroline Araiz, Sandrine Delbosc, Jean Paul Cristol, Nathalie Linck, Gérard Cros and Pierre Louis Teissedre. 2004. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hyperten-

sion, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52, 5593-5597

Nuttall, S; Kendall, M.; Bombardelli, E. and P. Morazzoni. 1998. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, Leucoselect®. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics.* Vol. 23, 385-389.

Oszmianski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J. and J. Macheix. 1986. Grape seed phenolics: extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 37, Nº1, 7-12.

Ough, C. y M. Amerine. 1998. *Methods for analysis of musts and wines.* Wiley Ed. Chapter 7 Phenolic Compounds. 205-206.

Özoglu, H. and A Bayindirli. 2002. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control.* Vol. 13, 213-221.

Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J. and Núñez, M.J. 2005. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and anti-radical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53, 2111-2117.

Pinent, M.; Bladé, M.; Salvadó, M.; Arola, L. and Ardévol, A. 2005. Metabolic fate of glucose on 3T3-L1 adipocytes treated with grape seed derived procyanidin extract (GSPE). Comparison with the effects of insulin. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53, 5932-5935.

Proestos, C. ; N. Chorianopoulos; G. J. E. Nychas and M. Komaitis. 2005. RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53, 1190-1195.

Renaud, S. and M. de Lorgeril. 1992. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *The Lancet.* Vol. 339, Nº 8808, 1523-1526.

Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdie, D.; Donéche, B. y Lonvaud, A. 2003. *Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino. Vinificaciones. 1ª edición-* Buenos Aires: Hemisferio Sur, V.1, 1636 pp.

Ribereau Gayon, J. et E. Peynaud. 1962. *Análisis de vinos.* Ed. Aguilar.

Ricardo da Silva, J.; Darmon, N.; Fernández, Y.; Mitjavila, S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 39, 1549-1552.

Ricchelle, M.; Isabelle Tavazzi and Elizabeth Offord. 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (Coffee, Cocoa and Tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 3438 – 3442.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N.J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P. and Pridham, J.B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical research.* Vol. 22, 375-383.

- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
- Roedig-Penman, A. and M. H. Gordon. 1997. Antioxidant properties of catequins and Green tea extracts in model food emulsions. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45, 4267-4270.
- Ruidavets, J. B.; Teissedre, P.L.; Ferrières, J.; Carando, S.; Bougard, G. y J. J Cabanis. 2000. Catechin in the mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis.* Vol. 153, 107-117.
- Ruf, J. C. 1999. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Bulletin de L'OIV.* Vol 72, nº 817-818, 242-259.
- Sato, M.; Maulik, G.; Ray, P.S.; Bagchi, D. and D.K. Das. 1999. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* Jun; 31(6):1289-97.
- Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T. Kataoka, S. and N. Yamaji. 1998. Antiulcer activity of grape seed Extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 1460-1464.
- Sánchez Ferrer, A.; Bru, R.; Cabanes, J. and García Carmona, F. 1988. Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry.* Vol. 27, 319-321.
- Sánchez Moreno, C.; Satué- Gracia, M.T. and E. Frankel. 2000. Antioxidant activity of selected Spanish Wines in corn oil emulsions. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 48, 5581-5587.
- Sánchez Moreno, C.; Larrauri, J. y F. Saura-Calixto. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food research international.* Vol. 32 (407-412).
- Siddhuraju, Perumal and Klaus Becker. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2144 -2156.
- Siddhuraju, P. and K. Becker. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2144 -2155.
- Siddhuraju, P.; Mohan, P. and K. Becker. 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 79, 61-67.
- Simonetti, P. ; Pietta, P. and G. Testolin. 1997. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 45, 1152-1155.
- Simonetti, P.; Ciappellano, S.; Gardana, C.; Bramato, L.; Pietta, P. 2002. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, 6217 - 6221.

- Singleton, V. L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with Phosphomolibdic – phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 16: 144-158.
- Teissedre, P.; Waterhouse, A.; Walzem, R.; German, J.; Frankel, E.; Ebeler, S. and J. Clifford. 1996. Composés phénoliques du raisin et du vin et santé. *Bulletin de L'OIV*. Vol 781-782, (251-275).
- Thorngate, J. H. and V. Singleton. 1994. Localization of procyanidins in grape seeds. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol 45, n°2, 259-262.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. and B.D. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 4113-4117.
- Vinson, J.A.; Yousef A. Dabbag; Mamdouh M. Sherry and Jinhee Jang. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, N°11, 2800-2802.
- Vinson, J. and B. Hontz. 1995. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, N°2, 401-403.
- Waterhouse, A. Wine and heart disease. 1995. *International Wine & health symposium. Wine in context: Nutrition, Physiology, Policy. Chemistry and industry, 1 may, pages 338-341)*
- Wei Zheng and Shioh Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 5165-5170.
- Wren, A.; Cleary, M.; Frantz, C.; Melton, S.; Norris, L. 2002. 90-day toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, 2180 – 2192.
- Yamaguchi, F.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. and T. Ariga. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by Electron Spin resonance spectrometry in an H₂O₂/ NaOH/DMSO System. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, 2544 – 2548.
- Yamakoshi, J.; Kataoka, S.; Koga, T. and Ariga, T. 1999. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in Cholesterol-fed rabbits. *Rep. Noda Inst. Sci. Res.* Vol. 43, 81-89.
- Yen, G.H. and Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43, 27-32.
- Yen, Gow-Chin; Pin-Der Duh, Da Yon Chiang. 2000. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry*. Vol. 70, 437-441.
- Yen, G. C.; Duh, P.D. and Tsai, C. L. 1993. Relationship between antioxidant activity and maturity in peanuts hulls. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 41, 67-70.
- Yerdeo, A. 2001. Deshidratación de pulpas de pera y membrillo por secado en lecho de espuma. Tesis de grado. Licenciatura en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

Yildirim, A.; Mavi, A., Oktay, M.; Kara, A.; Algur, O. and V. Bilaloglu. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea Desf. Ex DC*), Sage(*Salvia triloba L.*), and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 48, 5030-5034.

Yildirim, A.; Mavi A. and A.A. Kara. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 4083-4089.

Yilmaz, Y. and R. Toledo. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industries byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. Journal of food composition and analysis. Vol.19, N^o1, 41-48.

Yilmaz, Y.; Toledo, R. Major. 2004. Flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, Epicatechin and gallic acid. J. Agric. Food Chem. Vol. 52, 255 - 260.

Yilmaz, Y. and R. Toledo. 2004. Health aspects of functional grape seed constituents. Trends in food science & technology. Vol. 15, 422-433.

Zaporozhets, O.; Krushynska, O.; Lipovska, N. and V. Barvinchenko. 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. J. Agric. Food Chem. Vol. 52, 21-25.

Zheng, Wei and Shioh Y. Wang. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 5165 - 5170.

Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B. and F. Nury. 1994. Wine analysis and production. Chapman & Hall, New York. pp 455-458

CAPÍTULO 10: APÉNDICE

10.1. MÉTODO FOLIN CIOCALTEU

Los compuestos fenólicos del vino son oxidados por el reactivo de Folin- Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfo-túngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce por oxidación de los fenoles del vino, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul.

La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el vino, y posee una absorción máxima a 765 nm.

El procedimiento emplea el ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración.

El reactivo de Folin Ciocalteu también se combina con los fenoles monohidroxilados y otras sustancias fácilmente oxidables, incluyendo el ácido ascórbico, el dióxido de azufre y las aminas aromáticas. En los vinos dulces y los mostos, se presenta una seria interferencia debido a los azúcares reductores.

Material

Matraz aforado de 100 ml.
Espectrofotómetro (765nm)
Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
Pipetas de 1, 5, 20 y 50 mL.

Reactivos

Reactivo de Folin- Ciocalteu:

Puede ser preparado de la siguiente manera: 100g de tungstato de sodio y 25 g de molibdato de sodio, son disueltos en 700 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico a 85% (densidad = 1,71g/ml), 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (densidad = 1,19 g/ml). Poner a ebullición sobre reflujo durante 10 horas, agregar 150g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo y poner nuevamente en ebullición durante 15 minutos. Dejar enfriar y completar a 1 litro con agua destilada.

El color final del reactivo debe ser amarillo. No debe haber tonos verdes. Para reoxidar soluciones envejecidas de reactivo de Folin Ciocalteu, que tenga color azul, verde o naranja, se agregan algunas gotas de bromo, y se lleva a ebullición bajo campana.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro en solución a 20% (m/v).

Modo de trabajo

a. Vino blanco

En un matraz aforado de 100 mL, se introducen respetando el orden, 1 mL de vino, 50 mL de agua destilada, 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 20 mL de la solución de carbonato de sodio y se enrasa a 100 mL con agua destilada.

Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 30 min para estabilizar la reacción y se mide la absorbancia a 765 nm con una cubeta de 1 cm de paso óptico, frente a un blanco preparado con agua destilada.

b. Vino tinto

Se debe trabajar igual que en el caso del vino blanco, pero diluyendo la muestra 5 veces con agua destilada.

Cálculos

a) Vino blanco

$$\text{Índice de Folin-Ciocalteu} = A_{765} \times 20$$

b) Vino tinto

$$\text{Índice de Folin-Ciocalteu} = A_{765} \times 100$$

Los valores más habituales del índice Folin-Ciocalteu para vino blanco son 3-5, 5-10 para rosados y de 20-50 para tintos.

Para expresar los fenoles totales en mg/L de ácido gálico debe construirse una curva de calibración empleando concentraciones crecientes de ácido gálico, y luego debe obtenerse la ecuación de regresión, que vincule concentraciones y densidades ópticas.

Notas suplementarias:

1. Este método no es específico y mide el número de -OH (Grupos fenólicos potencialmente oxidables) presentes en la muestra. Diferentes taninos darán diferentes respuestas. Los valores obtenidos se expresan en GAE, equivalentes en ácido gálico, si la curva de calibración se ha realizado con esta sustancia.

2. El reactivo de Folin Ciocalteu usa sulfato de litio, para reducir los problemas de precipitación del reactivo. Las sales de litio son más solubles que las de otros cationes.

3. El carbonato de sodio se usa para proveer un medio alcalino a la mezcla de reacción. La reducción del Mo (VI) y el W (VI) requiere la presencia del anión fenolato. Las moléculas reducidas de molibdeno y tungsteno son azules, las moléculas no reducidas son amarillas.

4. Los azúcares reductores son capaces de reducir las moléculas en medio alcalino. Puede aplicarse un factor de corrección, en el caso de tenores de azúcares reductores entre 1, 0 y 2,5 g/100 mL, se divide el contenido de fenoles totales por 1,03. Si los azúcares reductores están entre 2,5 y 10g /100 mL, el contenido de fenoles totales debe ser dividido por 1,06. No se necesita corrección en el caso de vinos secos.

Singleton, V. L. and Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with Phosphomolibdic - phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture.1965, 16: 144-158.

Zoecklein, B. et al.(1994) Wine analysis and production. Chapman & Hall, New York. pp 455-458

Methods for analysis of musts and wines. Ough, C. y M. Amerine. Chapter 7 Phenolic Compounds.pp 205-206.

10.2. MICROMÉTODO FOLIN CIOCALTEU

Los compuestos fenólicos del vino son oxidados por el reactivo de Folin- Ciocalteu. Este reactivo contiene una mezcla de ácido fosfo-túngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce por oxidación de los fenoles del vino, originando óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul.

La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el vino, y posee una absorción máxima a 765 nm.

El procedimiento emplea el ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración.

El reactivo de Folin Ciocalteu también se combina con los fenoles monohidroxilados y otras sustancias fácilmente oxidables, incluyendo el ácido ascórbico, el dióxido de azufre y las aminas aromáticas. En los vinos dulces y los mostos, se presenta una seria interferencia debido a los azúcares reductores.

Material

Matraz aforado de 25 ml.
Espectrofotómetro (765nm)
Cubeta de vidrio de 1 cm de recorrido óptico.
Pipetas de 1 y 5mL
Micropipetas de 250 y 1000 μ L de capacidad
Puntas (tips) para Micropipetas de 250 y 1000 μ L de capacidad

Reactivos

Reactivo de Folin- Ciocalteu:

Puede ser preparado de la siguiente manera: 100g de tungstato de sodio y 25 g de molibdato de sodio, son disueltos en 700 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido fosfórico a 85% (densidad = 1,71g/ml), 100 ml de ácido clorhídrico concentrado (densidad = 1,19 g/ml). Poner a ebullición sobre reflujo durante 10 horas, agregar 150g de sulfato de litio, algunas gotas de bromo y poner nuevamente en ebullición durante 15 minutos. Dejar enfriar y completar a 1 litro con agua destilada.

El color final del reactivo debe ser amarillo. No debe haber tonos verdes. Para reoxidar soluciones envejecidas de reactivo de Folin Ciocalteu, que tenga color azul, verde o naranja, se agregan algunas gotas de bromo, y se lleva a ebullición bajo campana.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro en solución a 20% (m/v).

Modo de trabajo

En un matraz aforado de 25 mL, se introducen respetando el orden, 250 μ L de muestra (vino o extracto fenólico), 1250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 5000 μ L de la solución de carbonato de sodio y se enrasa a 25 mL con agua destilada.

Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 30 min para estabilizar la reacción y se mide la absorbancia a 765 nm con una cubeta de 1 cm de paso óptico, frente a un blanco preparado con agua destilada.

Curva de Calibración

Se realiza empleando concentraciones crecientes de ácido gálico: 0, 50,100, 150,250, 500,750 y 1000 mg/L. Se emplean 250 µL de muestra y se opera de igual modo que con una muestra problema. Las determinaciones se hacen por cuadruplicado. Los datos obtenidos se someten a un análisis de regresión lineal, obteniéndose la ecuación que vincula la concentración con la lectura de densidad óptica a 765 nm. La ecuación a obtener es del tipo: $y = a + (b * DO\ 765\ nm)$.

10.3. PODER REDUCTOR: MÉTODO DE OYAIZU

Este método determina el poder reductor. Este método se fundamenta en la reducción del anión Ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}]$ a ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}]$. Este anión posteriormente se combina con el catión Fe^{+3} , originando el ferrocianuro férrico $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \text{Fe}_4$, denominado azul de Prusia, de color azul. Se genera una mayor intensidad de color cuanto mayor sea el poder reductor de la sustancia ensayada.

El extracto reductor en estudio se emplea en un volumen de 1 ml (en el caso original: té, se emplea en concentraciones de 10 a 1000 μg , contenidos en 1 mL de agua destilada). El medio de reacción es un buffer fosfato (2,5 mL, 0,2M, pH=6,6), y a esto se agrega la sustancia que será reducida: ferricianuro de potasio $[\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_3]$ (2,5 mL 1%). La mezcla se incuba a 50°C por 20 minutos. Luego se agrega una porción (2,5 mL) de ácido tricloroacético (10%) a la mezcla y se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos. De la capa superior de la solución se toman 2,5 mL, estos se mezclan con 2,5 mL de agua destilada y con 0,5 mL de Cl_3Fe al 0,1%, y la absorbancia se mide a 700 nm, empleando una cubeta de 1 cm de paso óptico. Una mayor lectura en la absorbancia de la mezcla de reacción, indica un mayor poder reductor.

Yen, G.H.;Chen, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 27-32.

10.4. DETERMINACIÓN DEL COLOR DEL JUGO DE MANZANAS. ESTIMACIÓN DEL GRADO DE OXIDACIÓN. MÉTODO DE ÖZOGLU

La medida del color se realiza determinando la absorbancia a 420 nm ($A_{420 \text{ nm}}$) en espectrofotómetro, empleando cubetas de 1 cm de paso óptico. El jugo debe ser previamente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, y debe ser diluído convenientemente.

La inhibición del pardeamiento o de la oxidación fue calculada de la siguiente forma:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\Delta A_{420 \text{ nm testigo}} - \Delta A_{420 \text{ nm tratamiento}}) \times 100] / \Delta A_{420 \text{ nm testigo}}$$

Özoglu, H. and A. Bayindirli. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. Food Control, 2002, 13,213-221.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL EXTRACTO MÉTODO DEL PICNÓMETRO

Consiste en determinar los pesos correspondientes a idénticos volúmenes de agua y de extracto concentrado de fenoles, en un frasco especial denominado picnómetro y en condiciones normalizadas. Se opera a 15°C de temperatura.

Se desengrasa perfectamente el picnómetro.

Se seca en estufa y se enfría. Se pesa el picnómetro vacío (p).

Se llena el picnómetro con agua destilada a 15°C y se pesa (P_{agua}).

Se llena el picnómetro con el extracto fenólico a 15°C y se pesa (P_{extracto}).

Se efectúan los cálculos.

$$D = [(P_{\text{extracto}}) - (p)] / [(P_{\text{agua}}) - (p)]$$

$$D = (50,3763 - 24,0998) / (48,8978 - 24,0998)$$

$$\mathbf{D = 1,059}$$

Ribereau Gayon, J. et E. Peynaud. Análisis de vinos. Ed. Aguilar, 1962.

CÁLCULO DE LA DOSIS DEL EXTRACTO SECADO EN LECHO DE ESPUMA A EMPLEAR EN ENSAYO COMPARATIVO ENTRE EXTRACTO LÍQUIDO CONCENTRADO Y EXTRACTO SECADO EN LECHO DE ESPUMA.

El extracto para secar se preparó de la siguiente forma:

25 g de agua destilada
2,5 g de ovoalbúmina
0,5 g de carboximetilcelulosa
0,5 g de $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$
10,59 g de extracto concentrado de semillas de uva

39,9 g peso total

El peso total de la mezcla húmeda es de 39,9 g.
Realizado el secado se obtuvieron 4,709 g de polvo.

El extracto concentrado de semillas de uva tiene una concentración de fenoles totales, medida por el método de Folin Ciocalteu, de 186.254,6 mg por litro.
Su densidad es de 1,059, medida por el método del picnómetro.
En consecuencia, en 10 ml de extracto concentrado hay:

$$D = P / V$$

$$\text{En consecuencia: } P = D \times V$$

$$P = 1,059 \text{ g/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$P = 10,59 \text{ g}$$

En 1000 ml de extracto concentrado hay 186.254,6 mg de fenoles totales.
En 10,59 g (10 ml) de extracto concentrado hay 1862,546 mg de fenoles totales.
La dosis a agregar por muestra es de 22,86 mg de fenoles totales.

1862,546 mg de fenoles totales están en.....4,709 g de polvo obtenido luego del secado en lecho de espuma

22,86 mg de fenoles totales estarán en.....X = 0,058 g de polvo obtenido luego del secado en lecho de espuma

$$X = 58 \text{ mg de polvo de extracto por cada } 100 \text{ ml de muestra}$$