UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO- CHILE

"EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE ORUJO DE UVA EN LA EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL VINO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA"

Tesis presentada por:

JIMENA ALEJANDRA GARCÍA OSSANDÓN

Como requisito para optar al grado de:

INGENIERO CIVIL QUÍMICO

Profesores Guía

Dra. Alejandra Urtubia U.

Dr. Cristián Ramírez B.

Valparaíso, Septiembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mis padres, María Elena y Pedro, por ser las personas que a través de sus enseñanzas, amor, apoyo y sacrificio han logrado que culmine esta importante etapa de mi vida. Me considero muy afortunada de haberlos tenido conmigo durante todo este proceso y agradezco todo lo que han hecho por mí y las oportunidades que me han dado para desarrollarme como mejor persona. Los adoro.

A mis hermanos Carola, Pepe y Pedro, por hacerme sentir amada y apoyada ante cualquier circunstancia de la vida y por sobre todo los consejos de vida y conversaciones eternas que tanto han forjado mi percepción de la vida. Los amo!

A mi cuñada Jocelyn, quien junto con mi hermano, significaron un apoyo importante este periodo universitario y me acogieron como una hija, gracias por la amistad y buena onda, Te quiero mucho.

A mis sobrinos, Sebastián y Pedrito, por darme tanta alegría. Los amo

A mis amigas de la Universidad, Paula, Marión y Andrea, con quienes pasé los momentos más alegres y estresantes de esta etapa, gracias por su buena onda, alegría y amistad. Las amo.

A mis amigas de la vida Caty y Loreto, por estar en todas conmigo, Las amo.

A Sebastián, por ser mi mejor amigo y compañero, gracias por todo el apoyo y amor, Te amo!

A mis Profesores, Alejandra y Cristián, por su disponibilidad para resolver mis dudas en todo momento y por guiarme a lo largo de toda la investigación. Muchas Gracias

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar el efecto de técnicas pre-fermentativas del orujo de uva en su microestructura, midiendo la concentración de polifenoles y actividad antioxidante, durante el proceso de fermentación alcohólica. Para lograr el objetivo se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio, para mosto con orujo sometido a cuatro tratamientos pre-fermentativos: Molienda, Secado, Congelación y Congelación con posterior radiación UV; más una fermentación sin tratamiento de orujo. Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se hicieron las siguientes mediciones: Polifenoles Totales (Método Folin-Ciocalteau), Flavonoides Totales (Método Colorimétrico), Antocianinas Monoméricas (Método diferencial de pH) y Actividad Antioxidante (Método Radical DPPH·). Los resultados de la presente investigación demostraron que el único pre-tratatmiento de orujo que tuvo efecto en la concentración de polifenoles totales, flavonoides totales, antocianinas y actividad antioxidante, fue la molienda de orujo, obteniendo valores 70%, 81%, 166% y 55%, respectivamente en comparación a la fermentación sin tratamiento de orujo. Los tratamientos de Secado, Congelación y Congelación con posterior radiación UV, significaron un cambio sólo en la concentración de monómeros de antocianinas, en comparación con la fermentación sin tratamiento de orujo. El aumento medido en la concentración de antocianinas fue de: 187% el secado, 443% la congelación y 394% la congelación con posterior radiación UV.

Del trabajo realizado se concluye que los pre-tratamientos estudiados si afectan la micro-estructura celular, siendo el más efectivo el de molienda de orujo, ya que produjo un aumento en todas las variables medidas. Los tratamientos restantes sólo tuvieron efecto en la concentración de antocianinas, lo que confirma que sí hubo un cambio en la estructura celular, pues éstos compuestos están ubicados en las vacuolas de las células de la piel, y por tanto se puede inferir que los tratamientos realizados si produjeron un cambio estructural que permitió la liberación de éstas al vino. Se recomienda evaluar nuevamente los tratamientos aquí empleados, pero monitoreando el nivel de destrucción celular, para así tener una noción más clara de lo que ocurre a nivel micro-estructural y realizar un análisis sensorial, posterior a todo el proceso de vinificación, para determinar la calidad del producto final.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of pre-fermentative treatment on grape pomace structure, measuring polyphenol concentration and antioxidant activity, during the alcoholic fermentation process. To achieve this goal, fermentations were performed with pre-treated grape pomace, the treatments applied were: grinding, drying, freezing and freezing with UV radiation, plus a fermentation without grape pomace pre-treatment. To determine the phenolic composition the following measures were made: Total Polyphenols (Folin-Ciocalteau Method), Total Flavonoids (Colorimetric Method), Anthocyanins (pH differential Method) and Antioxidant Activity (DPPH scavenging Method). The results showed that the only pre-treatment that increased the total polyphenols, total flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity was the grape pomace grinding (70%, 81%, 166%, 55%) in comparison with the non-treated grape pomace fermentation. The drying, freezing and freezing with UV radiation only had an effect on the anthocyanins concentration, compared to the control fermentation. Each treatment increased the anthocyanins in 187%, 443%, 394%.

From the results, it is clear that the studied pre-treatments had an effect on grape pomace cell structure, being the grinding the most effective method. The remaining treatments only had an effect on anthocyanins profiles, which asures that there was a change on the cell structure, because the anthocyanins are located on the vacoules of grape skin cells.

Further studies should be carried out with cell structure analysis, to get a better idea of what happened at a cellular level , that can give more information about the observed phenomena. Sensorial test should be carried out at the end of the vinification process to evaluate the quality of the final product.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ____ **II**

RESUMEN ____ **IV**

ABSTRACT ____ **V**

ÍNDICE ____ **VI**

ÍNDICE DE FIGURAS ____ **X**

ÍNDICE DE TABLAS ____ **XII**

1 INTRODUCCIÓN ____ **1**

1.1 Hipótesis ____ **2**

1.2 Objetivos ____ **2**

1.2.1 Objetivo General ____ 2

1.2.2 Objetivos Específicos ____ 2

2 ANTECEDENTES ____ **3**

2.1 Mercado del vino ____ **3**

2.2 Proceso de elaboración de vino ____ **4**

2.2.1 Elaboración Vino Tinto ____ 5

2.2.2 Elaboración Vino Blanco ____ 7

2.3 Vino como antioxidante ____ **10**

2.3.1 Radicales Libres ____ 10

2.3.2 Estrés oxidativo ____ 12

2.3.3 Compuestos Antioxidantes ____ 13

2.4 Compuestos fenólicos en el vino 15
2.4.1 Ácidos fenólicos 16
2.4.2 Flavonoides 17
2.4.3 Estilbenos 21
2.4.4 Taninos 22
2.4.5 Curaminas 23
2.4.6 Lignanos 23

2.5 Técnicas propuestas para aumentar el contenido de polifenoles en el vino 24
2.5.1 Molienda 24
2.5.2 Secado 25
2.5.3 Congelación 26
2.5.4 Congelación y radiación UV 26

2.6 Otras técnicas investigadas para aumentar el contenido de polifenoles en el vino 27
2.6.1 Pulsos de Campo eléctrico 27
2.6.2 Termovinificación 28

3 MATERIALES Y MÉTODOS 29

3.1 Estrategia 29

3.2 Materiales 29

3.3 Pre-tratamiento del orujo 29
3.3.1 Orujo Control 30
3.3.2 Orujo Molido 30
3.3.3 Orujo Secado 30
3.3.4 Orujo Congelado 31
3.3.5 Orujo congelado con radiación UV 31

3.4 Proceso de fermentación alcohólica 32

3.5 Evolución de la fermentación 33
3.5.1 Densidad 34
3.5.2 Sólidos Solubles 34
3.5.3 Turbidez 34
3.5.4 Acidez Total 34

3.5.5 Concentración Nitrogéno (YAN) 35

3.6 Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante 35

3.6.1 Polifenoles Totales 35

3.6.2 Flavonoides Totales 36

3.6.3 Pigmento monomérico de antocianinas 36

3.6.4 Capacidad Antioxidante 38

3.6.5 Análisis estadísticos 38

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40

4.1 Evolución de la fermentación 40

4.1.1 Densidad 40

4.1.2 Sólidos Solubles 41

4.1.3 Turbidez 42

4.1.4 Concentración de Nitrógeno Asimilable 43

4.1.5 Acidez total 44

4.2 Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante 46

4.2.1 Polifenoles Totales 46

4.2.2 Flavonoides Totales 49

4.2.3 Antocianinas Monoméricas 50

4.2.4 Actividad Antioxidante 53

5 CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES 55

5.1 Conclusiones 55

5.2 Recomendaciones 56

6 ANEXOS 57

6.1 Protocolo de fermentación 57

6.2 Cálculo de Acidez Total 58

6.3 Cálculo de la concentración de nitrógeno asimilable 59

6.4 Proceso de secado de orujo _____ **59**

6.5 Curva de Calibración Polifenoles Totales _____ **60**

6.6 Curva de Calibración Flavonoides Totales _____ **61**

6.7 Curva de Calibración Actividad Antioxidante _____ **61**

6.8 Tablas de resultados _____ **63**

REFERENCIAS _____ **72**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1: Exportación a nivel mundial de vino en el año 2015. Fuente: (ITC, 2016) 3
Figura 2-2: Destino de exportaciones del Chile año 2015, Fuente: (ITC, 2016) 4
Figura 2-3: Diagrama de elaboración de vino tinto, Fuente: (Grainger and Tattersall, 2005) 8
Figura 2-4: Diagrama proceso de elaboración del vino blanco, Fuente: (Grainger and Tattersall, 2005) 9
Figura 2-5: Clasificación de compuestos fenólicos, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 16
Figura 2-6: Estructura química general ácidos hidroxibenzoicos, Fuente : (Garrido and Borges, 2013) 16
Figura 2-7: Estructura química general ácidos hidroxicinámicos, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 17
Figura 2-8: a) Estrucuctura química general flavona - b)Luteolina (Flavona presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013).....17
Figura 2-9: a) Estructura química general flavonona - b)Eriodicitol (Flavonona presente en el vino) Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 18
Figura 2-10: a) Estructura química general flavonol-b)Quercetina (Flavonol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 18
Figura 2-11: a) Estructura química general flavononoles -b) Taxifolina (flavononol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 19
Figura 2-12: Estructura química general flavanes, Fuente: (Garrido and Borges, 2013).....19
Figura 2-13: a)Estructura química general flavonoles-b)Catequina (flavonol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 19
Figura 2-14: Estructura química general chalconas, Fuente: (Garrido and Borges, 2013).....20
Figura 2-15: Estructura química general antocianinas, Fuente: (Feliciano et al., 2009).....20
Figura 2-16: Estilbenos y sus derivados presentes en el vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 21
Figura 2-17: Estructura química de taninos condensados presentes en la uva y vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 22
Figura 2-18: Estructura química general curaminas, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 23
Figura 2-19: Estructura química general de lignanos presentes en el vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013) 23

Figura 3-1: Esquema de la metodología para la aplicación de pre-tratamientos al orujo de uva30
Figura 3-2: Orujo sometido a radiación UV 32
Figura 3-3: Fermentadores 1[L] con mosto de distintos tratamientos de orujo 32
Figura 3-4: Esquema de la metodología empleada para desarrollar las fermentaciones a escala de laboratorio.....33
Figura 4-1: Variación de densidad para las fermentaciones alcohólica para cada pre-tratamiento de orujo.....40
Figura 4-2: Variación de sólidos solubles para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 41
Figura 4-3: Variación de turbidez para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo42
Figura 4-4: Variación de concentración de nitrógeno para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo.....43
Figura 4-5: Variación de acidez total para las fermentaciones con tratamiento de orujo.....44
Figura 4-6: Variación del contenido de polifenoles totales para las fermentaciones con tratamiento de orujo 46
Figura 4-7: Variación del contenido de flavonoides totales para las fermentaciones con tratamiento de orujo 49
Figura 4-8: Variación del contenido de antocianinas para las fermentaciones con tratamiento de orujo 50
Figura 4-9: Variación de la actividad antioxidante para las fermentaciones con tratamiento de orujo 53
Figura 6-1: Secado de orujo 59
Figura 6-2: Variación de la humedad de orujo en el tiempo.....60
Figura 6-3: Curva de calibración polifenoles totales 60
Figura 6-4: Curva de calibración Flavonoides Totales 61
Figura 6-5: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox [mg/L] 62
Figura 6-6: Curva de calibración actividad antioxidante 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1: Número de réplicas de las mediciones realizadas 38
Tabla 4-1: Valores de densidad a las 0 y 160[h] 40
Tabla 4-2: Valores de sólidos solubles a las 0 y 160[h] 41
Tabla 4-3: Valores de turbidez a las 0 y 160[h] 42
Tabla 4-4: Valores de concentración de nitrógeno asimilable a las 0 y 160[h] 44
Tabla 4-5: Valores de acidez total a las 0 y 160[h] 45
Tabla 4-6: Valores de concentración de polifenoles totales a las 0 y 160[h] 47
Tabla 4-7: Valores de concentración de flavonoides totales a las 0 y 160[h] 49
Tabla 4-8: Porcentaje de aumento en la concentración de antocianinas para cada tratamiento de orujo. 51
Tabla 4-9: Valores de concentración de antocianinas monoméricas a las 0 y 160[h] 52
Tabla 4-10: Valores de Actividad Antioxidante a las 0 y 160[h] 53
Tabla 6-1: Variación contenido de polifenoles totales en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 63
Tabla 6-2: Variación contenido de flavonoides totales en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 64
Tabla 6-3: Variación contenido de antocianinas en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 65
Tabla 6-4: Variación capacidad antioxidante en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 66
Tabla 6-5: Variación de densidad en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 67
Tabla 6-6: Variación de sólidos solubles en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 68
Tabla 6-7: Variación de turbidez en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 69
Tabla 6-8: Variación de concentración de nitrógeno (YAN) en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 70
Tabla 6-9: : Variación de acidez total en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo 71

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años el vino ha sido objeto de diversos estudios que tienen por objetivo, determinar condiciones de operación o mejoras tecnológicas en el proceso de producción, que permitan obtener un producto de calidad superior. La calidad del vino depende de la composición química que éste posee. Existen dos grupos de compuestos de gran relevancia en las propiedades organolépticas y sensoriales del vino: los compuestos volátiles (que caracterizan el aroma del vino) (Jiang et al., 2013) y los compuestos fenólicos (que caracterizan propiedades como astringencia, color) (Garrido and Borges, 2013). De acuerdo a estudios epidemiológicos y clínicos el consumo moderado de vino tinto reduce el riesgo de aparición de enfermedades como cáncer, diabetes, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas (Scalbert et al., 2005; Stoclet et al., 2004). Lo anterior se atribuye al alto contenido de compuestos fenólicos que tiene el vino tinto, la estructura química de los compuestos fenólicos, permite que estos actúen neutralizando a los radicales libres que provocan el estrés oxidativo, el cual desencadena en las enfermedades antes mencionadas (Scalbert et al., 2005; Stoclet et al., 2004). La capacidad de los polifenoles de actuar como antioxidantes, permite que el vino pueda ser envejecido, ya que estos compuestos, protegen al vino de la oxidación (Bimpilas et al., 2015). En la uva, los polifenoles se encuentran principalmente en el orujo (65% en las pepas, 12% en la piel) (Hidalgo and Hidalgo Togores, 2011) y durante el proceso de elaboración del vino sólo una parte de dicha composición se extrae hacia el vino, debido a la insuficiente permeabilidad de las células que hacen que la liberación de polifenoles sea menor (Lea and Piggott, 2003), es por esto que en la actualidad se utilizan diversas técnicas pre-fermentativas que tienen como objetivo aumentar la permeabilidad de las membranas celulares, para así, aumentar la liberación de estos compuestos al vino: termovinificación (Kelebek et al., 2007), maceración en frío (Cai et al., 2014), utilización de pulsos eléctricos (Puértolas et al., 2010), entre otras. Sin embargo la utilización de estas técnicas puede afectar el color y estabilidad del producto final (Cai et al., 2014). En el presente estudio se propone la implementación de tratamientos pre-fermentativos de orujo de uva, que bajo distintas condiciones, se espera afecten la microestructura celular, aumentando la permeabilidad de las membranas celulares, obteniendo así una mayor concentración de compuestos fenólicos, lo que significaría un vino con mayor capacidad antioxidante.

1.1 Hipótesis

El tratamiento pre-fermentativo en el orujo de uva afecta la microestructura celular permitiendo una mayor liberación de compuestos fenólicos en el proceso de elaboración de vino.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Determinar el efecto del tratamiento físico del orujo en la concentración de polifenoles y la capacidad antioxidante durante el proceso de fermentación alcohólica.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener perfiles de concentración de polifenoles y actividad antioxidante, mediante la realización de fermentaciones alcohólicas a escala de laboratorio, a partir de mosto con orujo sometido a distintos tratamientos pre-fermentativos.
- Determinar la relación que existe entre el contenido de polifenoles totales, flavonoides totales y antocianinas, durante la fermentación con la capacidad antioxidante.
- Evaluar el efecto del pre-tratamiento de orujo en el desarrollo de la fermentación alcohólica.

2 ANTECEDENTES

2.1 Mercado del vino

La actividad vitivinícola en Chile pasó de producirse artesanalmente, hasta ser uno de los principales productos exportados por el país. Las condiciones climáticas permiten que en Chile se produzcan gran variedad de vinos, habiendo 14 regiones vinícolas a lo largo del país desde el Valle del Elqui en la región de atacama hasta la región del Bío Bío (Dowling, 2012). El hecho de poseer estas ventajas naturales ha hecho que la industria del vino se haya desarrollado enormemente en las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los principales países exportadores de vino en el mundo:

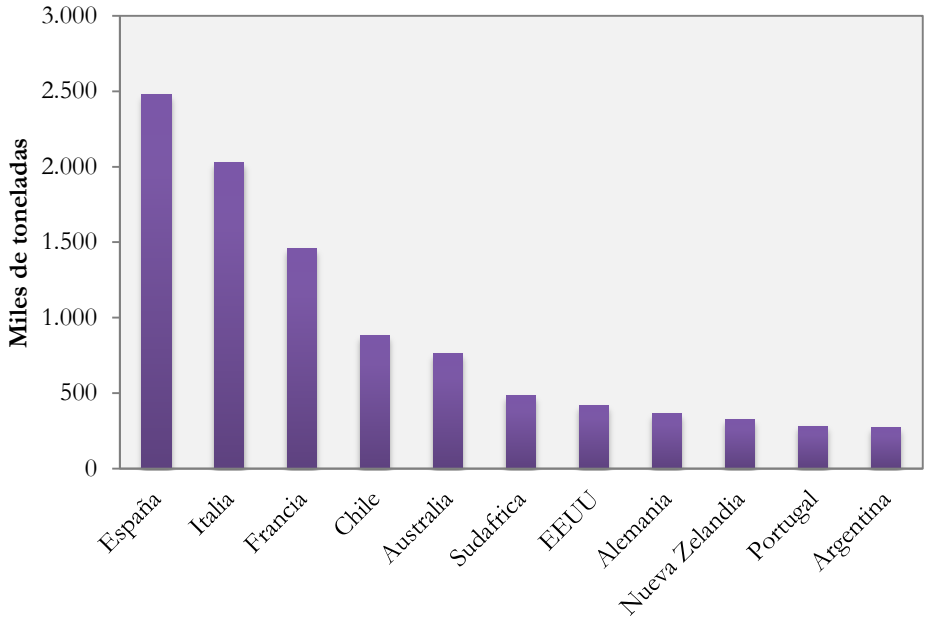

Figura 2-1: Exportación a nivel mundial de vino en el año 2015. Fuente: (ITC, 2016)

Como se puede apreciar en la Figura 2-1, Chile ocupa la cuarta posición de los principales países exportadores de productos vitivinícolas, lo que equivale al 6% de la exportación mundial de vino. El país que lidera la exportación de vinos es España con cerca de 2.500 toneladas anuales. De todo el vino producido en Chile, alrededor del 60% es exportado (OIV, 2016), el resto es para consumo nacional, los principales países hacia los cuales se exporta el vino se muestran en la Figura 2-2:

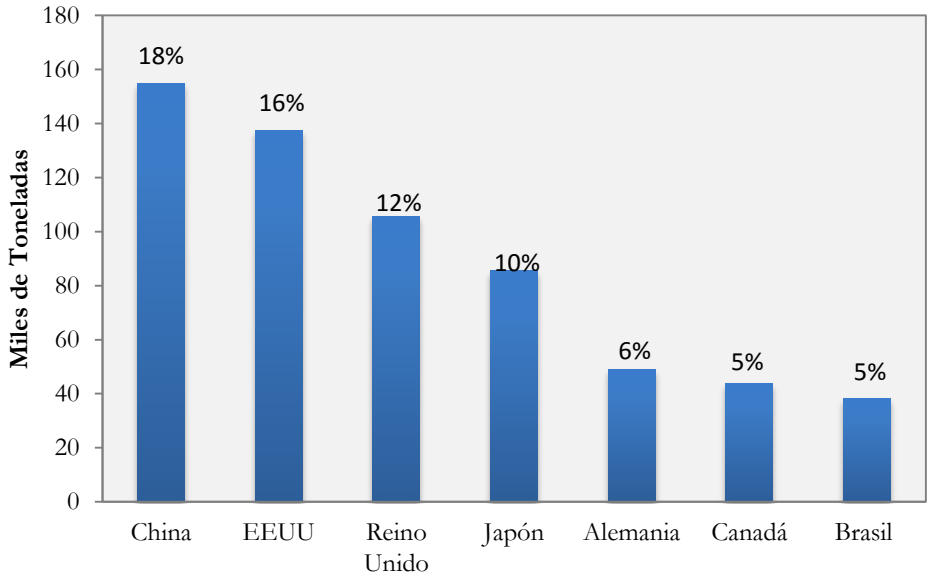

Figura 2-2: Destino de exportaciones del Chile año 2015, Fuente: (ITC, 2016)

Cabe destacar que en los años previos al 2015 el principal destino de exportación era Estados Unidos, el cual es uno de los principales importadores de vino a nivel mundial. En el 2015 esta tendencia cambió y China es el principal consumidor de vinos de origen chileno (18%).

Este aumento se debe al esfuerzo realizado por ciertas viñas, que a lo largo de los años han buscado posicionar a Chile como uno de los productores de vino de calidad (Dowling, 2012), otro factor a considerar es la globalización que ha hecho que el gigante asiático conozca cada vez más acerca del consumo del vino (Dowling, 2012).

El aumento en el consumo de vino a nivel mundial se puede atribuir a que las técnicas de producción empleadas en el último tiempo han permitido incrementar sus propiedades organolépticas, haciendo a este producto aún más deseable por el consumidor. Y lo que hace que Chile se haga cada vez más conocido en el mercado mundial es la elaboración de vinos de alta calidad a precios no tan elevados.

2.2 Proceso de elaboración de vino

El vino se define como una bebida alcohólica obtenida de la fermentación alcohólica del mosto de uva, mediante la acción metabólica de levaduras sobre las azúcares presentes en la

pulpa (Fructosa y Glucosa), convirtiéndolas en etanol y dióxido de carbono (Grainger and Tattersall, 2005):

$$C_6H_{12} \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + Energía$$

En la Figura 2-3 se presenta un esquema de la elaboración del vino, el cual consta de las siguientes etapas:

2.2.1 Elaboración Vino Tinto

- **Vendimia**

  Cuando el fruto adquiere el grado de madurez deseado se cosecha. La cosecha puede realizarse en forma manual o mediante la utilización de máquinas.

- **Recepción y despalillado**

  A la uva recepcionada se le remueve la parte herbácea del racimo (raspón o escobajo), esto se hace con la finalidad de evitar que el vino quede con olores y sabores herbáceos desagradables, que finalmente con el tiempo afectaría su contenido ácido y disminuiría su grado alcohólico.

- **Estrujado**

  Los granos de uva despalillados son estrujados para obtener el mosto, es decir, mediante presión se produce la ruptura de la uva, poniendo en contacto la pulpa con la piel y las pepas.

- **Fermentación Alcohólica**

  Previo a la fermentación se debe acondicionar el mosto, con la finalidad de que la fermentación se lleve a cabo correctamente, las adiciones que se realizan usualmente son:

  - Adición de dióxido de azufre: Su principal función es actuar como un desinfectante, también brinda cierto poder antioxidante en el vino, se añade para inhibir el crecimiento de levaduras salvajes y otras bacterias.
  - Adición de sucrosa: En general, en climas fríos las uvas no contienen suficiente azúcar para producir un vino balanceado.
  - Regulación de pH: Puede ser necesaria cuando el pH del mosto es muy alto o muy bajo.
  - Adición de levaduras: El productor de vino tiene la posibilidad de llevar a cabo la fermentación con la levadura presente en la piel (Pruina) o bien puede hacer una adición de cierta levadura específica.

- Nutrientes para las levaduras: Al ser microorganismos vivos necesitan nutrientes específicos para sobrevivir. Usualmente se utiliza el diamonio fosfato (DAP), que asegura que la levadura consuma la totalidad de las azúcares y para frenar la formación de ácido sulfhídrico, se utiliza cuando los mostos no son ricos en nitrógeno. Otro nutriente es la tiamina (vitamina B1) que ayuda a aumentar la población de levadura y que vivan por un periodo de tiempo mayor.

La fermentación es un proceso que produce una liberación de energía por lo que durante la elaboración del vino, la temperatura debe ser controlada. Durante el proceso de fermentación se produce la extracción de color hacia el vino, ya que el jugo de uva se encuentra en contacto con el orujo (piel y pepas), al producirse dióxido de carbono el orujo es empujado por el gas, hacia la superficie formándose "el sombrero" y disminuyendo el contacto entre el jugo y el orujo, por esta razón se realiza el remontado, que consiste en hundir el orujo en el jugo periódicamente para aumentar la extracción de color.

- **Descube**

  Una vez terminada la fermentación y maceración, según sea el caso, se separa el mosto del orujo.

- **Prensado**

  La parte sólida que fue separada en el descube se somete a un prensado, en donde se extrae el vino de prensa, que corresponde al líquido remanente en el orujo que queda de la fermentación.

- **Fermentación Maloláctica**

  Ocurre después de la fermentación alcohólica y corresponde al proceso de transformación de ácido málico a ácido láctico, esta transformación ocurre por la acción de bacterias del género *Lactobacillus, Leuconostoc y Pediococcus*

- **Clarificación**

  En esta etapa se le adicionan compuestos orgánicos al vino con la finalidad de precipitar elementos que provocan la turbidez del vino.

- **Crianza en barrica**

  Dependiendo del tipo de vino que quiere producirse es el tiempo de maduración que necesita. Para vinos de reserva o gran reserva el vino se somete a periodos largos de

maduración en barricas de madera, en donde la acidez disminuye y el sabor del vino en cuestión se hace más agradable. Durante este tiempo el vino se somete a una oxigenación leve (que le da estabilidad de color al vino) y absorbe compuestos de la madera que le dan características aromáticas específicas al vino.

- **Crianza en botella**

  Luego de ocurrida la maduración se procede a embotellar el vino, el vino se redondea y alcanza su momento óptimo de consumo.

2.2.2 Elaboración Vino Blanco

Para el caso del vino blanco el proceso es similar, pero en distinto orden, a continuación se detalla el proceso de elaboración de vino blanco y en la Figura 2-4 se puede ver el esquema del proceso (Grainger and Tattersall, 2005):

- **Estrujado**

  Una vez en la viña, se les remueven los tallos y son ligeramente estrujadas.
- **Prensado**

  A diferencia del proceso de elaboración de vino tinto, el prensado ocurre antes de la fermentación, el orujo de la uva blanca no se utiliza en el proceso de fermentación y son eliminadas al final de esta etapa.
- **Acondicionamiento del Mosto**
- **Fermentación**

  Se adicionan especies de levaduras seleccionadas y se acondiciona el mosto a temperaturas bajas entre 10 y 18°C. , bajas temperaturas se requieren para la extracción de compuestos aromáticos.
- **Fermentación Maloláctica**
- **Maduración**
- **Clarificación**
- **Estabilización en frío**

  Esta etapa sirve para prevenir la formación de cristales de ácido tartárico después de que el vino este embotellado.
- **Filtración**
- **Embotellado**

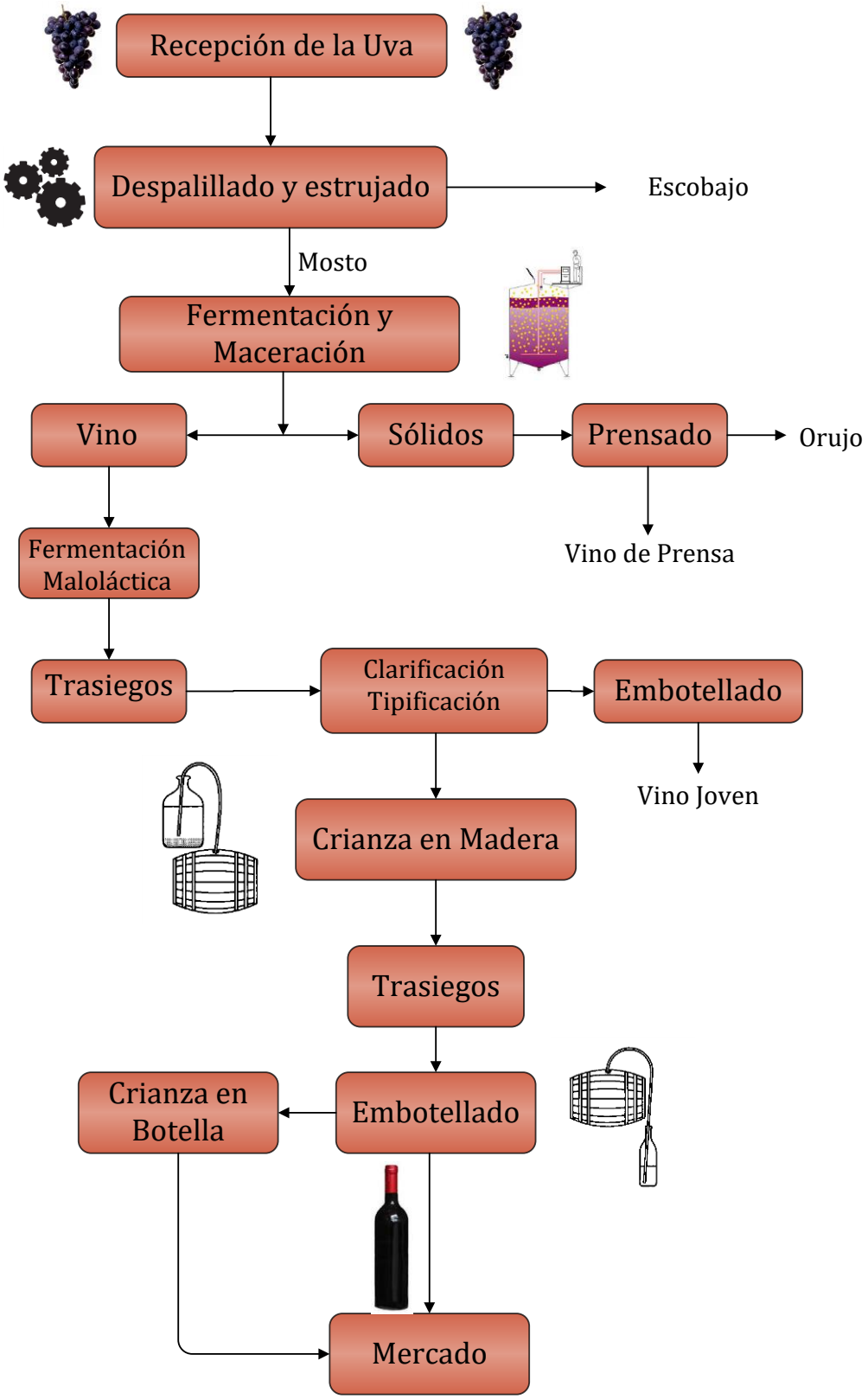

Figura 2-3: Diagrama de elaboración de vino tinto, Fuente: (Grainger and Tattersall, 2005)

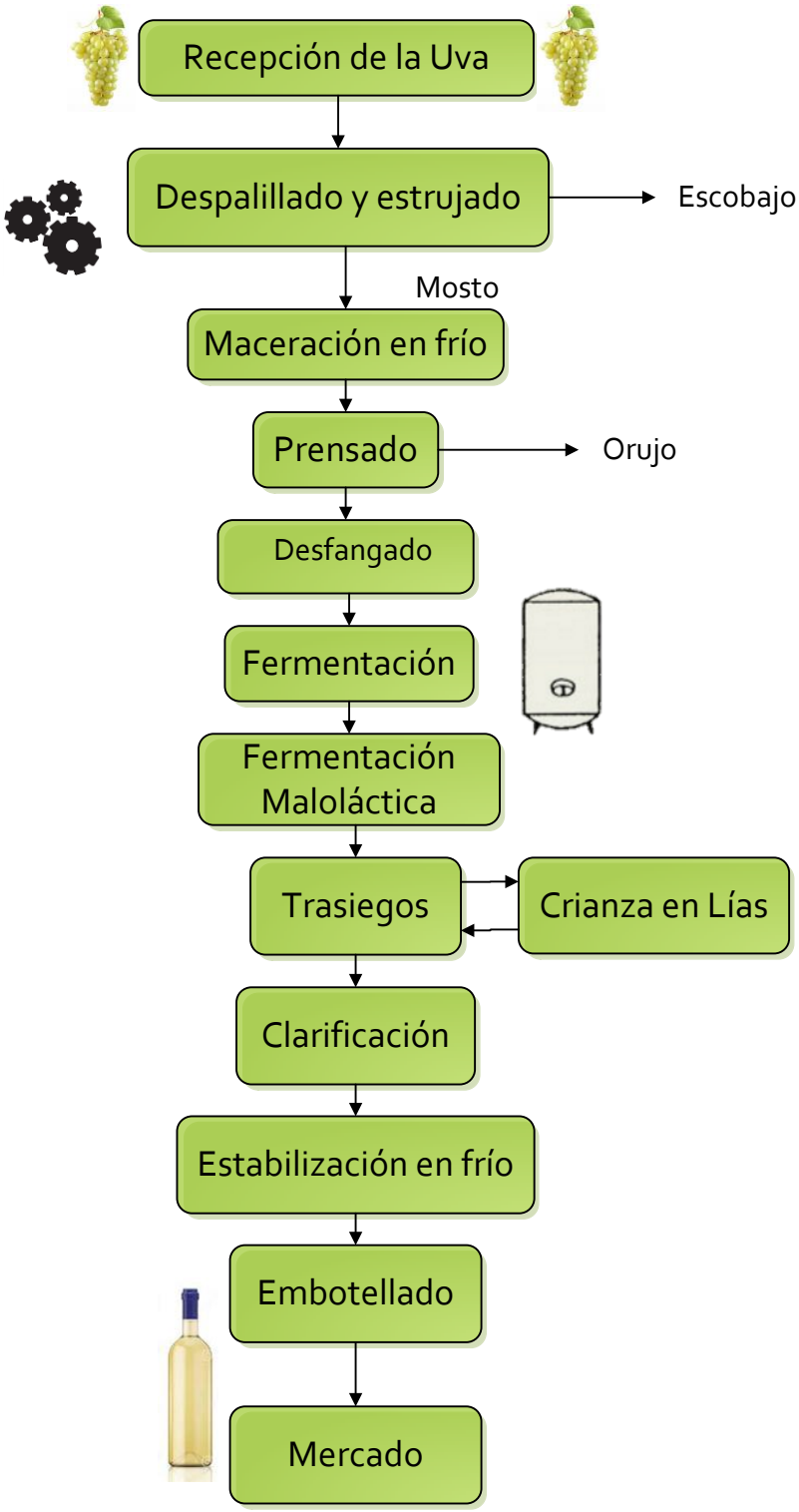

Figura 2-4: Diagrama proceso de elaboración del vino blanco, Fuente: (Grainger and Tattersall, 2005)

2.3 Vino como antioxidante

El vino de uva es el vino de frutas más consumido en el mundo, desde hace más de 5.000 años (Zeng et al., 2008). El aroma del vino es una de las principales cualidades que determinan su calidad y la preferencia del consumidor (Jiang et al., 2013). El aroma del vino se atribuye a la combinación de diversos compuestos químicos que determinan sus características organolépticas. Cerca de 800 compuestos volátiles han sido identificados a lo largo de los años, entre los que destacan compuestos como: alcoholes, ésteres, aldehídos, ácidos y monoterpenos (Gupta et al., 2015).

Otro grupo importante de compuestos que influyen en las propiedades organolépticas como: color, astringencia y sabor; son los compuestos fenólicos (Garrido and Borges, 2013). Según diversos estudios epidemiológicos el consumo de estos compuestos reducen el riesgo de contraer enfermedades como: cáncer, diabetes, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Scalbert et al., 2005; Stoclet et al., 2004). Esto se atribuye principalmente a que los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante, esto significa que tienen la capacidad de retardar la oxidación de otras moléculas originadas por la presencia de radicales libres (Hogan et al., 2009).

2.3.1 Radicales Libres

Los radicales libres son compuestos químicos que tienen un electrón desapareado, lo que hace que sean altamente inestables y reactivos, al buscar estabilidad, donan o ganan un electrón de otro compuesto (Halliwell, 1993).

Los átomos ordenan sus electrones en los orbitales atómicos, este orden siempre se hace en pares de electrones, lo que confiere al átomo estabilidad y por lo tanto una baja reactividad con el medio. Bajo ciertas circunstancias un orbital puede perder su paridad (perdiendo o ganando un electrón), la presencia del electrón desapareado en el orbital más externo hace que el compuesto se vuelva reactivo con otras moléculas de su entorno, usualmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Al reaccionar los radicales libres con dichos sustratos altera sus propiedades estructurales y funcionales, causando un daño irreparable en la mayoría de los casos (White et al., 1994).

La existencia de radicales libres no puede eliminarse, ya que existen factores exógenos y endógenos que producen estas moléculas, como lo son los procesos metabólicos y la acción de oxidantes ambientales, respectivamente. Los radicales libres se generan en procesos aeróbicos como respiración celular, exposición a infecciones microbianas, activadas por actividad física intensa, o la acción de toxinas provenientes del cigarrillo, alcohol, ionización y radicación UV, pesticidas y ozono (Poljšak et al., 2011).

Los seres humanos están expuestos a estos procesos de manera simultánea todo el tiempo, ningún tejido ni célula es inmune a los radicales libres que se producen. Los más dañinos a los que está expuesto el ser humano son los que tienen oxígeno (Halliwell, 1993).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), se refiere a radicales libres y a moléculas oxigenadas como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), superóxido ($O_2{\cdot}^-$), radical hidróxido (·OH), etc (Halliwell et al., 1992; Riley, 1994).

En los procesos aeróbicos que emplean oxígeno para oxidar moléculas que contienen carbono e hidrógeno, para producir energía, el oxígeno molecular se reduce a una serie de intermediarios radicales como se muestra en las siguientes reacciones (Gutteridge, 1994):

$$O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2 \cdot$$

$$HO_2 \cdot \rightarrow H^+ + O_2 \cdot^-$$

$$H_2O_2 + e^- \rightarrow HO^- + HO \cdot$$

$$HO \cdot + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$$

Además de las especies reactivas del oxígeno (ROS), las reacciones oxidativas se atribuyen a especies radicales que contienen nitrógeno, llamadas especies reactivas de nitrógeno (RNS, Reactive Nitrogen Species), que son producto de reacciones desencadenadas del radical de óxido nítrico (NO·) (Pisoschi and Pop, 2015). El óxido nítrico es biosintetizado a partir de L-argenina, oxígeno y NADPH, por la acción de enzimas o la reducción de nitrato inorgánico, el óxido nítrico actúa como señal en los procesos de vasodilatación y neurotransmisión. Esta especie reacciona con el anión radical superóxido ($O_2{\cdot}^-$), lo que produce especies altamente reactivas de nitrógeno, como el peroxinitrito($ONOO^-$) , un compuesto oxidante de numerosas moléculas biológicas (Green et al., 1990; Gutteridge, 1994; Hou et al., 1999).

Las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno no sólo producen el daño de biomoléculas, sino que son sintetizadas por grupos enzimáticos para desintoxicación y como señalizadores en reacciones biosintéticas (Lopez-Alarcon and Denicola, 2013).

A lo largo de la evolución, el ser humano ha adquirido mecanismos para sobrellevar estas reacciones provocadas por los radicales libres, pero estos no podrían llevarse a cabo sin la ayuda de los compuestos que se ingieren en la alimentación, ya que a diferencia de las plantas, el ser humano no puede sintetizarlos, pues no cuenta con los sistemas para producirlos (Zoecklein, 2010). Los compuestos que degradan o desactivan los radicales libres o pro-oxidantes se denominan antioxidantes.

2.3.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre cuando la velocidad con la que se generan las especies reactivas en el organismo supera la velocidad con que dichas especies son removidas por los mecanismos y compuestos antioxidantes (Dennery, 2010). Este puede ser originado por una sobregeneración de compuestos oxidantes (ROS y RNS) o por la reducida capacidad de los sistemas endógenos para combatir el ataque oxidativo dirigido hacia las biomoléculas (Persson et al., 2014).

El daño producido a nivel celular, ocasionado por el estrés oxidativo, inducido por la actuación de radicales libres, contribuye al desencadenamiento de enfermedades crónicas como enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclorosis lateral amiotrófica), enfisema, enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, cataratas, cáncer, entre otras (Aruoma, 1998; Fernández-Pachón et al., 2004; Landrault et al., 2001; Lopez-Alarcon and Denicola, 2013; Persson et al., 2014; Toda, 2011).

En general, el estrés oxidativo se asocia a la incidencia de alrededor de 100 enfermedades o patologías, ya sea como causa o efecto (Gutteridge, 1993; Halliwell et al., 1992).

El daño irreversible ocasionado por la oxidación de biomoléculas por parte de las ROS/NOS conlleva al envejecimiento temprano de las células, que produce un deterioro en las funciones fisiológicas, que promueven la incidencia de enfermedades y reducen la esperanza de vida (Pisoschi and Pop, 2015).

En resumen, el estrés oxidativo se origina por el desequilibrio existente en las reacciones de oxidación, viéndose favorecida las reacciones de oxidación ocasionadas por las especies

reactivas (ROS y RNS) o bien puede ser resultado de la reducida actividad de los sistemas de defensa antioxidantes (Pisoschi and Pop, 2015).

2.3.3 Compuestos Antioxidantes

El concepto de antioxidante se refiere a cualquier compuesto que, al encontrarse en menor concentración en comparación al sustrato oxidable, puede retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Godic et al., 2014). La función antioxidante implica disminuir el estrés oxidativo, la mutación de ADN, y otros parámetros de daño celular. Estudios epidemiológicos prueban que los antioxidantes tienen la habilidad de contrarrestar los efectos oxidativos de los radicales que producen la incidencia de enfermedades, pero en algunos casos la capacidad de defensa del sistema antioxidante puede no ser suficiente, lo que produce el desencadenamiento de alguna enfermedad (Godic et al., 2014).

Los primeros sistemas de defensa antioxidantes que han sido identificados, son los que previenen la formación de ROS, y los que bloquean o capturan los radicales formados (Pisoschi and Pop, 2015). Dichos sistemas de defensa está presentes en los compartimientos acuosos y membranales de la célula, y pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Otro tipo importante de sistema antioxidante de la célula, son los procesos de reparación, que consisten en remover las moléculas de la célula que han sido dañadas, antes de que su estructura condicione la alteración del metabolismo de ésta (Pisoschi and Pop, 2015). Esta reparación consiste en moléculas de ácidos nucleicos por enzimas específicas (Poljšak et al., 2011), removiendo las proteínas oxidadas mediante sistemas proteolíticos, y reparando lípidos oxidados mediante enzimas como: fosfolipasas, peroxidasas o trasnferasas acilo (Pisoschi and Pop, 2015). De acuerdo a estudios realizados se ha asumido que el mal funcionamiento de estos sistemas de reparación, conllevan más al envejecimiento celular, que cambios moderados en los sistemas de defensa de antioxidantes en contra de la formación de los ROS (Pisoschi and Pop, 2015)

Existe evidencia de que bajo condiciones fisiológicas normales, el balance que existe entre compuestos oxidantes y antioxidantes, favorece levemente la formación de sustancias oxidantes (un leve estrés oxidativo), lo que requiere de la intervención de los sistemas endógenos antioxidantes del organismo (Droge, 2002). Bajo estas circunstancias, a medida que el organismo envejece, dichos sistemas endógenos antioxidantes o sistemas de reparación

disminuyen su capacidad para contrarrestar el efecto que tiene el estrés oxidativo, teniendo esto en cuenta, es que en la actualidad existen intervenciones que limitan o inhiben el envejecimiento y tienen como finalidad disminuir la incidencia de ciertas enfermedades (Godic et al., 2014; Halliwell et al., 1992)(Abramovic et al., 2015; Garaguso and Nardini, 2015; Li et al., 2009, 2009).

El equilibrio u homeostasis de las reacciones de oxidación y reducción en la célula, se asegura con su sistema complejo de defensa antioxidante, que consiste en:

- **Enzimas antioxidantes:** superóxido dimutasa, catalasa, peróxido de glutanión.
- **Compuestos no enzimáticos:** glutanión, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina y albúmina)
- **Compuestos de bajo peso molecular:** Ácido úrico, coenzimaQ y ácido lipoico (Poljšak et al., 2011).

Se ha confirmado que antioxidantes exógenos presentes en frutas y vegetales refuerzan la acción de los antioxidantes endógenos previamente mencionados, algunos de los principales son: Vitamina C, vitamina E, carotenoides y polifenoles (estilbenos, ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros). Estudios clínicos prueban que una dieta alta en frutas y verduras, granos, legumbres y ácidos grasos Omega-3 pueden prevenir la incidencia de enfermedades causadas por estrés oxidativo, ya que contienen antioxidantes (Willett, 2006).

En el caso de los polifenoles, existen estudios que asocian el consumo de uvas o de alimentos y bebestibles obtenidos de la uva con la reducción del riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, esto debido a que la uva es una de las frutas más ricas en polifenoles (Anselm et al., 2007; Bradamante et al., 2004; Pezzuto, 2008). Las plantas producen estos compuestos con la finalidad de prevenir el ataque de virus, bacterias, hongos u otros patógenos (Dempsey et al., 1999). Los compuestos fenólicos, simples o complejos, son ubicuos en las plantas, y más en las uvas y por lo tanto en el vino (Kanner et al., 1994).

A pesar del contenido alcohólico del vino, los polifenoles se encuentran solubilizados gracias a la presencia de éste, por lo que su consumo, provee una mejor disponibilidad de estos compuestos para ser absorbidos por el organismo, a diferencia de alimentos sólidos como son

frutas o verduras con alto contenido polifenólico de las cuales la disponibilidad para ser absorbidos es menor (Alonso et al., 2004).

2.4 Compuestos fenólicos en el vino

Los compuestos fenólicos constituyen un diverso grupo de metabolitos secundarios, que están presentes en la uva y consecuentemente en el vino (Garrido and Borges, 2013). El contenido fenólico del vino tinto, depende de la variedad procesada, condiciones climáticas y las prácticas enológicas durante la vinificación y posterior maduración (Mulero et al., 2015).

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en las propiedades sensoriales del vino, siendo responsables de propiedades como: Aroma, color, sabor, amargor y astringencia (Scalbert et al., 2005).

El consumo moderado de vino tinto significa un aporte beneficioso a la salud de las personas, esto porque se ha comprobado que es un bebestible con alto nivel de polifenoles (Shahidi and Ambigaipalan, 2015), dentro de los beneficios asociados a su consumo moderado destacan:

- Inhibe la oxidación de lípidos y proteínas (Heinonen et al., 1998).
- Inhibición de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Kanner et al., 1994).
- Previene el estrés oxidativo mediante la modulación de enzimas en los sistemas antioxidantes (Puiggros et al., 2005).
- Disminución en la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Bianchini and Vainio, 2003).
- Previene la arteriosclerosis y enfermedades al corazón, el consumo de 196 [mL] de vino tinto al día reduce significativamente el riesgo de padecer arteriosclerosis en un adulto de 70[kg](Shahidi and Ambigaipalan, 2015).
- Además de sus propiedades antioxidantes, los polifenoles actúan en el organismo como sistemas antimicrobianos, anti-inflamatorios y anti-envejecimiento(Hogan et al., 2009).

En el vino, existe una gran diversidad de compuestos fenólicos, estos se clasifican en como se observa en la Figura 2-5:

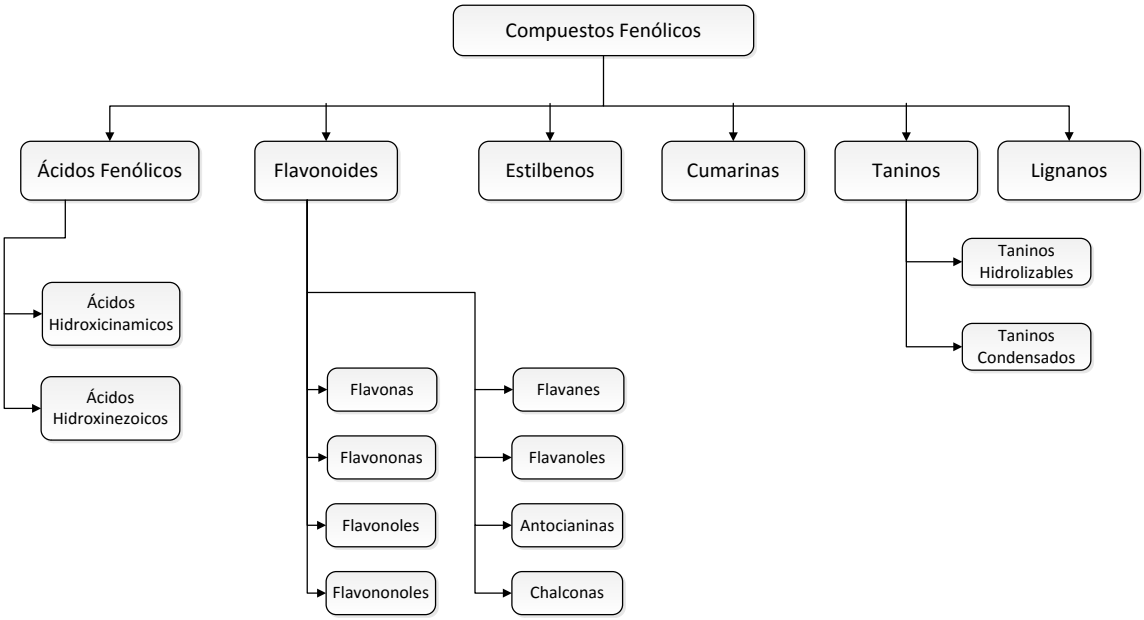

Figura 2-5: Clasificación de compuestos fenólicos, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.4.1 Ácidos fenólicos

Usualmente se dividen en dos grupos:

- **Ácidos hidroxibenzoicos:** Se caracterizan por poseer siete átomos de carbono, entre los más comunes encontrados en el vino destacan: para-hidroxibenzoico, vinílico, gálico, entre otros (Baderschneider and Winterhalter, 2001). El ácido gálico es uno de los polifenoles más importantes en el vino, ya que es el precursor de taninos hidrolizables (Kallithraka et al., 2009).

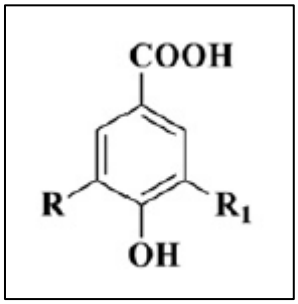

Figura 2-6: Estructura química general ácidos hidroxibenzoicos, Fuente : (Garrido and Borges, 2013)

- **Ácidos hidroxicinámico:** Son uno de los ácidos fenólicos más comunes y mayormente medidos, se asocian al proceso de oscurecimiento del vino y son los

precursores de la formación de compuestos volátiles en el vino (Kallithraka et al., 2009).

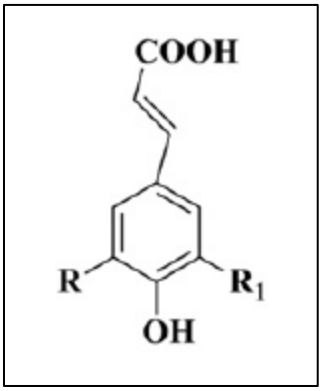

Figura 2-7: Estructura química general ácidos hidroxicinámicos, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son moléculas que tiene una estructura básica de 15 átomos de carbono, que incluyen 2 anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos (C6-C3-C6), teniendo esta estructura base, es que existe una amplia diversidad de compuestos .En la naturaleza los flavonoides se pueden encontrar en su forma libre o conjugada, la última es esterificada por una o dos moléculas de azúcar, en su grupo hidroxilo. Dependiendo del lugar de la molécula flavonoide en donde se conjuga, es la clasificación que existe (Garrido and Borges, 2013):

- **Flavonas:** Se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre los carbonos C_2 y C_3, y por la ausencia de un grupo hidróxilo en este último, este tipo de flavonoides no es muy común en las uvas excepto por la luteolina (Fang et al., 2008).

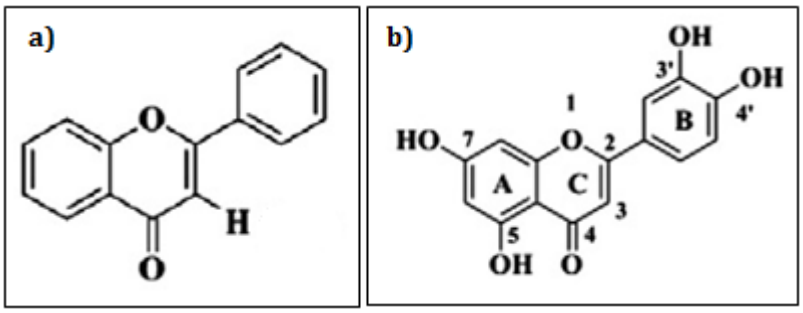

Figura 2-8: a) Estrucuctura química general flavona - b)Luteolina (Flavona presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Flavononas:** A diferencia de las flavonas, las flavononas se caracterizan por tener un enlace saturado entre el carbono 2 y 3, algunas flavononas extraidas de las uvas son: Eriodicitol, Naringenina y Hesperetina (Tsao, 2010).

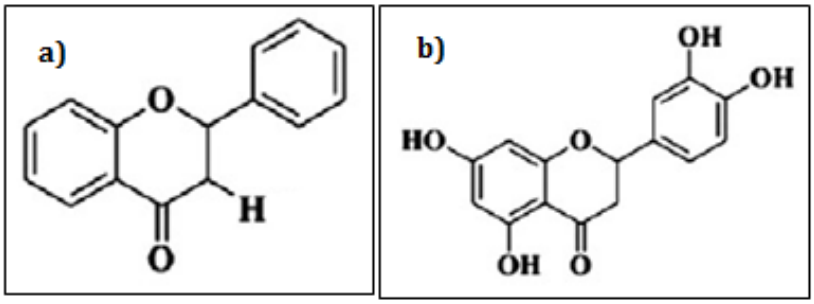

Figura 2-9: a) Estructura química general flavonona - b)Eriodicitol (Flavonona presente en el vino) Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Flavonoles:** Se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y un grupo hidroxilo en el carbono 3, usualmente se denominan 3-hidroxiflavonas. Diversas azúcares pueden enlazarse a los flavonoles, obteniéndose: glucósidos, galactósidos, diglicósidos, entre otros (Garrido and Borges, 2013). En la uva se pueden encontrar: quercetina, kaempferol, entre otros (Hsu et al., 2009).

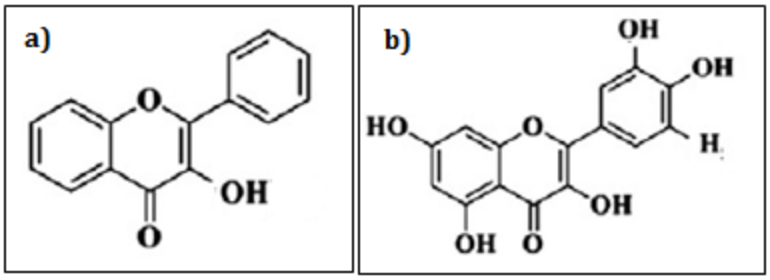

Figura 2-10: a) Estructura química general flavonol-b)Quercetina (Flavonol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Flavononoles:** Se caracterizan por no tener un doble enlace en los carbonos 2 y 3, y por tener un grupo hidroxilo en el carbono 3, algunos compuestos con estas características encontradas en el vino son: taxifolina, astilbina, entre otras (Zoecklein, 2010).

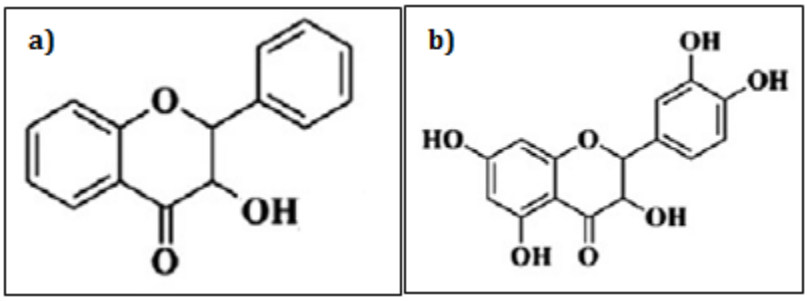

Figura 2-11: a) Estructura química general flavononoles -b) Taxifolina (flavononol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Flavanes:** Se caracterizan por presentar un enlace doble entre los carbonos 2 y 3, y además por no poseer un grupo carbonilo en la posición 4.

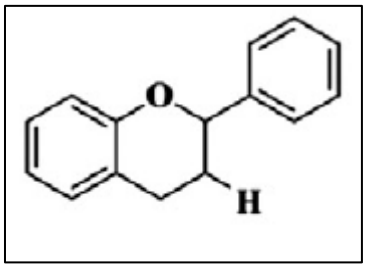

Figura 2-12: Estructura química general flavanes, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Flavanoles:** Se caracterizan por presentar un enlace doble entre los carbonos 2 y 3, y además por no poseer un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 3. Los flavonoles más comunes en la naturaleza son la catequina y su enantiómero la epicatequina, también son abundantes en el vino ya que se ubican en la piel y pepas de las uvas (Lunte et al., 1988).

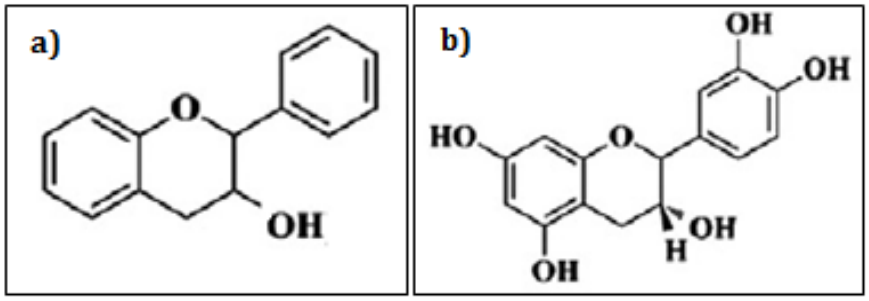

Figura 2-13: a)Estructura química general flavonoles-b)Catequina (flavonol presente en el vino), Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Chalconas y dihidrochalconas:** Son compuestos que tienen dos anillos aromáticos unidos por un sistema carbonílico insaturado, este tipo de compuestos son de gran importancia, ya que son productos intermedios y precursores de la formación de flavonoides en las uvas y el vino (Moreno-Arribas, 2009).

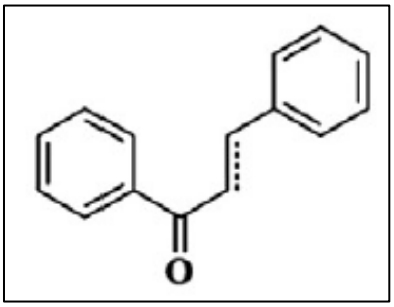

Figura 2-14: Estructura química general chalconas, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

- **Antocianinas:** Son las moléculas que dan el color característico del vino tinto, sirven para medir el color de los vinos mediante la estructura química de las antocianinas presentes (Feliciano et al., 2009). Estos compuestos sólo se encuentran en las vacuolas de las células de la piel de las uvas, mientras que el resto de los flavonoides en la piel y pepas (Sacchi et al., 2005).

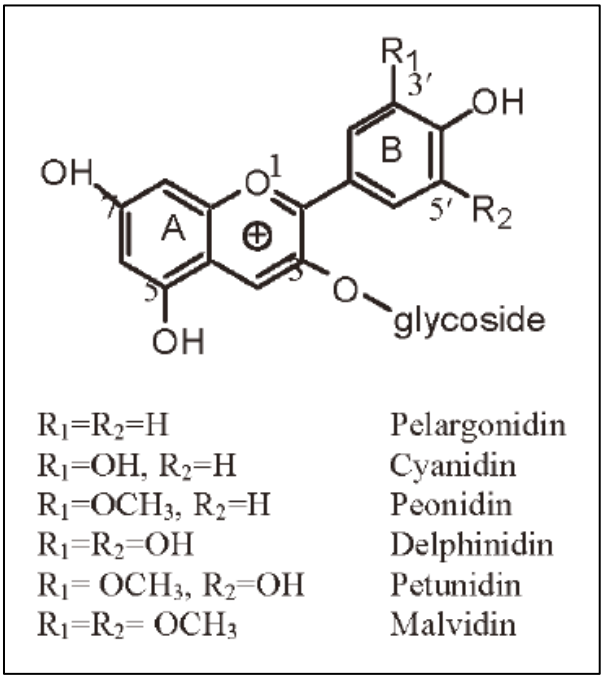

Figura 2-15: Estructura química general antocianinas, Fuente: (Feliciano et al., 2009)

2.4.3 Estilbenos

Son polifenoles que constan de dos anillos aromáticos unidos por un puente eteno. El resveratrol es el estilbeno más común en las uvas y vino. Existen estudios que afirma que se encuentra en la piel de la uva y a medida que la uva madura, su concentración disminuye, la uva produce este compuesto cuando posee alguna infección fúngica o estrés abiótico como: radiación UV, catálisis de metales pesados, etc (Pussa et al., 2006).

Los procesos a los cuales se somete a la uva son un factor importante que influye en la concentración que el producto final obtiene, un ejemplo de esto, es que los vinos que poseen un tiempo mayor de maduración, tienen una mayor concentración de resveratrol (Pussa et al., 2006). El estudio de estos compuestos ha aumentado, apuntando a estudios que relacionan las prácticas enológicas con el perfil de estos compuestos en el vino (Garrido and Borges, 2013).

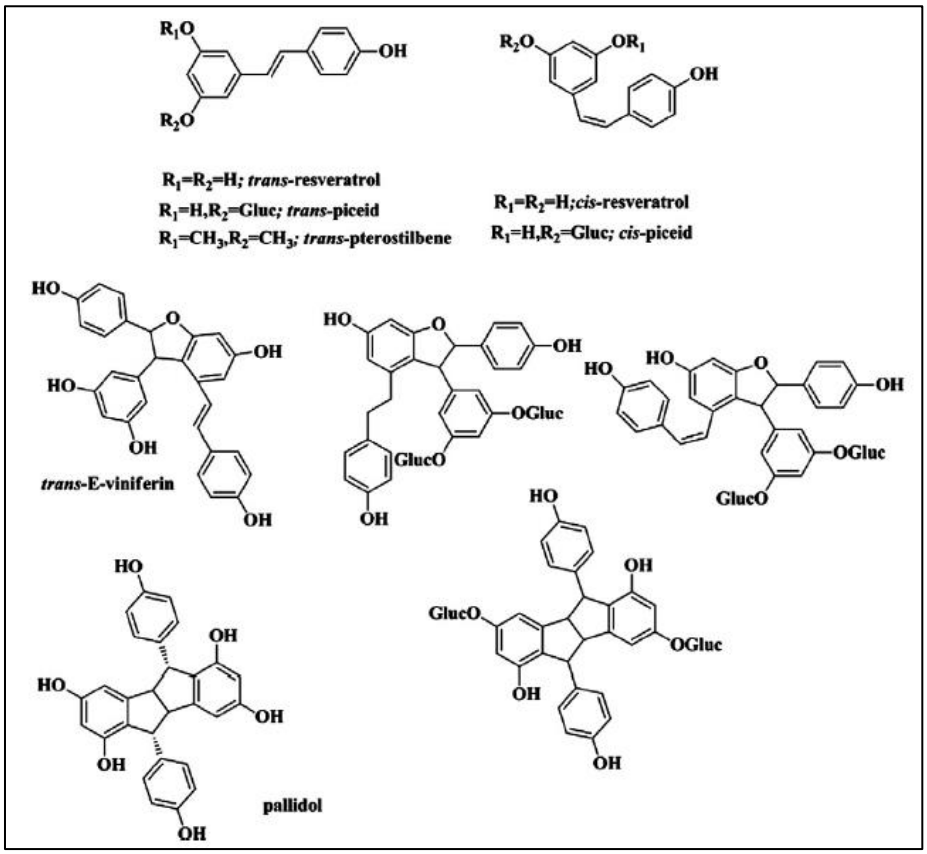

Figura 2-16: Estilbenos y sus derivados presentes en el vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.4.4 Taninos

Son los polifenoles que brindan las propiedades de astringencia al vino, usualmente se dividen en dos grupos:

- **Taninos Hidrolizables:** Son polifenoles complejos que pueden ser degradados (debido a cambios de pH, o bien a hidrólisis enzimática) a fragmentos de menor tamaño, como azúcares y ácidos fenólicos (Garrido and Borges, 2013). La maduración en barrica favorece la extracción de estos al vino.
- **Taninos Condensados:** También denominados proantocianidinas, se encuentran en la parte sólida de la uva (piel y pepas) y en la pulpa. La cantidad, estructura y grado de polimerización depende de la localización de estas moléculas en el tejido de la uva. Los taninos condensados se transfieren al vino durante el proceso de elaboración de éste (Garrido and Borges, 2013).

  El estudio de las propiedades físico químicas de estos compuestos constituyen un tema relevante a estudiar, ya que estos compuestos son los principales responsables de las características sensoriales del vino (color, sabor, astringencia y amargor), además de jugar un papel importante en la maduración del vino, debido a sus habilidades de oxidación, condensación y polimerización (Garrido and Borges, 2013).

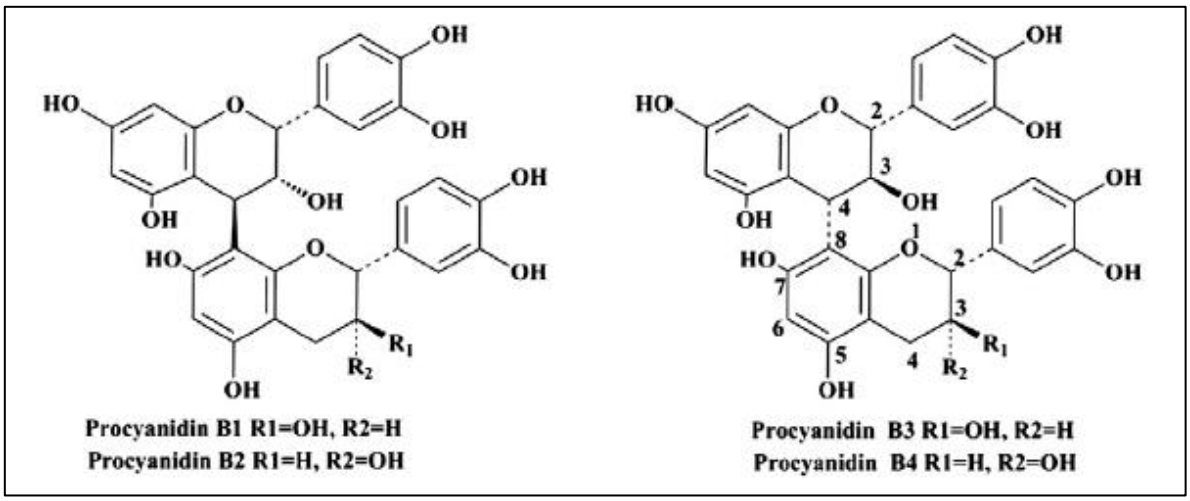

Figura 2-17: Estructura química de taninos condensados presentes en la uva y vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.4.5 Curaminas

Se caracterizan por obtenerse de la ciclación de ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, producto de la isomerización e hidroxilación de la molécula estructural del ácido (Garrido and Borges, 2013).

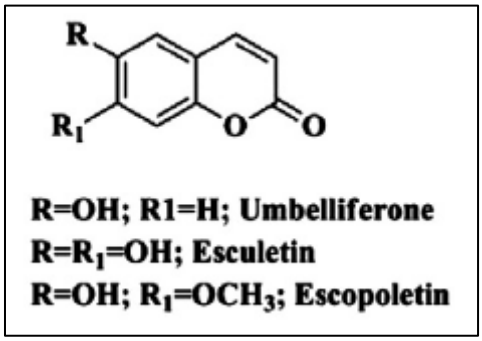

Figura 2-18: Estructura química general curaminas, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.4.6 Lignanos

Corresponde a dímeros con un anillo aromático y una cadena de 3 carbonos, resultante de la unión de dos alcoholes (coniferílico, sinapílico). Algunos de los presentes en el vino son:

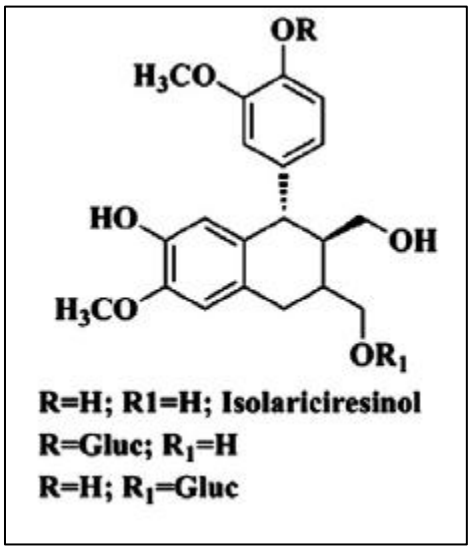

Figura 2-19: Estructura química general de lignanos presentes en el vino, Fuente: (Garrido and Borges, 2013)

2.5 Técnicas propuestas para aumentar el contenido de polifenoles en el vino

Los compuestos fenólicos del vino son de gran importancia, ya que tienen impacto en el color, sabor y su capacidad para ser añejados, además, como se señaló previamente, estudios afirman que el contenido de polifenoles tiene relación con la capacidad antioxidante del vino y hace que el vino tenga propiedades beneficiosas para la salud.

Se estima que la uva en su pulpa contiene casi la totalidad de los polifenoles no flavonoides, mientras que los flavonoides se encuentran principalmente en la piel, pepas y tallos (12%, 65%, 22% respectivamente) (Hidalgo and Hidalgo Togores, 2011).

De los flavonoides presentes en el orujo, sólo un porcentaje se traspasa al vino brindándole las propiedades antes mencionadas (40% de las antocianinas y 20% de los taninos) (Lea and Piggott, 2003). Se sabe que para el caso de las antocianinas, éstas se encuentran en las vacuolas de las células hipodermales, por lo que la extracción implica que traspasen las membranas de la célula, es decir, se necesita la ruptura de la membrana para que los compuestos sean liberados (Sacchi et al., 2005). En el proceso de fermentación de vino hay una serie de factores que influyen en la liberación de polifenoles: la concentración de alcohol, de dióxido de carbono, dióxido de azufre, temperatura y tiempo de contacto entre el orujo y la pulpa (Sacchi et al., 2005). En la actualidad se han realizado estudios que exploran diversas técnicas pre-fermentativas que tienen como objetivo incrementar el contenido polifenólico del vino para así enriquecerlo con las propiedades antes descritas. Teniendo en cuenta la información presentada, se propone investigar técnicas pre-fermentativas al orujo de uva, a continuación se describen las técnicas a utilizar en la presente investigación:

2.5.1 Molienda

Como se detalló anteriormente, los compuestos polifenólicos se encuentran principalmente en la piel y pepas (Hidalgo and Hidalgo Togores, 2011), este tratamiento tiene como finalidad disminuir el tamaño de partícula del orujo, para aumentar el área de transferencia de materia entre el orujo y el medio acuoso, y así obtener una mayor extracción de polifenoles al vino. Se debe tener en cuenta que en la producción de vino, la uva es estrujada, dónde lo que ocurre es que se revienta la uva, y el tamaño de la piel no es significativamente disminuido. Otro factor a considerar es que en la elaboración de vino, las pepas casi no alteran su forma después del

proceso de estrujado, y como se mencionó anteriormente, las pepas poseen el 65% de los compuestos fenólicos, por esta razón se plantea determinar el efecto que tiene en la extracción de polifenoles, la molienda de parte de las pepas presentes en la uva y una disminución en el tamaño de los pedazos de piel.

2.5.2 Secado

En el último tiempo se ha estudiado el efecto de secar la uva previo al proceso de fermentación, la técnica consiste en secar la uva a temperaturas menores a 60°C, con la finalidad de aumentar la concentración de azúcar en la uva, y así obtener un grado alcohólico mayor, se utiliza como una alternativa a la adición de sucrosa al mosto previo a la fermentación (Castilhos et al., 2016). Adicionalmente este tratamiento produce una ruptura de las membranas celulares, al liberar agua, lo que hace que haya una mayor extracción de compuestos fenólicos y aromáticos al momento de realizarse el proceso de fermentación (Castilhos et al., 2016). En el estudio realizado por (Castilhos et al., 2016), en donde se analizaron 4 tipos de vinos de cepas híbridas (Bordó, Isabel, Violeta y Carmen) con un pre-tratamiento de deshidratación parcial de la uva (pérdida de agua 20% en peso), se obtuvo que sólo para el vino Isabel se produjo un aumento considerable en la concentración de polifenoles totales (76%), mientras que para el resto de los vino analizados no hubo un aumento significativo. En la investigación no se analizó la concentración de antocianinas monoméricas ni la actividad antioxidante.

(Panceri et al., 2015)estudió el efecto de la deshidratación de uva, previo a proceso de fermentación alcohólica, en la elaboración de vino de las Cepas Cabernet Sauvignon y Merlot. La deshidratación se realizó por aire convectivo, hasta perder el 30% de su peso inicial, los resultados arrojaron, que para el caso del Cabernet Sauvignon, la concentración de polifenoles totales aumento en un 11% en comparación con el vino producido con uva sin tratamiento. La concentración de antocianinas monoméricas tuvo una disminución del 44% en comparación con la uva control, y para la actividad antioxidante, el efecto del tratamiento produjo un aumento del 25%.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios mencionados, se propone determinar el efecto del secado de orujo de uva, en la microestructura celular, y determinar si

se produce un aumento en la concentración de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

2.5.3 Congelación

Estudios reportan que al congelar el orujo se produce un aumento en los líquidos intracelulares, lo que provoca la ruptura de las membranas (Moreno-Perez et al. 2013). Además existen estudios adicionales en manzanas que reportan que la congelación- descongelación provoca un daño celular, ya que el cambio de temperaturas promueve la formación de cristales que significan un rompimiento de la membrana celular (Ramírez et al., 2011).

Para la elaboración de vino se ha estudiado como pre-tratamiento la maceración en frío, que consiste en someter el mosto a bajas temperaturas (5-15°C) por un periodo de 4-10 días previo al proceso de fermentación, se produce una extracción acuosa de compuestos aromáticos y polifenoles desde la uva (Cai et al. 2014), la rápida disminución de la temperatura promueve la formación de cristales de hielo, y por lo tanto la liberación de compuestos polifenólicos y otros compuestos aromáticos (Ortega-Heras et al. 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se propone determinar el efecto, de la congelación del orujo de uva, en la composición fenólica y actividad antioxidante, ya que al congelar el orujo se espera que se produzca un aumento en el volumen de líquido, y con la descongelación se busca promover un cambio en la temperatura y que se formen cristales, todo esto con el objetivo de alterar la estructura celular y así obtener una mayor liberación de polifenoles y actividad antioxidante.

2.5.4 Congelación y radiación UV

Se han realizado estudios que determinan el efecto de la radiación ultravioleta en los racimos de uva, es decir, una sobreexposición a los rayos solares, mediante la poda de la planta (Berli et al., 2011; Núñez-Olivera et al., 2006). La exposición a radiación afecta la fisiología de la uva, y por lo tanto cambia su composición (Núñez-Olivera et al. 2006; Berli et al. 2011). La exposición a radiación implica una maduración temprana de la uva, como respuesta al estrés provocado por la sobreexposición de radiación, la uva sintetiza metabolitos secundarios que corresponden a compuestos fenólicos que absorben la radiación UV (Kolb et al. 2003). Según (Song et al., 2015), que analizó el efecto de someter a la uva (cv. Pinot Noir) en la plantación a una radiación solar mayor, realizando una poda de la planta de la uva, determinó que se

produce un aumento del 63% en la concentración de polifenoles totales y un 45% en la concentración de antocianinas totales

Según un estudio realizado por (LIU et al., 2012) la aplicación de radiación ultravioleta, provoca un aumento en la concentración de polifenoles totales del 20% y un aumento de la capacidad antioxidante del 11%, en tomates.

También existe una investigación que estudia el efecto de someter a radiación gamma la uva previamente cosechada y despalillada (Gupta et al., 2015), con la finalidad de provocar una alteración en la fisiología de la célula, promoviendo la producción de polifenoles, que protegen a la uva de la radiación aplicada (Gupta et al., 2015). En la industria de los alimentos se utiliza esta técnica con la finalidad de mejorar el tiempo de duración de los alimentos, ya que al ser fotones de alta energía, el estrés que producen, promueve la producción de compuestos a nivel fisiológico para contrarrestar el efecto de la radiación (Lacroix and Ouattara, 2000). Según (Gupta et al., 2015) la aplicación de radiación gamma sobre uvas, provocó un aumento en la concentración de polifenoles totales del 31% y en la capacidad antioxidante un aumento de 37% en comparación al vino producido sin tratamiento.

Se propone evaluar el efecto de dos pretratamientos en la uva, la congelación- descongelación, que tiene los efectos antes descritos y el sometimiento del orujo a radiación ultravioleta, con la finalidad de determinar el efecto combinado de ambos tratamientos.

2.6 Otras técnicas investigadas para aumentar el contenido de polifenoles en el vino

Además de las técnicas propuestas en esta investigación, se han realizado estudios que exploran otras técnicas pre-fermentativas que tienen como finalidad aumentar la permeabilidad de las membranas celulares, para así provocar un aumento en el contenido de polifenoles en el vino.

2.6.1 Pulsos de Campo eléctrico

Es una técnica que consiste en inducir poros en las membranas de las células (electroporación) sometiendo a la uva a pulsos de campo eléctrico, aumentando así la permeabilidad de las células y acelerando el proceso de liberación de componentes del orujo al jugo de uva (El Darra et al., 2016). Esta técnica se ha estudiado para diversos tipos de uva Cabernet Sauvignon, Merlot y Syrah (El Darra et al., 2016; Puértolas et al., 2010).

2.6.2 Termovinificación

Es un método que tiene como objetivo la ruptura de la estructura celular mediante el calentamiento de las uvas (previo a la obtención de mosto) a 70°C por un periodo breve de tiempo (30 a 40 minutos), seguido por un enfriamiento, previo al proceso de fermentación (Atanacković et al., 2012; El Darra et al., 2016).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia

En este estudio se simuló el proceso de fermentación alcohólica en la producción de vino tinto a partir de uva de la cepa Cabernet Sauvignon, con la finalidad de obtener perfiles de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante a lo largo de ésta. Se evaluó el efecto sobre la liberación de compuestos fenólicos al vino, aplicando tratamientos al orujo de uva, previo al proceso de fermentación, los tratamientos empleados fueron: Orujo sin tratamiento, Orujo Molido, Orujo Secado, Orujo Congelado y Orujo congelado y con posterior radiación UV. Para la determinación de los compuestos fenólicos se determinaron: polifenoles totales, flavonoides totales, antocianinas monoméricas; y para la actividad antioxidante se utilizó el método de radical DDPH. Adicionalmente se realizaron mediciones para evaluar la evolución de las fermentaciones midiendo las siguientes variables: Densidad, Sólidos Solubles, Turbidez, Concentración de Nitrógeno Asimilable y Acidez Total.

3.2 Materiales

Uva Cabernet Sauvignon (Obtenida de la Región del Maule), Levadura S. Cerviseae, Fosfato diamónico, Metabisulfito de potasio, Ácido Tartárico, Carbonato de Potasio, Hidróxido de Sodio , Ácido Gálico, (+)-Catequina, Trolox, reactivo Folin- Ciocalteau , Carbonato de sodio, nitrito de sodio, cloruro de plata, 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl, acetato de sodio, cloruro de potasio, metanol, ácido clorhídrico.

3.3 Pre-tratamiento del orujo

Para analizar el efecto en la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que tiene un tratamiento pre-fermentativo del orujo en uva de la cepa Cabernet Sauvignon, proveniente de la Región del Maule, se realizaron fermentaciones alcohólicas a escala de laboratorio, donde se varío el pre-tratamiento de orujo. Se realizaron fermentaciones con cuatro tratamientos de orujo y en duplicado: Molienda, Secado, Congelación y Congelación con posterior Radiación UV. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede apreciar un esquema de la metodología empleada para la aplicación de los pre-tratamientos al orujo de uva. A continuación se describe detalladamente la ejecución para cada pre-tratamiento:

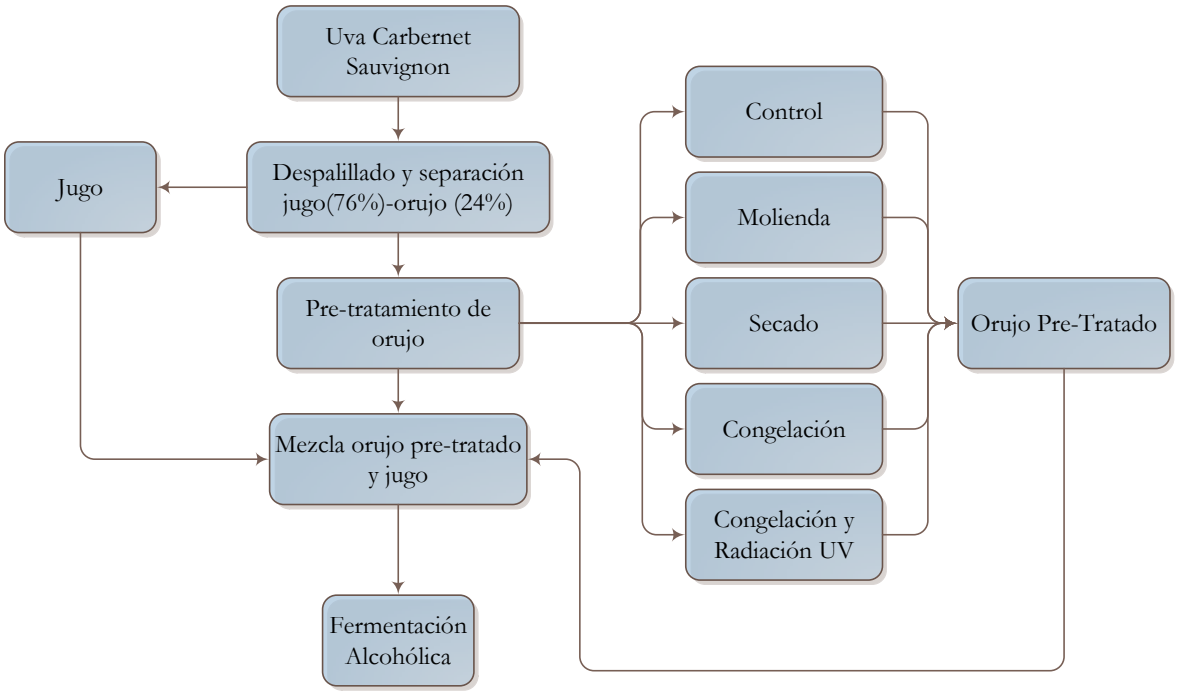

Figura 3-1: Esquema de la metodología para la aplicación de pre-tratamientos al orujo de uva

3.3.1 Orujo Control

Para la fermentación sin pre-tratamiento, se pesaron 950 [g] de uva despalillada por réplica y luego se realizó el estrujado de forma manual, es decir, se rompen las uvas con las manos, luego el mosto obtenido es trasvalijado a botellas de 1[L] en donde posteriormente se llevó a cabo la fermentación alcohólica.

3.3.2 Orujo Molido

Se pesaron 950 [g] de uva despalillada por réplica y luego fueron procesadas en una licuadora a potencia mínima por 20 segundos, obteniendo un mosto con un tamaño de orujo menor, el mosto es trasvalijado a botellas de 1[L] para su posterior fermentación.

3.3.3 Orujo Secado

Se pesaron 950 [g] de uva despalillada por réplica, y se procede al estrujado manual, luego se separa el jugo del orujo, utilizando un prensa-papas, el orujo obtenido corresponde a un 24% del peso in proceso de secado a 50 [°C] (ya que los compuestos fenólicos son susceptibles a altas temperaturas, por lo que temperaturas menores a 60 [°C] son apropiadas para que los

compuestos mantengan sus propiedades (Drosou et al., 2015)) en una estufa de secado (Marca: Memmert). El proceso de secado se lleva a cabo hasta obtener un peso constante de orujo.

El jugo obtenido se congela hasta el día de montaje de la fermentación. Cuando llega el momento, se calcula la cantidad de agua que perdió el orujo (66%[1]) y se le adiciona la misma cantidad de agua destilada, con la finalidad de mantener la proporción orujo y jugo que tenía la uva inicialmente. Luego de 1 hora de estar en contacto el agua con el orujo, se procede a mezclar el orujo hidratado con el jugo, obteniendo 950 [g] de mosto a fermentar.

3.3.4 Orujo Congelado

Se pesaron 950 [g] de uva despalillada por réplica, y se realiza el estrujado manual de la uva, luego se separa el orujo del jugo con un prensa-papas, obteniéndose la misma proporción de orujo y jugo (24% y 76% respectivamente) y ambos son sometidos a un proceso de congelación a -20[°C] (Moreno-Perez et al., 2013) hasta el día de montaje de la fermentación. Cuando llega el día del montaje, se procede a descongelar el orujo y el jugo (proceso lento de descongelación) para luego mezclarlos y obtener el mosto a fermentar.

3.3.5 Orujo congelado con radiación UV

Se pesan 950 [g] de uva despalillada por réplica, y se procede al estrujado manual, luego se separa el jugo del orujo, utilizado un prensa-papas, el orujo obtenido corresponde a un 24% del peso inicial y el jugo el 76% restante. Luego, se procede a congelar el orujo y jugo de uva, la congelación se lleva a cabo a -20[°C] hasta el día de montaje de la fermentación, en donde se descongela el jugo y orujo, y el orujo descongelado es sometido a radiación UV en el equipo de radiación UV del laboratorio de alimentos (Figura 3-2)que posee un arreglo de luces LED que brindan una irradiancia de 0,18 [W/m^2] que corresponde a radiación UV-A de 365[nm] de longitud de onda. Según (LIU et al., 2012) dosis de radiación de 8[kJ/m^2] aumentan la concentración de polifenoles y poder antioxidante del tomate, por lo que se aplica la misma dosis, lo que equivale a un tiempo de exposición de 12[h] bajo el arreglo de luces LED. Una vez realizado el pre-tratamiento de congelación y posterior radiación UV, el orujo se mezcla con el jugo en la proporción antes indicada, y se obtiene mosto pre tratado para su posterior fermentación.

[1] Ver anexo 6.4: Proceso de secado de orujo

Figura 3-2: Orujo sometido a radiación UV

3.4 Proceso de fermentación alcohólica

Los mostos obtenidos de los pretratamiento de orujo se trasvalijan a biorreactores de 1[L], luego se procede a acondicionar el mosto, de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio de biorreactores[2]. Finalmente, el mosto acondicionado es inoculado y se introduce en un Shaker (Marca: Stuart), sin agitación, con la finalidad de mantener una temperatura de 28[°C] durante todo el proceso de fermentación. En la Figura 3-3 se muestran los fermentadores utilizados en esta investigación:

Figura 3-3: Fermentadores 1[L] con mosto de distintos tratamientos de orujo

[2] Ver acondicionamiento de mosto en el anexo 6.1

Una vez iniciada la fermentación se toman muestras cada 12[h], las primeras 48[h], y luego una muestra cada 24[h]. Las mediciones para evaluar la evolución de la fermentación alcohólica fueron realizadas al mismo tiempo en que se tomaba la muestra. Para las mediciones de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante la muestra se congeló hasta el día del análisis. En la Figura 3-4 se muestra un esquema de la metodología utilizada para medir las variables de interés:

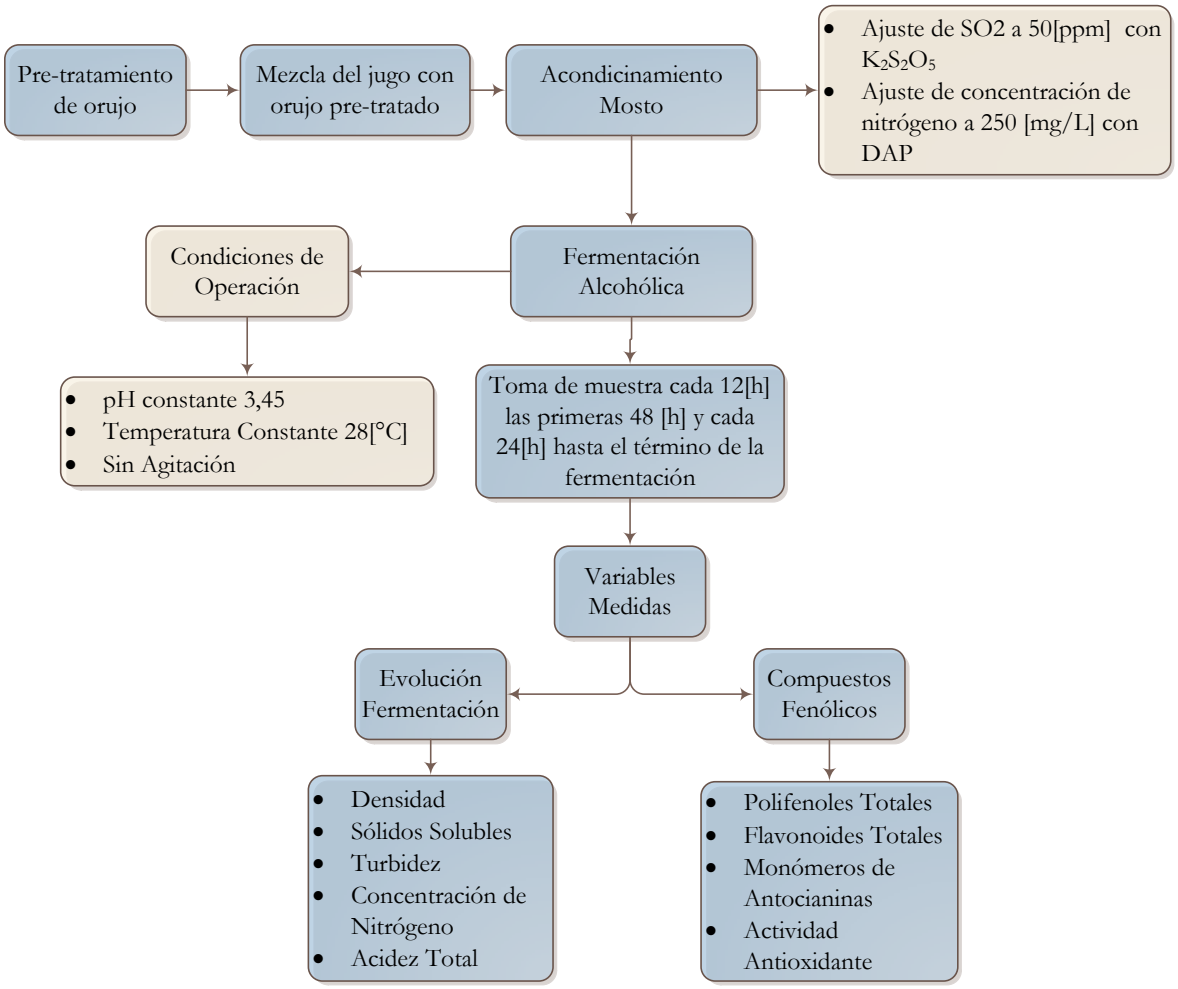

Figura 3-4: Esquema de la metodología empleada para desarrollar las fermentaciones a escala de laboratorio.

3.5 Evolución de la fermentación

La fermentación alcohólica inicia cuando la levadura entra en contacto con el mosto. El mosto posee alrededor de 220 a 240 [g/L] de azúcar total inicial (22 a 24[°Brix]), a lo largo de la fermentación la levadura consume dichas azúcares, produciendo etanol y dióxido de carbono, y

se produce un cambio en la densidad a medida que avanza la fermentación, la densidad al terminar la fermentación puede llegar a valores entre 995 y 990 [g/L] y la concentración de azúcar residual a valores menores a 2[g/L] (Delanoë et al., 2003).

3.5.1 Densidad

Para la medición de densidad se utiliza un picnómetro (aproximadamente 10[mL]) y una balanza analítica (Marca: *Nahita,* Modelo: 5034-EX). El picnómetro es llenado con mosto, se registra la masa del mosto, y con el volumen de capacidad del picnómetro se calcula su densidad mediante:

$$\rho_{mosto} = \frac{masa\ mosto[g]}{volumen\ picnómetro[mL]}$$

3.5.2 Sólidos Solubles

La medición de los sólidos solubles, o grados Brix, es un estimador del contenido de azúcar en el mosto, y se suele medir durante las fermentaciones para monitorear la variación que tiene el mosto en el contenido de azúcar a medida que las levaduras actúan. La medición de los grados brix se realizó con un refractómetro (Marca: Hannah Instrumento, Modelo: HI96811).

3.5.3 Turbidez

Para el seguimiento de la población de microorganismos en la fermentación, se mide la turbidez. A medida que avanza la fermentación las levaduras se reproducen y este cambio se registra con el cambio en la turbidez, ésta se mide con un Turbidímetro (Marca: Hannah Instrument, Modelo: HI 83749) que entrega valores en NTU (Nephelometric Turbidity Unit). El rango de medición del equipo es 0-500 [NTU], y debe ser calibrado antes de utilizarlo, la calibración se realiza con estándares del equipo que tienen una turbidez conocida. El mosto utilizado posee una turbidez superior a 500 [NTU], por lo que la muestra analizada debe ser diluida con el fin de obtener una turbidez dentro del rango de medición del equipo.

3.5.4 Acidez Total

La medición de acidez total se realiza titulando la muestra con una solución de hidróxido de sodio, en el titulador automático (marca: Lab Tec), hasta llegar a pH 7. La acidez total se

calcula con el volumen de hidróxido de sodio gastado en la titulación y se obtiene en [g Ácido Tartárico/L mosto][3].

3.5.5 Concentración Nitrogéno (YAN)

Para cuantificar la concentración asimilable por levadura se utiliza el Método de Sorensen. La muestra de mosto se titula, en el titulador automático (Marca: Lab Tec) con una solución de hidróxido de sodio hasta llegar a pH 8, y posteriormente se adicionan 2[mL] de formaldehído y se titula nuevamente hasta llegar a pH 8, se registra el volumen gastado en la segunda titulación y se calcula la concentración de nitrógeno asimilable [mg Nitrogeno /L][4]. Para obtener la concentración de YAN se realiza el siguiente cálculo:

3.6 Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante

A medida que se lleva a cabo la fermentación, se toman muestras cada 12 [h] los dos primeros días, y los días siguientes una muestra diaria. La muestra se congela hasta el día del análisis, que es descongelada y luego centrifugada (Marca: Hermle, Modelo: Z323K), con la finalidad de eliminar la turbidez de la muestra. La centrifugación se llevó a cabo a 5.680 [rpm] durante 10 minutos a 20[°C] (Wang et al., 2015). Finalmente se procede a analizar la muestra centrifugada. Todos los análisis descritos a continuación se realizaron con el espectrofotómetro UV-VIS (Marca: Mecasys, Modelo: Optizen Pop).

3.6.1 Polifenoles Totales

Para la medición de polifenoles totales se utiliza el Método de Folin- Ciocalteau (Hosu et al., 2014; Li et al., 2009) que se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteau (se oxidan), a pH básico, obteniéndose una coloración azul, producto de la formación de los complejos, que se logra cuantificar midiendo su absorbancia a 760[nm] en un espectrofotómetro. Para realizar las mediciones de la muestra se construyó una curva de calibración con ácido gálico (en concentraciones de 0-500 [mg AG/L][5], por lo que los resultados obtenidos se expresan en esta unidad. A continuación se muestra el protocolo utilizado para la medición de polifenoles totales:

[3]Ver anexo 6.2 Cálculo de Acidez Total
[4] Ver Anexo 6.3: Cálculo de la concentración de nitrógeno asimilable
[5] Ver Anexo 6.5: Curva de Calibración Polifenoles Totales

- Se diluye la muestra a analizar de manera de obtener una absorbancia que se encuentre en el rango de absorbancias de la curva de calibración. Para este caso la muestra de mosto se diluye 1:10 en agua destilada.
- Se mezcla 0,1 [mL] de la muestra diluida con 2[mL] de reactivo Folin- Ciocalteau (previamente diluido 1:10 en agua destilada). Se deja reaccionar por 5 minutos.
- Se adicionan 1.6[mL] de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 7,5% p/v y se deja reaccionar por 1 [h] a oscuras.
- Pasado el tiempo de reacción se mide la absorbancia de la mezcla a 760[nm], realizando una muestra en blanco utilizando agua destilada en vez de muestra.

Con la absorbancia obtenida y la curva de calibración, se obtiene la concentración de polifenoles de la muestra.

3.6.2 Flavonoides Totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales se utiliza el método descrito por (Feliciano et al., 2009) con algunas modificaciones, donde el contenido de flavonoides totales se realiza por colorimetría, adicionando Cloruro de Aluminio y Nitrito de Sodio, que cuando reaccionan entre sí forman un complejo colorado que posee una absorción máxima a los 510 nm. Para la cuantificación se construye una curva de calibración utilizando concentraciones de (+)-Catequina de 0 a 300[mg/L][6]. El método descrito por (Feliciano et al., 2009)que se resume a continuación:

- Diluir la muestra de mosto en agua destilada (1:5)
- Mezclar 0,5[mL] de la muestra diluida con 2 [mL] de agua destilada.
- Adicionar 0,15 [mL] de solución de $NaNO_2$ (0,7[M]) y dejar reaccionar por 5 minutos.
- Adicionar 0,15[mL] de solución de $AlCl_3$ (0,44[M]) y dejar reaccionar por 6 minutos.
- Adicionar 1[mL] de solución de NaOH (1[M]) y luego 1[mL] de agua destilada y medir absorbancia a 510[nm].

3.6.3 Pigmento monomérico de antocianinas

Para determinar el contenido de antocianinas se utiliza el método descrito por (Lee et al., 2005), el método se basa en el cambio estructural reversible que tienen los monómeros de

[6] Ver Anexo 6.6: Curva de Calibración Flavonoides Totales

antocianinas cuando hay un cambio en el pH entre 1 y 4,5. A un pH de 1 se forma un oxonio colorado y a pH 4,5 una molécula sin color. La diferencia en la absorbancia a una longitud de onda de 520[nm] es proporcional a la concentración de antocianinas. Las antocianinas polimerizadas absorben radiación a esta longitud, por lo que el método sólo aplica para cuantificar las antocianinas monoméricas. Los resultados se expresan cianidina-3-glucósido (C3G). El método consiste en diluir la muestra de mosto en solución buffer a pH 4,5 y pH 1 (1:20) y luego medir la absorbancia a 520 [nm] y 700[nm], utilizando como blanco una celda con agua destilada. Para obtener la concentración de antocianinas (usando como estándar cianidina-3-glucósido) se utiliza la siguiente expresión:

$$Antocianinas\ \left[\frac{mgC3G}{L}\right] = \frac{A * PM * FD * 10^3}{\varepsilon * 1}$$

Donde,

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

- A_{520} y A_{700} : corresponden a las absorbancias registradas de la muestra a 520 y 700 nm respectivamente en los medios de pH 1 y 4,5 .
- PM : Peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,2 [g/mol]).
- FD: Factor de dilución utilizado.
- ε : Coeficiente de extinción molar (26.900 [L/mol*cm])
- 1: Espesor de la celda [cm].
- 10^3: Factor de conversión de g a mg .

La preparación de las soluciones buffer se detallan a continuación:

Solución pH 1: Se prepara una solución de cloruro de potasio (0,025[M]) sin aforar, por ejemplo si se prepara un litro de solución, se debe adicionar agua destilada hasta los 980 [mL], luego con el uso del pHmetro se le baja el pH hasta 1 con la adición de ácido clorhídrico concentrado.

Solución pH 4,5: Se prepara una solución de acetato de sodio (0,4[M]) sin aforar, por ejemplo si se prepara un litro de solución, se debe adicionar agua destilada hasta los 960 [mL], luego con el uso del pHmetro se le baja el pH hasta 4,5 con la adición de ácido clorhídrico concentrado.

3.6.4 Capacidad Antioxidante

Para estimar la capacidad antioxidante del vino en el proceso de fermentación se utilizó el método de actividad antirradical descrito por (Brand-Williams et al., 1995). Es un método simple, rápido y muy utilizado, consiste en evaluar la actividad antioxidante de una sustancia haciéndola reaccionar con una solución del radical estable (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH· en metanol. La solución de DPPH· en metanol es de color púrpura intenso y tiene una máxima absorción a 515[nm], pero cuando reacciona con las sustancias en el vino que son capaces de neutralizar al radical, la intensidad en el color disminuye (se vuelve a tonos amarillos) y esto es cuantificado con la medición de absorbancia a 515[nm]. Para la cuantificación de las muestras en la fermentación se realiza una curva de calibración utilizando Trolox como estándar[7]. El método se detalla a continuación:

- Diluir la muestra de vino con metanol (1:10)
- Mezclar 0,1 [mL] de muestra diluida con 3,9[mL] de solución de DPPH· en metanol (24[mg/L]). Dejar reaccionar a oscuras por 30 minutos y luego medir absorbancia a 515 [nm], se utiliza como blanco una celda con metanol y otra celda en donde se hace en análisis, pero en lugar de muestra, se hace reaccionar metanol.

3.6.5 Análisis estadísticos

La cantidad de réplicas realizadas para las mediciones se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3-1: Número de réplicas de las mediciones realizadas

Medición	Réplicas
Densidad	1
°Brix	2
Turbidez	2
Concentración YAN	1
Acidez total	1
Polifenoles totales	3
Flavonoides totales	3
Antocianinas	3
Capacidad Antioxidante	3

[7] Ver Anexo 6.7: Curva de Calibración Actividad Antioxidante

Cabe destacar que las mediciones sin duplicado ni triplicado requerían de la toma de un volumen considerable de muestra, por lo que se decidió hacer una réplica por cada botella de fermentación, con la finalidad de no alterar de manera considerable el volumen de reacción.

Los resultados obtenidos corresponden a los promedios de las réplicas de los análisis y los promedios entre los duplicados de cada fermentación. Los resultados se informan con sus respectivas desviaciones estándar.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evolución de la fermentación

4.1.1 Densidad

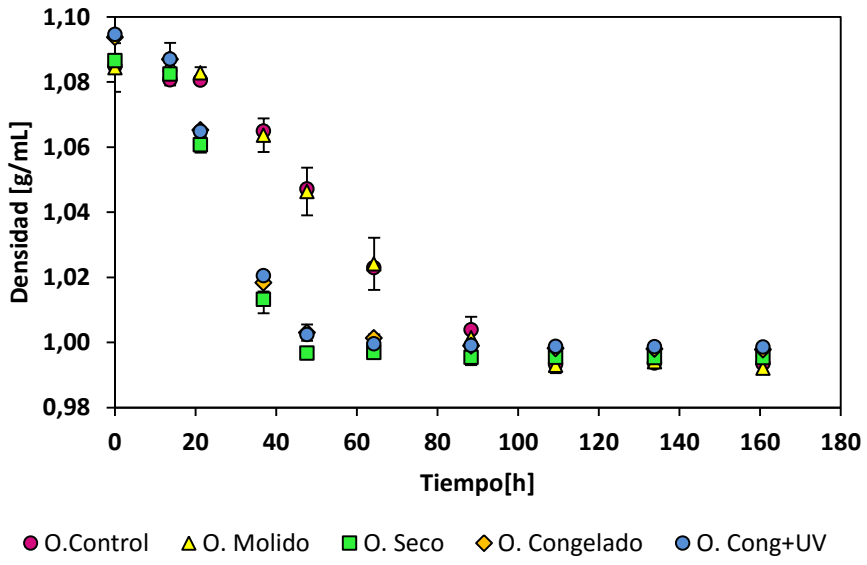

Figura 4-1: Variación de densidad para las fermentaciones alcohólica para cada pre-tratamiento de orujo

Tabla 4-1: Valores de densidad a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	Densidad [g/mL] 0[h]	Densidad [g/mL] 161[h]
Control	1,0849	0,9934
Molienda	1,0844	0,9921
Secado	1,0865	0,9954
Congelación	1,0937	0,9979
Congelación y radiación UV	1,0946	0,9986

Como se observa en la Figura 4-1, la densidad disminuye a medida que se desarrolla la fermentación, la fase estacionaria inicial, para todos los tratamientos, es menor a 12[h]. Para la fermentación control y con orujo molido, la fase estacionaria al terminar la fermentación se alcanza aproximadamente a las 90[h]. Para las fermentaciones con orujo seco, orujo congelado

y orujo congelado y radiación UV; la fermentación alcanza la fase de latencia aproximadamente a las 60 [h]. Los valores de la densidad al terminar la fermentación, a las 160[h], se detallan en la Tabla 4-1.

Como se puede apreciar en la Tabla 4-1para las fermentaciones con orujo congelado; y orujo congelado y radiación UV, las densidades iniciales y finales son mayores.

4.1.2 Sólidos Solubles

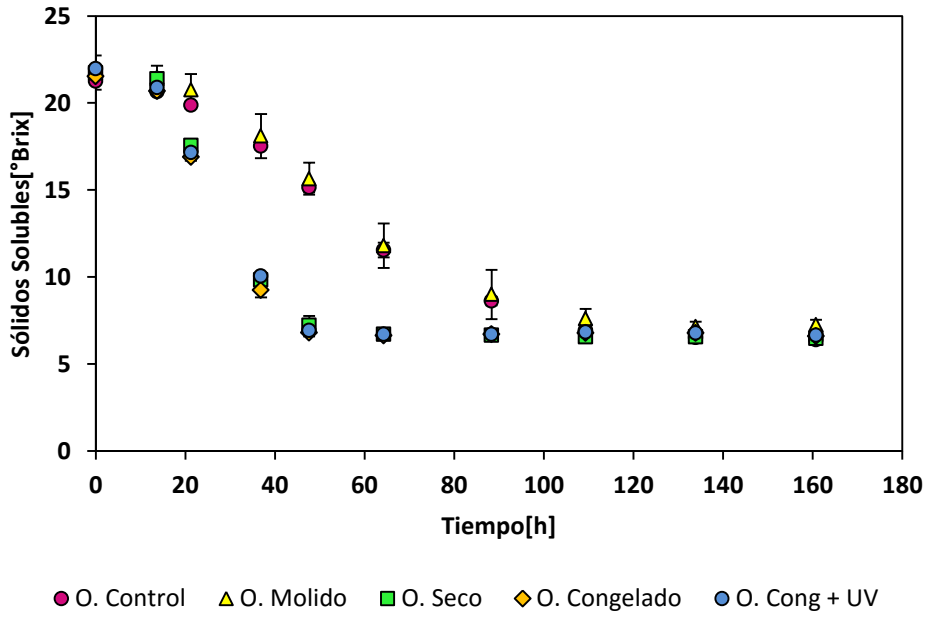

Figura 4-2: Variación de sólidos solubles para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Tabla 4-2: Valores de sólidos solubles a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	S. Solubles [°brix] 0 [h]	S. Solubles[°brix] 161[h]
Control	21,25	6,40
Molienda	21,95	7,25
Secado	21,73	6,48
Congelación	21,53	6,60
Congelación y radiación UV	21,98	6,65

En la Figura 4-2 se puede apreciar que la uva utilizada tiene un valor inicial de sólidos solubles de 22[°brix] aproximadamente, la fase de adaptación de las levaduras es en un tiempo menor a

12[h]. Para las fermentaciones control y con orujo molido, los sólidos solubles se estabilizan a las 109[h], en tanto, para las fermentaciones restantes la estabilización ocurre aproximadamente a las 64[h]. Los valores iniciales y finales para cada fermentación se detallan en la Tabla 4-2.

4.1.3 Turbidez

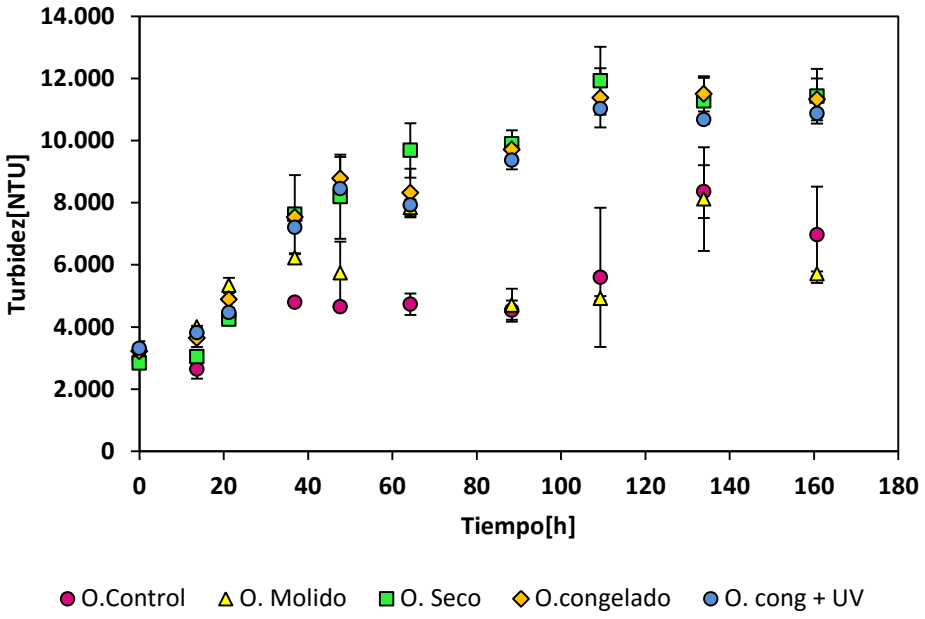

Figura 4-3: Variación de turbidez para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Tabla 4-3: Valores de turbidez a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	Turbidez [NTU] 0 [h]	Turbidez [NTU] 161[h]
Control	2.928	6.965
Molienda	3.242	5.715
Secado	2.835	11.425
Congelación	3.220	11.325
Congelación y radiación UV	3.315	10.875

La Figura 4-3 muestra la turbidez para cada tratamiento, se puede observar que los pre-tratamientos de secado, congelación y congelación y radiación UV, registraron valores superiores de turbidez en comparación con la fermentación control y con orujo molido. De lo anterior se concluye que la población celular para los primeros era mayor a la observada para la

fermentación control y con orujo molido, lo cual también se pudo observar cualitativamente al final de las fermentaciones, pues para las fermentaciones con orujo congelado, seco y congelado y radiación UV, la cantidad de borra era considerable mayor. En la

Tabla 4-3 se puede observar que al final de la fermentación la diferencia en la turbidez es considerable.

4.1.4 Concentración de Nitrógeno Asimilable

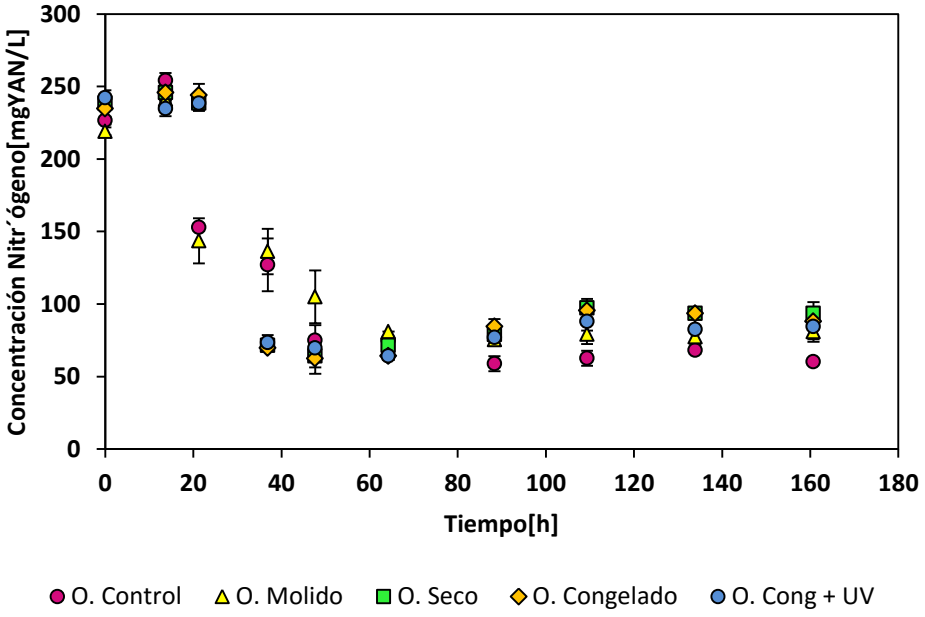

Figura 4-4: Variación de concentración de nitrógeno para las fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Previo al proceso de fermentación se acondicionó el mosto con la adición de DAP, obteniéndose concentraciones de nitrógeno superiores a los 200 [mg/L]. Como se puede observar en la Figura 4-4, para las todas las fermentaciones, fue necesaria la adición de DAP a las 12[h], ya que la concentración previa a la adición era inferior a los 250[mg/L]. Para los pre-tratamientos con orujo seco, congelado y congelado y radiación UV; se tuvo que adicionar DAP nuevamente a las 24[h] ya que los niveles de nitrógeno eran insuficientes. Los valores al inicio y término de la fermentación se detallan en la Tabla 4-4

Tabla 4-4: Valores de concentración de nitrógeno asimilable a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	C. Nitrógeno[mg/L] 0 [h]	C. Nitrógeno [mg/L] 161[h]
Control	226	60
Molienda	219	81
Secado	238	93
Congelación	235	88
Congelación y radiación UV	242	84

4.1.5 Acidez total

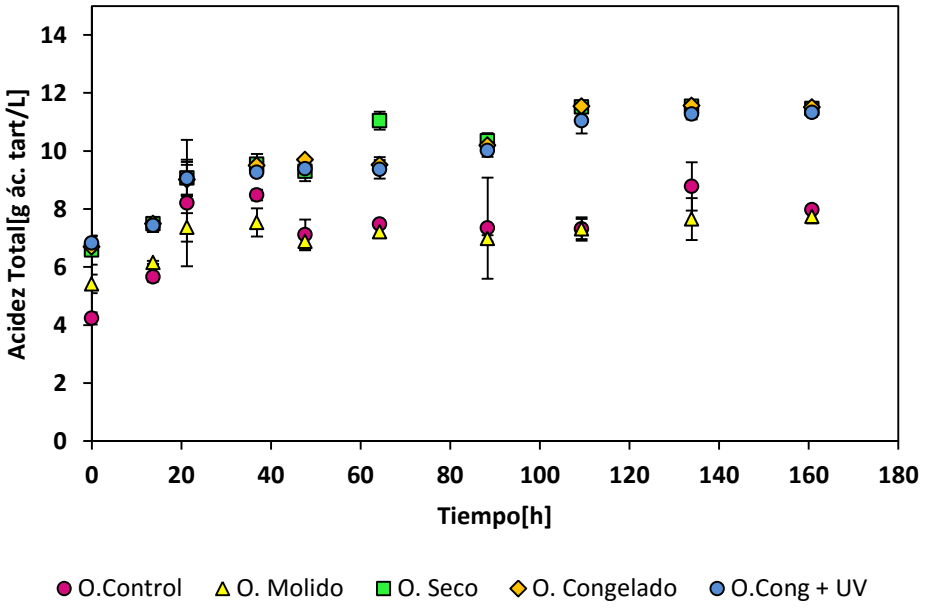

Figura 4-5: Variación de acidez total para las fermentaciones con tratamiento de orujo

Para el caso de la acidez, como se observa en la Figura 4-5, se puede observar que las fermentaciones control y con orujo molido, presenta valores inferiores a los obtenidos para el resto de los pre-tratamientos. En la Tabla 4-5 se detallan los valores de acidez total al comenzar y finalizar las fermentaciones para cada pre-tratamiento:

Tabla 4-5: Valores de acidez total a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	A. Total[mg AT/L] 0 [h]	A.Total[mg AT/L] 161[h]
Control	4,2	7,9
Molienda	5,4	7,7
Secado	6,5	11,4
Congelación	6,7	11,5
Congelación y radiación UV	6,8	11,3

De la Figura 4-1 y Figura 4-2, se puede observar que las fermentaciones el control y la fermentación con orujo molido fueron más rápidas que el resto de las fermentaciones, pero los valores de densidad y sólidos solubles al final de las fermentaciones son similares y están dentro de los rangos esperados (Delanoë et al., 2003). La diferencia entre dichas fermentaciones fue, que para las 3 últimas (Orujo Congelado, Orujo Seco y Orujo Congelado y radiación UV) el jugo que se separa previo a la fermentación, también fue congelado. En tanto para las fermentaciones control y orujo molido, se utilizó uva fresca. Cabe destacar que para los pre-tratamientos con el jugo fresco, la concentración inicial de nitrógeno asimilable estaba entre un rango de 95-105 [mg de N/L], en tanto para las fermentaciones con jugo congelado la concentración inicial, antes del acondicionamiento, era mayor 120-130 [mg de N/L], esto se puede atribuir a que la congelación del jugo, provocó una permeabilidad de las membranas celulares lo que significó un aumento en la excreción de aminoácidos (Hernandez-Orte et al., 2006) y por lo tanto, en la concentración de nitrógeno inicial. Al tener una mayor concentración de nitrógeno, la levadura tuvo un mayor tiempo de asimilación de los nutrientes, por lo que al darse las condiciones de temperatura y pH, las levaduras comenzaron a reproducirse con mayor rapidez que en las fermentaciones donde la concentración inicial de nitrógeno era menor. Al ser menor la concentración inicial el tiempo de adaptación es más largo y las levaduras demoran más en reproducirse (Beltran et al., 2005), y fue el efecto que se observó al ser fermentaciones con una fase de adaptación levemente más larga.

El aumento de la población de levaduras, observado para las fermentaciones con orujo seco, congelado y congelado y radiación UV, se puede explicar con lo mencionado anteriormente, al haber una mayor reproducción de levaduras, el nitrógeno asimilable es consumido a mayor

velocidad, razón por la cual fue necesaria la adición de DAP a las 24[h] para las fermentaciones con jugo congelado.

Para la acidez total los valores superiores para las fermentaciones con orujo seco, congelado y congelado y radiación UV, se atribuye a la cantidad de biomasa presente en el mosto, al ser más rápida la fermentación, se produce un aumento en la población celular, que se detecta con la medición de acidez total, además esta variable está relacionada con la concentración de nitrógeno (Moreno-Arribas, 2009), que para las fermentaciones con jugo congelado se adicionó en dos ocasiones.

4.2 Compuestos Fenólicos y Actividad Antioxidante

4.2.1 Polifenoles Totales

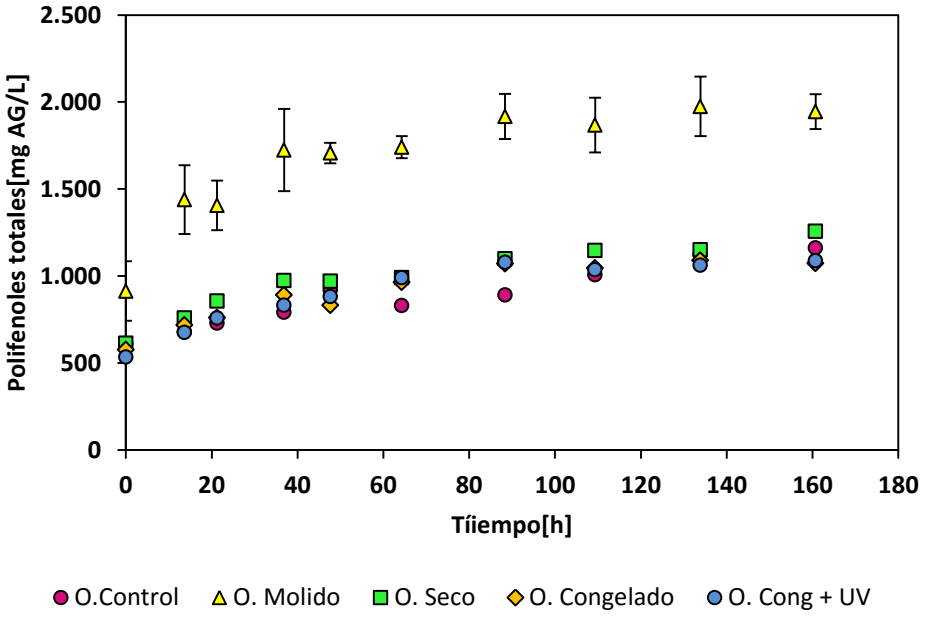

Figura 4-6: Variación del contenido de polifenoles totales para las fermentaciones con tratamiento de orujo

En la Figura 4-6 se observa la evolución en la concentración de polifenoles totales, se puede apreciar que el pre-tratamiento que produjo un aumento en la concentración fue el de molienda de orujo. Para el resto de los pre-tratamientos no se observa un cambio en comparación con la fermentación control. Los valores al inicio y final de las fermentaciones se detallan en la Tabla 4-6:

Tabla 4-6: Valores de concentración de polifenoles totales a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	PT [mg AG/L] 0 [h]	PT [mg A.G/L] 161[h]
Control	610	1.161
Molienda	914	1.945
Secado	614	1.257
Congelación	578	1.073
Congelación y radiación UV	535	1.089

Se puede observar que la concentración inicial de polifenoles totales para los pre-tratamientos de orujo secado, orujo congelado y congelado y radiación UV, son prácticamente la misma. Al contrario de lo que se obtuvo para la fermentación con orujo molido, que corresponde a un 50% mayor a la concentración medida para la fermentación control. Hacia el final de la fermentación se observa la misma tendencia, la concentración de polifenoles para la fermentación con orujo molido es un 68% mayor que la concentración para la fermentación control.

Los valores obtenidos de concentración de polifenoles totales se encuentran dentro del rango esperado para el tipo de uva (1.500-3.000 [mg AG/L]) (Li et al., 2009), se debe tener en cuenta que el estudio citado corresponde a uvas de la misma especie pero localizadas en China, y se debe considerar que existen múltiples factores que influyen en el contenido polifenólico de las uvas, como son: las condiciones climáticas de las plantaciones, el punto de madurez al cual es cosechada la uva, las técnicas en la elaboración del vino, entre otras (Di Majo et al., 2008). El rango aquí presentado significa una referencia de que el orden de magnitud de los resultados obtenidos no difieren considerablemente y se puede considerar como un rango razonable para la especie en cuestión.

Los resultados obtenidos de las variables de evolución de la fermentación, no tienen relación con la concentración de polifenoles, ya que la única alteración observada es para la fermentación con orujo molido. Lo anterior se puede explicar por el hecho de que al ser la misma uva para todos los tratamientos, la cantidad de polifenoles a extraer es la misma. El aumento en la concentración para la fermentación con orujo molido se atribuye a que las pepas

fueron afectadas en mayor medida por dicho tratamiento, ya que al ser molidas, se produce un aumento en el área de trasferencia para la difusión de estos compuestos al vino.

Por el estudio realizado por (El Darra et al., 2016) la técnica de termovinificación aplicada previo al proceso de fermentación significó un aumento en el contenidos de polifenoles totales del 32% y la aplicación de pulsos eléctricos un aumento del 18%. Las células de la piel son una barrera limitante en la liberación de polifenoles, el tratamiento de vinificación, al aumentar la temperatura en un tiempo reducido provoca una degradación severa en las células de la piel principalmente, viéndose afectadas en menor medida las células de las pepas. La degradación de las membranas permite obtener un aumento en la concentración de polifenoles totales (El Darra et al., 2016). La aplicación de pulsos eléctricos provoca un daño localizado en las membranas celulares, medianamente reversible, por lo que en comparación con la termovinificación, el daño a la célula es menor (El Darra et al., 2016).

En el estudio realizado por (Puértolas et al., 2010) la aplicación de un pulso eléctricos a las uvas produjo un aumento en el contenido polifenólico del 17%, concluyendo que la debilitación de las membranas mediante este método promueve la liberación de compuestos fenólicos.

Según (Atanacković et al., 2012) el efecto de aplicar termovinificación significó un aumento del 55% en el contenido de polifenoles totales, en este estudio atribuyen el efecto a la debilitación de las membranas y posterior liberación de polifenoles.

Para los casos estudiados por (Ortega-Heras et al., 2012) la aplicación de una maceración en frío no tuvo efecto significativo en la concentración de polifenoles totales, lo que coincide con lo observado para los tratamientos con congelación, en donde la formación de cristales no produjo efecto alguno en la concentración de polifenoles totales.

Según (Panceri et al., 2015)el secado de uva mediante convección hasta perder 30% del peso, afectó en la concentración de polifenoles totales aumentando en un 11% para la cepa de Carbernet Sauvignon. Si se compara el proceso de secado aplicado en esta investigación los resultados no coinciden, pues, con el pre-tratamiento de secado, no existe en aumento en los polifenoles totales, esto se atribuye a que las técnicas de secado empleadas son distintas, lo cual claramente tiene un efecto en el resultado final.

En el estudio realizado por (Castilhos et al., 2016), en donde se analizaron 4 tipos de vinos de cepas híbridas (Bordó, Isabel, Violeta y Carmem) con un pre-tratamiento de deshidratación parcial de la uva, se obtuvo que sólo para el vino Isabel se produjo un aumento considerable en la concentración de polifenoles totales (76%). Lo anterior es una prueba de que todos los experimentos varían con la especie de uva utilizada, y el proceso aplicado. En este caso se puede relacionar con los resultados obtenidos con el orujo secado, que tampoco tuvo un efecto en la concentración de polifenoles totales.

4.2.2 Flavonoides Totales

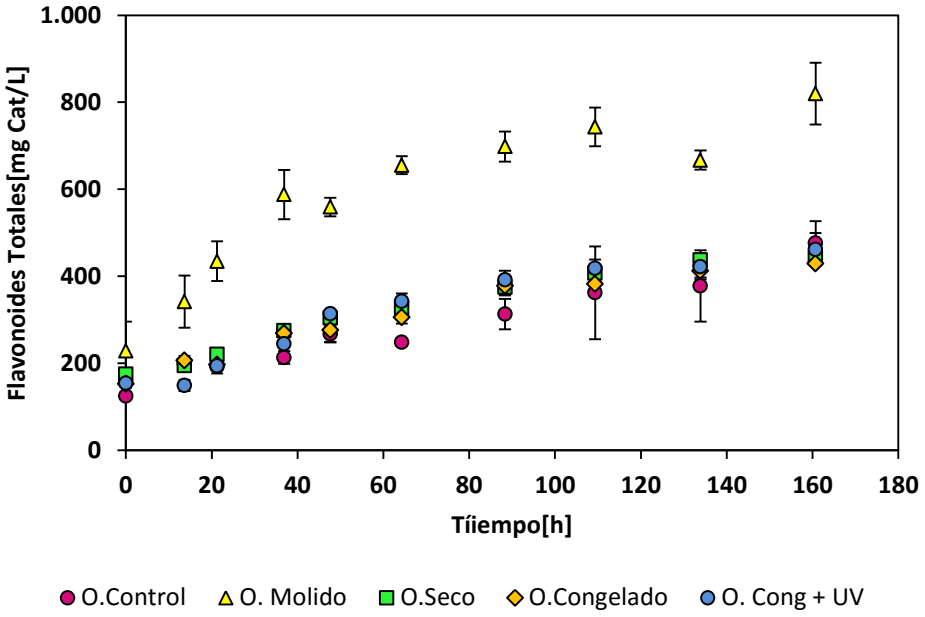

Figura 4-7: Variación del contenido de flavonoides totales para las fermentaciones con tratamiento de orujo

Para la medición de flavonoides totales se observa en la Figura 4-7 una tendencia similar a la de polifenoles totales, el tratamiento que tuvo un efecto considerable en el contenido de flavonoides fue el de molienda de orujo, en tanto el resto de los tratamientos no tuvieron un efecto en la concentración de estos compuestos.

Tabla 4-7: Valores de concentración de flavonoides totales a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	FT [mg cat/L] 0 [h]	FT [mg cat/L] 161[h]
Control	125	476
Molienda	229	820

Secado	175	441
Congelación	153	429
Congelación y radiación UV	154	461

Los valores obtenidos, mostrados en la Tabla 4-7 están dentro del rango descrito por (Li et al., 2009) para Cabernet Sauvignon (400- 1.700 [mg Cat/L]).

En los estudios en donde se analizan otros pre-tratamientos a la uva, no se miden los flavonoides totales, ya que utilizan técnicas de cromatografía líquida para determinar compuestos flavonoides de manera más específica. Como se mencionó en los antecedentes el 65% de los compuestos flavonoides se encuentran localizados en las pepas, lo que se comprueba en la investigación, pues el tratamiento de orujo molido, fue el que tuvo un mayor efecto sobre las células de las pepas, y el aumento observado en la concentración de flavonoides totales se atribuye a este efecto del tratamiento. Para el resto de los tratamientos no se observó diferencias con la fermentación control.

4.2.3 Antocianinas Monoméricas

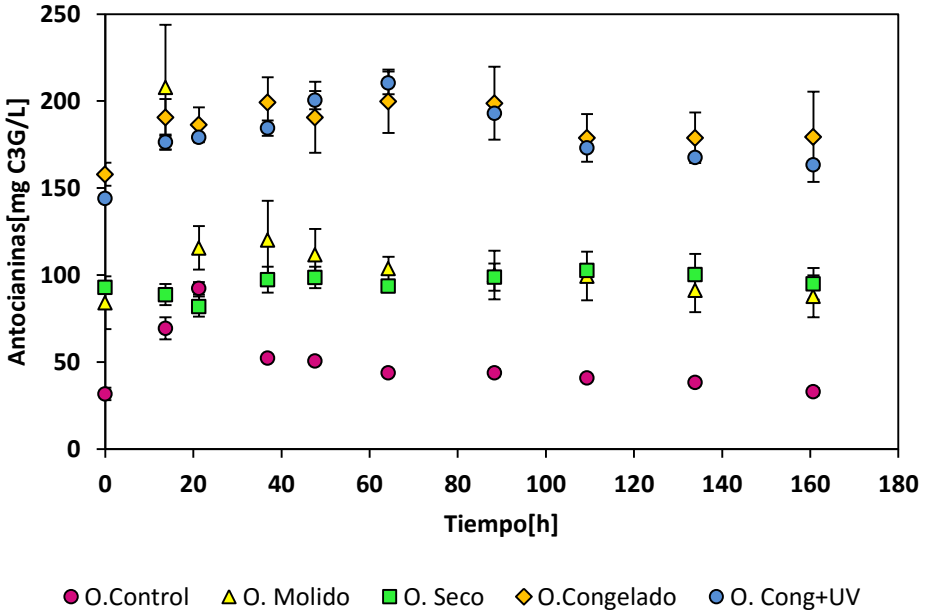

Figura 4-8: Variación del contenido de antocianinas para las fermentaciones con tratamiento de orujo

Como se puede observar en la Figura 4-8, todos los tratamientos realizados al orujo tuvieron un efecto en la concentración de monómeros de antocianinas. Los valores de concentración están dentro del rango descrito por (Sacchi et al., 2005) (20-200[mg C3G/L]). De los

resultados obtenidos se afirma que los tratamientos realizados al orujo sí afectan la microestructura celular, pero más aún, se puede afirmar que las células de la piel de la uva son las que se ven afectadas en mayor medida, pues como se mencionó en los antecedentes las antocianinas están ubicadas al interior de las vacuolas de las células de la piel, por lo que para provocar el aumento observado, se debe haber ejercido un efecto en la estructura de la célula.

Para las fermentaciones sin pre-tratamiento y con molienda de orujo se observa que a las 13 y 21 [h] existe un aumento considerable en la concentración de antocianinas, esto se explica porque al inicio de la fermentación, las antocianinas monoméricas son liberadas al medio (ya que son solubles en agua, por lo que están inmediatamente disponibles (Bimpilas et al., 2015)). Una vez liberadas, son parte de una serie de reacciones de polimerización, copigmentación y oxidación, que hacen que la concentración disminuya después del aumento observado, ya que son moléculas muy inestables (Ortega-Heras et al., 2012; Sacchi et al., 2005).

Para el resto de los tratamientos no es posible observar ese *peak* , esto se explica principalmente por el hecho de que como se dijo anteriormente, la fermentación para estos tratamientos fue más rápida, por lo que el momento del *peak* en la concentración no fue detectado en el horario de toma de muestras previamente determinado.

En la Tabla 4-8 se detalla el aumento provocado en la concentración de antocianinas por cada tratamiento, al final de la fermentación alcohólica.

Tabla 4-8: Porcentaje de aumento en la concentración de antocianinas para cada tratamiento de orujo.

Tratamiento	% Aumento [mg C3G/L]
Orujo Molido	166
Orujo Seco	187
Orujo Congelado	443
Orujo Congelado+ UV	394

Según (El Darra et al., 2016), la aplicación de pulsos eléctricos no tuvo un efecto significativo en la concentración de antocianinas, en comparación con la uva sin pre-tratamiento. Los mismos resultados se obtuvieron para la aplicación del pre-tratamiento de termovinificación.

Según (Castilhos et al., 2016)el efecto del secado parcial de la uva, no provoca un cambio significativo en la concentración de monómeros de antocianinas.

En los estudios realizados por (El Darra et al., 2016) y (Castilhos et al., 2016) se concluye que los tratamientos aplicados provocan un efecto en la microestructura de la célula, dicho efecto depende del tipo de uva y de las condiciones de operación de los pre-tratamientos.

Según el estudio realizado por (Gil-Muñoz et al., 2009), el efecto de la maceración en frio, para la cepa Cabernet Sauvignon provoca un aumento del 81% en la extracción de monómeros de antocianinas. Lo anterior se atribuye al hecho de que para la cepa de Cabernet Sauvignon el espesor de las membranas de las células de la piel es menor es comparación a otras cepas, por lo que, la formación de cristales provocada en la maceración en frio, provoca la ruptura de las membranas, produciéndose la liberación de antocianinas observadas, que es lo que se observa en esta investigación, para el tratamiento de congelación.

En la Tabla 4-9 se detallan los valores de la concentración de antocianinas al comienzo y final de la fermentación alcohólica. Los pre-tratamientos que tuvieron un mayor efecto fueron los de Congelación y Congelación con radiación UV, que entre sí, tienen prácticamente el mismo efecto. Los pre-tratamientos de molienda y secado de orujo, producen un aumento en la concentración, pero en menor medida y similares entre sí.

Tabla 4-9: Valores de concentración de antocianinas monoméricas a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	**MA [mg C3G/L] 0 [h]**	**MA[mg C3G/L] 161[h]**
Control	32	33
Molienda	84	87
Secado	93	95
Congelación	158	179
Congelación y radiación UV	144	163

4.2.4 Actividad Antioxidante

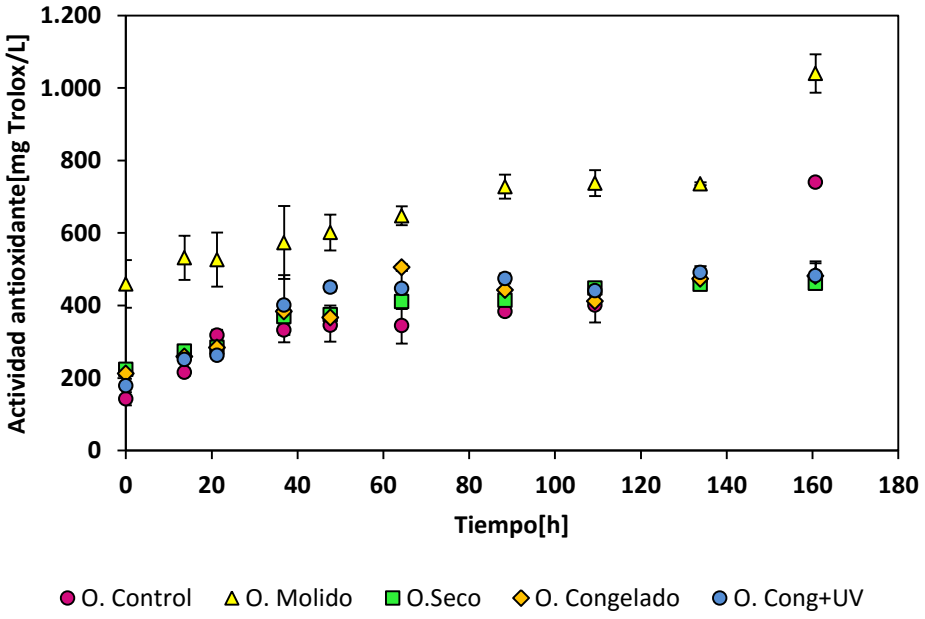

Figura 4-9: Variación de la actividad antioxidante para las fermentaciones con tratamiento de orujo

Para la medición de la actividad antioxidante mostrada en la Figura 4-9 se puede observar una tendencia similar a los resultados obtenidos con las mediciones de polifenoles totales y flavonoides totales. El único tratamiento que produjo un aumento en la actividad antioxidante durante el proceso de fermentación fue el de molienda de orujo (40% mayor). Para el resto de las fermentaciones con tratamientos no se observa diferencia alguna con la fermentación control. Los valores obtenidos para cuantificar la actividad antioxidante están dentro del rango esperable descrito por (Fernández-Pachón et al., 2004) para el Cabernet Sauvignon (200-3500[mg Trolox/L]) y se detallan en la Tabla 4-10.

Tabla 4-10: Valores de Actividad Antioxidante a las 0 y 160[h]

Pre- Tratamiento Orujo	AA [mg Trolox/L] 0 [h]	AA[mg Trolox/L] 161[h]
Control	142	740
Molienda	460	1.040
Secado	224	461
Congelación	212	482
Congelación y radiación UV	178	483

De la Figura 4-6 y la Figura 4-7 se observa que el contenido de polifenoles totales y flavonoides totales tiene relación con la actividad antioxidante de la muestra, es decir, al aumentar la concentración de polifenoles totales o flavonoides totales, se produce un aumento en la actividad antioxidante, esto concuerda con lo observado por (Fernández-Pachón et al., 2004; Panceri et al., 2015). Para la concentración de antocianinas monoméricas no aplica esta relación. Lo anterior coincide con el estudio de (Li et al., 2009), que plantea que la concentración de polifenoles totales y flavonoides totales están fuertemente correlacionadas con la actividad antioxidante medida por el método empleado en esta investigación. El mismo estudio determina también que la correlación entre monómeros de antocianinas y actividad antioxidante es mucho más débil, lo que coincide con lo observado en este estudio. Los monómeros de antocianinas pueden reaccionar con metabolitos de la fermentación o bien con otros polifenoles (Di Majo et al., 2008; Ivanova-Petropulos et al., 2015). Estas reacciones generan pigmentos derivados de antocianinas, compuestos que juegan un rol importante en la estabilización del color del vino. Los compuestos fenólicos que participan en las reacciones de pigmentación son los ácidos hidrocinámicos, flavanoles y flavonoles (Ivanova-Petropulos et al., 2015). Los compuestos formados en las reacciones de co-pigmentación influyen en la actividad antioxidante(Di Majo et al., 2008; Sacchi et al., 2005), si bien en la presente investigación se observa un efecto considerable en la concentración de antocianinas, la actividad antioxidante se ve inalterada en comparación a la fermentación control, esto puede ser explicado, por los efectos combinados de las reacciones que se producen durante la fermentación que tienen un efecto nulo en la medición de la actividad antioxidante (Sacchi et al., 2005).

5 CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De la investigación realizada se concluye que la aplicación de los tratamientos propuestos, si afectan la microestructura celular del orujo. Lo anterior se comprobó con la alta liberación de antocianinas monoméricas en las fermentaciones con orujo tratado, en comparación con la fermentación sin tratamiento.

En la medición de polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante, el único pre-tratamiento que tuvo un efecto significativo fue la molienda del orujo. Los valores para las variables medidas se relacionan principalmente con el hecho de que dicho tratamiento tuvo un efecto considerable sobre las pepas de la uva, las cuales contienen un 65% de los compuestos fenólicos, y al disminuir su tamaño de partícula, se obtiene una mayor extracción de compuestos fenólicos, sin considerar a las antocianinas. Para el resto de los tratamientos, se puede inferir que las células de las pepas fueron afectadas en menor medida.

Con los resultados obtenidos con las mediciones de polifenoles totales, flavonoides totales, antocianinas monoméricas y actividad antioxidante, se comprueba lo planteado por diversos estudios, la concentración de polifenoles totales y flavonoides totales, se relaciona con la actividad antioxidante. Dichos estudios plantean de igual manera, la débil correlación que existe entre la concentración de antocianinas con la actividad antioxidante, lo cual se pudo observar claramente con los datos presentados.

El único efecto observado, del pre-tratamiento de orujo, sobre las variables de la evolución de la fermentación, fue que para los tratamientos de orujo control y orujo molido, la concentración inicial de nitrógeno asimilable registrada fue menor a la concentración inicial del mosto con orujo seco, congelado y congelado con radiación UV. Lo anterior se atribuye a la utilización de jugo de uva fresca, para los dos primeros, y jugo congelado para los tres restantes. Se infiere que la congelación afectó la estructura de las células de la pulpa, promoviendo la liberación de aminoácidos, lo que fue detectado con el aumento en la concentración de nitrógeno asimilable.

Dicho aumento provocó una etapa de adaptación menor para la población de levadura, y por lo tanto, una fermentación que duró menos, lo cual se vio reflejado en las mediciones de densidad, sólidos solubles, turbidez y acidez total. El fenómeno observado no influyó en la medición de polifenoles y actividad antioxidante.

5.2 Recomendaciones

- Complementar la investigación con un monitoreo de la microestructura celular, para determinar el efecto del nivel de destrucción de las células sobre la medición de las variables medidas.
- Complementar la investigación con metodologías más específicas para la determinación de compuestos fenólicos utilizando cromatografía de líquido y así determinar el efecto de la concentración de estos en los fenómenos observados.
- Utilizar métodos disponibles para la medición de la actividad antioxidante, que se basan en distintos fenómenos, con la finalidad de complementar la investigación (ABTS, FRAP, ORAC, entre otras).
- Determinar el contenido de polifenoles que tiene la uva a utilizar inicialmente, para así determinar el nivel de extracción que existe para fermentaciones con o sin tratamientos.
- Evaluar nuevamente el efecto de someter el orujo a radiación UV, pero sin someter este a una congelación previa.

6 ANEXOS

6.1 Protocolo de fermentación

A continuación se detalla el protocolo para llevar a cabo las fermentaciones en el laboratorio de bioreactores:

- **Preparación de materiales**
  El material de vidrio a ocupar se debe esterilizar en un Autoclave por 15 minutos a 121°C . Y el material de plástico se esteriliza con una solución de Metabisulfito de potasio (100 g/l), esta solución se emplea por su función antioxidante y antiséptica en contra de las levaduras y bacterias no deseadas.

- **Acondicionamiento del mosto de uva**
  Sulfitado: El sulfitado se utiliza como antioxidante y antiséptico. Se añade principalmente para el control de bacterias que puedan perjudicar la producción del vino. Se ajusta adicionando metabisulfito de potasio y ajustando la cantidad de SO2 libre a 30 ppm o superior.

  Ajuste de Nitrógeno*:* El nitrógeno se ajusta adicionando una cantidad superior a los 150 [mg/l] de YAN para proveer a las levaduras de nutriente para su síntesis y crecimiento. El ajuste, por lo general en la industria, se hace con fosfato diamónico (DAP). Cuando comienza la fermentación este nutriente se agota, por lo que se suele añadir nuevamente para que la fermentación termine correctamente.

  Ajuste de pH*:* El pH se ajusta a 3,45. Este ajuste se hace con soluciones de Ácido Tartárico, para bajar el pH, y con Carbonato de Potasio, para subir el pH.

- **Preparación del inóculo**
  Se toman 4 [g] de levadura y se agregan a un mezcla de 20[mL] de mosto y 20 [m] de agua destilada que se mantenga en el rango 35- 40°C. Una vez adicionada la levadura se agita a los 5 minutos, luego a los 15 minutos y finalmente se deja reposar hasta completar 30 minutos. Finalizando el tiempo de activación (30 minutos) se deja enfriar la mezcla.

- **Inoculación de la levadura**

Previo a inocular la levadura se debe verificar que la diferencia de temperatura entre la levadura y el mosto dentro del fermentador sea inferior a 5°C. Posteriormente se adiciona la levadura reactivada y en las condiciones del mosto en el fermentador. Se debe agregar un inóculo de 0,05 g/ de levadura.

- **Fermentación**

  La fermentación comienza una vez que ha entrado en contacto la levadura con el mosto en los fermentadores. Los parámetros operacionales deben mantenerse en los rangos de trabajo por lo que deben ajustarse si no se posee control automático de ellos.

  Por lo general, en una fermentación normal empezando con una concentración de entre 22 a 24 ºBrix, equivalente a un rango entre 220 a 240 [g/l] de azúcar total inicial, la completa fermentación alcohólica se produce cuando los azucares residuales fermentables en el vino deben llegan a ser menos de 2 [g/l].

6.2 Cálculo de Acidez Total

Al titular la muestra de mosto con hidróxido de sodio, se registra el volumen gastado para llegar a pH 7 y se calcula la acidez total [g de ácido tartárico/L mosto] como sigue:

$$C_{acidez} = \frac{V_{NaOH} * C_{NaOH}}{V_{muestra}} * \frac{PM_1}{n_H} * \frac{PM_2/2}{PM_1/2}$$

Donde,

C_{acidez} : Concentración de acidez total [g ácido tartárico/L mosto]

V_{NaOH}: Volumen de solución Hidróxido de sodio gastados en la titulación [mL]

C_{NaOH}: Concentración de la solución de hidróxido de sodio [M]

$V_{Muestra}$: Volumen de muestra (3 [mL])

PM_1: Peso molecular ácido sulfúrico [g/mol]

PM_2: Peso molecular ácido tartárico [g/mol]

n_H: Cantidad de moléculas de hidrógeno en el ácido sulfúrico [-]

6.3 Cálculo de la concentración de nitrógeno asimilable

Con el volumen gastado de hidróxido de sodio se calcula la concentración de nitrógeno como se muestra a continuación:

$$C_{YAN} = \frac{V_{NaOH} * C_{NaOH}}{V_{muestra}} * PM_1 * Conv$$

C_{YAN} : Concentración de nitrógeno asimilable por levadura [mg N/L]

V_{NaOH}: Volumen de solución Hidróxido de sodio gastados en la titulación [mL]

C_{NaOH}: Concentración de la solución de hidróxido de sodio [M]

$V_{Muestra}$: Volumen de muestra (3 [mL])

PM_1: Peso molecular nitrógeno [g/mol]

Conv: Conversión de mg a g: 1000[mg/g]

6.4 Proceso de secado de orujo

El orujo a secar se dispuso en una capa de alrededor de 0,5[cm] en la estufa y se secó a 50[°C] hasta obtener un peso constante. Para la medición de la masa se dispusieron 3 placas de petris a las cuales se les midió la masa en el tiempo.

Figura 6-1: Secado de orujo

A continuación se presenta el gráfico que registra el cambio en la humedad:

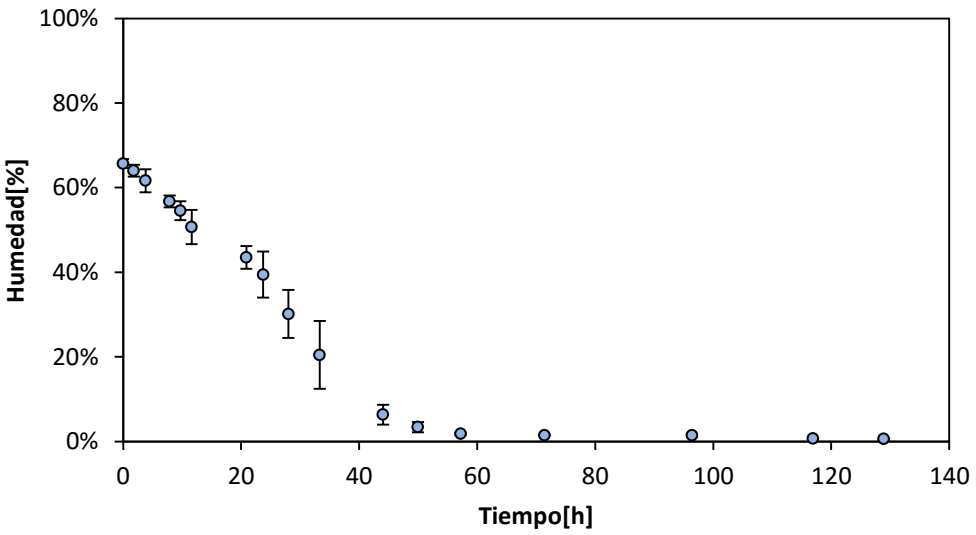

Figura 6-2: Variación de la humedad de orujo en el tiempo

Como se observa la humedad inicial era del 66%, y terminó siendo nula, por lo tanto, al orujo seco se le adiciona el 66% de su peso en agua para la rehidratación para luego llevar a cabo la fermentación.

6.5 Curva de Calibración Polifenoles Totales

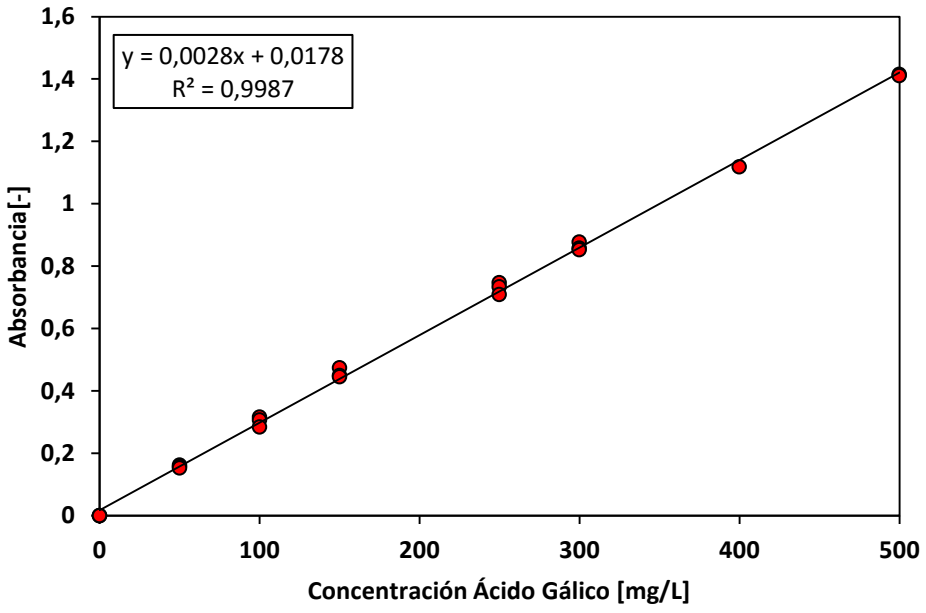

Figura 6-3: Curva de calibración polifenoles totales

Se hicieron soluciones de ácido gálico en agua destilada de concentraciones de 0 a 500 [mg/L], luego a cada solución se le aplicó el método de Folin Ciocalteau, y se midió las absorbancias para cada concentración y se construyó la curva de calibración que se muestra en la Figura 6-3

6.6 Curva de Calibración Flavonoides Totales

Se hace una solución de (+)-Catequina en metanol de 5 [g/L] y luego se hacen multiples diluciones en agua destilada para obtener concentraciones de 0 a 300 [mg/L], a las diluciones se les aplica el método descrito por (Feliciano et al., 2009) y con las absorbancias medidas se construye la curva de calibración mostrada en la Figura 6-4.

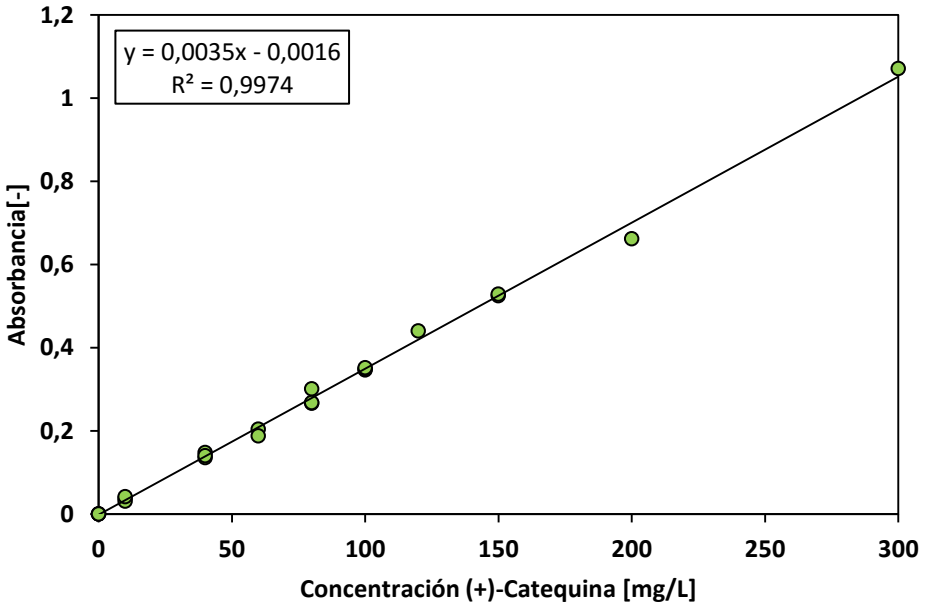

Figura 6-4: Curva de calibración Flavonoides Totales

6.7 Curva de Calibración Actividad Antioxidante

Para la construcción de la curva de calibración se utilizan soluciones con concentraciones de 0-120 [mg Trolox/L] en metanol. Las diluciones se mezclan con la solución de DPPH· y se les mide la absorbancia hasta que esta se haga constante.

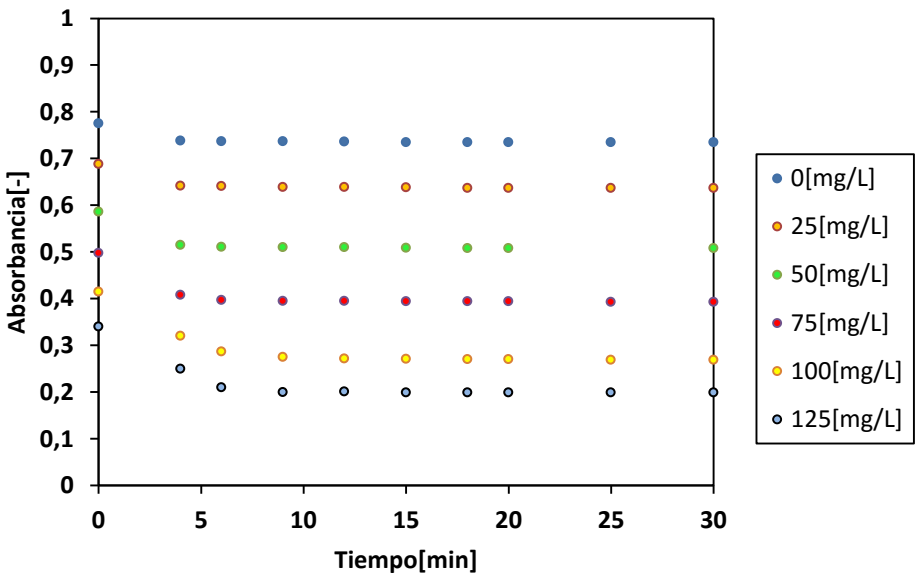

Figura 6-5: Absorbancia a distintas concentraciones de Trolox [mg/L]

Luego se calcula el porcentaje de reducción de DPPH· (a los 30 minutos)como sigue:

$$\%Reducción\ DPPH = \frac{A_{\sin trolox} - A_{trolox}}{A_{\sin trolox}} * 100\%$$

Se obtiene el porcentaje de reducción para cada concentración de trolox y se construye la curva de calibración

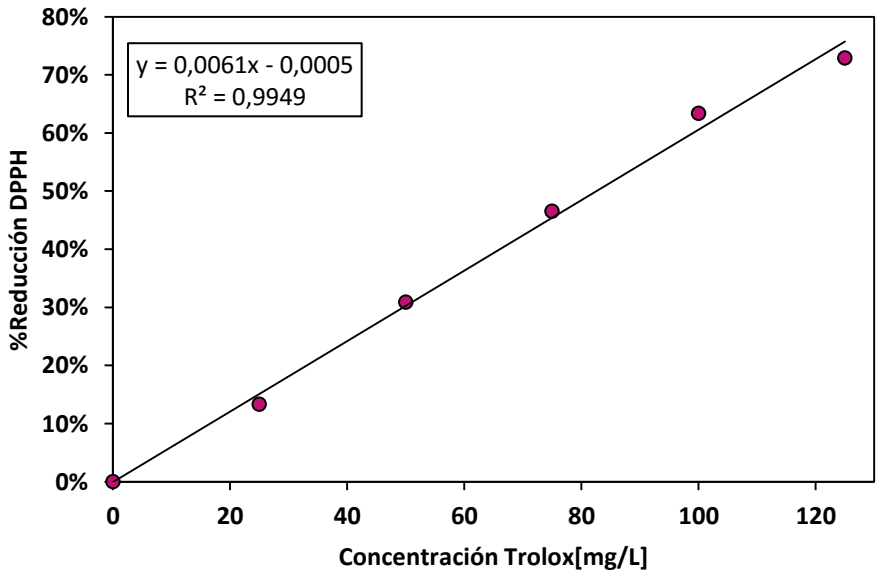

Figura 6-6: Curva de calibración actividad antioxidante

6.8 Tablas de resultados

Tabla 6-1: Variación contenido de polifenoles totales en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Polifenoles Totales [mg AG/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	610	914	614	578	535
14	680	1.439	759	719	677
21	729	1.407	857	761	760
37	791	1.725	973	892	832
48	919	1.707	970	832	881
64	830	1.741	991	964	991
88	891	1.917	1.099	1.071	1.079
109	1.007	1.867	1.147	1.045	1.036
134	1.124	1.975	1.151	1.090	1.062
161	1.161	1.945	1.257	1.073	1.089
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	7,6	170,9	0,8	19,4	24,4
14	43,8	197,8	8,4	42,1	21,9
21	45,5	142,3	11,8	48,8	0,8
37	40,4	236,5	8,4	73,2	1,7
48	21,9	58,9	25,3	84,2	2,5
64	31,1	63,1	12,6	77,4	27,8
88	97,6	129,6	10,9	77,4	48,0
109	237,4	157,4	10,9	60,6	73,2
134	229,8	170,9	45,5	28,6	42,9
161	80,0	101,0	36,2	51,3	67,3

Tabla 6-2: Variación contenido de flavonoides totales en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Flavonoides Totales[mg Catequina/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	125	229	175	153	154
14	199	342	194	207	149
21	193	435	221	197	194
37	213	588	275	269	245
48	268	559	304	276	313
64	248	655	327	305	343
88	313	698	375	378	392
109	362	743	407	382	418
134	378	667	437	412	422
161	476	820	442	429	462
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	0,4	66,9	6,7	9,1	7,7
14	12,4	59,9	0,3	10,8	12,8
21	15,9	45,8	6,4	1,3	8,1
37	14,8	56,6	2,7	19,9	0,0
48	18,2	21,2	11,8	28,6	3,0
64	8,1	20,5	13,5	13,8	17,8
88	35,0	34,7	18,9	18,2	21,2
109	106,7	44,4	3,7	19,9	20,5
134	81,8	22,2	11,1	14,8	28,6
161	50,5	70,7	4,0	0,3	38,0

Tabla 6-3: Variación contenido de antocianinas en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Antocianinas [mg C3G/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	32	84	93	158	144
14	69	208	89	191	176
21	92	116	82	186	179
37	52	120	97	199	184
48	51	112	99	191	201
64	44	104	94	200	210
88	44	100	99	199	193
109	41	99	103	179	173
134	38	91	100	179	168
161	33	88	95	179	163
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	3,5	15,2	0,2	6,6	0,2
14	6,3	35,8	6,1	10,6	4,3
21	3,6	12,5	5,8	10,1	0,6
37	0,1	22,5	7,4	14,6	4,4
48	1,1	14,8	6,1	20,4	5,3
64	0,5	6,8	1,7	18,2	6,5
88	2,1	14,0	7,8	21,0	0,0
109	0,0	13,9	3,4	13,8	0,4
134	0,1	12,7	11,9	14,5	0,0
161	2,1	12,1	9,1	26,0	1,8

Tabla 6-4: Variación capacidad antioxidante en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Actividad Antioxidante [mg Trolox/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	142	460	224	212	178
14	216	531	274	259	252
21	319	527	285	284	263
37	333	574	370	384	402
48	345	602	375	367	451
64	344	648	411	505	448
88	384	728	414	443	475
109	401	738	448	412	441
134	471	735	459	474	491
161	740	1040	461	482	483
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	18,2	65,7	2,2	14,4	5,4
14	10,6	60,6	1,7	11,8	3,4
21	14,1	74,3	9,3	28,2	10,5
37	34,5	100,3	19,7	7,6	82,6
48	45,2	49,4	2,0	32,8	12,2
64	49,6	25,8	20,3	9,6	48,7
88	1,3	33,4	8,2	34,8	13,6
109	47,6	35,5	2,8	21,2	14,2
134	4,0	4,0	12,3	22,8	17,2
161	0,4	53,0	7,8	34,6	39,1

Tabla 6-5: Variación de densidad en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Densidad [g/mL]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	1,0849	1,0844	1,0865	1,0937	1,0946
14	1,0806	1,0855	1,0824	1,0869	1,0870
21	1,0805	1,0828	1,0607	1,0652	1,0648
37	1,0649	1,0636	1,0133	1,0184	1,0206
48	1,0471	1,0464	0,9967	1,0030	1,0024
64	1,0230	1,0241	0,9969	1,0014	0,9995
88	1,0039	1,0015	0,9955	0,9990	0,9991
109	0,9933	0,9930	0,9955	0,9982	0,9988
134	0,9936	0,9941	0,9954	0,9980	0,9987
161	0,9934	0,9921	0,9954	0,9979	0,9986
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	0,0005	0,0075	0,0004	0,0008	0,0005
14	0,0008	0,0065	0,0002	0,0004	0,0004
21	0,0006	0,0017	0,0024	0,0002	0,0002
37	0,0081	0,0051	0,0043	0,0027	0,0009
48	0,0042	0,0073	0,0009	0,0025	0,0009
64	0,0021	0,0080	0,0012	0,0011	0,0001
88	0,0030	0,0065	0,0024	0,0001	0,0005
109	0,0002	0,0024	0,0027	0,0001	0,0007
134	0,0017	0,0015	0,0026	0,0001	0,0005
161	0,0009	0,0012	0,0021	0,0000	0,0007

Tabla 6-6: Variación de sólidos solubles en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Sólidos Solubles[°Brix]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	21,3	22,0	21,7	21,5	22,0
14	20,7	21,5	21,4	20,7	20,9
21	19,9	20,8	17,6	16,9	17,2
37	17,5	18,1	9,8	9,3	10,1
48	15,2	15,7	7,2	6,8	6,9
64	11,6	11,8	6,7	6,6	6,7
88	8,6	9,0	6,7	6,7	6,7
109	7,0	7,6	6,6	6,8	6,8
134	6,5	7,2	6,6	6,8	6,8
161	6,4	7,3	6,5	6,6	6,7
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	0,49	0,78	0,04	0,04	0,11
14	0,07	0,67	0,04	0,11	0,18
21	0,18	0,92	0,07	0,21	0,28
37	0,04	1,27	0,39	0,42	0,00
48	0,28	0,92	0,53	0,21	0,04
64	0,42	1,27	0,07	0,04	0,00
88	0,25	1,41	0,21	0,07	0,00
109	0,07	0,57	0,28	0,04	0,11
134	0,04	0,28	0,28	0,04	0,04
161	0,14	0,28	0,04	0,07	0,00

Tabla 6-7: Variación de turbidez en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Turbidez [NTU]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	2.928	3.243	2.835	3.220	3.315
14	2.640	4.003	3.045	3.645	3.820
21	4.368	5.340	4.253	4.893	4.470
37	4.795	6.230	7.630	7.535	7.203
48	4.655	5.740	8.198	8.783	8.448
64	4.735	7.840	9.683	8.313	7.925
88	4.540	4.705	9.888	9.705	9.368
109	5.595	4.915	11.925	11.375	11.025
134	8.360	8.120	11.275	11.500	10.675
161	6.965	5.715	11.425	11.325	10.875
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	180	95	106	325	417
14	304	39	92	290	339
21	187	247	110	286	304
37	21	113	1.259	134	979
48	21	1.004	1.354	689	301
64	346	269	873	781	375
88	311	530	95	629	230
109	2.242	78	1.096	955	318
134	849	1.669	742	566	35
161	1.549	78	884	672	389

Tabla 6-8: Variación de concentración de nitrógeno (YAN) en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Concentración Nitrógeno[mg YAN/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	226	219	238	235	242
14	136	151	178	154	154
21	153	144	75	70	68
37	127	136	72	70	73
48	75	105	64	62	70
64	75	81	72	64	64
88	59	75	79	84	77
109	63	79	97	95	88
134	68	77	94	94	83
161	60	81	94	88	84
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	2,60	2,60	0,00	0,00	5,19
14	5,21	5,21	18,16	0,00	0,00
21	2,60	15,62	2,59	5,19	7,78
37	18,22	15,62	2,59	0,00	5,19
48	10,59	18,22	7,78	10,37	0,00
64	0,00	0,00	2,59	2,59	2,59
88	5,21	2,60	2,59	5,19	5,19
109	5,21	2,60	2,59	5,19	15,56
134	2,60	5,21	2,59	2,59	12,97
161	0,00	5,21	7,78	5,19	10,37

Tabla 6-9: : Variación de acidez total en fermentaciones con distintos tratamientos de orujo

Acidez Total [mg Ác. Tart/L]					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	4,23	5,41	6,58	6,69	6,83
14	5,65	6,15	7,49	7,49	7,44
21	8,21	7,37	9,07	9,01	9,05
37	8,48	7,53	9,54	9,49	9,26
48	7,11	6,88	9,29	9,70	9,38
64	7,48	7,21	11,04	9,52	9,36
88	7,34	6,98	10,35	10,19	10,01
109	7,31	7,31	11,51	11,53	11,04
134	8,78	7,65	11,53	11,55	11,27
161	7,97	7,74	11,46	11,51	11,33
Desviación Estándar					
Tiempo[h]	**Control**	**Molido**	**Seco**	**Congelado**	**Cong+UV**
0	0,21	0,32	0,50	0,18	0,24
14	0,15	0,06	0,00	0,00	0,24
21	2,18	0,49	0,63	0,51	0,57
37	0,18	0,49	0,36	0,10	0,13
48	0,52	0,31	0,33	0,07	0,18
64	0,06	0,15	0,31	0,26	0,32
88	1,74	0,11	0,26	0,15	0,21
109	0,40	0,35	0,06	0,14	0,44
134	0,84	0,73	0,03	0,06	0,18
161	0,03	0,24	0,03	0,07	0,15

REFERENCIAS

Abramovic, H., Kosmerl, T., Poklar Ulrih, N., Cigic, B., 2015. Contribution of SO2 to antioxidant potential of white wine. Food chemistry 174, 147–153.

Alonso, Á.M., Castro, R., Rodríguez, M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., 2004. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. Food Research International 37 (7), 715–721.

Anselm, E., Chataigneau, M., Ndiaye, M., Chataigneau, T., Schini-Kerth, V.B., 2007. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. Cardiovascular research 73 (2), 404–413.

Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J Amer Oil Chem Soc 75 (2), 199–212.

Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Bukarica, L.G., Bursać, M., Cvejić, J., 2012. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. Food chemistry 131 (2), 513–518.

Baderschneider, B., Winterhalter, P., 2001. Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem. 49 (6), 2788–2798.

Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., Guillamon, J.M., 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. Journal of agricultural and food chemistry 53 (4), 996–1002.

Berli, F.J., Fanzone, M., Piccoli, P., Bottini, R., 2011. Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of Vitis vinifera L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. Journal of agricultural and food chemistry 59 (9), 4874–4884.

Bianchini, F., Vainio, H., 2003. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP) 12 (5), 417–425.

Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Balta-Brouma, K., Lymperopoulou, T., Oreopoulou, V., 2015. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. Food chemistry 178, 164–171.

Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A., 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol. Cardiovascular drug reviews 22 (3), 169–188.

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

Cai, J., Zhu, B.-Q., Wang, Y.-H., Lu, L., Lan, Y.-B., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2014. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. Food chemistry 154, 217–229.

Castilhos, M.B. de, Garcia Maia, J.D., Gómez-Alonso, S., Del Bianchi, V.L., Hermosín-Gutiérrez, I., 2016. Sensory acceptance drivers of pre-fermentation dehydration and submerged cap red wines produced from Vitis labrusca hybrid grapes. LWT - Food Science and Technology 69, 82–90.

Delanoë, D., Maillard, C., Maisondieu, D., 2003. El vino: Del análisis a la elaboración. Acribia, Zaragoza.

Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F., 1999. Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences 18 (4), 547–575.

Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M., 2008. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. Food chemistry 111 (1), 45–49.

Dowling, J., 2012. *Cámara Chilena Norteamericana de Comercio.* [En línea]
Available at: http://www.amchamchile.cl
[Último acceso: 07 Julio 2016].

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews 82 (1), 47–95.

El Darra, N., Turk, M.F., Ducasse, M.-A., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E., 2016. Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. Food chemistry 194, 944–950.

Fang, F., Li, J.-M., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q.-H., Huang, W.-D., 2008. Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. Food Research International 41 (1), 53–60.

Feliciano, R.P., Bravo, M.N., Pires, M.M., Serra, A.T., Duarte, C.M., Boas, L.V., Bronze, M.R., 2009. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal. Food Anal. Methods 2 (2), 149–161.

Fernández-Pachón, M., Villaño, D., García-Parrilla, M., Troncoso, A., 2004. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. Analytica chimica acta 513 (1), 113–118.

Garaguso, I., Nardini, M., 2015. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. Food chemistry 179, 336–342.

Garrido, J., Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. Food Research International 54 (2), 1844–1858.

Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J.I., Martínez-Cutillas, A., Gómez-Plaza, E., 2009. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. Eur Food Res Technol 228 (5), 777–788.

Godic, A., Poljsak, B., Adamic, M., Dahmane, R., 2014. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. Oxidative medicine and cellular longevity 2014, 860479.

Grainger, K., Tattersall, H., 2005. Wine production: Vine to bottle. Blackwell Pub, Oxford, Ames, Iowa, 130 pp.

Green, S.J., Mellouk, S., Hoffman, S.L., Meltzer, M.S., Nacy, C.A., 1990. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: Cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from l-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunology Letters 25 (1-3), 15–19.

Gupta, S., Padole, R., Variyar, P.S., Sharma, A., 2015. Influence of radiation processing of grapes on wine quality. Radiation Physics and Chemistry 111, 46–56.

Gutteridge, J.M., 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Free radical research communications 19 (3), 141–158.

Gutteridge, J.M., 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chemico-biological interactions 91 (2-3), 133–140.

Halliwell, B., 1993. The chemistry of free radicals. Toxicology and industrial health 9 (1-2), 1–21.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? The Journal of laboratory and clinical medicine 119 (6), 598–620.

Heinonen, M., Rein, D., Satué-Gracia, M.T., Huang, S.-W., German, J.B., Frankel, E.N., 1998. Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin−Liposome Oxidation System. J. Agric. Food Chem. 46 (3), 917–922.

HERNANDEZ-ORTE, P., BELY, M., CACHO, J., FERREIRA, V., 2006. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different Saccharomyces cerevisiae strains during fermentation in controlled synthetic media. Aust J Grape Wine Res 12 (2), 150–160.

Hidalgo, L., Hidalgo Togores, J., 2011. Tratado de viticultura, 4ª ed., rev. y amp ed. Mundi-Prensa, Madrid, México.

Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K., 2009. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (Vitis aestivalis) and Cabernet Franc (Vitis vinifera) wine grapes. LWT - Food Science and Technology 42 (7), 1269–1274.

Hosu, A., Cristea, V.-M., Cimpoiu, C., 2014. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. Food chemistry 150, 113–118.

Hou, Y.C., Janczuk, A., Wang, P.G., 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors. Current pharmaceutical design 5 (6), 417–441.

Hsu, Y.-L., Liang, H.-L., Hung, C.-H., Kuo, P.-L., 2009. Syringetin, a flavonoid derivative in grape and wine, induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. Molecular nutrition & food research 53 (11), 1452–1461.

ITC, 2016. *Trade Map: Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas.* [En línea] Available at: http://www.trademap.org
[Último acceso: 07 Julio 2016].

Ivanova-Petropulos, V., Hermosín-Gutiérrez, I., Boros, B., Stefova, M., Stafilov, T., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Kilár, F., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. Journal of Food Composition and Analysis 41, 1–14.

Jiang, B., Xi, Z., Luo, M., Zhang, Z., 2013. Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. Food Research International 51 (2), 482–489.

Kallithraka, S., Salacha, M.I., Tzourou, I., 2009. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. Food chemistry 113 (2), 500–505.

Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J.E., 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. J. Agric. Food Chem. 42 (1), 64–69.

KELEBEK, H., CANBAS, A., CABAROGLU, T., SELLI, S., 2007. Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes. Food chemistry 105 (1), 334–339.

Lacroix, M., Ouattara, B., 2000. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products — a review. Food Research International 33 (9), 719–724.

Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P.-L., 2001. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. J. Agric. Food Chem. 49 (7), 3341–3348.

Lea, A.G.H., Piggott, J.R., 2003. Fermented beverage production, 2nd ed. ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, xxii, 423.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International 88 (5), 1269–1278.

Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., Wang, H., 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. Food chemistry 112 (2), 454–460.

LIU, C.-h., CAI, L.-y., LU, X.-y., HAN, X.-x., YING, T.-j., 2012. Effect of Postharvest UV-C Irradiation on Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Tomato Fruit During Storage. Journal of Integrative Agriculture 11 (1), 159–165.

Lopez-Alarcon, C., Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. Analytica chimica acta 763, 1–10.

Lunte, S.M., Blankenship, K.D., Read, S.A., 1988. Detection and identification of procyanidins and flavanols in wine by dual-electrode liquid chromatography-electrochemistry. Analyst 113 (1), 99.

Moreno-Arribas, M.V. (Ed.), 2009. Wine Chemistry and Biochemistry. Springer New York, New York, NY.

Moreno-Perez, A., Vila-Lopez, R., Fernandez-Fernandez, J.I., Martinez-Cutillas, A., Gil-Munoz, R., 2013. Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. Food chemistry 139 (1-4), 770–776.

Mulero, J., Martinez, G., Oliva, J., Cermeno, S., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Martinez-Cacha, A., Barba, A., 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. Food chemistry 180, 25–31.

Núñez-Olivera, E., Martínez-Abaigar, J., Tomás, R., Otero, S., Arróniz-Crespo, M., 2006. Physiological Effects of Solar Ultraviolet-B Exclusion on Two Cultivars of Vitis vinifera L. from La Rioja, Spain. Am J Enol Vitic. 57 (4), 441–448.

Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M.L., 2012. Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. LWT - Food Science and Technology 48 (1), 1–8.

Panceri, C.P., Gois, J.S. de, Borges, D.L., Bordignon-Luiz, M.T., 2015. Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. LWT - Food Science and Technology 63 (1), 228–235.

Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A., 2014. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? Oxidative medicine and cellular longevity 2014, 427318.

Pezzuto, J.M., 2008. Grapes and human health: a perspective. Journal of agricultural and food chemistry 56 (16), 6777–6784.

Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European journal of medicinal chemistry 97, 55–74.

Poljšak, B., Jamnik, P., Raspor, P., Pesti, M., 2011. Oxidation-Antioxidation-Reduction Processes in the Cell: Impacts of Environmental Pollution, in: Nriagu, J.O. (Ed.), Encyclopedia of environmental health. Elsevier Science, Amsterdam, London, pp. 300–306.

Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., Raso, J., 2010. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. Food chemistry 119 (3), 1063–1070.

Puiggros, F., Llopiz, N., Ardevol, A., Blade, C., Arola, L., Salvado, M.J., 2005. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. Journal of agricultural and food chemistry 53 (15), 6080–6086.

Pussa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., Raal, A., 2006. Survey of grapevine Vitis vinifera stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry 54 (20), 7488–7494.

Ramírez, C., Troncoso, E., Muñoz, J., Aguilera, J.M., 2011. Microstructure analysis on pre-treated apple slices and its effect on water release during air drying. Journal of Food Engineering 106 (3), 253–261.

Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. International journal of radiation biology 65 (1), 27–33.

Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O., 2005. A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. Am J Enol Vitic. 56 (3), 197–206.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition 45 (4), 287–306.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. Journal of Functional Foods 18, 820–897.

Song, J., Smart, R., Wang, H., Dambergs, B., Sparrow, A., Qian, M.C., 2015. Effect of grape bunch sunlight exposure and UV radiation on phenolics and volatile composition of Vitis vinifera L. cv. Pinot noir wine. Food chemistry 173, 424–431.

Stoclet, J.-C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.-H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B., 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. European journal of pharmacology 500 (1-3), 299–313.

Toda, S., 2011. Polyphenol Content and Antioxidant Effects in Herb Teas. CM 02 (01), 29–31.

Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients 2 (12), 1231–1246.

Wang, L., Sun, X., Li, F., Yu, D., Liu, X., Huang, W., Zhan, J., 2015. Dynamic changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity of mulberry wine during alcoholic fermentation. Journal of Functional Foods 18, 254–265.

White, C.R., Brock, T.A., Chang, L.Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A., 1994. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (3), 1044–1048.

Willett, W.C., 2006. The Mediterranean diet: science and practice. Public health nutrition 9 (1A), 105–110.

Zeng, X.A., Yu, S.J., Zhang, L., Chen, X.D., 2008. The effects of AC electric field on wine maturation. Innovative Food Science & Emerging Technologies 9 (4), 463–468.

Zoecklein, B.W., 2010. Wine analysis and production, [Nachdr. 2010] ed. Kluwer Academic, New York, 621 pp.