



**Aprovechamiento de subproductos  
de vinificación.  
Evaluación del potencial biológico  
de la semilla de uva.**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Marina Martos Garrido**

**Facultad de Farmacia**

**Universidad de Sevilla**





El Trabajo de Fin de Grado Experimental titulado ***“Aprovechamiento de subproductos de vinificación. Evaluación del potencial biológico de la semilla de uva”***, presentado por la alumna del Grado en Farmacia **Marina Martos Garrido**, ha sido realizado en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla) bajo la dirección de **Dña. María Luisa Escudero Gilete**, Profesora Titular de la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 15 de Junio de 2016



## RESUMEN

Las semillas procedentes de subproductos de vinificación de Pedro Ximénez pueden ser aprovechadas por su contenido en compuestos fenólicos y por sus propiedades bioactivas. En este estudio se ha evaluado el contenido medio en fenoles totales de los extractos de semillas mediante el método de Folin Ciocalteu (49,54 mg ácido gálico/ g semilla) y su capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS y FRAP (498,26 y 249,83  $\mu\text{mol}$  de Trolox (TE) por gramo de semilla, respectivamente). Los resultados obtenidos indican que estas semillas son una buena fuente natural de compuestos fenólicos y antioxidantes.

Por otro lado, se ha evaluado el efecto de añadir estas semillas en avanzado estado de maduración a la vinificación en tinto de Syrah (S1: adición de 450 gr, S2: adición de 900 gr), concretamente desde el inicio de la vinificación hasta el descube (una vez terminada la fermentación alcohólica). El comportamiento de la evolución del contenido fenólico ha sido diferente en los vinos con adición de semillas respecto al vino testigo (S0: sin adición de semillas). El vino con adición de 900 g (S2) presentó el mayor contenido en fenoles totales (2.541,00 mg/L) al final del proceso de vinificación, cuando el vino ya está estabilizado. En cuanto a la capacidad antioxidante, el vino con adición de 450 g de semillas (S1) obtuvo mejores resultados en los ensayos de ABTS y FRAP (1,73  $\mu\text{mol}$  TE/mL y 0,87  $\mu\text{mol}$  TE/mL) que el vino (S2). En ambos casos, la adición de semillas produjo en los vinos un aumento significativo de la capacidad antioxidante con respecto al vino testigo (S0).

Este estudio forma parte de un proyecto, donde además de la capacidad antioxidante se están evaluando otros parámetros que permitirán valorar el potencial biofuncional que aportan las semillas como coadyuvantes en el proceso de vinificación, con objeto de aprovechar este subproducto y mejorar la calidad de los vinos de las regiones de clima cálido.

PALABRAS CLAVE:

*semillas, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, vinificación, clima cálido*



# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	9
1.1.	Vid y uva .....	9
1.2.	La vinificación .....	11
1.3.	Polifenoles .....	12
1.4.	Capacidad antioxidante de los polifenoles .....	13
1.5.	Potencial biofuncional de subproductos de vinificación .....	14
2.	Objetivos .....	15
3.	Material y métodos .....	17
3.1.	Muestras.....	17
3.2.	Preparación de las muestras de semillas .....	18
3.3.	Materiales y reactivos .....	18
3.4.	Determinación de fenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu .....	19
3.4.1.	Fundamentos.....	19
3.4.2.	Procedimiento .....	19
3.5.	Estudio de la capacidad antioxidante: Método ABTS .....	20
3.5.1.	Fundamento .....	20
3.5.2.	Procedimiento .....	20
3.6.	Estudio de la capacidad antioxidante: Método FRAP .....	21
3.6.1.	Fundamento .....	21
3.6.2.	Procedimiento .....	22
3.7.	Análisis estadístico .....	23
4.	Resultados y discusión .....	23
4.1.	Análisis de semillas.....	23
4.2.	Análisis de vinos .....	24
4.2.1.	Fenoles totales .....	24
4.2.2.	Capacidad antioxidante.....	25
5.	Conclusiones.....	29
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	31



## 1. INTRODUCCIÓN

La vinificación en blanco genera una gran cantidad de residuos especialmente en las regiones de alta producción. La acumulación de estos residuos supone un problema medioambiental importante, para solucionarlo, tradicionalmente los subproductos de la vinificación son enviados a destilerías para la obtención de etanol o bien son utilizados como fertilizantes o biomasa. Pero para ello, requieren un tratamiento previo, lo cual representa un coste económico importante para la industria vitivinícola y solo una pequeña porción de estos residuos son reutilizados (*Fontana y cols., 2013; Jara-Palacios y cols., 2014; Bordiga, 2015; Teixeira y cols., 2014*). En línea con el movimiento que existe desde hace algunos años dirigido hacia un desarrollo más sostenible, resulta muy interesante la búsqueda de soluciones alternativas para la reutilización y revalorización de los subproductos de la vinificación (*Bordiga, 2015*). El principal subproducto de la industria vitivinícola es el orujo de uva, constituido por semillas, hollejos, raspones y restos de pulpa. El orujo de uva, se propone como una buena fuente de compuestos biofuncionales que pueden ser empleados para varios propósitos en la industria farmacéutica, alimentaria, nutracéutica y química.

### 1.1. Vid y uva

La vid es una planta termófila cultivada en las zonas templadas de prácticamente todo el mundo. Es un arbusto caducifolio que pertenece a la familia de las Vitáceas y al género *Vitis* L. La especie *Vitis vinifera* L., conocida como la vid europea, agrupa la mayoría de las variedades cultivadas, ya que presenta las mejores cualidades para la producción de vino (*Jara-palacios y cols., 2015*).

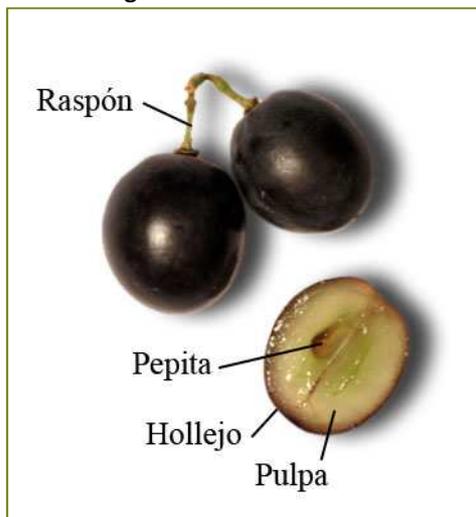
La uva es el fruto de la vid, y de forma general se clasifica como uva blanca o uva tinta, diferenciándose en la presencia o no de antocianos, compuestos responsables de la coloración de la piel u hollejo de la uva tinta. Se organizan en racimos, en los cuales se distinguen dos partes: parte leñosa o raspón y los frutos o bayas, unidos al raspón mediante los pedicelos.

El raspón presenta una alta concentración de polifenoles y agua, y una baja concentración de azúcares.

En la baya o fruto se distinguen principalmente tres partes: la pulpa, la semilla y el hollejo (Figura 1. **Partes de la uva**). La pulpa es la parte que ocupa más volumen y contiene principalmente agua y azúcares, y además contiene ácidos orgánicos, minerales y una pequeña parte de compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos. La semilla es la parte dura de la baya especialmente rica en ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoleico, 10-12%) y

polifenoles entre los que destacan los flavanoles (Tabla 1. **Composición de subproductos de la uva** (Nerantzis y col., 2006)). Además contiene fibra, proteínas, azúcares y sales minerales. El hollejo es la capa que envuelve al fruto y lo protege gracias a una sustancia llamada pruina, es rico en polisacáridos y compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoles y antocianos en variedades tintas. Estos varían en función de la variedad y el grado de maduración de la uva (Jara-Palacios, 2015; Nerantzis y col.,2006).

**Figura 1.** Partes de la uva



**Tabla 1.** Composición de subproductos de la uva (Nerantzis y col., 2006)

**Composición de la semilla de uva**

<b>Semillas</b>	~ 3 % a 6 % del peso de uva
- <b>Azúcares</b>	~ 34-36%
- <b>Ácidos orgánicos</b>	~ 2-7%
- <b>Aceite de semilla</b>	~Ácidos grasos insaturados 12-17% (76% linoleico)
- <b>Polifenoles</b>	~4-6 % (60-70% de compuestos extraíbles de semilla)
- <b>Minerales</b>	~2-4%

## 1.2. La vinificación

La vinificación es el conjunto de operaciones llevadas a cabo para obtener el vino de la uva. Según el “Código Internacional de Prácticas Enológicas” de la Organización Internacional de la Viña y Vino (OIV), el vino es exclusivamente la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. Su graduación alcohólica no puede ser inferior a 8,5% vol. salvo legislación particular de determinadas regiones que tienen en cuenta condiciones climáticas, de variedad, factores cualitativos especiales o tradiciones, en cuyo caso el grado alcohólico podrá ser rebajado a 7% vol. (OIV, 2016).

La primera clasificación general de los vinos se hace en función de la uva de partida, tinta o blanca. Por otro lado, el proceso de vinificación varía según el vino a producir: la vinificación en blanco se realiza a partir del mosto, bien de uva blanca (vino blanco) o uva tinta (vino rosado), en ausencia de las partes sólidas de la uva; mientras que en la vinificación en tinto el mosto es macerado con los hollejos y semillas durante la fermentación.

La variedad de uva y el proceso de vinificación influyen en las características cualitativas y cuantitativas del vino, pero además de éstos, existen otros factores implicados.

Dentro de los factores determinantes de la producción vitícola, el clima de una determinada zona geográfica es posiblemente el que más influye en el tipo de vino que se produce, ya que condiciona las variedades y la calidad de la uva (Gordillo-Arrobas, 2012; Keller, 2015).

En la elaboración de los vinos tintos, el estado de maduración de las uvas es de importancia capital ya que el desarrollo adecuado de la fermentación dependerá del contenido de azúcares y ácidos de la uva, y el color y la capacidad de crianza de los vinos dependerán del contenido en compuestos fenólicos, en especial antocianos y taninos.

La calidad de las uvas tintas está relacionada con el contenido de compuestos fenólicos, responsables del color y la astringencia de los vinos (Borbón L. y cols., 2008). En la uva, estos compuestos se encuentran principalmente en las semillas y el hollejo, y su síntesis requiere de adecuadas condiciones climáticas. El ambiente y las condiciones de cultivo tienen efectos cuantitativos sobre los procesos de desarrollo y maduración de la baya y sobre la actividad del metabolismo secundario. Concretamente, la temperatura afecta directamente a la velocidad de reacciones enzimáticas y químicas y puede acelerar o ralentizar la síntesis o la degradación de distintos metabolitos. Este es el caso del ácido málico cuya metabolización se acelera con la temperatura, o de los azúcares cuya concentración en la baya aumenta por la deshidratación que provocan las altas temperaturas, lo que en conjunto resulta en vinos más

alcohólicos y desequilibrados en acidez. Para evitar estos efectos se tiende a adelantar la cosecha, como ocurre en zonas de clima cálido, con lo que se empobrece la madurez fenólica y aromática. La temperatura elevada también tiene un efecto negativo sobre la acumulación de pigmentos antocianicos reduciendo la intensidad del color del vino (Carbonell-Bejarano y col., 2016; Keller, 2015, Cejudo-Bastante y cols., 2016). Además, se puede ver reducida la actividad biológica de los vinos como consecuencia del empobrecimiento en compuestos fenólicos de la uva utilizada para la vinificación.

En las regiones de clima cálido, como es el caso de Andalucía y concretamente la D.O. Condado de Huelva, se enfrentan a estos inconvenientes en el cultivo de la vid y la elaboración de vinos de uva tinta.

### 1.3. Polifenoles

Los polifenoles constituyen un grupo de sustancias químicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal que se sintetizan como metabolitos secundarios y poseen distintas estructuras químicas y actividad biológica. Son producidos durante el crecimiento fisiológico de la planta y/o como respuesta a varias formas de estrés medioambiental (Jara-Palacios, 2015; Paladino, 2008). Estos compuestos juegan un importante papel en las propiedades nutricionales y sensoriales de diversas frutas y vegetales, ya que contribuyen al amargor, la astringencia, el color y la estabilidad, además presentan efectos beneficiosos para la salud humana en la prevención de enfermedades degenerativas y cáncer (Jara-Palacios, 2015; Rice-Evans y cols., 1997; Moreno-Montoro y cols., 2015; Cejudo-Bastante y cols., 2016). Los polifenoles están naturalmente presentes en prácticamente todos los materiales vegetales, cereales y frutas, así como sus derivados, tales como el vino y la sidra.



Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos

Según su estructura, los compuestos fenólicos se clasifican en compuestos flavonoides y no-flavonoides. Los flavonoides son todos aquellos cuyo esqueleto está formado por quince átomos de carbono, y dentro de estos encontramos cuatro grandes familias: flavanoles, flavonoles, flavonas y antocianos. Los no-flavonoides son el resto de polifenoles que no comparten estructura común, este grupo incluye fundamentalmente ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos y cinámicos, y estilbenos (Figura 2).

La cantidad y calidad de los polifenoles en la uva dependen sobre todo de la variedad, el clima, el terreno, las prácticas de cultivo y el grado de maduración (Keller, 2015).

Los componentes fenólicos constituyen el tercer componente más abundante en uvas después de carbohidratos y ácidos cítricos, y se encuentran principalmente en el hollejo (28-35%) y la semilla (60-70%), siendo los flavanoles más abundantes en el hollejo y los flavan-3-oles en semillas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Distribución de los principales polifenoles en uva blanca

	Hollejo	Semilla	Raspón	Pulpa
<b>Ácidos fenólicos</b>	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Flavanoles</b>	Sí	Sí	Sí	No
<b>Flavonoles</b>	Sí	A veces	A veces	No

#### 1.4. Capacidad antioxidante de los polifenoles

Los compuestos antioxidantes se definen como aquella sustancia que cuando se presenta en bajas concentraciones, comparada con el sustrato oxidable, disminuye o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato (Gutteridge y cols., 1994). En la oxidación existe una transferencia de electrones de una sustancia a otra que desemboca en múltiples reacciones en cadena produciendo radicales libres que ocasionen daño celular. Los compuestos antioxidantes interfieren en esta cadena de diferentes formas: mediante la captación directa de los radicales libres, oxidándose ellos mismos, formando compuestos peróxido con intermediarios, o bien, mediante modulación de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. (Antolovich, 2001).

Una de las propiedades más importantes que poseen los compuestos fenólicos es su gran actividad reductora. La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos

depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como del peso molecular (*Antolovich y cols., 2001; Rice-Evans y cols., 1997*).

### **1.5. Potencial biofuncional de subproductos de vinificación**

Los subproductos de la vinificación como el orujo de uva, formado por semillas, raspones, hollejos y restos de pulpa, son fuentes bien conocidas de compuestos antioxidantes (ácidos fenólicos, quercetinas, flavonoides, fitoalexinas, estilbenos, resveratrol, etc.), que contrarrestan efectos de grasas saturadas reduciendo la oxidación lipídica y reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Existe un creciente interés en el empleo de estos subproductos ricos en polifenoles procedentes de la industria vitivinícola para producir extractos y nuevos productos para el mantenimiento de la salud con propiedades anticancerígenas, antiaging, cardioprotectoras, etc. (*Fontana y cols., 2013; Jara-Palacios, 2015*). La extracción de polifenoles de materiales de desecho procedentes de prácticas industriales tradicionales representa una atractiva, sostenible y rentable fuente de componentes biofuncionales de alto valor biológico que pueden ser incorporados a alimentos (*Bordiga, 2015; Teixeira, 2014*).

Son muchas las investigaciones llevadas a cabo acerca de las posibilidades de estos productos: diversos estudios apuntan a la actividad antimicrobiana de los residuos de la vinificación y han evaluado su concentración mínima inhibitoria frente a diferentes microorganismos (*Jayaprakasha y cols., 2003; Anastasiadi y cols., 2012*); otros estudios apuntan hacia los potenciales usos del aceite de semilla de uva (*Nerantzis y col., 2006*). Pero sin duda la vía de investigación más desarrollada es sobre de su potencial antioxidante y sus posibles usos, por ejemplo en la industria alimentaria como antioxidantes naturales en sustitución de aditivos de origen sintético (*Fontana y cols., 2013*).

En este estudio se va a evaluar el contenido fenólico de semillas de uva y el efecto de la adición de éstas al vino como fuente natural de antioxidantes.

## 2. Objetivos

En este trabajo se va a estudiar la capacidad antioxidante de extractos de semillas de uva blanca mediante varios métodos analíticos, así como el resultado de utilizar en la vinificación de tinto semillas obtenidas de orujo de vinificación de Pedro Ximénez en avanzado estado de maduración.

- Revisión bibliográfica de los antecedentes y el estado actual de la materia
- Profundizar en la capacidad antioxidante de semillas procedentes de orujo de uva *Vitis vinifera* L. en un avanzado estado de maduración
- Evaluar el potencial biofuncional que aportan las semillas como coadyuvante en la vinificación para enriquecer la composición fenólica de los vinos tintos de regiones de clima cálido
- Valorar el potencial biofuncional que aportan las semillas como coadyuvantes en el proceso de vinificación, con objeto de aprovechar este subproducto y desarrollar una industria enológica más sostenible



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Muestras

Las muestras utilizadas para realizar los diferentes ensayos incluidos en este trabajo se describen a continuación.

En primer lugar, semillas obtenidas a partir de muestras de orujo de la campaña 2014 en el Condado de Huelva de la finca “La Aurora”. Las semillas pertenecen a la variedad de uva Pedro Ximénez (PX), que se vendimia con un elevado nivel de maduración. Las semillas fueron separadas de los hollejos y raspones, y congeladas.

En segundo lugar, se utilizaron muestras de vino tinto de la variedad Syrah de la campaña 2015 proporcionadas por la “Cooperativa Nuestra Señora del Socorro” (Rociana del Condado, España) y amparada por D.O. Condado de Huelva. Las muestras fueron obtenidas en diferentes momentos de la vinificación y de tres depósitos de acero inoxidable de 50L cada uno. Una vez recogidas las muestras de vino, se transportaron al laboratorio y fueron congeladas. El contenido de los depósitos correspondía a los siguientes ensayos:

- S0. Vino testigo. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah
- S1. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah y adición de 450 gr de semillas procedentes de orujo de vinificación de PX
- S2. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah y adición de 900 gr de semillas procedentes de orujo de vinificación de PX

Las semillas fueron añadidas desde el primer momento de la vinificación al mosto y se retiraron en el descube, tras la fermentación alcohólica.

De todas las muestras recogidas, se seleccionaron para el análisis las correspondientes a las etapas de descube (DC), previa a la fermentación maloláctica (PF), durante la fermentación maloláctica (ML), y durante la estabilización del vino (TR, V1, V2) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Fecha y etapa de vinificación a la que corresponde cada muestra

<b>Etapas de vinificación</b>		
<b>DC</b>	25/08/2015	Descube
<b>PF</b>	07/09/2015	Prefermentación maloláctica
<b>ML</b>	21/09/2015	Fermentación maloláctica
<b>TR</b>	01/10/2015	Vino estable. Trasiego
<b>V1</b>	11/11/2015	Vino estable
<b>V2</b>	19/01/2016	Vino estable

### 3.2. Preparación de las muestras de semillas

- **Liofilización y molienda**

Las muestras fueron secadas para eliminar el agua. El secado se realizó mediante liofilización durante 24 horas. Posteriormente éstas fueron molidas para obtener un polvo fino y homogéneo. La molienda se realizó con un molino de pulverizado modelo IKA A11-B (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Alemania), reproduciendo los tiempos de molturado (5 x 10 segundos).

- **Extracción**

Para la extracción de los compuestos fenólicos se tomaron 6 tubos Falcom, cada uno con aproximadamente 1 gramo de muestra liofilizada y molida, y se añadieron 5 mL de metanol al 75% a cada uno. La mezcla se agitó durante toda la noche en un agitador magnético modelo Vortex IKA Genios 3 (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Alemania) y a la mañana siguiente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido (extracto líquido) se recogió y el residuo sólido se sometió tres veces más a agitación magnética durante 45 minutos y a centrifugación. Finalmente los sobrenadantes se combinaron y el extracto líquido obtenido se congeló a -20 °C hasta su posterior análisis.

### 3.3. Materiales y reactivos

- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent<sup>®</sup> 8453
- Agitador Vortex IKA Genios 3 (IKA<sup>®</sup>, Staufen, Alemania)
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Cubeta de vidrio de 10 mm de camino óptico
- Cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico
- Micropipetas Eppendorf
- Matraces aforados de 10, 25, 50, 100, 500, 1000 mL
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España)
- Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) Sigma-Aldrich (Madrid, España)
- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) Sigma-Aldrich (Madrid, España)
- Tampón fosfato salino (PBS)

- Persulfato de potasio (Panreac, Barcelona, España)
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España)
- Diluciones de referencia de pH 4.00, 7.00, 9.00 y disolución de mantenimiento del electrodo del pH-metro (KCl, 3 M) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Solución HCl 40 mM
- TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Tricloruro de hierro (Panreac, Barcelona, España)
- Acetato de sodio trihidratado (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Ácido acético (Panreac, Barcelona, España)

### **3.4. Determinación de fenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu**

#### **3.4.1. Fundamentos**

Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3HW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) que se reduce en una mezcla de óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). Se produce una coloración azul con un máximo de absorbancia a 765 nm, que es proporcional a la cantidad de fenoles totales.

#### **3.4.2. Procedimiento**

El método se llevó a cabo según el protocolo de *Singleton y Rossi (1965)*, con algunas modificaciones. Se realizó una recta de calibrado a partir de 7 disoluciones patrón de ácido gálico de distintas concentraciones (0-1000 mg/L). Se tomaron 0.25 mL de cada disolución patrón de ácido gálico y se depositaron en un matraz de 25 mL. Se añadió agua destilada, se agitó y, seguidamente, se añadieron 1.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 3.75 mL de disolución de carbonato sódico al 20%. Se mezcló todo, se enrasó con agua destilada y la disolución se dejó reposar durante dos horas a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada disolución a 765 nm y en cubeta de 10 mm. Cada disolución se analizó por triplicado. Para el análisis de las muestras (con una dilución previa adecuada) se procedió igual que para las disoluciones patrón.

La recta de calibrado se construyó representando la absorbancia frente a la concentración. El valor de la absorbancia obtenido para cada muestra se llevó a la recta de

calibrado y, por interpolación, se calculó la cantidad de fenoles totales expresada en miligramos de ácido gálico por litro (mg/L); y, posteriormente, se calculó la cantidad de fenoles totales expresada como miligramos de ácido gálico por gramo de materia seca (mg/g), teniendo en cuenta el peso de muestra utilizado para la extracción.

### **3.5. Estudio de la capacidad antioxidante: Método ABTS**

#### **3.5.1. Fundamento**

El método ABTS mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para captar el radical coloreado  $ABTS^{*\cdot}$ , en un medio acuoso, convirtiéndolo en un producto decolorado. Se basa en la generación del radical catiónico  $ABTS^{*\cdot}$  por la oxidación de su precursor el ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenziltiazolina)sulfónico (ABTS) con persulfato potásico. Este radical, de coloración verde-azulada, es estable hasta 16 horas a baja temperatura y se caracteriza por su absorción a 734 nm. A este radical formado se añade el patrón antioxidante Trolox o la muestra y se mide el descenso de absorbancia producido, ya que la coloración desaparece al ser reducido el radical mediante antioxidantes.

#### **3.5.2. Procedimiento**

Se ha seguido el procedimiento descrito por *Re y cols.* (1999) con ligeras modificaciones. Se preparó una disolución madre de ABTS 7 mM en agua milliQ®. Para formar el catión radical, se preparó una disolución de persulfato potásico (2.45 mM), usando como disolvente la disolución madre de ABTS. Esta disolución se almacenó a temperatura ambiente durante 16 horas en ausencia de luz para la completa reacción del ABTS y el persulfato. Para preparar el reactivo de trabajo, la disolución fue diluida con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm.

Para la medida de las muestras, se añadió inicialmente 2 mL del reactivo (blanco) en una cubeta, y se midió su absorbancia a 734 nm. A continuación, se agregaron 50  $\mu$ L de la muestra y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de la absorbancia nuevamente a 734 nm. Cada muestra fue analizada en varias concentraciones, realizando 4 diluciones de cada una (1/100, 1/200, 1/400, 1/800). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Para obtener la recta de calibrado, se preparó una disolución madre de Trolox (1mM), y a partir de ésta se prepararon 6 disoluciones patrón de distinta concentración (0.031-1 mM).

Para la medida de la actividad antioxidante de estas disoluciones se procedió de la misma forma que con las muestras (Figura 3).



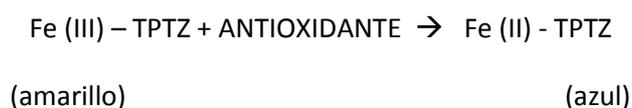
**Figura 3.** Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración y el reactivo ABTS.

La recta de calibrado se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración de las distintas disoluciones del patrón Trolox, y se calculó la pendiente de la recta. A continuación se representó la cantidad de muestra analizada frente a la absorbancia medida, obteniéndose así la pendiente de la recta de la muestra, que finalmente fue comparada con la pendiente obtenida para el patrón Trolox. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC: Trolox-equivalent antioxidant capacity, mmoles de Trolox con la misma actividad antioxidante que 100 g de muestra seca o mL de vino).

### **3.6. Estudio de la capacidad antioxidante: Método FRAP**

#### **3.6.1. Fundamento**

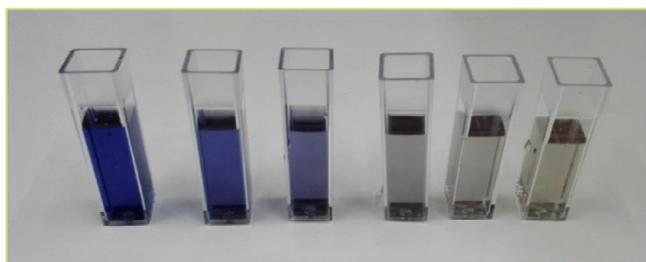
El método FRAP se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso en medio acuoso. Para ello se provoca una reacción por la adición del compuesto TPTZ (2,4,6 tripiridyl-s-triazina), que a pH ácido (pH=3.6) se une al ión ferroso formando un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm.



### 3.6.2. Procedimiento

Se ha seguido el procedimiento descrito por *Benzie y Strain* (1996) con ligeras modificaciones. Diariamente se preparó el reactivo de trabajo, que consistió en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH=3.6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM, y tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM en una proporción 10/1/1 (v/v/v). Para la medida del blanco se añadió 3 mL de este reactivo en una cubeta, y se midió su absorbancia a 593 nm. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación se realizó la lectura de la absorbancia a 593 nm, a la que se restó el valor del blanco. Cada muestra fue analizada en varias concentraciones (4 diluciones) y por duplicado.

Para construir la recta de calibrado, se preparó una disolución madre de Trolox (1mM), y a partir de ésta, se prepararon 6 disoluciones patrón de distinta concentración (0.031-1 mM). Para la medida de la actividad antioxidante de las disoluciones patrón se procedió de la misma forma que con las muestras. (Figura 4)



**Figura 4.** Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración, y el reactivo FRAP

La recta de calibrado se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración de las disoluciones del patrón Trolox, y se calculó la pendiente de la recta. A continuación, se representó la cantidad de muestra analizada frente a la absorbancia medida, obteniéndose así la pendiente de la recta de la muestra, que finalmente fue comparada con la pendiente obtenida para el patrón Trolox. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC: *Trolox-equivalent antioxidant capacity*, milimoles de Trolox con la misma actividad antioxidante que 100 g de muestra seca o mL de vino).

### 3.7. Análisis estadístico

El tratamiento de los datos se ha realizado con el paquete estadístico Statistica® v 8.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2007). Se ha aplicado el Análisis Múltiple de la Varianza para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre grupos (S0, S1 y S2), mediante el análisis de las medias de cada uno de los grupos. ANOVA es un análisis univariante (para una sola variable), mientras que MANOVA es multivariante (para más de una variable) (Norman y Streiner, 1996).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Análisis de semillas

Mediante el método Folin-Ciocalteu se determinó la cantidad de fenoles totales (FT) en los extractos de semilla expresada como miligramos de ácido gálico por gramo de materia seca (mg/g). La media de los seis extractos analizados fue 49,54 mg/g semilla.

A continuación, se evaluó la capacidad antioxidante por el método TEAC, por el cual se obtienen las pendientes de pérdida de absorbancia de ABTS<sup>•+</sup> en función del volumen de muestra utilizado, y se compararon con la obtenida con el patrón Trolox. Los resultados se expresan en micromoles de Trolox/g de producto seco. El resultado, tras el análisis de las seis muestras, fue 498,54  $\mu$ moles TE/g.

Por otro lado, también se evaluó la capacidad antioxidante por el método FRAP, por el cual se obtuvieron pendientes de ganancia de absorbancia en función del volumen de muestra utilizado, y se compararon con la obtenida con el patrón Trolox. El resultado, expresado en micromoles de Trolox/g de producto seco, fue 249,83  $\mu$ moles TE/g. En la Tabla 4 se muestran los resultados de los análisis de las muestras de semillas.

**Tabla 4.** Resultados ensayos para semillas. Cada valor representa la media (n=6)  $\pm$  desviación estándar

Variables	Semillas
Fenoles Totales (mg/g de semilla)	49,54 $\pm$ 5,47
ABTS ( $\mu$ moles TE/ g de semilla)	498,26 $\pm$ 89,16
FRAP ( $\mu$ moles TE/ g de semilla)	249,83 $\pm$ 62,69

La cantidad de fenoles obtenida supone alrededor del un 5% del peso total de la semilla, este resultado es similar al observado por *Jara-Palacios y cols.* (2014) en semillas de la variedad Zalema, con niveles de FT en torno a 65 mg/g de peso seco, aunque los valores de actividad antioxidante para los ensayos de ABTS y FRAP fueron más elevados (966,4  $\mu\text{mol/g}$  y 386,1  $\mu\text{mol/g}$  respectivamente). En otro estudio realizado de la variedad Malbec y con un disolvente de extracción diferente (etanol:agua, 50:50), se obtuvieron valores menores para los fenoles totales (42,2 mg/g) (*Antonelli, 2015*). No obstante, la comparación de resultados es difícil, ya que el contenido fenólico depende de variables tales como la variedad de uva o el estado de maduración de la semilla, entre otras.

## 4.2. Análisis de vinos

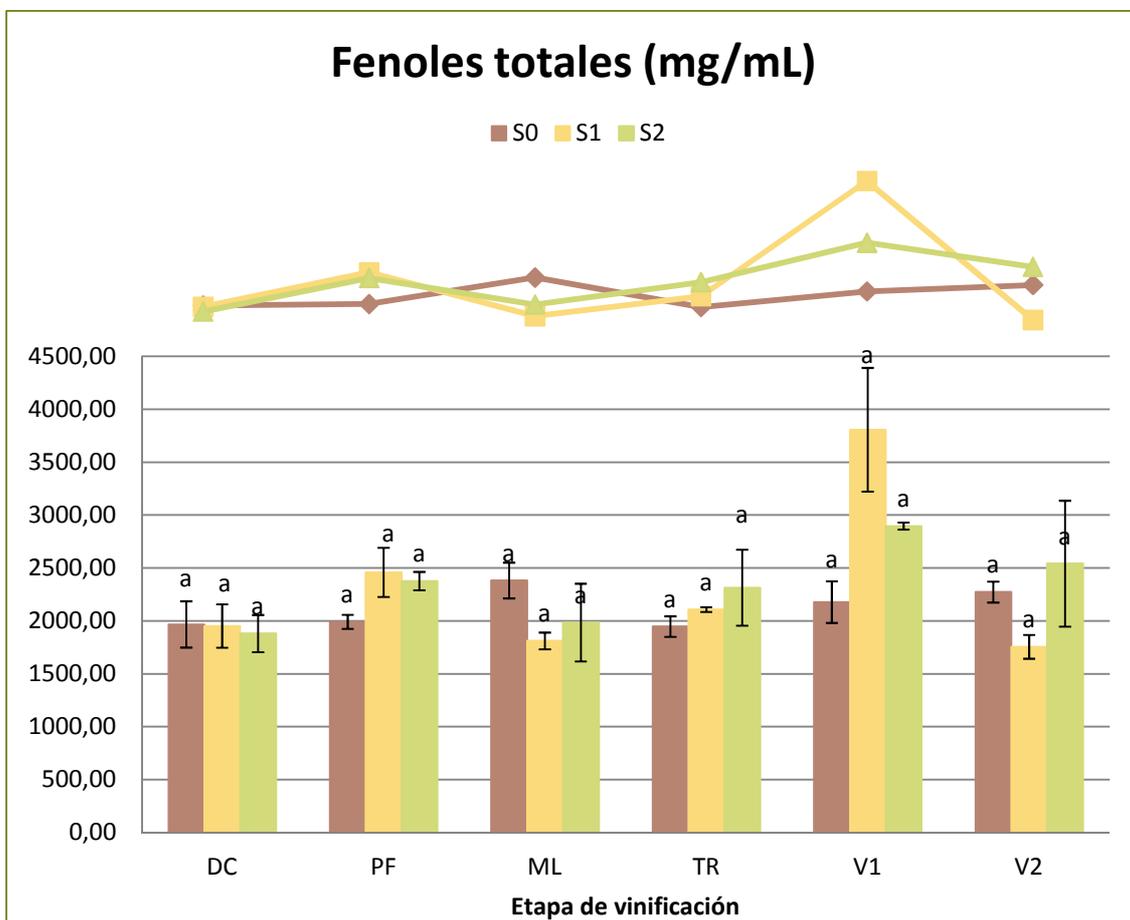
### 4.2.1. Fenoles totales

Mediante el método Folin-Ciocalteu se determinó la cantidad de fenoles totales en las diferentes muestras de vino. Para cada etapa se analizaron muestras de los tres ensayos. Los resultados vienen expresados en miligramos de ácido gálico por mL de vino.

En la Figura 5 se puede observar que en la primera etapa (DC), los vinos correspondientes a los tres ensayos desarrollados presentan concentraciones similares de fenoles totales (S0: 1.967,08 mg/L; S1: 1.951,81mg/L; S2: 1.880,44 mg/L). En la etapa previa a la fermentación maloláctica (PF), la concentración de fenoles totales en los vinos de los ensayos S1 y S2 experimenta una subida, y el vino testigo (S0) se mantiene con un ligero ascenso, no obstante, no se aprecian diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Durante la fermentación maloláctica (ML) los vinos S1 y S2 descienden y vuelven a presentar valores similares al primera etapa tras el descube (DC) (S1: 1.811,35 mg/L; S2: 1.984,61 mg/L) y en este punto es el vino del ensayo testigo (S0) el que presenta valores superiores (2.381,98 mg/L). En las etapas sucesivas, al comenzar la estabilización del vino, los valores medios de FT de los tres ensayos estudiados van aumentando, pero en la etapa final el vino con adición de 450 gr de semillas (S1) experimenta un importante descenso de los FT, situándose en valores menores a los iniciales (1.755,08 mg/L). El vino del ensayo al que se le adiciona una doble cantidad de semillas (S2) es el que presenta mayor concentración de FT (2.541,00 mg/L) en el último punto de muestreo (V2), en el que el vino se considera totalmente estable.

En un estudio similar sobre el efecto de la adición de semillas hidrolizadas en el perfil fenólico y cromático de los vinos, se obtuvieron resultados parecidos tras la adición de 250g y 500g de éstas semillas durante la vinificación: tras el descube el vino control tenía mayor contenido en fenoles totales (S0:2.734 mg/L, S1: 2.266 mg/L, S2: 2.073 mg/L), sin embargo,

tras 150 días, el que obtuvo mayor cantidad de polifenoles totales fue el vino al que se le adicionaron la mitad de semillas (S0:2.009 mg/L, S1:2.735 mg/L, S2:2.066 mg/L) (Cejudo-Bastante y cols.,2016).



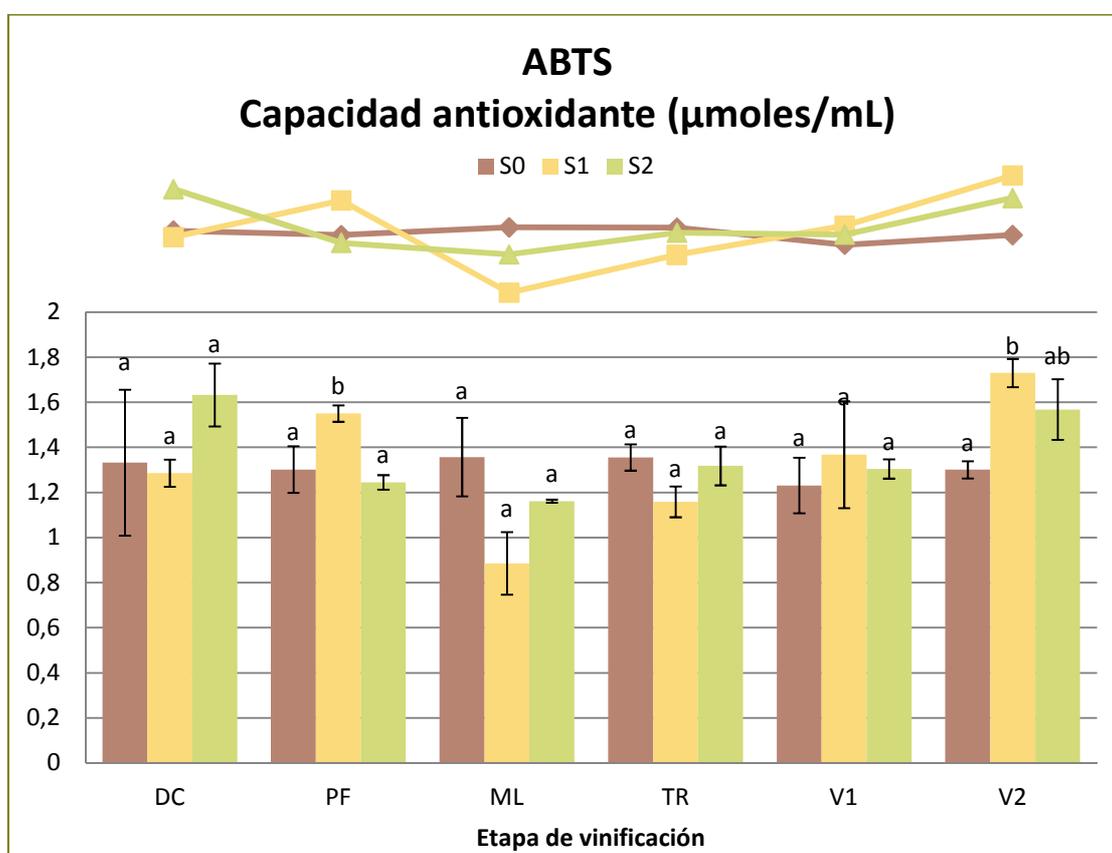
**Figura 5.** Media  $\pm$  desviación estándar de fenoles totales. S0: depósito testigo; S1: depósito con 450g de semilla; S2: depósito con 900g de semilla. Valores en las barras del mismo punto de muestreo con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante por el método TEAC, se obtuvieron las pendientes de pérdida de absorbancia de ABTS<sup>•+</sup> en función del volumen de muestra usado, y se compararon con la obtenida con el patrón Trolox. Los resultados vienen expresados en micromoles de Trolox/mL de vino (Figura 6).

Según los resultados obtenidos, tras el descube (DC), el vino elaborado con adición de mayor cantidad de semillas (S2) tiene la mayor capacidad antioxidante (1,63  $\mu$ mol TE/mL). En la Figura 6 se observa que en el vino testigo (S0) los niveles de capacidad antioxidante se mantienen estables a lo largo de todo el proceso de vinificación. En el caso de los vinos

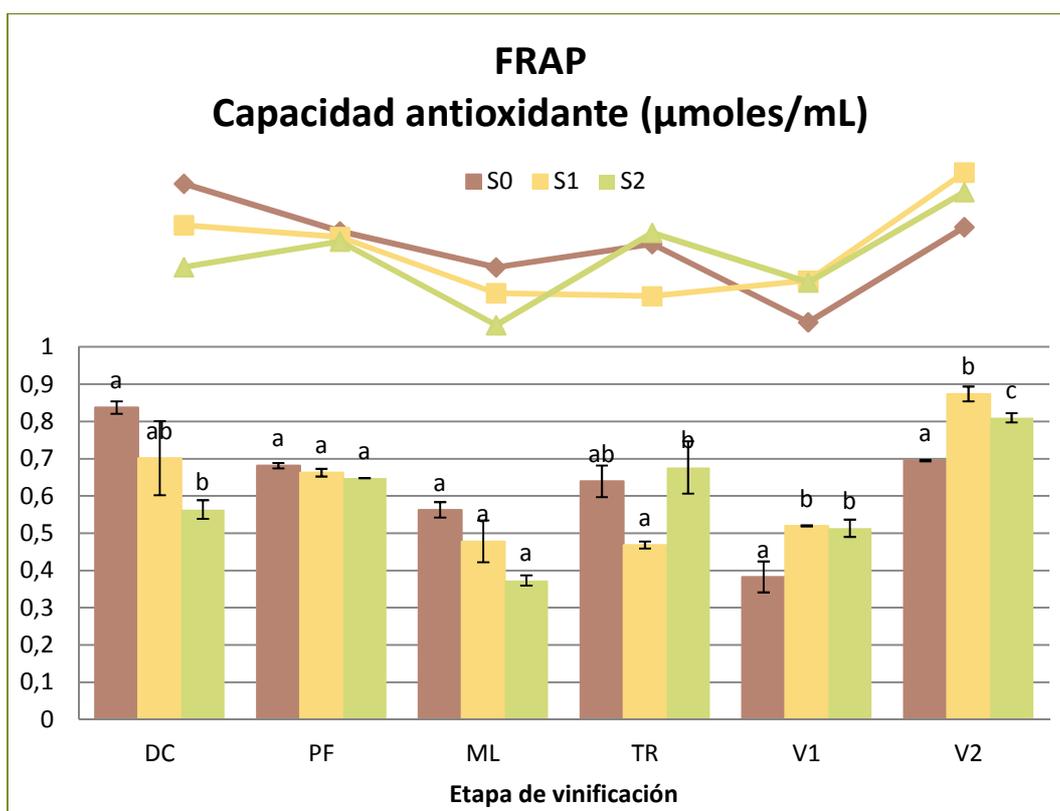
elaborados con adición de semillas (S1 y S2) se producen mayores variaciones de la capacidad antioxidante, observándose una disminución de estos niveles durante la fermentación maloláctica (ML), y a continuación, un aumento en las sucesivas etapas de estabilización del vino. En el último punto de muestreo (V2), las muestras de los tres ensayos aumentan su actividad antioxidante, siendo el vino con adición de 450 g de semillas (S1) el que presenta mayor aumento de la capacidad antioxidante (1,73  $\mu\text{mol TE/mL}$ ), seguido del vino con adición de 900 gr de semillas (S2) (1,50  $\mu\text{mol TE/mL}$ ) y el vino testigo (S0), con la menor capacidad antioxidante (1,30  $\mu\text{mol TE/mL}$ ). Es también en esta etapa donde se obtienen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el vino S1 y el testigo.



**Figura 6** Media  $\pm$  desviación estándar de la capacidad antioxidante medida mediante método ABTS. S0: vino testigo; S1: vino con adición de 450g de semilla; S2: vino con adición de 900g de semilla. Valores en las barras del mismo punto de muestreo con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Por otro lado, también se evaluó la capacidad antioxidante por el método FRAP, por el cual se obtuvieron pendientes de ganancia de absorbancia en función del volumen de muestra utilizado, y se compararon con la obtenida con el patrón Trolox. El resultado obtenido es expresado en micromoles de Trolox/g de producto seco.

En el ensayo de FRAP, aparecen más diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras, especialmente cuando el vino comienza a estabilizarse (TR, V1 y V2). Las muestras de los tres vinos ensayados siguen una evolución similar en las primeras etapas. En la etapa ML, correspondiente a la fermentación maloláctica, experimentan un descenso importante de la capacidad antioxidante (S0: 0.56  $\mu\text{mol TE/mL}$ , S1: 0.48  $\mu\text{mol TE/mL}$  y S2: 0.37  $\mu\text{mol TE/mL}$ ), este comportamiento es similar a lo observado previamente en los resultados obtenidos en fenoles totales y capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS<sup>•+</sup> en los vinos en los que realizó la adición de semillas (S1 y S2). Al igual que en los ensayos de ABTS<sup>•+</sup>, los tres tipos de vino (S0, S1 y S2) experimentan un aumento de la capacidad antioxidante en las últimas etapas de vinificación, alcanzando en la etapa V2 una actividad antioxidante significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) el vino elaborado con adición de 450 gr de semillas (S1) (0,87  $\mu\text{mol TE/mL}$ ), seguido del vino con adición de doble cantidad de semillas (S2) (0,81  $\mu\text{mol TE/mL}$ ) y del vino testigo S0 (0,70  $\mu\text{mol TE/mL}$ ). De nuevo S0 muestra la menor capacidad antioxidante (0,70  $\mu\text{mol TE/mL}$ ) (Figura 7).



**Figura 7.** Media  $\pm$  desviación estándar de la capacidad antioxidante medida mediante método FRAP. S0: vino testigo; S1: vino con adición de 450g de semilla; S2: vino con adición de 900g de semilla. Valores en las barras del mismo punto de muestreo con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A la vista de los resultados obtenidos en los tres ensayos, se podría concluir que la presencia de semillas en avanzado estado de maduración fenólica durante la fermentación alcohólica mejora las propiedades antioxidantes del vino, ya que para ABTS y para FRAP los vinos S1 y S2 han obtenido valores significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que el testigo en las etapas finales, cuando el vino es estable. El depósito S1 es el que mayor capacidad antioxidante obtuvo en los dos ensayos, sin embargo, en el ensayo de Folin-Ciocalteu obtuvo el menor resultado en fenoles totales. Esto podría deberse a que las muestras de S1 tuvieran mayor cantidad de un tipo de polifenoles que presenta mayor capacidad antioxidante. En el estudio mencionado anteriormente de *Cejudo-Bastante y cols.* (2016), se obtuvieron resultados sin grandes diferencias en cuanto al contenido en fenoles totales, pero con algunas diferencias importantes en el perfil fenólico (ácido protocatéquico y procianidinas) y el perfil cromático. Por tanto, en este sentido, sería conveniente profundizar en el análisis de los compuestos fenólicos individuales y su capacidad antioxidante.

En cuanto a la cantidad adicionada de semillas, S1 obtuvo mejores resultados para la capacidad antioxidante, sin embargo, sólo en FRAP la diferencia fue significativa. En otro estudio llevado a cabo por *Puškaš y col.* (2006), en el que se empleó la adición de cantidades crecientes de semillas de la variedad de uva Merlot (50, 100 y 150 g/kg) y tiempos de maceraciones diferentes, se observó un aumento del contenido fenólico y de la intensidad de color del vino conforme la cantidad de semillas adicionadas aumentaba.

Este trabajo forma parte de un proyecto en el que se están evaluando otros parámetros además de la capacidad antioxidante, según el resultado que se obtenga, teniendo en cuenta todos los parámetros, se podrá decidir qué cantidad de semillas es la más adecuada adicionar en la vinificación en tinto de clima cálido para obtener vinos de mejor calidad.

## 5. Conclusiones

- Las semillas procedentes de subproductos de vinificación de Pedro Ximénez son una buena fuente natural de compuestos fenólicos.
- Se ha evaluado la actividad antioxidante por métodos *in vitro* (FRAP y ABTS), comprobándose que los extractos de semillas procedentes de subproductos de vinificación de Pedro Ximénez son una buena fuente de compuestos con capacidad antioxidante.
- La capacidad antioxidante evaluada por métodos espectrofotométricos varía según el tipo de vino. Los vinos tintos a los que se les ha adicionado semillas durante la vinificación proporcionan los mejores resultados de actividad antioxidante.
- La reutilización de subproductos de vinificación en blanco durante el proceso de vinificación en tinto podría proporcionar una mejora en valor biológico de los vinos.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2001;127(1):183-198.
- Anastasiadi M, Pratsinis H, Kletsas D, Skaltsounis A, Haroutounian S. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Sci Technol*. 2012;48(2):316-322.
- Benzie I, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76.
- Borbón L, Mercado L, López M. Influence of climate in grapes and most Bonarda y Syrah varieties. *Rev FCA UNCuyo*. 2008; XL(2):83-89.
- Bordiga M. Valorization of wine making by-products. 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.
- Carbonell-Bejarano P, Martínez-Zapater J. Revista de la SEBBM - Dossier - Bioquímica del vino - Estructura y composición de la uva y su contribución al vino [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en:  
<http://www.sebbm.com/revista/articulo.asp?id=4822&catgrupo=262&tipocom=24>
- Cejudo-Bastante M, Rodríguez-Morgado B, Jara-Palacios M, Rivas-Gonzalo J, Parrado J, Heredia F. Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. *Food Chem*. 2016;209:348-357.
- Fontana A, Antonioli A, Bottini R. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *J Agr Food Chem*. 2013;61(38):8987-9003.
- Gordillo-Arrobas B. Relación color-composición fenólica en vinos tintos de clima cálido. Evaluación de la copigmentación por Colorimetría Triestímulo [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla. Departamento Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal; 2012.
- Gutteridge J. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem-Biol Interact*. 1994;91(2-3):133-140.

- Jara-Palacios M, Hernanz D, Cifuentes-Gomez T, Escudero-Gilete M, Heredia F, Spencer J. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.* 2015;183:78-82.
- Jara-Palacios M, Hernanz D, Escudero-Gilete M, Heredia F. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Res Int.* 2014;66:150-157.
- Jara-Palacios M, Hernanz D, González-Manzano S, Santos-Buelga C, Escudero-Gilete M, Heredia F. Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta.* 2014;125:51-57.
- Jara-Palacios M. Aprovechamiento de los constituyentes biofuncionales de Subproductos de Vinificación de Uvas en el "Condado de Huelva" [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla. Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal; 2015.
- Jayaprakasha G, Selvi T, Sakariah K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int.* 2003;36(2):117-122.
- Keller M. Developmental Physiology. En: Keller M, autor. *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology.* 2nd ed. Academic Press; 2015. p. 244-256.
- Moreno-Montoro M, Olalla-Herrera M, Gimenez-Martinez R, Navarro-Alarcon M, Rufián-Henares J. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *J Food Compos Anal.* 2015;38:19-26.
- Nerantzis E, Tataridis P. Integrated Enology-Utilization of winery wastes for the production of high added value products. *e-JST.* 2006;1(3):71-89.
- Norman GR, Streiner DL. *Bioestadística.* Madrid: Mosby/Doyma Libros, S.A.; 1996.
- OIV. Definición de los productos de la vid por ficha código. Organización Internacional de la Viña y el Vino. 2016 [en línea]. [consultado en Mayo 2016]. Disponible en: <http://www.oiv.int/public/medias/3736/definici-n-de-productos-es.pdf>
- Paladino SC. Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos contenidos en las Semillas de la Vid (*Vitis vinifera* L.) [Tesis Doctoral]. Facultad de Ciencias Agrarias - UNCuyo; 2008.

- Puškaš V, Kovač V, Dodić J. The effect of supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic compounds of wines. *Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara*. 2006; IV(3):79-82.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*. 1999; 26(9-10):1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997; 2(4):152-159.
- Singleton V.L, Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult*. 1965;(16):144-158.
- StatSoft Inc. STATISTICA (Data Analysis Software System), v 8. Tulsa, OK, USA; 2007
- Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno D et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *IJMS*. 2014;15(9):15638-15678.