



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

**Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja
(*Vitis vinifera*) mediante solventes eutécticos profundos naturales**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Q.F.B.T. Héctor Silvino Torres de la Vega

Codirigida por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca y Dra. Miriam Rocío Estévez González

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dra. Miriam Rocío Estévez González
Secretario

Dr. Jorge Luis Chávez Servín
Vocal

Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado
Sinodal

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Sinodal


Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias
Naturales


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2018
México.

Índice General

Índice de figuras	iii
Índice de Cuadros	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Introducción	vii
2. Antecedentes	3
2.1. Vitis vinífera.....	3
2.2. Bagazo de uva.....	5
2.3. Compuestos Fenólicos.....	6
2.3.1. No Flavonoides.	10
2.3.2. Flavonoides.....	12
2.4. Solventes eutécticos naturales profundos (NADES).....	14
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos.....	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. Materiales y Métodos	19
6.2. Material Biológico.....	19
6.3. Secado y molienda de Bagazo de Uva.....	19
6.4. Preparación de NADES.....	19
6.5. Extracción de Compuestos fenólicos	20
6.5.1 Extracción con NADES.....	20
6.5.2. Extracción con Metanol.....	20
6.6. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales por el Método Folin-Ciocalteau.....	21
6.7. Determinación de Antocianinas Totales.	22
6.8. Determinación de Taninos Condensados.	23
6.9. Determinación de la Capacidad antioxidante de BU.....	24
6.9.1. Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos por método DPPH.	24
6.9.2. Poder antioxidante de reducción de Hierro (FRAP).	25
6.9.3. Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada.	26
6.9.4. Determinación de la capacidad antioxidante por método Capacidad Antioxidante de Radicales de Oxígeno (ORAC).	27
6.10. Determinación de Compuestos fenólicos por HPLC.....	28
6.11. Estudio de CF mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) -Espectrometría de Masas.....	29
7. Análisis Estadístico.....	30
8. Resultados y Discusión.....	31
8.1. Obtención de la muestra.....	31

8.2. Extracción de CF a partir de BU mediante NADES y metano-agua 80:20.....	31
8.3. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales por el Método Folin-Ciocalteu.....	32
8.4. Determinación de Antocianinas Totales.	34
8.5. Determinación de Taninos Condensados.	36
8.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante de CF de BU.....	38
8.6.1. Método DPPH	38
8.6.2. Método Capacidad antioxidante de reducción de Hierro (FRAP).	39
8.6.3. Método Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada (CUPRAC)..	41
8.6.4. Método Capacidad Antioxidante de Radicales de Oxígeno (ORAC).	44
8.7 Caracterización parcial de los Compuestos Fenólicos del EM y NADES del BU mediante HPLC.	46
8.8. Resultados cualitativos por UPLC-MS/MS.	49
9. Conclusiones.	58
10. Bibliografía.	59

Índice de figuras

Figura 1 Proceso de elaboración de vino y sus subproductos	17
Figura 2 Compuestos fenólicos derivados	19
Figura 3 Síntesis del Ácido Shikímico	20
Figura 4 Estructuras principales de los flavonoides	24
Figura 5 Comparación de la solubilidad de flavonoides en NADES	27
Figura 6 Secado de BU para la obtención de la muestra de trabajo a lo largo de 72 h.	43
Figura 7 Extracción de FT mediante NADES y metanol-agua 80:20	45
Figura 8 Extracción de AT mediante NADES y metanol-agua 80:20	48
Figura 9 Extracción de TC mediante NADES y metanol-agua 80:20	50
Figura 10 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de BU con NADES y el EM por el método DPPH	52
Figura 11 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de BU con NADES y el EM por el método FRAP.	53
Figura 12 Comparación de los potenciales obtenidos por el método electroquímico (voltamperometría cíclica) a partir de los Voltamperogramas para cada tratamiento de extracción.	54
Figura 13 Voltamogramas cíclicos para los diferentes extractos de CF a partir de Bu	56
Figura 14 Comparación de la capacidad antioxidante de Trolox y los diferentes tratamientos por el método Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada (CUPRAC)	57
Figura 15 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos con NADES y el EM de BU por el método ORAC.	58
Figura 16 Perfil cromatográfico de los extractos obtenidos	60
Figura 17 Perfil cromatográfico del extracto de BU de la variedad Syrah (<i>Vitis vinifera</i>) con AM-CC redissuelto en metanol	62
Figura 18 Espectros UV para la detección de antocianinas encontradas entre los rangos de los 406 nm - 554 nm en tratamientos para la extracción de CF en BU.	62
Figura 19 Cromatograma UPLC para los extractos EM	63
Figura 20 Espectro de masas para los extractos AM-CC y EM.	65
Figura 21 Cromatogramas UPLC para antocianinas en EM	66
Figura 22 Cromatogramas UPLC para antocianinas en AM.CC	67
Figura 23 Espectro MS/MS del extracto EM.	68
Figura 24 Espectro MS/MS del extracto AM-CC.	69

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Clasificación de CF presentes en plantas de acuerdo a su grado de complejidad (Cornejo, 2012).	21
Cuadro 2 Condiciones de preparación de NADES para la extracción de compuestos fenólicos de bagazo de uva (<i>Vitis vinifera</i>).	32
Cuadro 3 Diluciones de ácido gálico para la elaboración de la curva de calibración	34
Cuadro 4 Diluciones de Catequina para curva de calibración	36
Cuadro 5 Probables precursores en ESI positivo, tipo de análisis MS tomadas del European MassBank (Stein-Chisholm y col., 2017).	42
Cuadro 6 Obtención de Porcentaje de rendimiento de tratamientos de extracción.	44
Cuadro 7 Resumen de resultados de la extracción de CF de BU	50
Cuadro 8 Resumen de resultados de la capacidad antioxidante los CF de BU para los diferentes métodos de extracción.	59
Cuadro 9 Cuantificación de ácido Gálico en BU mediante HPLC.	61
Cuadro 10 Posibles componentes en modo de ionización ESI positivo mediante MS/MS	69

Resumen

El bagazo de la uva (BU) es un subproducto ligno-celulósico resultado de la elaboración del vino y representa el 10% en peso de la producción total de uva. Este subproducto contiene entre 0.09% y 0.35% en base seca de compuestos fenólicos (CF), por lo que es apreciado por su capacidad antioxidante tanto en la industria cosmética como en la farmacéutica y, recientemente, en la industria de los alimentos. Lo anterior ha generado el interés por mejorar la extracción de CF, así como el uso de técnicas verdes. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el perfil general y rendimiento de CF extraídos de bagazo de uva (*Vitis vinifera*) mediante el uso de solventes eutélicos profundos naturales (NADES, por sus siglas en inglés) y comparar con un extracto metanólico 80:20 (EM). Se cuantificaron los fenoles totales (FT), taninos condensados (TC) y antocianinas totales (AT) y se determinó la capacidad antioxidante de cada extracto empleando un método electroquímico y técnicas colorimétricas. Se evaluó el perfil de compuestos fenólicos por cromatografía de alta resolución HPLC y cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas UPLC-MS para los extractos con mejores características. Los resultados mostraron que los NADES no permiten en general una buena extracción de CF comparada con la del metanol-agua 80:20. La determinación de la capacidad antioxidante por el método electroquímico mostró una menor capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con NADES en comparación con el EM. Mediante DPPH se encontró un porcentaje de inhibición del radical de 79.15% para el EM, mientras que para los extractos por NADES fue del 10.07% con Gli-CC. En el caso de FRAP y ORAC el EM mostró una capacidad antioxidante de 6.9 ± 0.77 g eq AA/100 g BU y 9350 ± 2.44 (μ M eq de Trolox)/g de BU, respectivamente, mientras que no se obtuvieron datos positivos para los extractos con NADES. Se obtuvieron rendimientos no superiores a 48.38 (mg eq AG)/g de BU para FT correspondiente al NADES Glu-CC comparado con el EM, donde se lograron recuperar 89.7 (mg eq AG)/g de BU. No se logró la recuperación de TC mientras que el EM permitió la recuperación de 2.44 mg eq (+) Cat por gramo de BU. La recuperación de AT fue la más exitosa, siendo de hasta 0.79 (mg eq Mvd-3-glu)/g de BU con el tratamiento AM-CC y para el EM de 1.05 (mg eq Mvd-3-glu)/g de BU. Los resultados mostraron la capacidad de extracción de NADES para AT, lo cual fue confirmado mediante UPLC-MS, por lo que se propone mejorar el procedimiento de extracción para aprovechar la técnica verde en la recuperación de estos antioxidantes.

Palabras Clave: Antocianinas, bagazo de uva, compuestos fenólicos, solventes eutélicos profundos, *Vitis vinifera*.

Abstract

Grape bagasse (BU) is a ligno-cellulose by-product resulting from the winemaking process and represents 10% by weight of the total grape production. This by-product contains between 0.09% and 0.35% by dry weight of phenolic compounds (PC), which is why it is appreciated for its antioxidant capacity in the cosmetic industry as well as in the pharmaceutical industry and, recently, in the food industry. This has generated interest in improving CF extraction as well as the use of green techniques. Therefore, the objective of this work was to evaluate the general profile and yield of CF extracted from grape bagasse (*Vitis vinifera*) by using natural deep eutectic solvents (NADES) and compare with a methanolic extract 80:20 (ME). The total phenols (TP), condensed tannins (CT) and total anthocyanins (TA) were quantified and the antioxidant capacity of each extract was determined using an electrochemical method and colorimetric techniques. The profile of phenolic compounds was evaluated by HPLC high resolution chromatography and high resolution chromatography coupled to UPLC-MS for the extracts with better characteristics. The results showed that the NADES do not allow a good extraction of PC compared with that of methanol. The determination of the antioxidant capacity by the electrochemical method showed a lower antioxidant capacity of the extracts obtained with NADES compared to the EM. By DPPH, a radical inhibition percentage of 79.15% was found for ME, while for extracts by NADES was of 10.07% with Gli-CC. In the case of FRAP and ORAC, the ME showed an antioxidant capacity of 6.9 ± 0.77 g eq AA/100g BU and 9350 ± 2.44 (μ M eq of Trolox)/g of BU, respectively, while no positive data were obtained for the NADES extracts. Yields not higher than 48.38 (mg eq GA)/g BU for TP corresponding to NADES Glu-CC compared to ME, where 89.7 (mg eq GA)/g of BU were achieved. The recovery of CT was not possible while the EM allowed the recovery of 2.44 mg eq (+) Cat per gram of BU. The recovery of TA was the most successful up to 0.79 (mg eq Mvd-3-glu)/g of BU with the treatment AM-CC and for the EM 1.05 (mg eq Mvd-3-glu)/g of BU). The results showed the extraction capacity of NADES for TA, which was confirmed by UPLC-MS, so it is proposed to improve the extraction procedure to take advantage of the green technique in the antioxidants recuperation.

Key words: Anthocyanins, grape bagasse, phenolic compounds, NADES, *Vitis vinifera*.

DEDICATORIA

*A la Sra. Ma. Isabel Zarazúa Basaldúa.
Q.E.P.D.*

*Por desearme hacer soñar con los Ángeles y
recordarte ahora en cada uno de ellos.*

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA, LABORATORIO DE BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA SUPERVICIÓN DE LA DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA, LABORATORIO DE BIOMATERIALES APLICADOS DEL CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA SUPERVICIÓN DE LA DRA. MIRIAM ROCIO ESTEVEZ GONZÁLES Y EN EL LABORATORIO DE ALIMENTOS FUNCIONALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS CAMPUS CELAYA BAJO LA SUPERVICIÓN DEL DR. SALVADOR HORACIO GUZMÁN MALDONADO.

Agradecimientos

A Dios por ser mi guía, aliento y consuelo a lo largo de toda mi vida.

A mis padres los Sres. Torres de la Vega por ser mi soporte y voz de aliento a lo largo de toda mi formación académica, gracias por su apoyo incondicional y confianza.

A la Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca, por ser una fina persona conmigo en todos los momentos que lo necesite, por tratarme con mano dura y ser cálida a la vez, por demostrar su fe en mí y en mi capacidad de entendimiento. Pero sobre todo por eso por enseñarme indirectamente valores que la hacen una gran persona de esas que uno no se topa por el camino todos los días. Gracias Dra. Tere.

A la Dra. Miriam Rocío Estévez González, por aceptarme de nuevo en su equipo de investigación, darme siempre ánimos a lo largo de carrera como Químico, ser siempre un ejemplo de tenacidad y fortaleza ante todo y todas las circunstancias que nos pone la vida, demostrarme su confianza. Sabe que la quiero mucho.

Al Dr. Jorge Luis Chávez Servín, por ayudarme con mis experimentos en el laboratorio, orientarme cuando no tenía idea si lo que hacía estaba bien o mal, ayudarme con el análisis de mis resultados por un ratito que terminaban siendo tres horas. Por ser siempre gente conmigo y su sencillez que lo caracteriza.

Al Dr. Salvador Horacio Guzmán Maldonado por abrirme las puertas de su laboratorio, su amabilidad y comentarios certeros a mis dudas, pero sobre todo por su motivación e interés a este proyecto desde el primer momento que se lo presente.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña por ayudarme con la técnica UPLC – MS/MS aún antes de avernos conocido, recibirme siempre con una sonrisa, sus

aportes a esta investigación observaciones que fueron básicas para darle una buena justificación a este trabajo.

Al Dr. José Antonio Maya Cornejo, por su infinita paciencia con mi corta capacidad de memoria de retención, sus bromas apoyo en la técnica Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada (CUPRAC).

A la Ing. Isela Flores Reyes, por su modo apoyo incondicional en la enseñanza de la prueba ORAC, los ratos tan amenos en el laboratorio escuchando música de calidad y por enseñarme de nuevo los valores de la limpieza, el orden y compartir comida.

A la M. en C. Nayeli Ailed Espinosa Villarreal, por ser tan linda conmigo desde que nos conocimos, ser casi mi sinodal y ayudarme a implementar las técnicas colorimétricas y a conseguir material en toda la facultad. Gracias Cariño.

Al M. en C. Josué López Martínez por su apoyo en el laboratorio a lo largo de estos más de dos años, por recordarme siempre de usar bata, facilitarme equipos y todo lo que necesite a lo largo de esta aventura de aprendizaje, caídas, tropiezos y saltos. Muchas Gracias Joss.

A la M. en C. Rosa Iris Godínez por ser la primera persona en ayudarme con este trabajo, darme consejos siempre de buena gana y contestar mis llamadas en momentos de estrés. Siempre tan linda.

A la Lic. Emilia Reyes Zamora por facilitarme miles de vasos de precipitado, celdas, espátulas y todo lo que necesite en mi estancia en la UNAM, gracias por las conversaciones interesantes sobre nuestras familias y por aceptarme ser tu amigo aun gustándome el reggaetón.

Al M. en C. Gustavo Andrés Molina Labastida por su gentil ayuda en la Técnica para la Determinación de Antocianinas Totales y demás consejos técnicos de los cuales es experto, gracias por brindarme siempre ese apoyo aun en los tiempos más saturados del laboratorio.

Al M. en C. Iván Luzardo Ocampo por su amable ayuda en la técnica de UPLC – MS/MS, preparación de la muestra y compañía durante el proceso de elaboración de la misma.

A la M. en C. Raquel Castañeda M. Por la elaboración de la técnica UPLC- MS/MS, y haberme dado una amable introducción sobre esta, con la cual se concretó parte de nuestro proceso de experimentación.

A la M en C. Mariela Camacho por su amable atención con el uso de Instrumentos, equipos y reactivos del vecino Laboratorio de Nutrición Humana.

A la Lic. Daniela Flores por su ayuda en la técnica de HPLC y manejo de las muestras que ayudo a concretar algunos de los objetivos de este trabajo de una manera eficiente y amable.

A mi tía la Sra. Aurora Guadalupe Serrano Valdés por su atención a lo largo de estos dos años y permitirme formar parte de su vida diaria, algunos desayunos y muchas cenas, por compartirme sus experiencias de vida y por dejarme ser una nueva anécdota de la suya.

A mi Terapeuta la Psi. Susana Rojo Pons por ser mi confidente en momentos de desesperación y alegría por darme consejos invaluable y por ayudarme a creer como persona y experiencia, por esas discusiones amigables que siempre llenaron a alegría y crecimiento a mis citas. Gracias Susana.

A mis muy buenos amigos de la vida y de los laboratorios donde trabajé a lo largo de más de dos años, doy gracias a Dios por haberlos encontrado, sin duda nos vimos crecer, compartimos muchas anécdotas de frustración y de alegría. Por eso ahora podemos decir que fuimos cortados con la misma tijera. Muchas gracias y cuenten con un su fiel amigo Silvino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada.

Introducción

Se ha denominado agroindustria a la actividad económica que combina el proceso de producción agrícola con el industrial para la generación de alimentos o materias primas destinadas a su comercialización. La tendencia actual es el notable aumento en la generación de residuos derivada del incremento en la generación de productos comercializables (Soto-Álvarez, 2015). Alrededor el 38% de estos residuos son producto del procesamiento de distintas variedades de alimentos derivados de la transformación de materias primas vegetales y animales que, por lo general, son el resultado de la extracción y utilización de la porción nutricional, haciendo a un lado los restos que tienen poco valor nutritivo o componentes no comestibles. La valoración de estos subproductos puede lograrse mediante la extracción de componentes presentes como proteínas, polisacáridos, fibras, compuestos fenólicos y fitoquímicos los cuales pueden ser reutilizados como ingredientes nutricionales, farmacológicamente funcionales o como comestibles (Baiano, 2014).

La industria vitivinícola constituye una parte importante de la economía de varias regiones del mundo. En México está integrada por productores de uva de mesa, uva pasa, jugo de uva concentrado, vino y de licores de uva. México ocupa el lugar 29 en el mundo en la producción de uva para vino (*Vitis vinífera*) (SAGARPA., 2016). Se conoce como vino a la bebida que se obtiene del fermentado alcohólico del zumo de la uva por acción de levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y anhídrido carbónico (Font y col., 2009). Dentro del proceso agroindustrial que implica la elaboración del vino se obtiene como subproducto el bagazo de uva (BU), el cual se genera durante la producción del mosto mediante el prensado de la uva. Está compuesto por los tallos, las semillas y la piel, con alrededor de un contenido de materia seca de un 31% y entre 50-72% de humedad, siendo el principal subproducto de la industria vinícola. Aproximadamente por cada 100 kg de uva procesada se obtienen alrededor de 15-20 kg de BU (Muñoz-De la Cruz., 2009) Se estima que a nivel mundial se producen 9 millones de toneladas de BU por año, lo que supone un 20% de la

cantidad de uva usada para vinificación. Este subproducto puede ser considerado como una importante fuente de antioxidantes naturales debido a su alto contenido en compuestos fenólicos (CF), lo que favorece tanto su aplicación en industrias alimentarias como cosméticas o farmacéuticas (Soto-Álvarez, 2015).

En trabajos previos se determinó la factibilidad de extraer CF de bagazo de uva mediante el uso de microondas y sonicación para mejorar la capacidad de solventes convencionales como agua y metanol (Cornejo García, 2012). Sin embargo, en años recientes las llamadas “Técnicas verdes” han atraído la atención para la extracción de diversos compuestos utilizando solventes amigables con el ambiente. Esto dio origen al interés por el uso de metabolitos primarios de las células vivas utilizados como extractantes, llamados solventes eutécticos naturales profundos (NADES, por sus siglas en inglés). Estos solventes poseen ventajas comparados con solventes tradicionales entre las que se encuentran bajo costo, inercia química con agua, viscosidad ajustable, alta biodegradabilidad, toxicidad farmacéuticamente aceptable, sostenibilidad, baja volatilidad entre otras (Weia y col., 2015).

Por lo anterior, esta investigación se planteó el uso de NADES para la extracción de CF presentes en el BU, haciendo un comparativo con el método tradicional de extracción a base de solventes orgánicos convencionales como metanol y agua (80:20).

2. Antecedentes

2.1. *Vitis vinifera*

La importancia del cultivo de *Vitis vinifera* no solo se centra en su producción como una hortaliza sino también está relacionado históricamente con el desarrollo de la cultura humana, debido al principal producto que se obtiene de su fruto, el vino. En la familia Vitaceae, el género *Vitis* es el de mayor importancia y cuenta con alrededor de 60 especies que son cultivadas en su mayoría en el hemisferio norte comparado con el sur, entre los 30° y 50° de latitud en ambos hemisferios, en condiciones climáticas subtropicales mediterráneas y continentales. Entre ellas, *Vitis vinifera* es la única especie ampliamente utilizada en la industria vinícola mundial. Se estima que tiene una antigüedad como especie de 65 millones de años y es uno de los cultivos frutales más comunes en el mundo con más de 60 millones de toneladas producidas anualmente (This y col., 2006).

Los principales productores de *Vitis vinifera* en el mundo son: Francia, Italia, Portugal, Alemania y España, en Europa; Estados Unidos, México, Chile, Uruguay y Argentina, en América; Sudáfrica y el Sur de Australia (Muñoz- De la Cruz y col., 2009). México ocupa el lugar 29 en el mundo en la producción de uva para vino, con una superficie de viñedos de 29 mil 923 hectáreas. En el 2015 se produjeron alrededor de 368 mil toneladas de uva de las cuales el 63% se destinó para su venta como producto fresco, 24.4% para la elaboración de vinos y el resto deshidratada. La producción y desarrollo del cultivo industrial es destinado en un 90% para la producción de vino, este desarrollo ha sido heterogéneo en el país y se divide en tres regiones principales: la zona Norte (Baja California y Sonora), la zona de La Laguna (Coahuila y Durango) y la zona Centro (Zacatecas, Aguascalientes y Querétaro) (SAGARPA, 2016). Por la superficie sembrada destacan Sonora, Baja California y Aguascalientes; por su potencial enológico sobresale Baja California y en segundo lugar Zacatecas. Querétaro representa el límite sur de la viticultura mexicana y se ha reportado que en la década de los años 70 Querétaro contaba con 8,000 hectáreas, disminuyendo para el año 2009

a 300 hectáreas las cuales en años recientes han ido en aumento, principalmente para el cultivo de uvas tintas de las variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Tempranillo, Merlot y Syrah (Ramos-Estrada, 2008). De acuerdo al Anuario Estadístico de Producción Agrícola de nuestro país, en los últimos años la producción de uva osciló de 244-345 mil toneladas en 32 mil hectáreas cosechadas, de las que se destinan aproximadamente el 60% a la industria vitivinícola (SAGARPA, 2006).

El fruto de uva (*Vitis vinifera*) ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes. La cáscara y semillas de la uva son consideradas fuentes importantes de compuestos fenólicos (CF), a los que se les atribuyen la propiedad astringente y antioxidante de las uvas y sus productos (Molina y col., 2010).

La elaboración de los vinos tintos obedece a un largo proceso que se compone por varias etapas, la primera corresponde a la recepción de la uva en donde se lleva a cabo la selección de la misma, seguida por el despallamiento de los racimos correspondiente a la separación de los raspones de la uva. Posteriormente la uva se somete a un proceso prensado y pasa por una fermentación alcohólica, es justo después de este paso donde se obtiene el bagazo de uva (BU) (Navarrete, 2013). El líquido fermentado sigue por una fermentación maloláctica la cual consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico por medio de bacterias que de forma natural se encuentran en la propia uva y por tanto también en el vino recién fermentado. Se continúa con la eliminación de los trasiegos los cuales son materias sólidas depositadas en el fondo de los recipientes (barricas), seguida de una última filtración y estabilización en frío para finalizar con su almacenamiento (Figura 1) (Navarrete, 2013).

A la par del proceso antes mencionado, el BU se recolecta después del prensado y se envasa para ser conservado mediante técnicas de congelación y eventualmente comenzar su procesamiento. El procesamiento del bagazo proveniente de vinificación de vinos tintos, es sometido a varias etapas, principalmente secado, molienda, tamizado (Navarrete, 2013).



Figura 1. Proceso de elaboración de vino y sus subproductos (Navarrete, 2013).

2.2. Bagazo de uva.

El BU es un subproducto ligno-celulósico resultado de la elaboración del vino, representando 10% en peso de la producción total de uva (Jiménez y col., 2008). La composición del bagazo es de un 45% de cascarilla, 30% de semilla y 25% de raspón en peso, se ha estimado que presenta un contenido de humedad de 65% (Martínez, 2012). Los CF presentes en el BU representan entre el 0.09%-0.35% del peso del bagazo seco, principalmente en la piel y semilla. Particularmente, la semilla de uva está compuesta básicamente por un 40% de fibra, 16% de aceites esenciales, 11% de proteína y 7% de otros complejos como compuestos fenólicos principalmente taninos, antocianinas, azúcares, minerales y otras sustancias

(Cornejo, 2012). Los CF son muy apreciados por su capacidad antioxidante, esto los hace muy útiles tanto en la industria cosmética como en la farmacéutica y, más recientemente, en la industria de los alimentos (Fantozzi y Betschart, 1981). Entre algunas de las aplicaciones del BU se encuentra su uso en la tecnología de los alimentos por ejemplo la obtención de aceite comestible de las semillas con potente capacidad antioxidante (Muñoz de la Cruz y col., 2009). También se ha encontrado que los CF pueden actuar como inhibidores de la oxidación de los lípidos en carnes congeladas, permitiendo aumentar la vida útil de la carne de pollo congelada o refrigerada gracias a que retrasan la oxidación lipídica. Además, poseen propiedades antibacteriales por lo que se han empezado a utilizar como conservadores. Se le ha encontrado que es una potencial fuente de biomasa para la generación de biogás, una rica fuente para la extracción de pigmentos rojos y un uso como composta (Muñoz-De la Cruz y col., 2017).

2.3. Compuestos Fenólicos

Se conocen como CF a aquellos compuestos químicos que están constituidos por un anillo aromático de carbono y además presentan grupos hidroxilo incluyendo derivados funcionales como grupos funcionales éster, grupos metilo y glicósidos. Los CF son constituyentes fundamentales del mundo vegetal, se encuentran en todas las partes de las plantas, desde las raíces a los frutos. Son el resultado del metabolismo de la fenilalanina, tirosina y unidades de acetato a través de la vía del ácido shikímico (Figura 2). A partir de dos sustratos, eritrosa 4 fosfato y fosfoenolpiruvato, se desencadenan una serie de reacciones, dónde participa el ácido shikímico, el cual tiene un control alostérico dando como producto: tirosina, fenilalanina y triptófano (Figura 3) (Espinosa, 2015; Muñoz-De la Cruz y col., 2017). La fenilalanina y tirosina dan lugar al ácido cinámico y ácido parahidroxicinámico que, al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Escamilla y col., 2009). Los CF cumplen diversas funciones entre las que se encuentran la función estructural a nivel de pared celular, defensa contra microorganismos e insectos, pigmento en hojas y flores, preservación de su

integridad por su continua exposición a ambientes estresantes como radiación UV, protección contra cambios de temperatura (Cornejo, 2012).

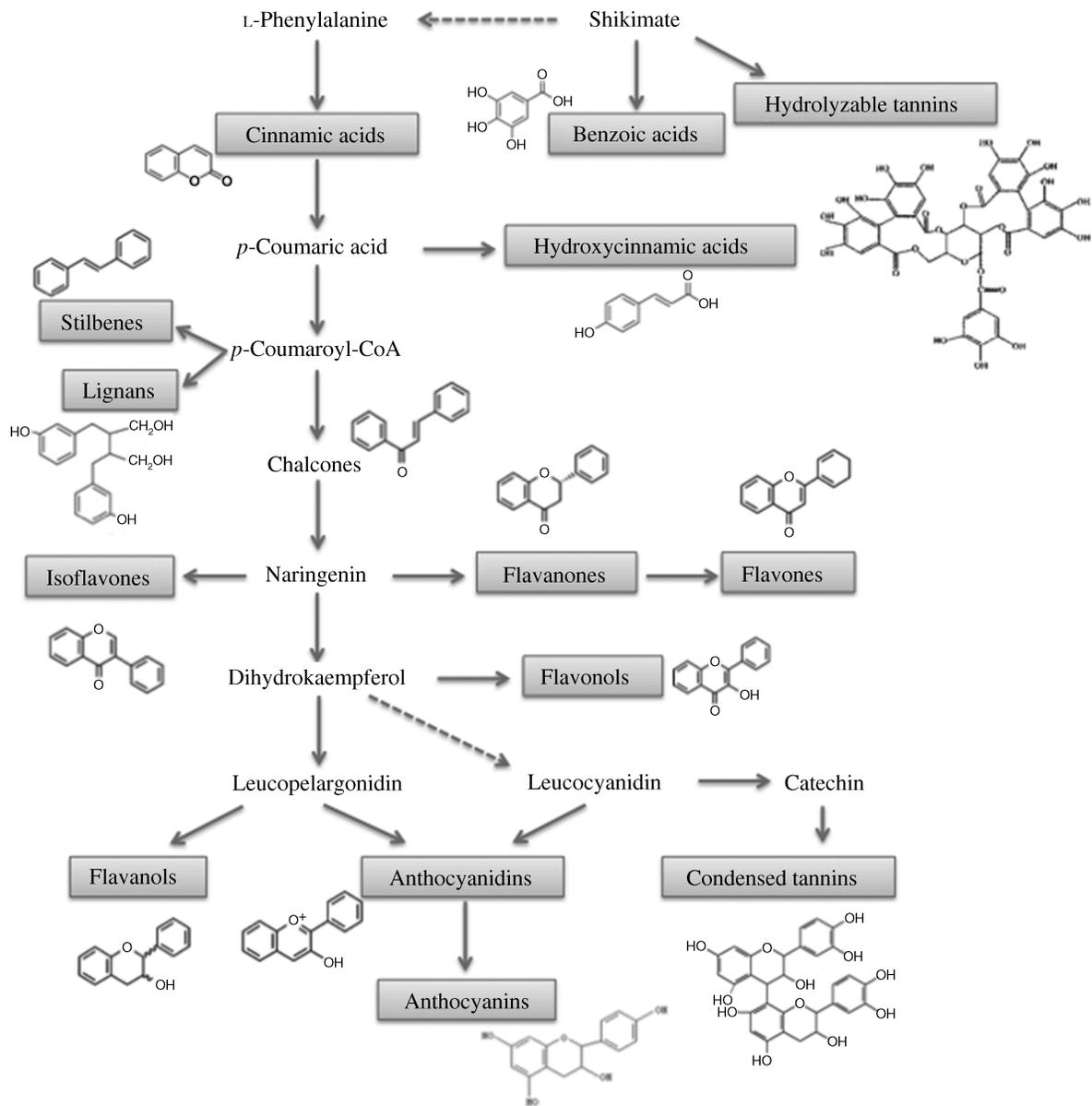


Figura 2. Compuestos fenólicos derivados (Muñoz-De la Cruz y col., 2017).

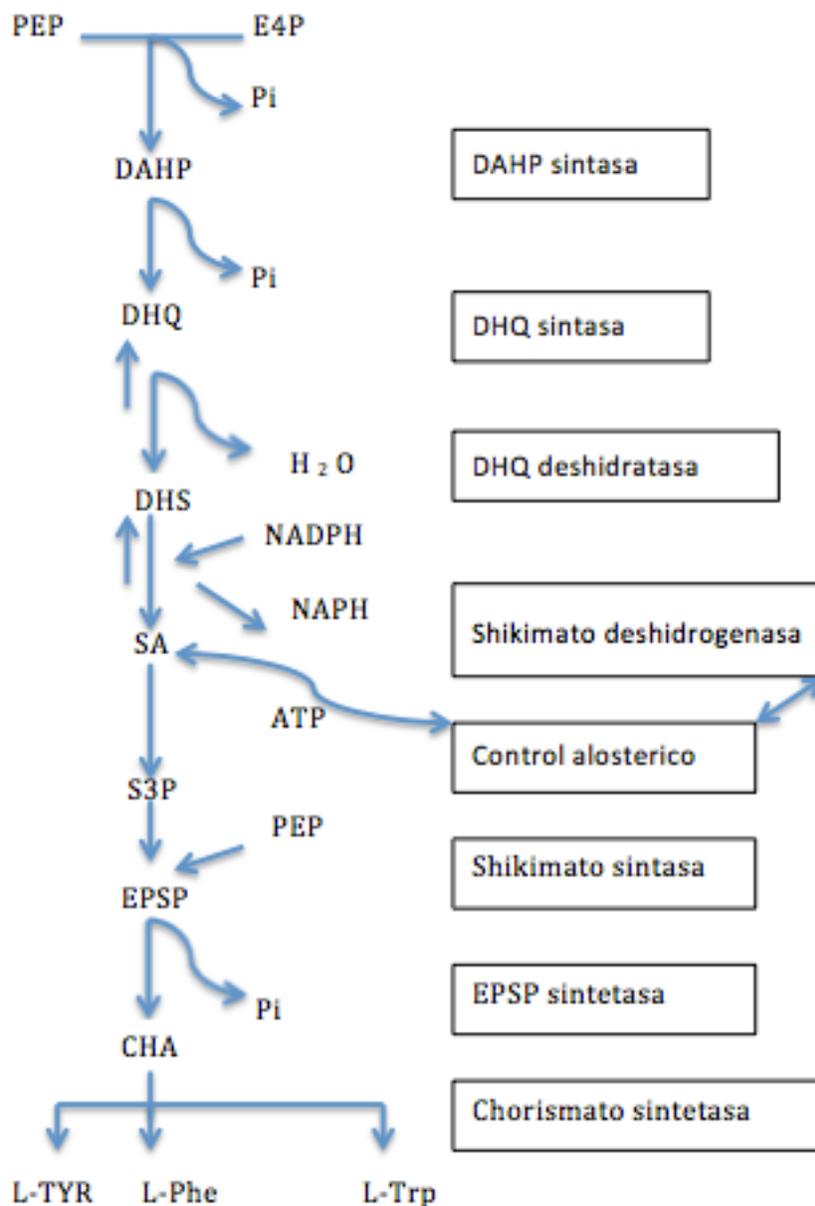


Figura 3. Síntesis del Ácido Shikímico (Espinosa, 2015).

Los CF pueden clasificarse de acuerdo a su esqueleto básico de carbono en de acuerdo a como lo muestra el Cuadro 1. Se dividen en dos grandes grupos: los flavonoides, (flavonoles, antocianinas, catequinas, epicatequinas y resveratrol) y los no flavonoides (ácidos benzoicos, ácidos cinámicos y estilbenos). Ambos grupos de compuestos son metabolitos secundarios esenciales para el crecimiento y la reproducción de distintas plantas, así como protectores frente a la acción de patógenos. Son responsables de propiedades fisiológicas tales como

antialérgicas, antiarterogénicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, cardioprotectoras y vasodilatadoras (Cornejo, 2012).

Cuadro 1. Clasificación de CF presentes en plantas de acuerdo a su grado de complejidad (Cornejo, 2012).

Estructura	Clase
C_6	Fenólicos simples, Benzoquinonas
$C_6 - C_1$	Ácidos Hidroxibenzoico
$C_6 - C_2$	Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos
$C_6 - C_3$	Ácidos Hidroxicinnámico, Fenilpropanoides
$C_6 - C_4$	Naptoquonas
$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
$C_6 - C_2 - C_6$	Stibanas, Antraquinonas
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides, Isoflavonoides
$(C_6 - C_3)_2$	Neolignanós
$(C_6 - C_3)_n$	Lignanós
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Bioflavonoides
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos condensados

Los polifenoles de los vinos han sido sujeto de un creciente estudio debido a sus propiedades antioxidantes y sus potenciales efectos sobre la salud (Brusse, 2013). Los CF poseen la habilidad de estabilizar a los radicales libres, donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que funcionan como agentes quelantes. Los antioxidantes de origen vegetal disminuyen el estrés oxidativo causado por los radicales libres protegen al cuerpo humano de especies reactivas de oxígeno, impidiendo el daño a de las células del organismo ocurrido por la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos e incluso del ADN (Cornejo., 2012).

En la uva, los CF juegan un papel importante en la calidad, y la manera en la cual estas sustancias son transformadas durante la vinificación influye directa o indirectamente sobre las características de los vinos, confiriéndoles una gran parte de su estructura, su color y de sus propiedades sensoriales. El 63% de los CF

totales de la uva de variedades tintas se encuentra en las semillas, el 34% en las pieles (orujo) y el 3% en el jugo; aun así, los compuestos presentes en las pieles aportan más CF que las semillas al vino debido a que estos son más fácilmente extraíbles (Meyer y Hernández, 1970). Se ha encontrado que la concentración de los CF presentes en la piel de la uva no es dependiente del tipo de variedad de la misma siendo que está afectada por las condiciones agroclimáticas o condiciones de cultivo de la planta (Fantozzi y col., 1981; Soto-Álvarez., 2015).

La industria del vino genera cantidades importantes de bagazo de uva rico en CF que generalmente no es intrínsecamente peligroso y es considerado desecho. Sin embargo, contienen un alto contenido de materia orgánica y el hecho de que la producción se concentre en un período particular del año plantea problemas potenciales de contaminación como es la reproducción de microorganismos y patógenos. El BU representa una importante fuente de antioxidantes debido a su alto contenido de CF el cual puede ser aprovechado.

2.3.1. No Flavonoides.

Esta categoría incluye fenoles, ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, ácidos fenil acéticos y estibenos. Los ácidos cinámicos están presentes en su mayoría como hidroxicinámicos unidos a ésteres de ácido tartárico entre los que se encuentran, por su importancia, los ácidos caféico, felúrico y p-cumárico; que se concentran en una proporción mayor (2-100 veces) en la piel de la uva comparados con su pulpa. Las actividades antioxidantes, antimutagénicas y hepatoprotectoras son atribuidas a los ácidos benzoicos presentes en su mayoría como hidroxibenzoicos. Existen además estilbenos los cuales son producidos por las plantas como respuesta a algún tipo de estrés y las fitoalexinas como es el caso del resveratrol al cual se le atribuyen propiedades antifúngicas y que se encuentra presente en la piel de la uva (Muñoz-De la Cruz y col., 2009).

2.3.1.1. Ácidos hidroxicinámicos

Son conocidos también como fenilpropanoides y representan al grupo más

ampliamente distribuido de compuestos fenólicos. Entre ellos existen estructuras básicas en su estado natural libre entre las que se encuentran el ácido cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico. La mayoría de estas estructuras se encuentran asociadas químicamente con otro tipo de compuestos como por ejemplo el ácido caféico con el ácido quínico que mediante una esterificación forma a el ácido clorogénico. Poseen una gran diversidad de propiedades biológicas entre las que se encuentran antibióticas, inhibición del crecimiento y germinación. En la naturaleza existen isómeros cis y trans siendo más frecuente este último (Piñeiro, 2005).

2.3.1.2. Fenoles y Ácidos hidroxibenzóicos

Se trata de los compuestos fenólicos más simples, incluyendo estructuras de C_6 y C_6-C_2 , respectivamente. A pesar de su simplicidad estructural, los analitos resultantes se han citado en muchas ocasiones en estudios centrados en la taxonomía de plantas, reflejando estrechamente el grado y la naturaleza de las estructuras presentes con propiedades dadas de la planta. Las estructuras de hidroquinonas son los fenoles más representativos en términos de variedad y frecuencia de aparición. Con respecto a las estructuras ácidas, es necesario enfatizar la importancia de los ácidos vainillínico y gálico, como las estructuras polifenólicas más representativas los cuales son utilizados para la elaboración de las técnicas colorimétricas utilizadas en esta investigación (Piñeiro, 2005).

2.3.1.3. Estilbenos

Esta familia de compuestos fenólicos posee la característica básica estructural de estar constituidos por dos ciclos benceno, generalmente enlazados por una cadena etano o etileno ($C_6.C_2.C_6$). Entre los isómeros trans de estos compuestos, destaca el compuesto resveratrol (3,5,4- trihidroxiestilbeno) el cual es generado en la uva como una respuesta a una infección fúngica o en situaciones de estrés. Este compuesto se encuentra en la piel de la uva (hollejo) y es extraído durante el proceso de fermentación de los vinos tintos (Piñeiro, 2005).

2.3.2. Flavonoides.

Se definen como moléculas polifenólicas de bajo peso molecular compuestas por un esqueleto de difenilpirano. Su estructura consiste dos anillos aromáticos unidos a 3 carbonos que habitualmente forman un compuesto heterocíclico oxigenado. Los cambios de sustituyentes en el anillo de pirano dan lugar a diversas estructuras (Figura 4). Entre estos compuestos se encuentran flavonoles, (quercetina, kaempferol y miricetina), flavonas (apigenina, luteolina y diosmetina), flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, flavonoles, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas (antocianinas), leucoantocianidinas o flavandioles, y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables) (Hertog y col., 1993).

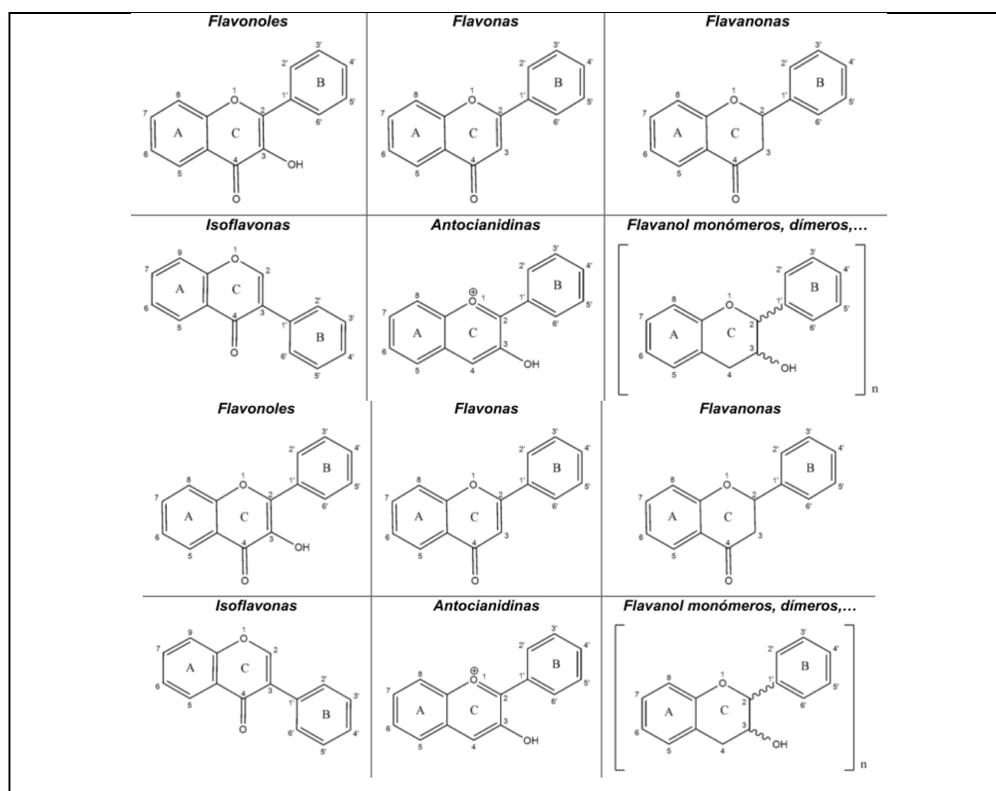


Figura 4. Estructuras principales de los flavonoides (Soto-Álvarez y col., 2015).

2.3.2.1. Antocianinas

Dentro de los compuestos flavonoides se encuentran las antocianinas, responsables de proporcionar el color al vino. Dentro de la uva estos compuestos se encuentran en vacuolas de las células localizadas en las capas de la hipodermis de la piel (Muñoz-De la Cruz y col., 2017). Estos compuestos también son considerados potentes antioxidantes por su capacidad de neutralizar radicales libres, así como absorber radiación, disminuyen el daño oxidativo en los lípidos plasmáticos, además de poseer un alto efecto anticancerígeno (Espinosa, 2015). Hasta ahora el bagazo de la uva ha sido considerado la principal fuente de colorantes naturales basados en antocianinas. Este constituye una fuente de antocianinas de bajo costo y abundante (Guzmán-Figueroa, 2010). En soluciones acuosas las antocianinas existen en diferentes formas de equilibrio: la base quinoidal, el catión flavilio, el carbidol o pseudobase y la chalcona. Cabe mencionar que el color proporcionado por las antocininas es dependiente el pH al disminuir el mismo el equilibrio se desplaza hacia el cation flavilio, al cambiar el pH esta reportado una pérdida de hasta un 80 % de intensidad en el intervalo de pH 1-5 como resultado de la formación de la base carbidol (Guzmán- Figueroa y col., 2010).

2.3.2.2. Taninos

Los taninos son compuestos relativamente de alto peso molecular (>500 uma) que están estructurados por tres o más subunidades fenólicas (Robbins, 2013) y se subdividen en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están caracterizados por su facilidad para unirse a proteínas, esto se debe a su gran número de grupos hidroxilo. Por otro lado, los condensados poseen un núcleo central el cual es un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o totalmente (Espinosa, 2015). Estos compuestos son responsables del sabor amargo y astringente además de tener potencial nutricional, fisiológico y farmacológico al ser capaces de formar complejos con proteínas (Muñoz-De la Cruz y col., 2009).

2.3.2.3. Flavonoles

Estos compuestos antioxidantes poseen como estructura en común a la 3-hidroxi flavona dando gran diversidad de compuestos dependiendo de la posición del grupo hidroxilo en la molécula. Poseen la capacidad de formar complejos de copigmentación muy estables con las antocianinas aportando contribuyendo de forma muy importante al color del vino tinto. Estos pigmentos formados son los responsables de la evolución del color del vino a lo largo del tiempo (Hermosin y col., 2009).

2.3.2.4 Flavonas

Estos flavonoides se caracterizan por tener un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 diferenciándose de los flavonoles por la ausencia del grupo hidroxilo en el carbono 3. La luteolina es la flavona encontrada en cantidades significativas tanto en uvas y el bagazo de la misma (Soto-Álvarez., 2015).

2.4. Solventes Eutécticos Naturales Profundos (NADES).

Los solventes eutécticos profundos (DES, por sus siglas en inglés) están constituidos por una mezcla de compuestos orgánicos comunes en células vivas cuyo punto de fusión es significativamente menor que el de cada componente individual. Cuando los compuestos que constituyen a los DES son metabolitos primarios, a saber, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares o derivados de colina estos solventes adquieren el nombre de solventes eutécticos naturales (NADES). Lo anterior confiere una menor volatilidad y por consiguiente un menor riesgo de contaminación que cualquier otro solvente orgánico (Paiva y col., 2014). Poseen una alta viscosidad basada en su bajo contenido de agua lo cual permite interacciones moleculares estables y juega un papel importante en el efecto estabilizador presentando una alta fijación relacionada con los CF (Dai y col., 2014).

En comparación con los disolventes convencionales, los componentes principales

de NADES son metabolitos primarios naturales. Los más comunes se basan en cloruro de colina, ácidos carboxílicos y otros donantes de enlaces de hidrógeno, por ejemplo, urea, ácido cítrico, ácido succínico, glicerol, azúcares, alcoholes de azúcar, aminoácidos y aminas con varios grupos hidroxilo. Estos grupos dan lugar a interacciones de enlace de hidrógeno entre dos moléculas dando como resultado la formación de líquidos viscosos estructurados (Dai y col., 2014; Paiva y col., 2014). Recientemente se ha descubierto que muchos metabolitos primarios abundantes en la célula vegetal que son capaces de cambiar de un estado del sólido a uno líquido al ser mezclados en la proporción apropiada. Este hallazgo lleva a la hipótesis de que los NADES son capaces de desempeñar un papel como medios alternativos al agua en organismos vivos en una amplia gama de productos naturales, lo que resultó en el descubrimiento de más de 100 NADES (Dai y col., 2013).

Gracias al carácter iónico propio de los NADES a lo largo de su proceso de investigación se les han atribuido diferentes usos y aplicaciones como disolventes para procesos biocatalíticos, disolventes de extracción y para aplicaciones electroquímicas entre otras. Estos estudios han incluido a los compuestos polifenólicos demostrando que la solubilidad de flavonoides en varios NADES es de 50 a 100 veces mayor que en agua como se muestra en la Figura 5 (Choi y col., 2011).

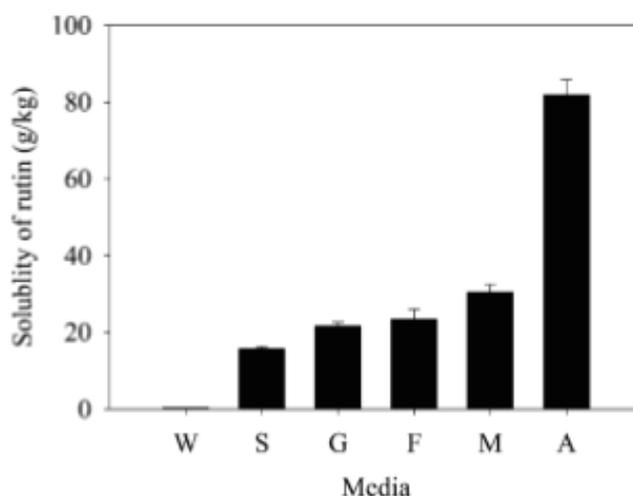


Figura 5 Comparación de la solubilidad de flavonoides en NADES. Agua (W), Sacarosa-Cloruro de Colina (S), Glucosa – Cloruro de Colina (G), Fructosa – Cloruro de Colina (F), Ácido málico-cloruro de colina (M) y Ácido aconítico – Cloruro de colina (A) (Choi y col., 2011).

Experimentos realizados con diferentes NADES para la extracción de compuestos a partir de la planta *Carthamus tinctorius* demostraron que la obtención de los metabolitos tanto polares como menos polares fue mayor con NADES que con los disolventes convencionales. El contenido de agua en NADES ha demostrado tener el mayor efecto en el rendimiento de compuestos fenólicos. La mayoría de los compuestos fenólicos principales se recuperaron de NADES con un rendimiento entre 75% -97%. Este estudio revela el potencial de NADES para aplicaciones que implican la extracción de compuestos bioactivos de fuentes naturales (Dai y col., 2013).

3. Justificación

La producción de vino de mesa representa una actividad agroindustrial de suma importancia, con alrededor de 60 especies cultivadas y una producción mundial anual de alrededor de 35.9 millones de toneladas (OIV, 2017). México ocupa el quinto lugar en América en el cultivo de *Vitis vinifera* con una producción alrededor de 89.79 mil toneladas en 29 mil 923 hectáreas cosechadas las cuales van en aumento (SAGARPA, 2016). Esta agroindustria genera como subproducto grandes cantidades de BU, se estima que mundialmente se producen alrededor de 9 millones de toneladas de BU, el cual ha sido desaprovechado en nuestro país. Este desecho agroindustrial es rico en compuestos fenólicos los cuales se sabe tienen propiedades antioxidantes, antimutagénicas, hepatoprotectoras entre otras. La optimización de las condiciones de extracción es de suma importancia para la recuperación de los mismos, lo cual resultaría en la creación de una nueva fuente de extracción de estos compuestos a partir de desechos agroindustriales.

El uso de solventes orgánicos con baja toxicidad para la extracción de compuestos fenólicos de diferente polaridad ha sido uno de los más recientes objetivos para la industria bioquímica. El presente estudio propone la utilización de NADES para la extracción de compuestos fenólicos de bagazo de uva tinta *Vitis vinifera*. Lo anterior generará un menor riesgo de daño al ambiente y a la salud humana debido a su alta biodegradabilidad combinada con perfiles de toxicidad farmacéutica aceptables, además de su alto poder de solubilización, Con esto se plantea crear evidencia que sustente el reemplazo de solventes tradicionales disminuyendo así el impacto negativo de los mismos. y crear nuevas alternativas para la obtención de fitoquímicos con potencial alimenticio, farmacéutico o industriales. La utilización de NADES para la recuperación de CF a partir de BU permitirá su aplicación en la tecnología de los alimentos, farmacéuticos e industrial (Goñi y col., 2007, Yemis y col., 2008, Dai y col.,2013).

4. Hipótesis

La aplicación de NADES como solventes para la extracción de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) permite un buen rendimiento de extracción.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo General.

Evaluar el perfil general y rendimiento de compuestos fenólicos extraídos de bagazo de uva (*Vitis vinifera*) mediante la extracción con NADES como solvente en comparación con extractos metanólicos.

5.2. Objetivos específicos

- Extraer compuestos fenólicos utilizando diferentes sistemas de NADES y un sistema convencional con (metanol-agua 80:20).
- Cuantificar los fenoles totales, taninos condensados y antocianinas de los diferentes extractos obtenidos mediante métodos espectrofotométricos.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos mediante ORAC, DPPH, FRAP y electroquímica.
- Evaluar el perfil de compuestos fenólicos por HPLC para los extractos con mejores características.
- Evaluar el perfil de compuestos fenólicos mediante cromatografía de líquidos acopada a espectrometría de masas.
- Determinar el rendimiento total de los compuestos fenólicos de acuerdo a los métodos de extracción.

6. Materiales y Métodos

6.1. Reactivos.

Los reactivos para la elaboración de los NADES se obtuvieron de Sigma (Sigma Chem; St. Louis MO, EUA). En conjunto con reactivos de la marca J.T. Baker (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México). Se siguieron los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Manual de Bioseguridad en el laboratorio 3° edición (2005) y la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

6.2. Material Biológico.

El bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) se obtuvo por donación de la empresa Cavas Freixenet México en Ezequiel Montes, Querétaro. Se trabajó con la variedad de uva roja Syrah. Las muestras de bagazo corresponderán a la cosecha y vendimia del verano del 2017.

6.3. Secado y molienda de Bagazo de Uva.

La muestra de BU (*Vitis vinifera*) (3 kg) fue limpiada separando del tallo manualmente. El BU se secó a una temperatura controlada de 40° C en un horno de convección por 72 h y se tomó registro de los pesos cada ciclo de 24 h. Posteriormente la muestra fue procesada en un molino de cuchillas Laboratory Will Modelo 4, con criba a la salida con una abertura de un diámetro de 0.5 mm. (Cornejo, 2012).

6.4. Preparación de NADES.

Para la preparación de los solventes se empleó el método de calentamiento (Dai y col., 2013). Brevemente, la mezcla de dos componentes se colocó en un matraz Erlenmeyer bajo agitación constante en baño María a temperatura controlada

hasta la formación de un líquido transparente, las condiciones de temperatura, porcentaje de agua y NADES empleados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones de preparación de NADES para la extracción de compuestos fenólicos de bagazo de uva (*Vitis vinifera*) (Wei y col., 2015).

NADES	Relación molar	Agua (%)	Temperatura (°C)
Ácido Cítrico- Cloruro de colina	1:2	25	80
Ácido Málico- Cloruro de colina	2:1	25	80
Sacarosa-Cloruro de colina	2:1	25	80
Glucosa-Cloruro de colina	2:1	25	80
Glicerol-Cloruro de colina	1:2	25	50

6.5. Extracción de Compuestos fenólicos

6.5.1 Extracción con NADES

Extracción con NADES. El proceso de extracción se realizó en un matraz Erlenmeyer (25 mL) cerrado en el cual se colocaron 100 mg de BU (*Vitis vinifera*) y 1.5 mL de disolvente NADES calentando a 40° C en agitación constante por una h. Las muestras se transfirieron a micro tubos de 2 mL, se procedió a una centrifugación de 11 0000 X g por 20 min. La suspensión resultante se filtró con un papel de acetato de celulosa Wattman de 8 µm agregando 1.5 mL de agua. Y se procedió a su posterior secado bajo atmosfera de nitrógeno y liofilización con el equipo Labconco FreeZone 4.5 liter Freeze Dry Systems. Este procedimiento de realizó por triplicado conservando las muestras a -80 °C (Dai y col., 2013).

6.5.2. Extracción con Metanol

Los compuestos fenólicos suelen llegar a poseer gran número de grupos hidroxilos y/o azúcares, esto los hace ser considerados polares, por lo que son ligeramente

solubles en disolventes polares, como el metanol (Pérez-Nájera y col., 2013). El procedimiento de extracción inició pesando 66.7 g bagazo de uva molido al cual se agregaron en 1000 mL de metanol-agua (80:20) para ser sometidos a un proceso de oscilación de 12 h y una posterior sonicación a 42 KHz en un equipo Branson durante 30 min. Para la recuperación final de un sobrenadante se centrifugó en un equipo Velocity 18R de la marca Metrix por tres ciclos a 3000 rpm. El extracto metanólico de BU (*Vitis vinífera*) (EM) concentrado fue secado bajo atmosfera de nitrógeno por una h y liofilizado con el quipo Labconco FreeZone 4.5 liter Freeze Dry Systems para ser congelado a una temperatura de -80° C. Este procedimiento se realizó por triplicado.

6.6. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales por el Método Folin-Ciocalteu.

Con el uso del método colorimétrico Folin-Ciocalteu adaptado (Waterman y Mole, 1994), el cual tiene su fundamento en el carácter reductor de los CF. El reactivo Folin-Ciocalteu está compuesto por los ácidos fosfotungsténico y fosfomolibdico de color amarillento a pH básico, dando lugar a la formación de óxidos de tungsteno y molibdeno con una coloración azul la cual es cuantificable mediante una determinación espectrofotométrica a 750 nm (Singleton y col., 1965; Pérez Najera y col., 2013). El método permite el análisis de compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (fenoles, ácido tánico, taninos, ligninas, ácidos húmicos, proteínas etc.) basándose en la reducción del ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio). Todo el procedimiento se realizó evitando el contacto de las muestras con la luz. La curva de calibración se realizó de acuerdo el Cuadro 3.

La cuantificación de Fenoles Totales (FT) se realizó por triplicado en una microplaca de 96 pozos. En obscuridad se adicionaron a los pozos 50 μ L de agua HPLC con ayuda de una pipeta multicanal. Se agregaron 13 μ L de agua HPLC a todos los blancos y 13 μ L de reactivo de Folin sólo a los de pozos correspondientes a la curva y muestras. Se dejó reposar la placa por 6 min.

Cumplido el tiempo se le agregaron 125 μL de Na_2CO_3 al 7% a todos los pozos y 100 μL de agua de HPLC, incluidos los blancos. Se cubrieron las muestras y se dejaron reposar 1 h 30 min a temperatura ambiente. Con el uso de un lector de ELISA (Thermo, Multiskacan Ascent) se procedió a la lectura a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico (mg eq AG)/g de bagazo. Se verificó la linealidad y reproducibilidad de la curva de calibración (Espinosa y col., 2015).

Cuadro 3. Diluciones de ácido gálico para la elaboración de la curva de calibración

Concentración (mg/mL)	Ácido gálico (μL)	Agua HPLC (μL)
0.20	250	2250
0.18	225	2275
0.16	200	2300
0.14	175	2325
0.12	150	2350
0.10	125	2375
0.08	100	2400
0.06	75	2425
0.04	50	2450
0.02	25	2475

6.7. Determinación de Antocianinas Totales.

Por el método de pH diferencial se realizó la determinación de las Antocianinas Totales (AT). La cuantificación se realizó a un pH de 1, con la finalidad de llevar a las antocianinas a la forma de ión flavilio el cual es el responsable del cambio de color dependiente a las antocianinas. En ausencia de luz se pesaron 0.2 g de muestra y se añadieron 3 mL de etanol acidificado, se sonicó a 42 KHz en un equipo Branson 1510, a 40° C durante 30 min ajustando el pH a 1.0 y 4.5 con HCl 4 N en dos series separadas. Se centrifugó la solución a 5000 rpm durante 15 min en equipo Velocity 18R de la marca Metrix por tres ciclos a 3000 rpm. El sobrenadante se decantó en otro tubo. Se leyó en un equipo UV- Vis UV WR 1600 PC en un rango de 494-700 nm. Para la obtención de la absorbancia de la muestra con la siguiente fórmula:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

La concentración de AT en la muestra se calculó según la siguiente ecuación.

$$AT = (A * MW * DF * 1000) / (\epsilon * l)$$

Donde: A = Absorbancia de la muestra, ϵ = Absortividad molar de Malvidina -3-O-glucósido, DF = Factor de dilución (15), E = Espesor de la celda (29 500), MW = Peso molecular de Malvidina -3-O-glucósido (463 g/mol).

6.8. Determinación de Taninos Condensados.

Los taninos condensados (TC) fueron determinados por el método de la vainillina-HCl, propuesto por Deshpande y Cheryan (1987) el cual se realizó y se cuantificó como equivalentes de (+) catequina en mg/100 g (mg EC/100 g). El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas (taninos condensados) en soluciones ácidas. La vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermediario de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado de rosa o rojo cereza. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como catequina (Ortiz y col., 2010). La elaboración de la curva patrón se hizo en total ausencia de luz marcando 10 diferentes concentraciones como lo marca el Cuadro 4.

La cuantificación se realizó por triplicado en una micro placa de 96 pozos y se colocó en cada pozo de la placa con multicanal lo siguiente:

- Blanco de calibración: En la placa 5 veces 40 μ L de HCl al 4%
- Blanco muestra: En la placa 5 veces 40 μ L de HCl al 4%.

Se preparó la solución (1:1) de HCl al 8% (6000 μ L) y Vainillina al 1% (6000 μ L) en una charola:

- Curva: 5 x 40 μ L de solución de HCl al 8%: Vainillina al 1%.

- Muestra: 5 x 40 µL de solución de HCl al 8%: Vainillina al 1%.

Cuadro 4. Diluciones de Catequina para curva de calibración

Concentración (mg/mL)	(+) Catequina (µL)	Metanol (µL)
0.20	500	1000
0.18	450	1025
0.16	400	1050
0.14	350	1075
0.12	300	1100
0.10	250	1125
0.08	200	1150
0.06	150	1175
0.04	100	1200
0.02	50	1225

En total ausencia de luz las muestras fueron leídas en un lector de ELISA (Thermo, Multiskacan Ascent) e incubadas por 20 min a 30° C. Se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Se verificó la linealidad y reproducibilidad de la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg eq de (+) Catequina/g de BU (Espinosa y col., 2015).

6.9. Determinación de la Capacidad antioxidante de BU.

6.9.1. Capacidad antioxidante de compuestos fenólicos por método DPPH.

La actividad antioxidante del bagazo de uva (*Vitis vinífera*) se evaluó de acuerdo al método químico para la neutralización del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) el cual es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y absorbe a una longitud de onda de 517 nm, descrito por Von Gadow y col. (1997). El fundamento del método consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción de una sustancia antioxidante; La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Castañeda y col., 2008). La

metodología consistió en agregar de 2 mL de una disolución en metanol de DPPH de 6×10^{-5} M, a los cuales se añadió 0.05 mL del extracto de BU, se registró la caída de absorbancia a 517 nm en un tiempo de 16 minutos utilizando un lector de ELISA (Thermo, Multiskacan Ascent). La actividad antioxidante se calcula como el Porcentaje de Inhibición (PI) para diferentes concentraciones del extracto en metanol de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$PI (\%) = \frac{Abs(t_0) - Abs(t_{16})}{Abs(t_0)}$$

Se calculó la CE_{50} (concentración de extracto que causa una inhibición al 50% del radical DPPH). Se dispuso de los valores de Porcentaje de Inhibición (PI) para diferentes concentraciones del extracto de acuerdo a los datos publicados por Soto-Álvarez (2015).

6.9.2. Poder antioxidante de reducción de Hierro (FRAP).

La mayor parte de los métodos para la valoración de la capacidad antioxidante de diversos compuestos se basan en una reacción de transferencia de un electrón (SET, por sus siglas en inglés) o en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés), entre un antioxidante y el radical libre. Dentro de los métodos derivados del mecanismo SET, en los que se valora la capacidad reductora del antioxidante, uno de los más utilizados es el de la reducción férrica (FRAP, por sus siglas en inglés). Esta metodología consiste en medir el incremento de la absorbancia a 595 nm en el rango del color azul que se desarrolla cuando el complejo TPTZ- Fe^{3+} se reduce a TPTZ- Fe^{2+} . De esta forma, la capacidad antioxidante que presenta el extracto de BU fue medida como la capacidad reductora del extracto. La determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso del BU se determinó mediante el método de Habilidad Reductora Férrica de Plasma (FRAP) descrita por Benzie y Strain (1996).

El reactivo se preparó con 25 mL de tampón acetato 300 mM (pH 3.6), 2,5 mL de una disolución de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 mM en HCl 40 mM y

2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a 20 mM en agua destilada. Se determinó colocando en una celda de 96 pozos con capacidad de 300 μL cada uno, 40 μL de muestra y 160 μL de reactivo preparado en fresco y fueron leídos a una longitud de onda de 595 nm después de 6 min de reposo. El valor de la capacidad antioxidante se obtuvo al interpolar el diferencial de la absorbancia en una curva patrón, con las concentraciones de 0, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 μL de ácido ascórbico 1 mM. Los valores se reportaron en mmol eq de ácido ascórbico por gramo de BU (mmol eq AA/g).

6.9.3. Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada.

Este método se basa en la reducción cúprica Cu^{+2} a Cu^{+1} para determinar la capacidad antioxidante reductora. El agente cromogénico oxidante usado es la neocuproína disuelto en etanol. En esta reacción determina el contenido de polifenoles que se oxidan (Torres-Ortiz, 2017). Las soluciones utilizadas para determinar la capacidad antioxidante por voltamperometría cíclica se realizaron de la siguiente manera: Se preparó una solución buffer 1.2 M de AcNH_4 (pH=7) en agua destilada, el pH fue ajustado adicionando HCl (1.2 M) y NaOH (1.2 M). Al mismo tiempo se elaboró una solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (neocuproína) a una concentración de 3×10^{-3} M en agua destilada. Finalmente, la neocuproína fue disuelta en etanol a una concentración 6×10^{-3} M. Con el objetivo de preparar una curva estándar de Trolox, se formularon soluciones de Trolox en etanol a diferentes concentraciones (1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 4×10^{-4} , 6×10^{-4} y 8×10^{-4} M) para obtener la capacidad antioxidante en función de equivalentes de Trolox. La curva estándar de Trolox y los voltamperogramas de los diferentes extractos fueron evaluados en un potencióstato Biologic VP-50 con una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

La solución CUPRAC que se empleó en cada una de las pruebas, fue la misma para la determinación de la curva estándar de Trolox y la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de BU, dicha solución fue preparada utilizando 2 mL de cada una de las soluciones previamente mencionadas y se adicionó en una celda electroquímica de la siguiente manera: solución de CuCl_2 ,

solución de neocuproina, solución buffer de Acetato de Amonio, solución de Trolox o muestra, aforando con agua destilada hasta 10 mL. La solución CUPRAC se mantuvo en agitación y a burbujeo contante con N₂ por 5 min. Para la obtención de los voltamperogramas, se montaron tres electrodos en una celda electroquímica. Se utilizó un electrodo de trabajo de carbón vítreo, un electrodo auxiliar de grafito y un electrodo auxiliar de Calomel Hg/Hg₂Cl₂ en una solución de KCl. Para cada una de las mediciones fue necesario pulir el electrodo de trabajo con polvo de alúmina y someterlo a una agitación ultrasónica durante 15 min, este procedimiento se realizó por triplicado. Se realizaron las mediciones con un potencial de circuito abierto (OCP) que determinó cuando el potencial mostró una variación superior a 1 mV por segundo.

6.9.4. Determinación de la capacidad antioxidante por método Capacidad Antioxidante de Radicales de Oxígeno (ORAC).

Este método tiene su fundamento en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de Hidrógeno. Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos, la cual se utilizó para la preparación de los reactivos y diluciones necesarias ajustando su pH a 7.4. Se preparó solución madre de fluoresceína 0.53 mM y solución de trabajo 8.18×10^{-5} mM. Se tomaron 1.5 mL de la solución de trabajo de fluoresceína y se colocaron en una celda espectrofotométrica. En la misma celda se agregó 0.75 mL de muestra (diluida en solución amortiguadora con el objetivo de que el poder antioxidante decayera en un lapso de tiempo menor que el estándar de Trolox 40 μM y mayor que la de 10 μM colocándolo en un baño maría a 37° C por 5 min, después de ese tiempo se agregaron 0.75 mL de solución AAPH (2,2- azobis (2-amidinopropano)-HCl). Se tomó la primera lectura a 512 nm y se regresó la celda a baño maría. Se continuó leyendo la celda cada minuto, hasta que el valor de la intensidad correspondió a un 10% del valor inicial. En este procedimiento se corrió un blanco junto con la muestra. Los valores se reportaron en μmol equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μmol ET/G) mediante una curva estándar usando el área neta bajo la curva (ANBC) de cuatro concentraciones de Trolox.

6.10. Determinación de Compuestos fenólicos por HPLC.

Se empleó el método descrito por Ramamurthy y col. (1992). El proceso inició con el pesaje de 100 mg de muestra liofilizada y molida, los cuales fueron colocados en un tubo falcón al que se le adicionaron 10 mL de metanol al 30%, la muestra se agitó por 10 min en un vortex, 10 min en sonicación y una segunda agitación por 10 min en vortex. Se procedió a un proceso de centrifugación por 5 min a 5000 rpm. Del sobrenadante recuperado, se tomó una alícuota la cual fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm , el filtrado fue colocado en un vial e inyectado inmediatamente al HPLC. El análisis se efectuó con una separación en fase reversa utilizando la columna Zorbax (ODS)-C18 (5 μm tamaño de partícula, 15 cm x 4.6 mm i.d.). Se empleó una precolumna Zorbax ODS –C18. La fase móvil fue corrida a 1.5 ml/min y consistió en solvente A (ácido fórmico al 1% en agua desionizada y solvente B (ácido fórmico al 1% en metanol). El gradiente del solvente fue programado de 10 a 100% en B en A en 30 min, el detector UV fue programado a 280 nm y el volumen de inyección fue de 20 μL . Todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de 0.45 μm . La identificación de CF se realizó mediante comparación con el tiempo de retención y espectros de absorción de estándares de CF comerciales y su cuantificación fue con curvas de calibración de los mismos (Godínez, 2017).

Aunado a la técnica antes mencionada se realizó una prueba para determinar la posible relación entre la presencia de los CF extraídos con NADES y el tiempo de extracción de los tratamientos. Las muestras fueron tomadas y pesadas de forma independiente con de 0.6 g de extracto liofilizado y 0.6 g de solvente NADES, se tomó una muestra sin agitación y otra sometida a 24 h de agitación. Los solventes fueron utilizados como blancos. Todos los tratamientos fueron primeramente disueltos en 5 mL de metanol. Después del proceso de agitación constante se sometieron a uno de sonicación en un solo ciclo de 10 min. Se procedió al análisis e identificación de los CF por HPLC con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250 mm 0.5 μm . La fase móvil fue acetonitrilo: agua (ácido acético 1%) en proporción 90:10 con un flujo de 1 ml/min. Se inyectaron 50 μL de cada muestra y

cada corrida fue de 15 min. Para obtener la identificación y cuantificación de los CF se utilizaron los estándares: Catequina, Quercetina y Ácido Gálico.

6.11. Estudio de CF mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) -Espectrometría de Masas.

UPLC-Espectrometría de Masas es otro método analítico utilizado para la detección de CF provenientes de matrices vegetales como lo es el BU. La espectrometría de masas es una técnica de detección que tiene su fundamento en la medición de la masa individual de átomos y moléculas. En esta técnica se lleva a cabo la determinación de la masa del peso molecular de los compuestos mediante la ionización, separación y medida de los iones moleculares presentes en el BU. Por una parte, la UPLC es una avanzada técnica de cromatografía de líquidos en la cual hay una estrecha columna con partículas de alrededor de los 1,7 μm y fases móviles que operan a altas presiones. Las principales ventajas de UPLC son el alto rendimiento en comparación con cromatografía líquida (HPLC), la mejora de la resolución, menores tiempos de retención y una mejor sensibilidad; Además de un mejor acoplamiento de los sistemas de ionización Electro Spray (ESI) los cuales fueron utilizados en este estudio junto con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este estudio se trabajó para su detección con los probables compuestos más abundantes en el BU que se tienen reportados (Soto-Álvarez, 2015) los cuales son descritos en la Cuadro 5. Se probaron los extractos NADES AM-CC así como el extracto metanólico. Se comprobó si existía o no algún efecto de intervención entre los analitos de interés y los solventes presentes en los que extractos conforman a los NADES (Jiménez-Cordón, 2011).

El análisis por UPLC de las muestras preparadas requirió de previo filtrado a través de un filtro de 0.22 μm . Las muestras se colocaron en viales de 2 mL, inyectando 5 μL de muestra para realizar el análisis. Se analizaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Acquity clase I equipado con un detector ultravioleta (UPLC-UV) usando una columna Acquity BEH C18 (50 mm x 2.1 mm x 1.7 μm) (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). El flujo fue de 0.5

mL/minuto. Las fases móviles consistieron en agua acidificada con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (ACN) (B). El gradiente comenzó a 0% de B, aumentó a 15% de B a los 2.5 minutos, aumentó a 90% de B a los 12 minutos, luego se mantuvo a 95% de B hasta 13 minutos y regresó a 0% de B a los 15 minutos. La detección se realizó con UV de longitud de onda de 210-600 nm (Stein-Chisholm y col., 2017). La malvidina es una antocianidina O-metilada considerada como el principal pigmento de la uva. Para el análisis de malvidina se realizó en el rango positivo debido a que este es un ión que ya está cargado positivamente.

Cuadro 5. Probables precursores en ESI positivo, tipo de análisis MS tomadas del European MassBank (Stein-Chisholm y col., 2017).

Compuesto	Relación m/z	Error masa (mDa)	Tiempo de Retención (min)	Detector de cuentas	Respuesta	Aductos
Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido)	639.1709	-7.8	6.12	521821	393314	+H
Malvidin-3-galactosido	493.1343	-7.5	2.56	87732	68821	+H

7. Análisis Estadístico.

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Se realizó un ANOVA de una vía y pos hoc de Tukey ($p \leq 0.05$) para la comparación de medias entre los diferentes extractos.

8. Resultados y Discusión.

8.1. Obtención de la muestra.

Quinientos gramos de la muestra de BU (*Vitis vinifera*) fueron separados del tallo manualmente con lo que se obtuvo un porcentaje de 46.19% de semilla y 53.81% de piel. Después del secado a lo largo de los tres ciclos continuos de 24 h se registró su peso y se determinó el porcentaje de humedad en 54.08%. El comportamiento de la muestra fue reportado en la Figura 6.

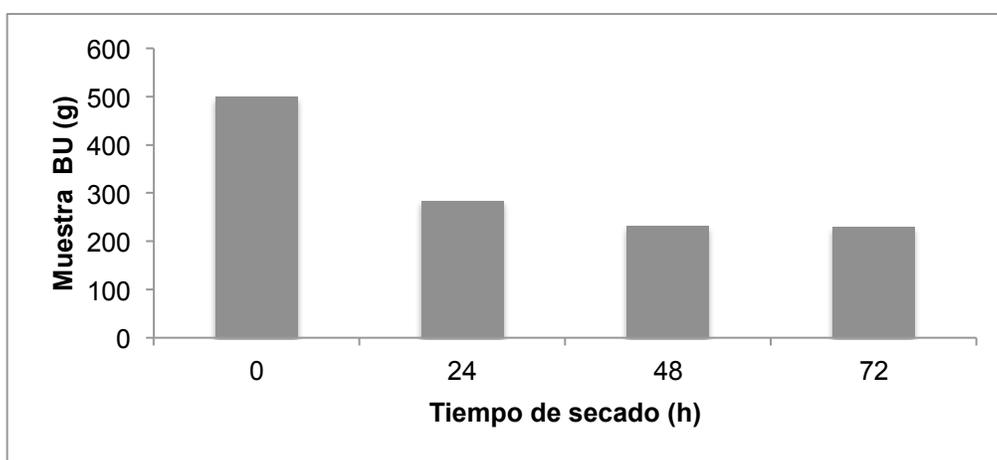


Figura 6. Secado de BU para la obtención de la muestra de trabajo a lo largo de 72 h. Se tomó el peso inicial de la muestra de 500 g manteniéndola a las condiciones de secado establecidas en la metodología. Se registró su peso a las 24, 48 y 72 h que resultó de 284.2, 231.2, 229.6 g, respectivamente.

8.2. Extracción de CF a partir de BU mediante NADES y metano-agua 80:20.

El rendimiento en base seca de los extractos (1.5 mL de solvente y 0.1 g de BU) se muestra en el Cuadro 6. En el caso del extracto metanólico (EM), el solvente se eliminó por completo dada la volatilidad del solvente, no así los NADES. Por lo anterior, no fue posible descartar los componentes de los solventes para el caso de NADES después de ser sometido abajo atmósfera de nitrógeno.

Cuadro 6. Obtención de Porcentaje de rendimiento de tratamientos de extracción.

Tratamiento	Peso Inicial del solvente (g)	BU (g)	Peso del extracto fresco (g)	Peso del extracto en base seca (g)	Rendimiento en base seca (%)
EM	1.2	0.1	1.25 ± 0.015	0.43 ± 0.049	34.95
AC-CC	2.06	0.1	1.12 ± 0.65	0.92 ± 0.32	81.44
AM-CC	1.89	0.1	1.04 ± 0.47	0.98 ± 0.01	93.59
S-CC	1.91	0.1	0.47 ± 0.87	0.31 ± 0.14	66.40
Glc-CC	2.00	0.1	0.62 ± 0.95	0.53 ± 0.36	86.41
Gli-CC	1.61	0.1	1.00 ± 0.37	0.82 ± 0.036	81.85

8.3. Determinación de Compuestos Fenólicos Totales por el Método Folin-Ciocalteu.

Con la finalidad de obtener mayor rendimiento de FT a partir del BU (*Vitis vinífera*) de la variedad Syrah, cada uno de los procesos de extracción fueron complementados con 30 min de sonicación a 42 KHz. Las concentraciones de FT del BU fueron expresadas en mg eq de ácido gálico (AG)/L de extracto y los rendimientos en (mg eq AG)/g de BU como se encuentran en la Figura 7. Previamente se descartó la interferencia de los solventes en la determinación. La mayor extracción ($p \leq 0.05$) se logró con metanol-agua 80:20 (440 mg EqAG/L). Lo anterior coincide con lo reportado por Meyer y Hernández. (1997) para variedades de uva tinta (*Vitis vinifera*) entre 497-1215 mg EqAG/L, incluyendo variedad Syrah. En el caso de la extracción con NADES, los resultados se comparan con los rendimientos obtenidos en granos de café verde (0.00099 mg/gramo café verde) (Paiva y col., 2014), siendo mayores en el caso del BU (*Vitis vinifera*), donde el resultado menor se observó con AC-CC (37.11 mg eq AG)/g de BU) y el mayor rendimiento se obtuvo con AM-CC (47.33 mg eq AG)/g de BU). Incluso la extracción de FT de BU utilizando NADES fue mayor que lo previamente reportado para menta (24.89 mgEAG/g) y salvia (23.56 mgEAG/g) utilizando como solvente de extracción ácido láctico-cloruro de colina (Bakirtziy col., 2015).

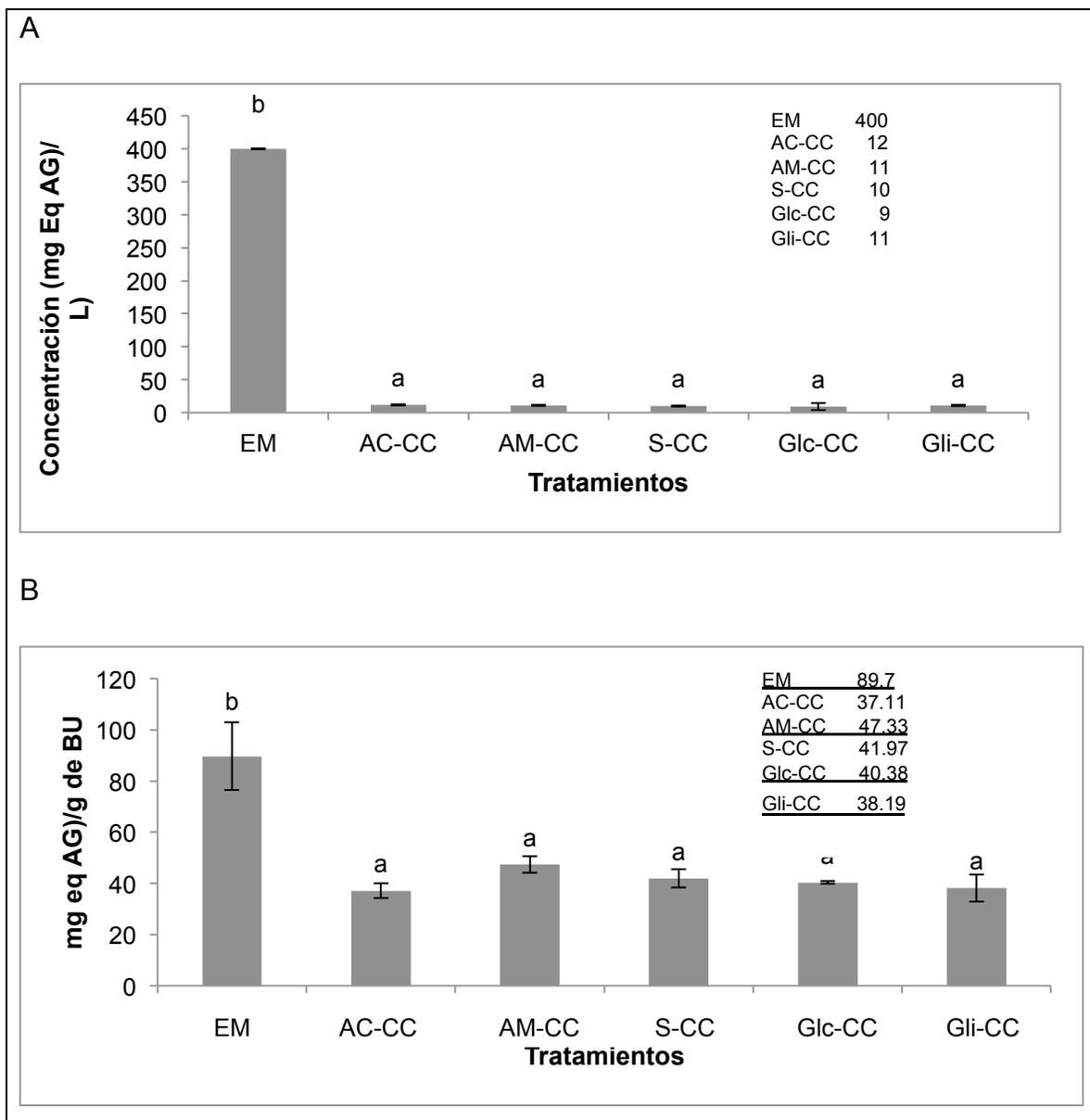


Figura 7. Extracción de FT mediante NADES y metanol-agua 80:20. A) Concentración de FT, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

Comparando con otro estudio donde se evaluó por este mismo método la cantidad de FT en piel de uva de la variedad Croata Plavac mali (*Vitis vinifera*), se encontraron rendimientos de 36 mg eq AG/g de BU para el EM y 18 mg eq AG/g de BU para NADES de Glu-CC (Bakirtziy col., 2015), menores a los encontrados en el presente trabajo que fueron de 89.7 y 48.38 mg eq AG/g, respectivamente. De manera contraria, los rendimientos de FT encontrados en nuestro estudio

resultaron ser inferiores para los tratamientos de AM-CC (47.33 mg eq AG/g de BU) y Gli-CC (38.19 mg eq AG/g de BU) los cuales están reportados por ese estudio de 91 y 63 mg eq AG/g de piel de uva respectivamente. Los NADES que se utilizaron en el presente estudio están basados en cloruro de colina adicionados con donadores de puentes de hidrógeno (azúcares, ácidos orgánicos, polialcoholes), lo cual interviene en la eficiencia de poder de extracción de los distintos NADES sobre CF como puede ser de la polaridad del solvente o el pH del mismo (Bakirtzi y col., 2015; Bosiljkov y col., 2016). Las condiciones climáticas, temperatura, sequias, intensidad luminosa, tipo de suelo, plagas, son algunos factores ambientales que influyen en el metabolismo de la vid para la producción de metabolitos secundarios como lo son los CF (Franco-Bañuelos y col., 2017).

8.4. Determinación de Antocianinas Totales.

Las antocianinas (AT) son compuestos altamente inestables y susceptibles a la degradación. Su color está asociado a los cambios de pH, temperatura, concentración presencia de oxígeno, luz entre otros factores (Cornejo., 2012). El rendimiento de AT obtenido para el EM fue de 1.05 mg eq Mvd-3-glu/g de BU, Con una concentración de 70.61 Mg AT/L. Las antocianinas producen los colores rojo y morado en la uva y van relacionados a una concentración de entre los 73 hasta 1708 mg AT/L de EM de BU para distintas variedades incluyendo la variedad Syrah, por lo que la concentración encontrada en este estudio se sitúa justo por debajo de este rango (Meyer y col., 1995).

La condición de fermentación en el BU es desfavorable para la obtención de mayores cantidades de antocianinas, lo que se puede ver reflejado en la variación de los resultados obtenidos dentro de una misma variedad de uva o diferente (Bulnes., 2012). Los NADES poseen una gran efectividad como agentes extractantes, sin embargo, su viscosidad y la naturaleza básica o ácida de algunos ingredientes pueden afectar la extracción o estabilidad de las antocianinas. La viscosidad baja es el mayor factor sobre los rendimientos de AT como es el caso el Gli-CC (259 cP) comparado con el Glu-CC (34 400 cP) con un rendimiento de

0.7 y 0.21 mg eq Mvd-3-glu)/g de BU, respectivamente (Figura 8) (Dai y col., 2016).

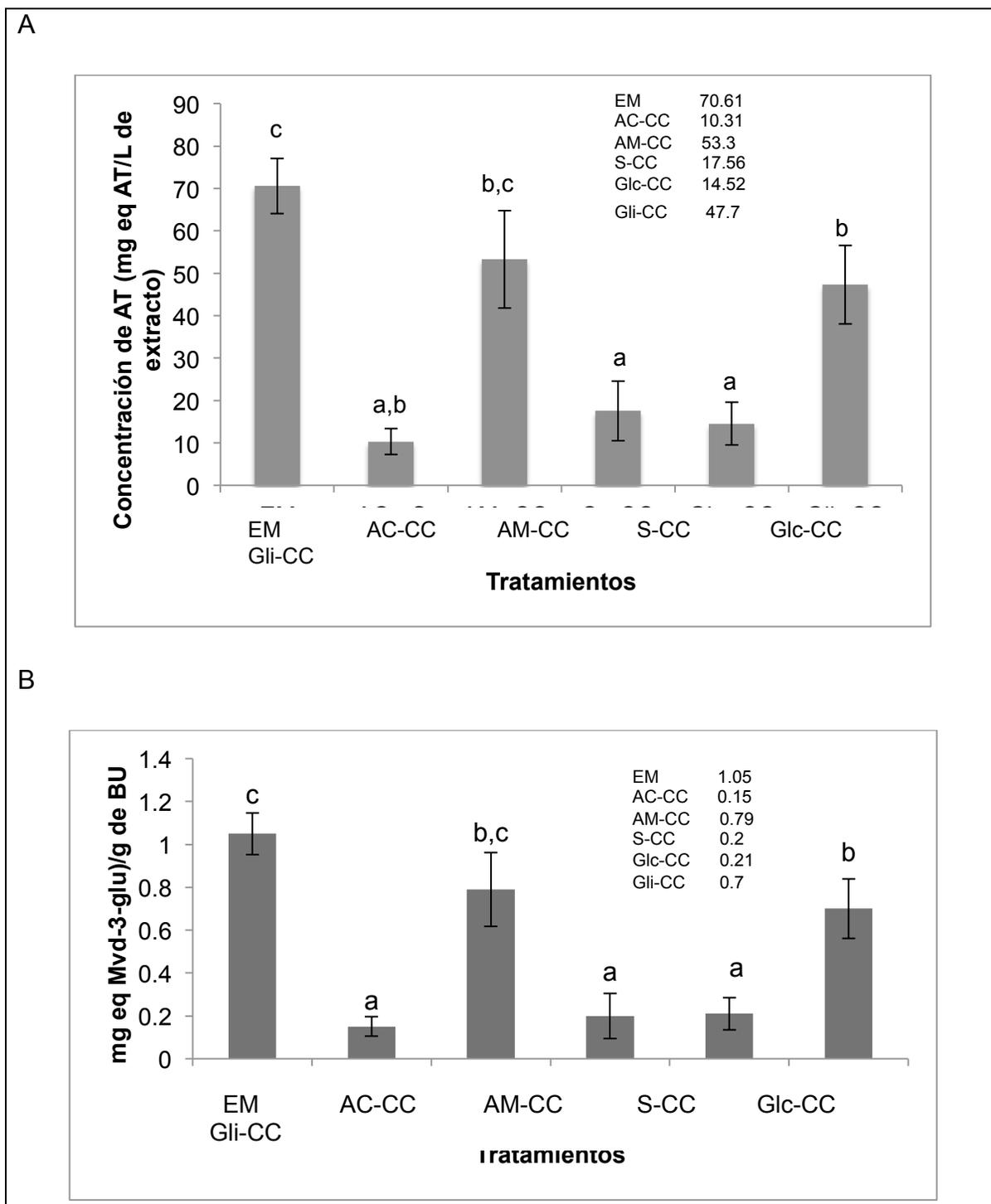


Figura 8. Extracción de AT mediante NADES y metanol-agua 80:20 A) Concentración de AT, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

En un estudio previo se evaluó por este mismo método la cantidad de AT en piel de uva de la variedad croata Plavac mali (*Vitis vinifera*) se observó que, entre los NADES, la mayor extracción de AT se obtuvo con AM-CC (24 mg eq At/L) , al igual que en el presente trabajo (Bakirtziy col., 2015) con el que se logro obtener 53.3 mg eq At/L. AM-CC es el NADES de mayor polaridad y un más bajo pH de presente estudio. Se sabe las antocianinas son moléculas polares que se solubilizan mejor en solventes polares que en solventes no polares y que el pH tiene gran importancia para las formas de equilibrio antociánico por lo que el poder de extracción de las antocianinas resultó ser como se tenía esperado. El EM superó a todos los NADES para la recuperación de AT, el NADES con menor capacidad de extracción fue Glu-CC con 14.5 mg eq At/L de extracto, menor que lo reportado por Bakirtziy col. (2015) de 16 mg eq At/L de extracto; Lo mismo ocurrió para el caso del NADES Gli-CC el cual esta reportado en el mismo estudio con 12 mg eq At/L de extracto encontrando en nuestro estudio 47.7 mg eq At/L (Bakirtziy col., 2015).

8.5. Determinación de Taninos Condensados.

Los TC son un grupo de moléculas sumamente importantes y responsables de algunas de las características organolépticas del BU sobre todo en relación con el sabor y el color. Es por eso que en este estudio se evaluó su rendimiento y concentración, lo cuales fueron obtenidos mediante el método Vainillina-HCl (Figura 9). Para el EM se obtuvo un rendimiento de 2.44 mg eq (+) Cat/g de BU. En un estudio donde se trabajó con la piel y la semilla por separado de la variedad de uva Syrah, se encontró en piel un máximo de 0.5 mg eq (+) Cat/g y en semilla 2.1 mg eq (+) Cat/g utilizando en un extracto etanólico al 12.5%, el cual tiene una polaridad diferente al EM; lo que explica el mayor rendimiento obtenido (Brusse, 2013).

Los CF de la piel difunden más fácilmente en medios polares pero los taninos de las semillas, donde se encuentran en mayor porcentaje, requieren la presencia de alcohol (Brusse, 2013). A su vez también se podría explicar la ausencia de TC en

los tratamientos realizados con NADES en este estudio, lo cuales se encuentran ligados de una forma mas íntima con la materia vegetal de la semilla, mientras que las antocianinas que se encuentran mayormente en la piel, están más disponibles. En el Cuadro 7 se muestra un resumen de los datos de extracción de CF, AT y TC.

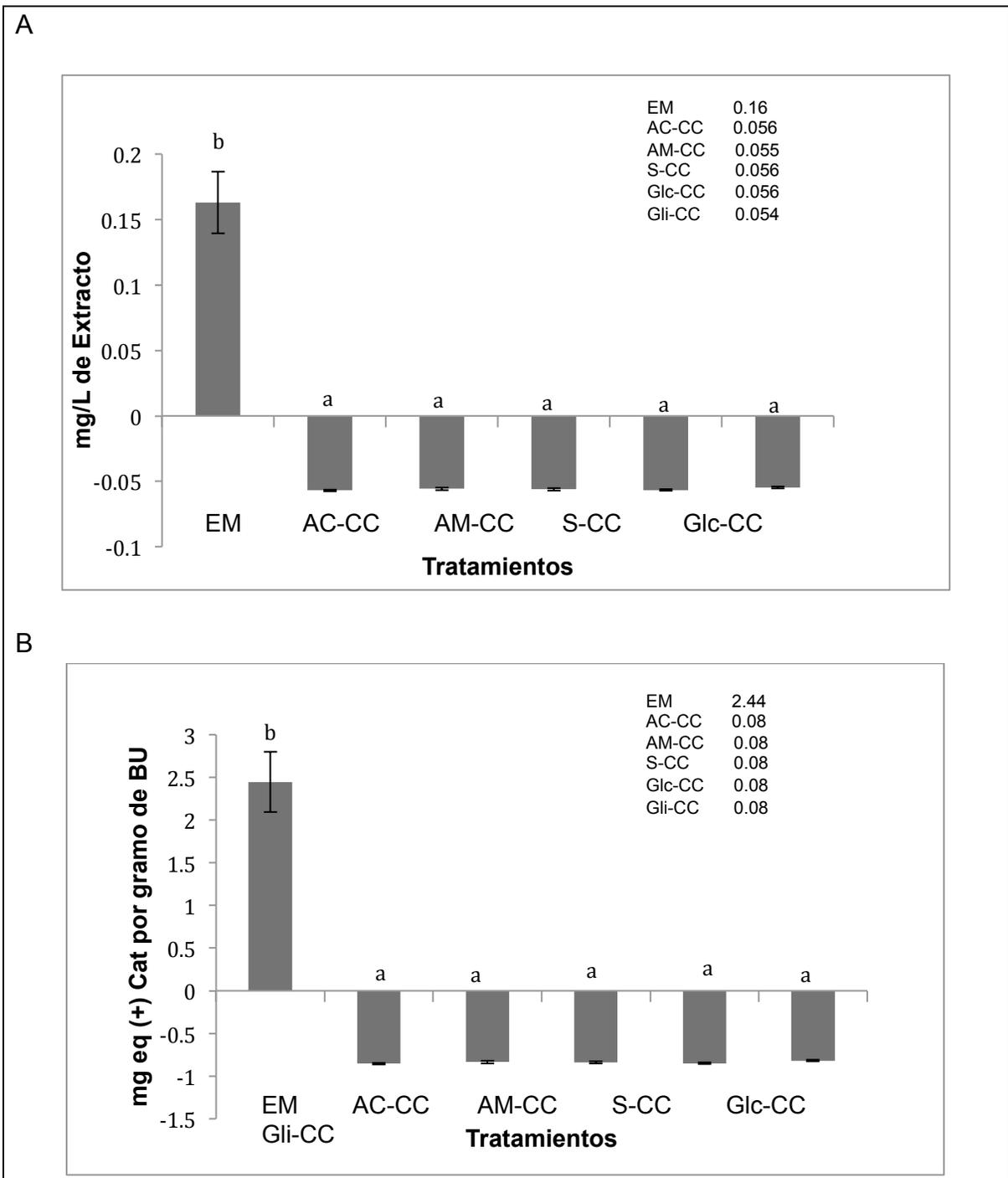


Figura 9. Extracción de TC mediante NADES y metanol-agua 80:20 A) Concentración de TC, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 7. Resumen de resultados de la extracción de CF de BU

	Unidades	EM	AC-CC	AM-CC	S-CC	Glc-CC	Gli-CC
FT	Rendimiento (mg eq AG)/g de BU	89.70 +13.2 ^b	37.11 +2.86 ^a	47.33 +3.21 ^a	41.97 +3.61 ^a	40.38 +0.48 ^a	38.19 +5.41 ^a
	Concentración (mg Eq AG)/L	440 +0.1 ^b	12 +0.99 ^a	11 +0.79 ^a	10 +0.91 ^a	9.0 +5.05 ^a	11 +1.15 ^a
AT	Rendimiento (mg eq Mvd-3-glu)/g de BU)	1.05 +0.09 ^c	0.15 + 0.045 ^a	0.79 +17 ^{b,c}	0.2 +0.10 ^a	0.21 +0.075 ^a	0.70 +0.138 ^b
	Concentración mg AT/L	70.61 +6.53 ^c	10.31 +3.04 ^{a,b}	53.30 +11.4 ^{b,c}	17.5 +7.0 ^a	14.52 +5.03 ^a	47.30 +9.24 ^b
TC	Rendimiento (mg eq (+) Cat)/g de BU	2.44 +7.83 ^b	-0.08 +0.22 ^a	-0.08 +0.36 ^a	-0.08 +0.31 ^a	-0.08 +0.23 ^a	-0.08 +0.25 ^a
	Concentración mg TC/L	0.16 +0.023 ^b	-0.056 +0.0006 ^a	-0.055 +0.001 ^a	-0.056 +0.0009 ^a	- 0.056 +0.0006 ^a	-0.0054 +0.0007 ^a

Resultados promedios de análisis en triplicado.

8.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante de CF de BU.

8.6.1. Método DPPH

Los CF presentan diferente capacidad antioxidante, relacionada con el número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene su estructura. Las catequinas, el ácido gálico y los taninos condensados entre otros CF presentes en el BU, son potentes secuestradores de radicales libres (hidroxil, peroxil, superoxido y DPPH) (Muñoz-De la Cruz, 2009). La prueba de capacidad antioxidante por DPPH corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto y es reportada como $\mu\text{g eq de AA/g de BU}$ (Figura 10). Para el EM se obtuvo un porcentaje de inhibición del 79.15%, superior al reportado en otro estudio para el EM de BU de uva de variedad Bangalore Blue que fue del de 67% (Chidambara y col., 2002) e inferior al reportado para la piel de la uva en la variedad Flame de

84.27% (Molina-Quijada y col., 2010), ambas variedades cultivadas en distintas partes del mundo bajo distintas condiciones para la producción de metabolitos secundarios. Por otro lado, para extractos realizados con NADES se ha logrado obtener en estudios realizados con Jengibre (*Zingiber officinale*) porcentajes de inhibición altos utilizando los NADES sacarosa-cloruro de colina (81.47%), prolina-ácido láctico (89.33%) y trehalosa-ácido cítrico (87.2%) (Rajan y col., 2015). Para nuestro estudio se obtuvieron valores no superiores al 10.07% de inhibición del radical encontrado en el extracto NADES Gli-CC. La diferencia entre el estudio antes mencionado con jengibre puede estar relacionada con el poder extractante de los NADES y su relación con los compuestos presentes en la muestra responsables de la inhibición del radical, los cuales son diferentes a los CF extraídos del BU de la variedad Syrah.

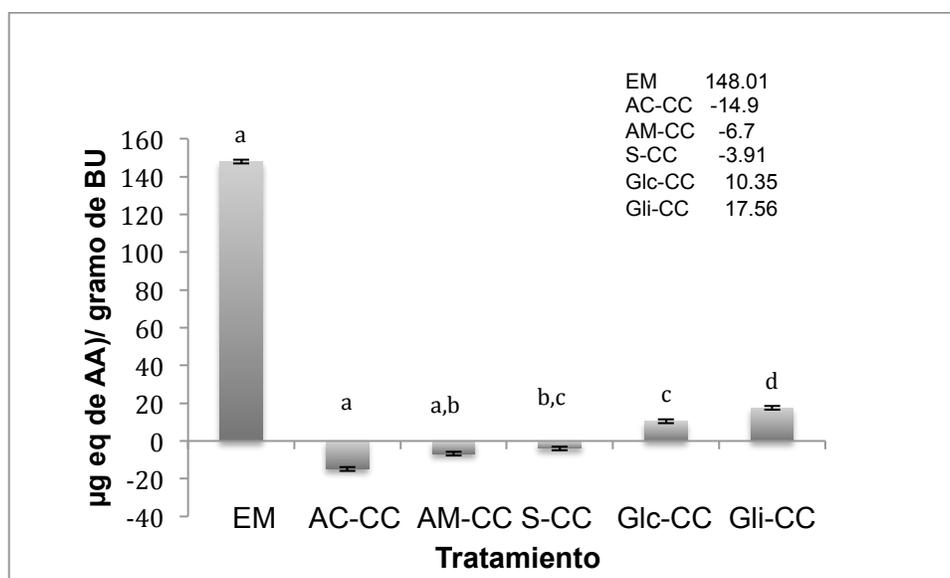


Figura 10. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de BU con NADES y el EM por el método DPPH. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

8.6.2. Método Capacidad antioxidante de reducción de Hierro (FRAP).

De acuerdo a los resultados de la prueba FRAP, el extracto con mayor actividad antioxidante respecto a la transferencia de electrones fue el EM con 6.9 mg eq Ac. ascórbico/100 g BU (Figura 11). En un estudio se ha reportado el uso de la mezcla

de solventes metanol:agua:ácido acético para la extracción de fenólicos de piel y de semilla de uva de la Variedad Cabernet Sauvignon, con valores de 605.18 y 165.47 μM eq Ac. ascórbico /g muestra seca (Xu y col., 2010). El protocolo del ensayo FRAP indica que se debe dejar reaccionar el reactivo con la muestra de 4 - 6 minutos. Esto genera un impacto en los resultados ya que pueden variar dependiendo del tiempo de análisis. Los CF de reacción rápida se descomponen en compuestos con menor reactividad por lo que se analizan mejor en tiempos de reacción cercanos a los 4 min. Sin embargo, algunos CF que reaccionan lentamente y requieren más tiempo de reacción para la detección, llegando inclusive a los 180 minutos para obtener su punto máximo de capacidad antioxidante. Sin embargo, el uso de este método para la determinación de capacidad antioxidante es simple, económico y rápido comparado con otros métodos de determinación de capacidad antioxidante (Bulnes., 2012).

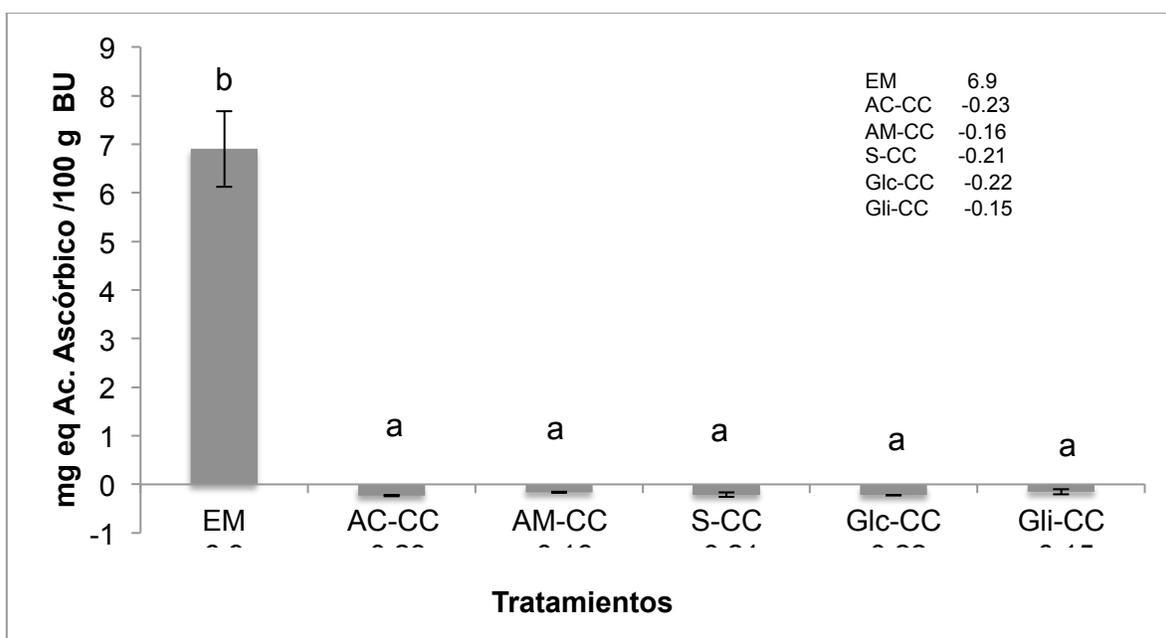


Figura 11. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de BU con NADES y el EM por el método FRAP. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los extractos correspondientes a los tratamientos con NADES no presentaron la actividad esperada al realizar esta prueba, no hubo diferencia significativa de

incremento de la capacidad antioxidante mostrándose con un comportamiento similar y por debajo del EM.

8.6.3. Método Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada (CUPRAC).

Adicionalmente, se utilizó el método electroquímico (voltamperometría cíclica) (Torres, 2017). En la Figura 12 se muestran los voltamperogramas para los tratamientos de EM y NADES. Se puede observar que el potencial inicial para el EM fue de 0.32 ± 0.0072 mV. Esos valores mostraron un cambio a potenciales negativos en comparación con los potenciales de tratamientos con NADES los cuales se sitúan en un rango de potencial de entre los 0.45 ± 0.0078 mV (AM-CC) y los 0.49 ± 0.0059 mV (AC-CC). Estos resultados son similares a los encontrados para un EM de *Crataegus gracilior*, el cual fue reportado 0.47 mV (Torres., 2017).

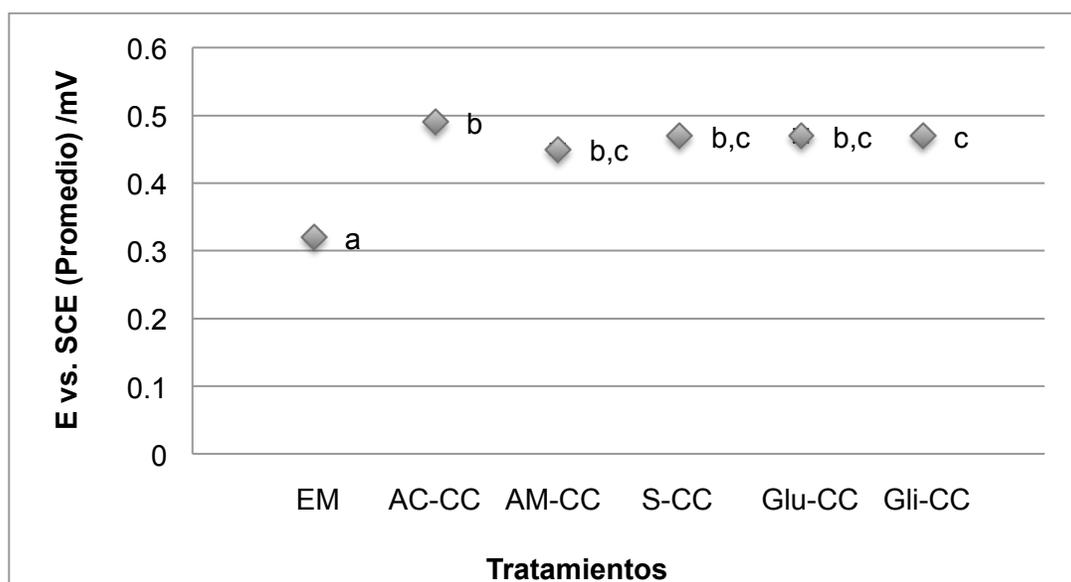
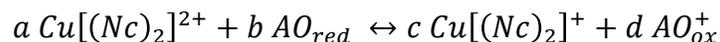


Figura 12. Comparación de los potenciales obtenidos por el método electroquímico (voltamperometría cíclica) a partir de los Voltamperogramas para cada tratamiento de extracción. EM. 0.32 ± 0.0072 mV , AC-CC 0.49 ± 0.0059 mV AM-CC 0.45 ± 0.0078 mV S-CC 0.47 ± 0.0023 mV Glu-CC 0.47 ± 0.0023 mV Gli-CC 0.47 ± 0.0063 mV. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

Este cambio a valores negativos potenciales tiene una relación con un incremento en la cantidad del complejo $c Cu[(Nc)_2]^+$ debido a la capacidad del agente antioxidante de donar un electrón al complejo oxidado $a Cu[(Nc)_2]^{2+}$ de acuerdo a la siguiente ecuación (Espinosa-Acosta y col., 2018).



Donde AO es el agente antioxidante reducido y el $+ AO_{ox}$ es el agente antioxidante cuando se oxida. Este comportamiento está directamente relacionado con la capacidad del agente antioxidante de los CF para promover la reacción de reducción para la molécula que previamente se había oxidado $a Cu[(Nc)_2]^{2+}$ (Espinosa-Acosta y col., 2018). Este comportamiento se basa en la ecuación de Nernst (Espinosa-Acosta y col., 2018).

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{Cu[(Nc)_2]^+}}{a_{Cu[(Nc)_2]^{2+}}}$$

En la ecuación de Nerst se parte de la oxidación a la reducción contrario a como ocurren el caso de los voltamperogramas (Figura 13). El complejo reducido se oxida y se ve reflejado en el pico máximo de oxidación siendo este una medida indirecta de la capacidad antioxidante.

Se utilizó una curva de calibración Trolox la cual se obtuvo a partir de la corriente máxima de oxidación y se utilizó para presentar la actividad antioxidante para los tratamientos a los cuales fue sometido el BU de la variedad Syrah. Se propuso que la relación entre el pico actual de los tratamientos de extracción a los cuales se sometió el BU y el pico actual de Trolox (concentración 400 μ M) permite determinar la capacidad antioxidante de cada extracto de BU comparado con el mismo. El pico de oxidación está relacionado con la presencia de CF en la solución de trabajo CUPRAC, los cuales son los responsables de la capacidad antioxidante del BU (Figura 14). El EM presentó la mayor actividad antioxidante comparado con el Trolox y los NADES presentaron valores de corriente por debajo de los valores de la gráfica de calibración de Trolox. Cabe mencionar que todos

tratamientos se realizaron a la misma concentración que Trolox de 4×10^{-4} g/mL de etanol. Por medio de esta prueba se pueden comparar los resultados con las técnicas colorimétricas realizadas en este trabajo las cuales arrojaron resultados con una similar tendencia en la capacidad antioxidante de los tratamientos.

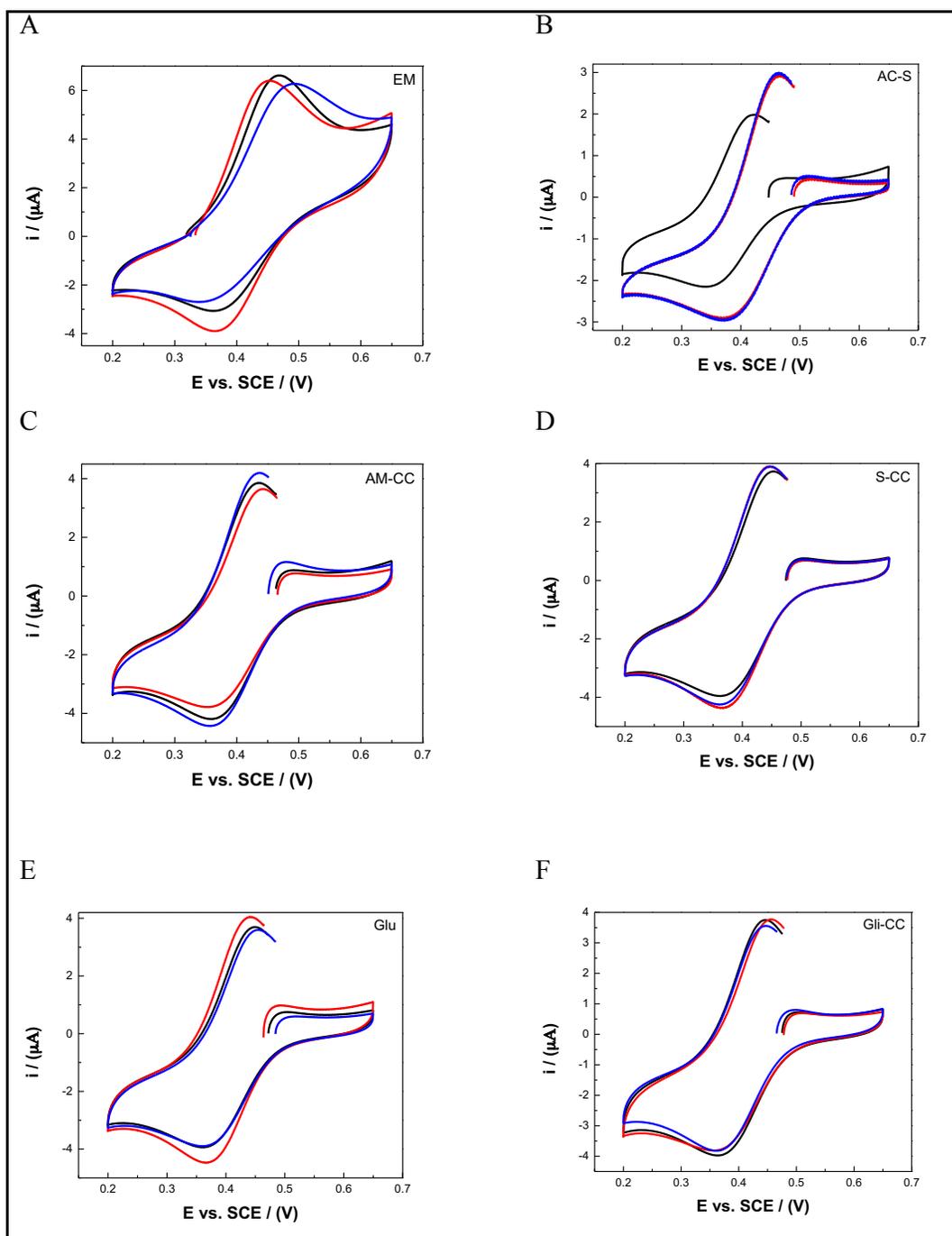


Figura 13. Voltamogramas cíclicos para los diferentes extractos de CF a partir de Bu. A) EM, B) AC-CC, C) AM-CC, D) S-CC, E) Glu-CC y F) Gli-CC. Estándar de referencia: Hg/Hg₂Cl₂, KCl (1M), contra electrodo de grafito y electrodo de trabajo de carbón vítreo (3 mm de diámetro). La exploración comenzó en el OCP con una velocidad de barrido de 100 mV • s⁻¹

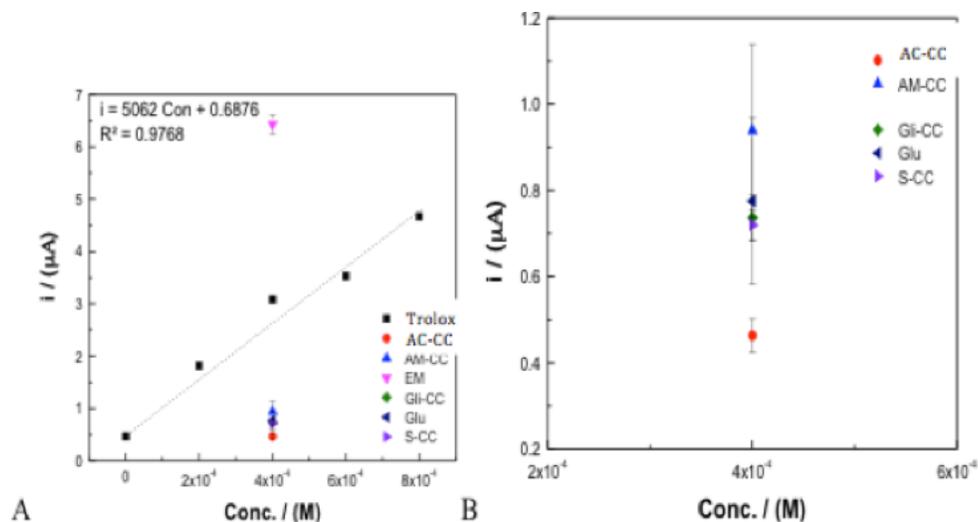


Figura 14. Comparación de la capacidad antioxidante de Trolox y los diferentes tratamientos por el método Capacidad Antioxidante Reductora Cúprica modificada (CUPRAC). A) Resultados obtenidos en comparación con la curva patrón de Trolox. EM $6.42 \pm 0.17 \mu\text{A}$, AC-CC $0.43 \pm 0.03 \mu\text{A}$, AM-CC $0.93 \pm 0.2 \mu\text{A}$, S-CC $0.7 \pm 0.03 \mu\text{A}$, Glu-CC $0.77 \pm 0.19 \mu\text{A}$, Gli-CC $0.77 \pm 0.05 \mu\text{A}$. B) Amplificación gráfica de los resultados obtenidos de tratamientos.

8.6.4. Método Capacidad Antioxidante de Radicales de Oxígeno (ORAC).

La capacidad antioxidante por radicales de oxígeno resultó ser alta para el EM al obtener una actividad ($p < 0.05$) de 9359 μM eq de Trolox/ g de BU de la variedad Syrah. Un estudio en el cual se trabajó con la variedad de uva tinta Malbec se encontró que el extracto Etanol:Agua 50:50 presentó una capacidad antioxidante de tan solo 2756 μM eq de Trolox/gramo de BU (Antoniolli y col., 2015). De igual manera, en el presente trabajo se observan valores superiores a otros trabajos reportados con la variedad de uva tinta Syrah utilizando como solvente agua y la mezcla Etanol:Agua 70:30, con actividades antioxidantes equivalentes a 1345.94 y 912.56 μM eq de Trolox/g de piel de uva y, para el caso de la semilla, 2230.69 y 2613.98 μM eq de Trolox/g de semilla, respectivamente (Ky y col., 2014). Para el caso de las extracciones con NADES, no se presentó actividad antioxidante por

especies reactivas de oxígeno a reportadas en la Figura 15. Un estudio mostró que en el extracto de la piel de uva (*Vitis vinifera*) de una variedad nativa de Croacia tratado con NADES Gli-CC, Glu-CC y AM-CC presentaron una actividad antioxidante de (110.59, 179, 371 y 120 (μM eq de Trolox)/g de muestra) los cuales resultan a su vez inferiores a los encontrados con el uso de otros tratamientos tradicionales de extracción. La variación de los resultados de ambos estudios puede deberse a distintos factores como pueden ser la presencia de diferentes compuestos debido a la diferencia de variedad de material vegetal, así como el procedimiento de extracción. En el Cuadro 8 se muestra un resumen de los resultados de actividad antioxidante de los diferentes extractos por los diferentes métodos. Dada la abundancia de grupos funcionales en los NADES, los resultados obtenidos determinación de capacidad antioxidante así como de inhibición del radicales pueden estar influenciados por la interferencia entre los grupos funcionales de los NADES y los de los CF, lo que puede estar enmascarando la actividad propia de los compuestos fenólicos (Dai y col., 2013).

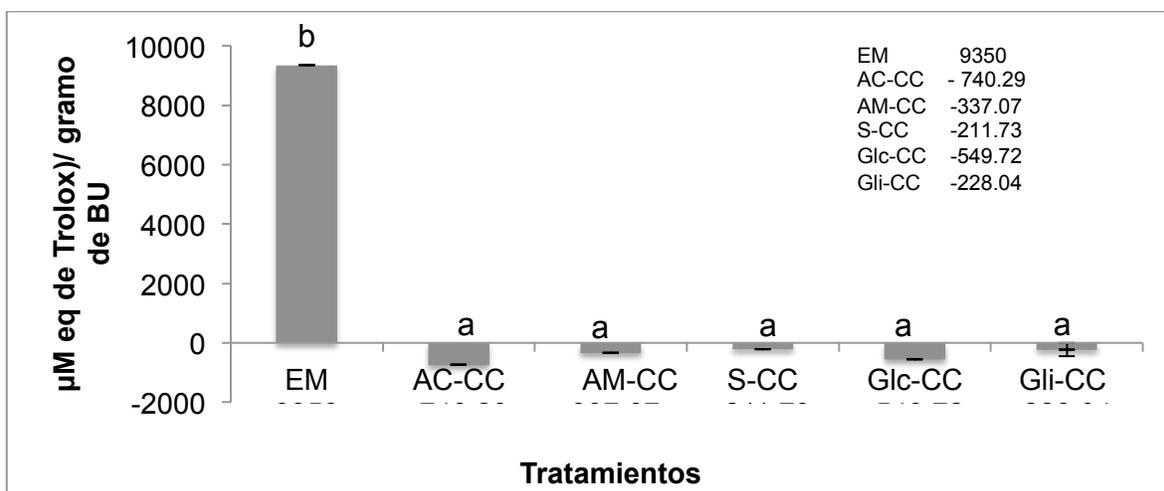


Figura 15. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos con NADES y el EM de BU por el método ORAC. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 8. Resumen de resultados de la capacidad antioxidante los CF de BU para los diferentes métodos de extracción.

	Unidades	EM	AC-CC	AM-CC	S-CC	Glc-CC	Gli-CC
DPPH	(μg eq de AA)/ gramo de BU	148.01 $\pm 2.05^a$	-14.90 $\pm 5.09^a$	-6.70 $\pm 7.09^{a,b}$	-3.91 $\pm 9.87^{b,c}$	10.35 $\pm 3.74^c$	17.56 $\pm 4.88^d$
	Inhibición (%)	79.15	-1.87	-2.19	-3.58	8.28	10.07
	E 50 mg/L	1.99	-----	-----	-----	2.25	-0.70
ORAC	(μM eq de Trolox)/ gramo de BU	9350 $\pm 2.44^b$	-740.29 $\pm 0.17^a$	-337.07 $\pm 0.25^a$	-211.73 $\pm 0.12^a$	-549.72 $\pm 0.12^a$	-228.04 $\pm 0.27^a$
FRAP	g eq AA /100 g BU	6.9 ± 0.77	-0.23 0.01	-0.16 0.01	-0.21 0.04	-0.22 0.005	-0.15 0.05
CUPRAC (Modificado)	mV	0.32 ± 0.0072	0.49 ± 0.0059	0.45 ± 0.0078	0.47 ± 0.0023	0.47 ± 0.0010	0.47 ± 0.0063

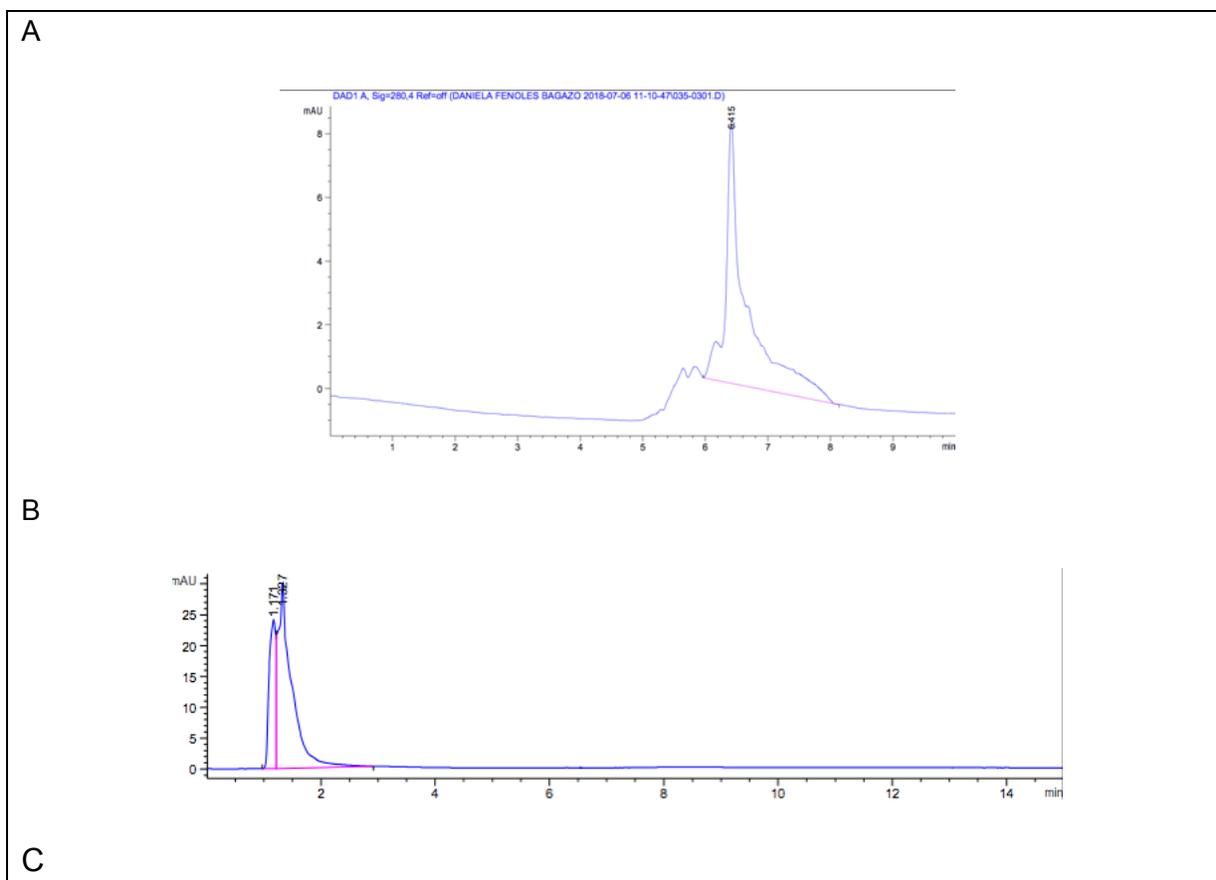
Resultados promedios de análisis en triplicado.

8.7 Caracterización parcial de los Compuestos Fenólicos del EM y NADES del BU mediante HPLC.

Se realizó un perfil cromatográfico por HPLC para los tratamientos realizados con el EM y los tratamientos NADES para el BU de la variedad Syrah (*Vitis vinifera*) (Figura 16). Por parte de los NADES solamente se detectó la presencia de un CF de los estándares evaluados, el cual resultó ser ácido Gálico (tiempo de retención de 2.22 min), común en uvas tintas (*Vitis vinifera*) como lo muestra la Cuadro 9. En únicamente dos de los tratamientos de NADES evaluados se encontró cantidad detectable de CF, para AC-CC 42.21 ± 0.19 ac. Gálico/g de extracto liofilizado y para AM-CC 0.18 ± 0.03 ac. Gálico/g de extracto liofilizado y para el caso del EM, 8.88 ± 3.64 mg ac. Gálico/g de extracto liofilizado. En un estudio se reportó un rendimiento de ácido Gálico en semilla de uva de 0.15 mg de Ácido Gálico/g EA

EM	8.88 \pm 3.64
AC-CC	42.21 \pm 0.19
AM-CC	0.18 \pm 0.03

Dado que el sistema AM-CC resultó extraer CF y antocianinas, se de terminó el efecto de la agitación por 24 h. El perfil del solvente puro mostró un pico importante en el minuto 6.41 correspondiente a otro compuesto no evaluado en esta prueba (Figura 17). Únicamente se se logró la detección de ácido Gálico en ambos tratamientos (sin agitación y con agitación por 24 h) correspondientes a las soluciones resuspendidas en metanol de los extractos liofilizados de AM-CC, con un rendimiento de 2.24 ± 0.21 mg/g de extracto liofilizado para el tratamiento sin agitación para el tratamiento con 24 h agitación de 2.01 ± 0.66 mg/g de extracto liofilizado.



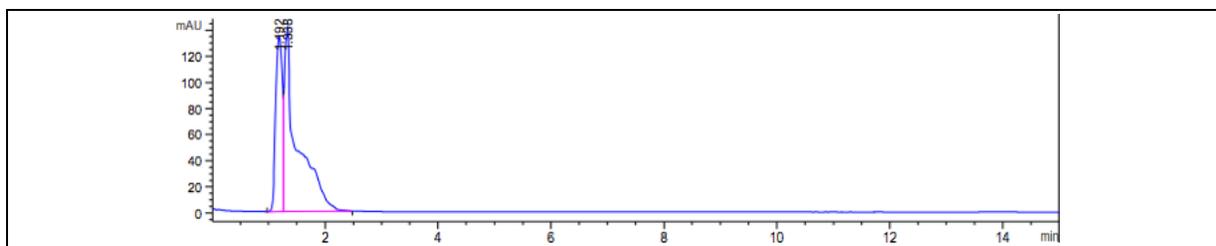


Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto de BU de la variedad Syrah (*Vitis vinifera*) con AM-CC redissuelto en metanol. A) Solvente puro AM-CC, B) Tratamiento sin agitación, C) Tratamiento con agitación 24 h

8.8. Resultados cualitativos por UPLC-MS/MS.

Para la determinación de los resultados por espectrometría UPLC-Masas se obtuvo un espectro UV para lograr la comprobación de la presencia de antocianinas en dos de los extractos evaluados, los cuales fueron AM-CC y EM. El rango del espectro UV donde se localizan las antocianinas va desde los 406 nm hasta los 554 nm. En la Figura 18 se muestra el espectro para la Malvidin 3-O (coumaroil glucósido) en extracto AM-CC en una longitud de onda 546 nm y 538 nm (Koeppen y col., 1966; Somers y col 1996). De igual forma, en el espectro correspondiente al EM con la presencia de un pico a 526.99 nm que podrían corresponder a Malvidin 3-O (coumaroil glucósido), tomando en cuenta que se tiene registro de Malvidin 3-galactósido 525 nm (Somers y col., 1996).

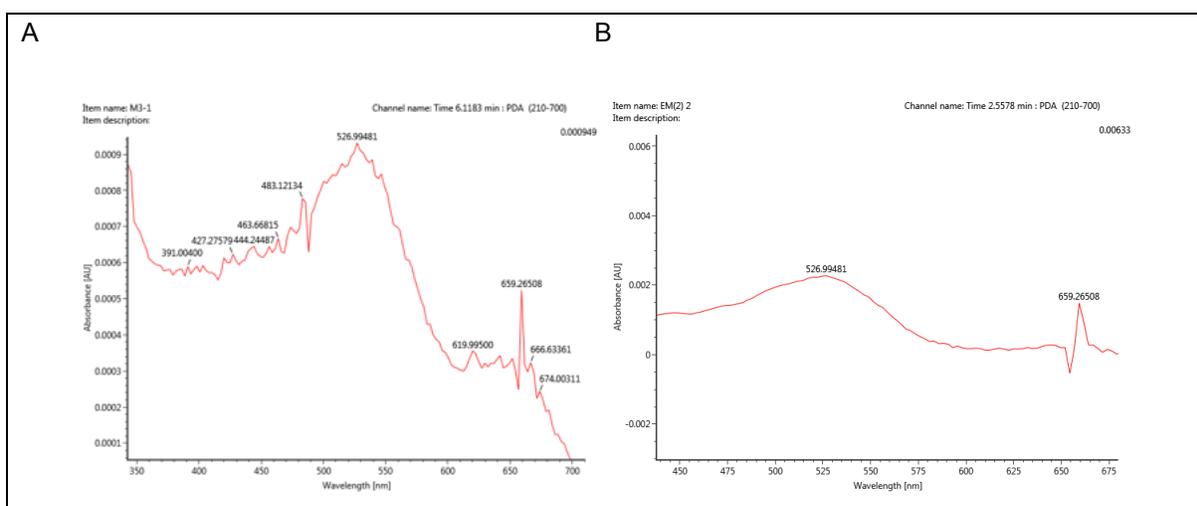


Figura 18. Espectros UV para la detección de antocianinas encontradas entre los rangos de los 406 nm - 554 nm en tratamientos para la extracción de CF en BU. A) AM-CC con picos

probablemente correspondientes a Malvidin 3-O (coumaroil glucósido) en 546 nm y 538 nm (Koeppen y col., 1966; Somers y col 1996). B) EM con un pico a 526.99 nm probablemente correspondiente a Malvidin 3-O (coumaroil glucósido),

Mediante UPLC fue posible la detección de los picos correspondientes a las antocianinas Malvidin-3-galactosido y Malvidin 3-O (coumaroil glucósido) en el EM y el NADES AM-CC (Figura 19). Para el caso del AM-CC se logró encontrar un pico a un tiempo de retención de 2.55 min para Malvidin-3-galactosido y para la Malvidin 3-O (coumaroil glucósido) con un tiempo de retención de 6.10 min. En la muestra correspondiente al EM, se logró encontrar la misma respuesta a los 2.55 min para Malvidin-3-galactosido y para la Malvidin 3-O (coumaroil glucósido) a un tiempo de retención de 6.04 min. Los picos coinciden con los tomados como referencia del European MassBank (NORMAN MassBank) de 2.56 min y 6.12 min.

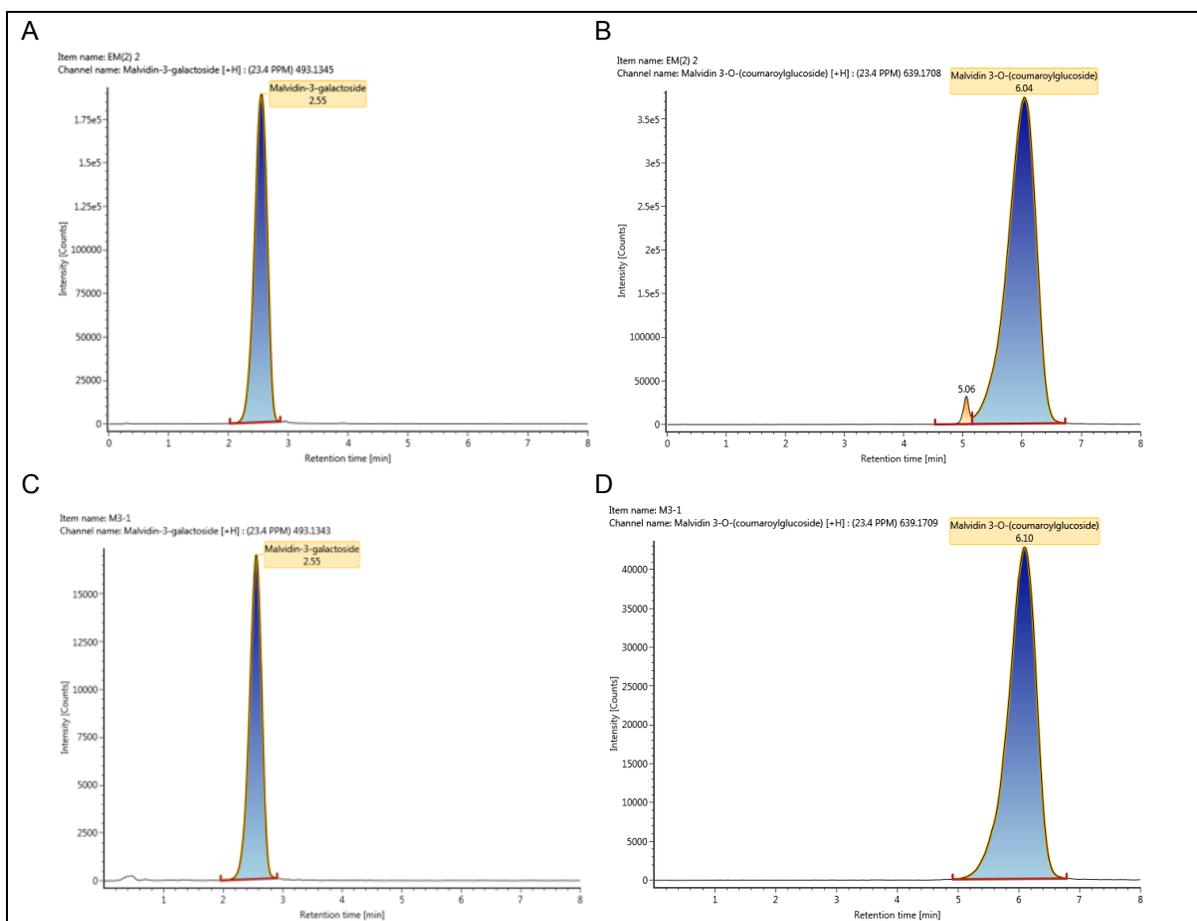
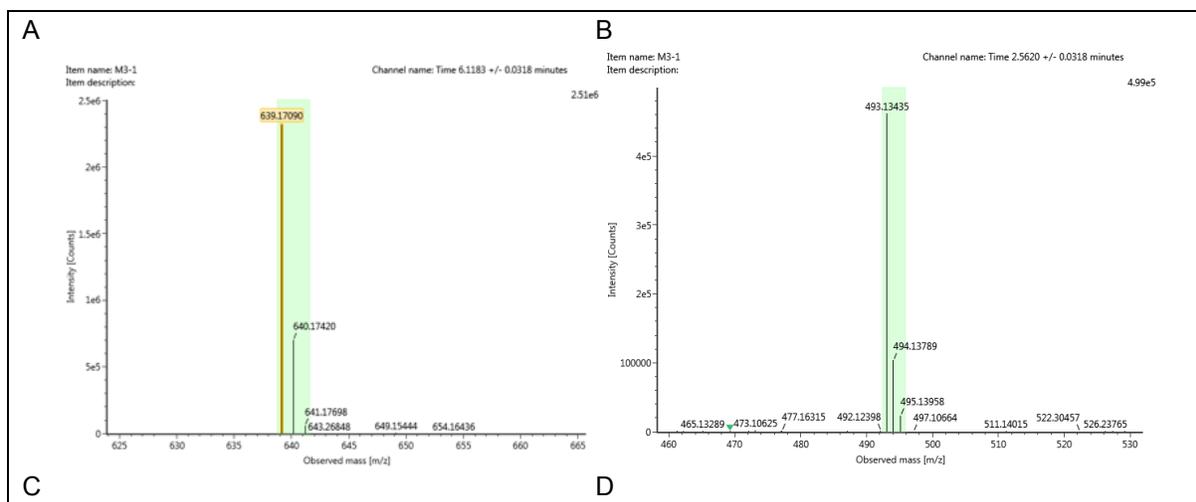


Figura 19. Cromatograma UPLC para los extractos EM. A) Malvidin-3-galactosido B) Malvidin 3-

O-(coumaroil glucósido) y **AM-CC**: C) Malvidin-3-galactosido, D) Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido).

En la Figura 20 se muestra el espectro de masas para el NADES AM-CC con una relación M/Z (Masa/Carga) máxima de 639.17 correspondiente al ion precursor del Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) (Figura 20A), y una relación M/Z (Masa/Carga) máxima de 493.13 para el ion precursor de Malvidin-3-galactosido (Figura 20B), los cuales coincide con la M/Z del European MassBank (NORMAN MassBank). También se muestran los espectros de masas para el EM, con una relación M/Z máxima de 493.13 correspondiente al ion precursor para el Malvidin-3-galactosido (Figura 20C), y otro de 639.17 correspondiente al ion precursor del Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) (Figura 20D), los cuales coinciden con la M/Z del European MassBank (NORMAN MassBank). En los espectros se reportan dos picos además del correspondiente a las antocianinas mencionadas que corresponden a compuestos que conforman el perfil isotópico del espectro extraídos por los tratamientos utilizados.



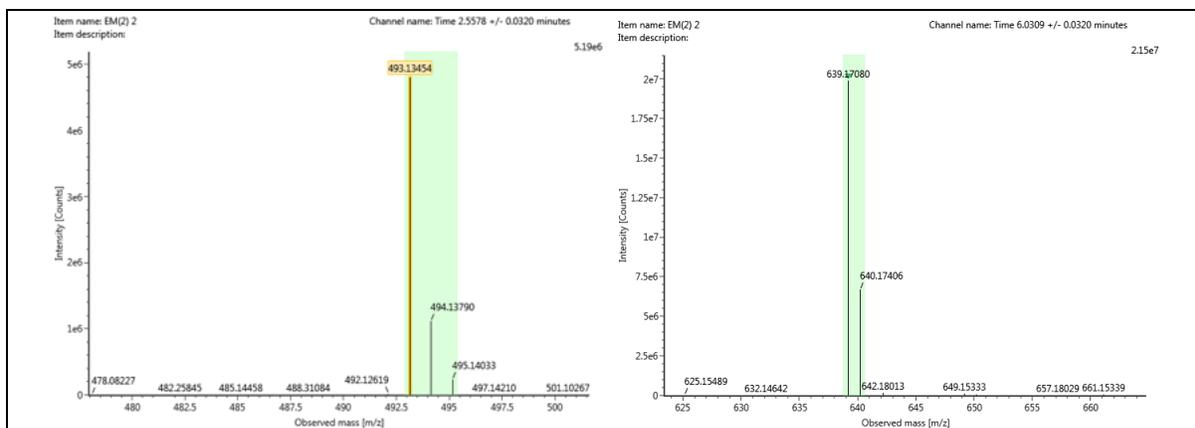


Figura 20. Espectro de masas para los extractos AM-CC y EM. A) AM-CC correspondiente a Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido), B) AM-CC correspondiente a Malvidin 3-galactosido, C) EM correspondiente a Malvidin 3-galactosido D) EM correspondiente a Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido)

En las Figuras 21 y 22 se muestran los cromatogramas UPLC correspondientes a los tratamientos EM y AM-CC, respectivamente. Se reportan, por un lado, los precursores para los dos compuestos encontrados de antocianinas, Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) y Malvidin 3-galactosido, seguidos de sus fragmentos de mayor intensidad. Todos los compuestos fueron encontrados a un tiempo de retención igual o cercano a los reportados 6.12 y 2.56 min respectivamente, de acuerdo al European MassBank (NORMAN MassBank). Los espectros MS/MS correspondientes los tratamientos EM y AM-CC se muestran en las Figuras 23 y 24. En todos los tratamientos evaluados fue posible encontrar los compuestos Malvidin 3-O-(coumaroil glucosido) y Malvidin 3-galactosido y sus respectivos fragmentos.

A

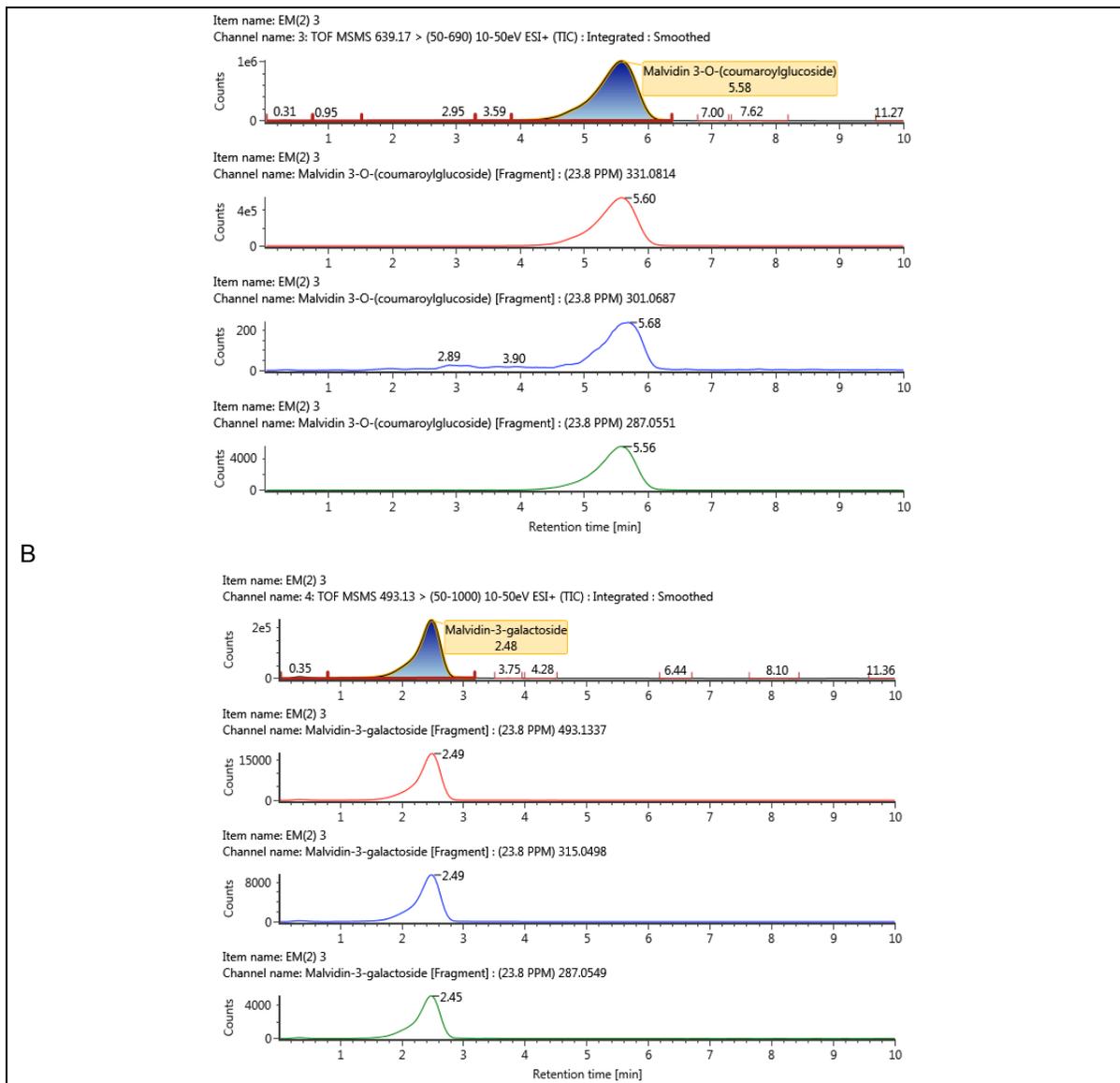


Figura 21. Cromatogramas UPLC para antocianinas en EM. A) Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) y fragmentos. B) Malvidin 3-galactosido y fragmentos.

A

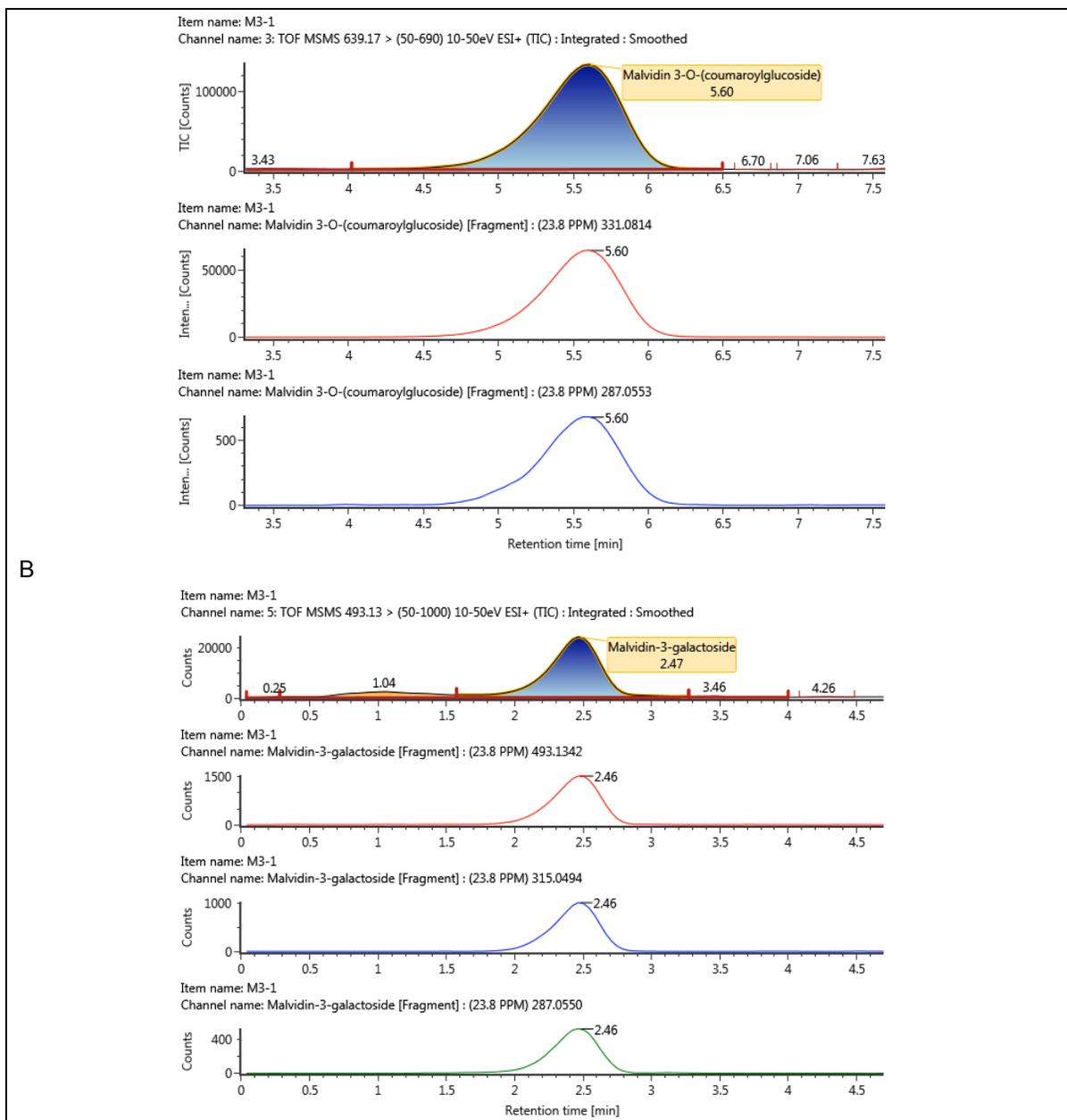


Figura 22. Cromatogramas UPLC para antocianinas en AM.CC. A) Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) y fragmentos. B) Malvidin 3-galactosido y fragmentos.

A

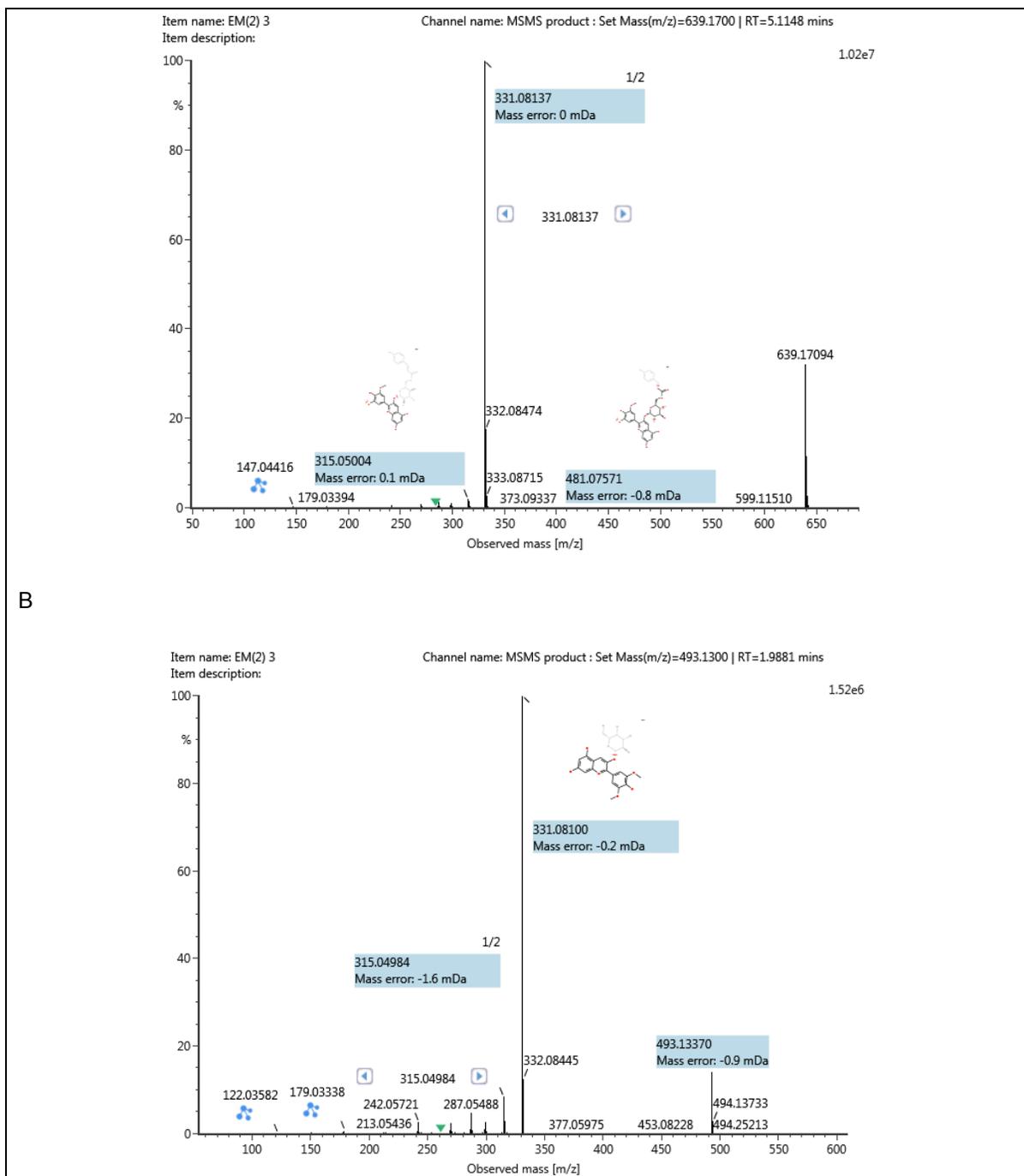


Figura 23. Espectro MS/MS del extracto EM. A) Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) y fragmentos. B) Malvidin 3-galactosido y fragmentos.

A

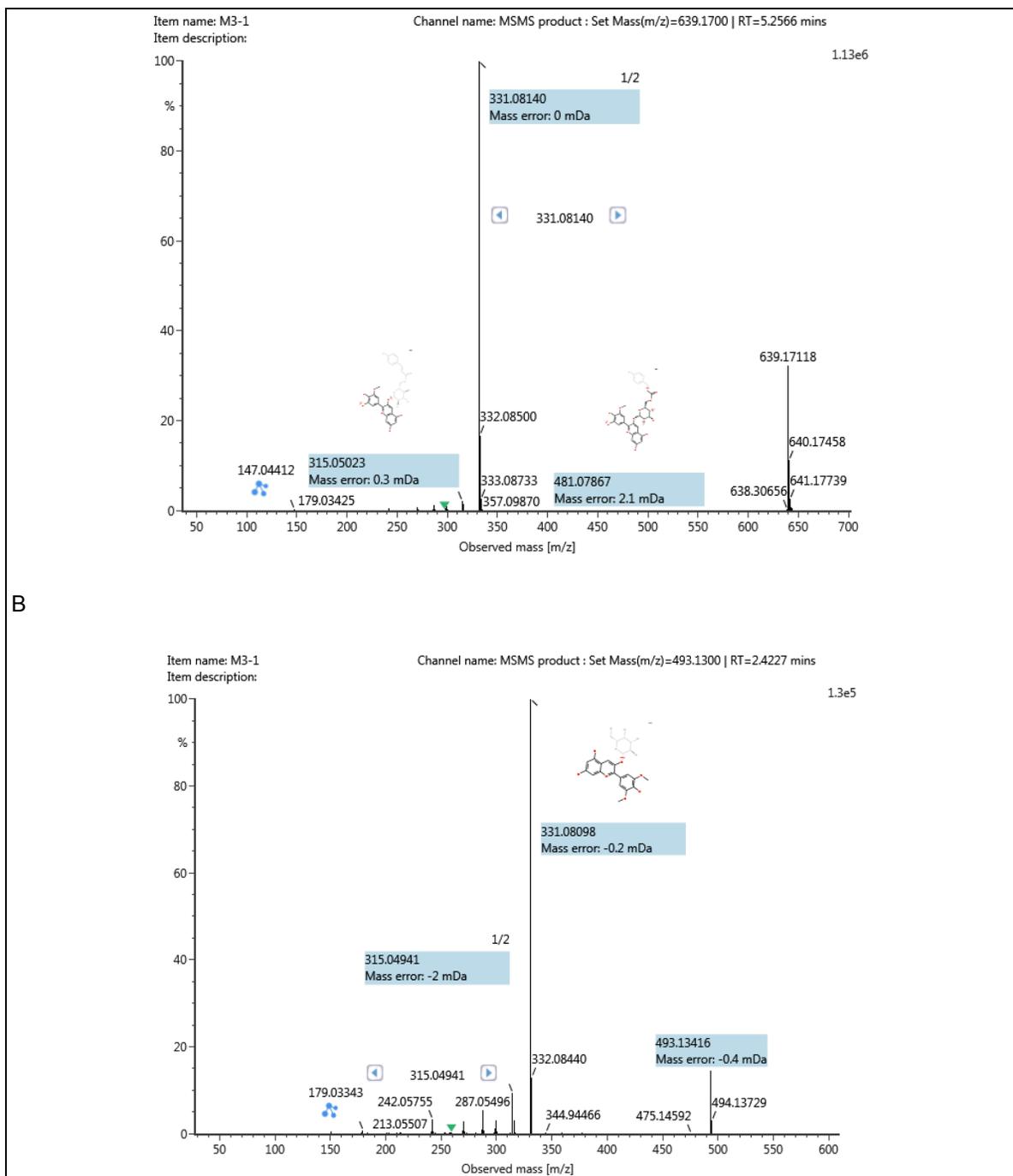


Figura 24. Espectro MS/MS del extracto AM-CC. A) Malvidin 3-O-(coumaroil glucósido) y fragmentos. B) Malvidin 3-galactosido y fragmentos.

En el Cuadro 10 se reporta la relación m/z para los compuestos precursores y fragmentos de alta intensidad en los tiempos de retención esperados. En cada uno de los perfiles isotópicos de los espectros se reportan, además de los fragmentos de Malvidina, otros compuestos que se encontraron en la muestra, estos pueden

ser a su vez fragmentos de una menor intensidad que los reportados o compuestos presentes en nuestro extracto que pudieran ser identificados posteriormente como CF de otra familia.

Cuadro 10. Posibles componentes en modo de ionización ESI positivo mediante MS/MS.

Muestra	Compuesto	Relación m/z	Error Masa (mDa)	Tiempo de Retención (min)	MSMS m/z
EM	Malvidin 3-O-(coumaroylglucosido)	639.1709	-7.7	5.58	331.0814 301.06870 287.0551
	Malvidin-3-galactosido	493.1337	-8.2	2.48	493.1337 315.0498 287.0549
AM-CC	Malvidin 3-O-(coumaroylglucosido)	639.1712	-7.5	5.6	331.0814 287.0551
	Malvidin-3-galactosido	493.1342	-7.7	2.47	493.1337 315.0498 287.0549

La capacidad de extracción de CF de los NADES puede atribuirse a interacciones mediante puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, carboxílico y amino (abundantes en los NADES), con los grupos hidroxilo de los CF. La polaridad de NADES debe considerarse como una propiedad importante que afecta su eficiencia. Por otro lado, la extractabilidad de los NADES está relacionada con sus propiedades físicas como la viscosidad. En comparación con los disolventes convencionales, la alta viscosidad de NADES es una característica negativa importante que afecta la extractabilidad pero que puede disminuirse diluyendo al NADES ligeramente con agua. En algunos casos se han utilizado columnas de resina cromatográfica macroporosas, en las cuales la resina absorbe los CF mientras que los ingredientes polares de los NADES pueden ser eluidos con agua, para después recuperar los CF con una mayor pureza (Dai y col 2013).

9. Conclusiones.

Los NADES con menor viscosidad y pH bajo mostraron los mejores resultados para la extracción de compuestos fenólicos de BU, en especial para la extracción de antocianinas, como fue el caso del NADES AM-CC. Dadas las propiedades de los NADES como solventes de alta biodegradabilidad, toxicidad farmacéuticamente aceptable y la capacidad de extracción de compuestos con polaridad diversa, se propone su uso para la extracción de antocianinas. Sin embargo, no fue posible determinar la capacidad antioxidante mediante las diferentes técnicas utilizadas. Únicamente se observó inhibición del radical DPPH en dos de los tratamientos NADES, Gli-CC y Glu-CC, sin embargo, los valores fueron bajos al comparar con el extracto metanólico. Es probable que los resultados estén enmascarados por la posible interacción entre los grupos funcionales de los NADES utilizados y los grupos funcionales de los compuestos fenólicos. Mediante UPLC-MS se observó la presencia de antocianinas al utilizar el NADES AM-CC, por lo que los datos invitan a continuar trabajando este tipo de solventes para la recuperación de dichos compuestos de importancia comercial.

10. Bibliografía.

Antoniolli A, Fontana A, Piccoli P, Bottini R 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food and Chemistry*. 8:172-178.

Baiano A. 2014. Recovery of biomolecules from Food Wastes – A Review. *Journal Molecules* 19: 14821- 14842.

Benzie I, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70–76.

Bakirtzi C, Triantafyllidou K, Makris D. 2015. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 70:8.

Bosiljkov T, Bosiljkov T, Dujmić, F, Cvjetko Bubalo M, Hribar J, Vidrih R, Brncic M, Zlatić Emil, Radojčić Redovniković I, Jokic, S. 2016. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Journal of Food and Bioproducts* doi:10.1016/j.fbp.2016.12.005

Bulnes P. 2012. Extracción subcrítica de orujo de uva Cabernet Sauvignon pre y post fermentación vínica. Identificación de Flavonoides y capacidad antioxidante. pp.46-60. Tesis de Maestría en Ciencias de Ingeniería Pontificia Universidad Católica de Chile.

Brusse M. 2013. Protoantocianidinas en uvas y vinos de las variedades Moastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia. pp. 36-200.

Castañeda C, Ramos L, Ibañez V, 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*. 8:56-72.

Cornejo -García F. 2012. Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) por microondas y métodos convencionales. Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro. pp.4-31.

Chidambara K, Singh R, Jayaprakasha G. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5909-5914.

Choi Y, Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends I, Witkamo G, Verpoote R. 2011 Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. Plant Physiology. 156: 1701-1705.

Dai Y, Spronsen J, Witkamp G, Verpoorte R, Choi Y. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, Journal Analytica Chimica Acta. 766:61–68.

Dai Y, Verpoorte R, Choi Y. 2014. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*), Food Chemistry. 159: 116-121.

Deshpande SS, Cheryan M. 1985. Evaluation of Vainillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. Journal of Food Science. 50:905-910.

Escamilla C, Cuevas E, Guevara J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes, Revista Facultad de Medicina UNAM. 52: 73-75.

Espinosa Villareal N. 2015. Efecto de la aplicación foliar del peróxido de hidrógeno sobre parámetros de crecimiento y compuestos antioxidantes en el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro. pp 2-34.

Espinoza-Acosta G, Ramos-Jacques A, Maya- Cornejo J, Molina G, Esparza R, Sánchez-González I, Hernández-Martínez A, Estévez M. 2018. Preparation of non-

acylated and acylated anthocyanins from Black Carrot (*Daucus carota* L.) for use as food ingredient. *Journal Food Chemistry. Preprints* 2018. doi: 10.20944/preprints201806.0288.v1

European MassBank (NORMAN MassBank)
<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=PR020010&dsn=RIKEN>

Fantozzi P, Betschart A. 1981 Grape seed: A potential source of protein. *Journal American Oil Chemistry Society*. 58:1027-1031.

Font I, Gudiño P, Sánchez A. 2015. La industria vinícola Mexicana y las políticas agroindustriales: Panorama General. *REDPOL Estado, Gobierno y Políticas Públicas*. 12:1-30.

Franco-Bañuelos A, Contreras-Martínez C, Carranza-Tellez J, Carranza-Concha J. 2017. Contenido de Fenoles Totales y capacidad Antioxidante de uvas no nativas para vino cultivadas en Zacatecas México. *Agrociencia*. 52:661-671.

Godínez R. 2017. Caracterización Fenólica y capacidad antioxidante de diferentes extractos de *Cnidioscolus aconitifolius* (Miller)I.M. John. Tesis de Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 3-46.

Goñi I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebolé A, Arija I, Estevez R. 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry Science* 86:508-16.

Guntero V, Longo M, Ciparicci S, Martini R, Andreatta A. 2015. Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vinícola. *VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química*.8:1850-3500.

Guzmán-Figueroa M, Ortega-Regules A, Anaya Berrios C. 2010. Piranoantocianinas: modificaciones estructurales de antocianinas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 4 : 84-95.

Hermosin I, Garcia E, Gómez S, Castillo N. 2009. Flavonoles en productos y subproductos vitivinícolas de Castilla- La Mancha : Autenticidad varietal, capacidad antioxidante y aprovechamiento de orujos. Instituto de la Vid y el Vino Castilla- La Mancha. 1-11.

Hertog M, Hallman P, Katan M, Kromhout D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20:21–29.

Jiménez A, Villegas H, Juan M, Ferrer J. 2008. Evaluación del tratamiento de hidrólisis ácida del bagazo de uva. Facultad de Ingeniería Universidad Rafael Urdaneta.pp. 2. <https://studylib.es/doc/5227222/evaluación-del-tratamiento-de-hidrólisis-ácida-del-bagazo...>

Jiménez- Cordón A. Efecto matriz en la determinación de polifenoles en vino por UPLC-MS. Tesis de Maestría en Química Avanzada. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Universidad de la Rioja. pp. 44. https://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000107.pdf

Ky I, Lorrain B, Kolbas N, Crozier A, Teissedre P. Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different French grape varieties. *Molecules* 2014, 19, 482–506.

Koeppen B. Basson D. 1966. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes. *Phytochemistry* 5:183-187.

Meyer J, Hernández R. 1970. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*. 21(4):184-188.

Molina L, Medina G, González R. Robles N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera L.*) de mesa cultivada en el noroeste de México. *CyTA – Journal of Food*. 8:57–63.

Molina-Quijada D , Medina-Juárez L, González-Aguilar G , Robles-Sánchez R , N.

Gómez-Meza . 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *Cy-TA Journal of food*. 8:57-63.

Muñoz de la Cruz FC. 2009. Caracterización fisicoquímica, nutracéutica y sensorial del extracto acuoso de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*), Tesis de Maestría en Nutrición Humana, Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 51–52.

Muñoz-De la Cruz FC, Cornejo-García FR, Vázquez-Díaz NM, Anaya-Loyola MA, García-Gasca T. 2017. Grape Bagasse: A Potential Source of Phenolic Compounds. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, Second Edition. Edited by Elhadi M. Yahia. © 2017 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2017 by John Wiley & Sons, Ltd. Chap 52, pp 1055-1066.

Navarrete A. 2013. Elaboración y caracterización de pasta funcional con adición de harina de bagazo de uva. Tesis de Ingeniería en Alimentos. Universidad de Chile. pp 1-14.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, Clasificación y especificaciones de manejo.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Ortiz A, Herrera M, Guzmán S, Hernández D. 2010. Efecto de localidad sobre contenido fitoquímico y capacidad antioxidante de zarzamora variedad Tupy (*Rubus Eubates*). XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, R, Reis R, Duarte A. 2014 Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *Sustainable Chemistry & Engineering*. 2:1063–1071.

Pérez-Nájera V, Lugo-Cervantes, Gutiérrez-Lomelí M, Del-Toro-Sánchez C. 2013.

Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta risso*) y determinación de su actividad antioxidante. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 15:18-22.

Piñeiro Z. 2005. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Doctorado en Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz. pp. 26-48.

Ramamurthy M, Maiti B, Thomas P, Nair M. 1992. High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing. Journal of Agriculture Food and Chemistry. 40(4):569-572.

Ramos-Estrada A. 2008. Caracterización microbiológica, bromatológica y análisis de minerales en el bagazo de uva roja (*Vitis vinífera*). Tesis de Licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 2-14.

Rajan M, Prabhavathy A, Ramesh U. 2015. Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for Zingiber officinale Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. The Natural Products Journal. 5:1-11

Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:2866-2887.

OIV, Balance 2017 de la OIV sobre la situación vinícola mundial. Organización Internacional de la viña y el vino. <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2017-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>

SAGARPA, 2006. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/

SAGARPA, 2016. Se reincorporará México a la Organización Internacional de la

viña y el vino. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

<https://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/Paginas/2016BS438.aspx>

Singleton V, Rossi J, 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents The American Journal of Enology and Viticulture 7:16.

Somers T. 1966. Grape phenolics: the anthocyanins of *Vitis vinifera*, var. Shiraz. Journal. Sci. Food Agric. 17:215-219.

Soto-Álvarez L. 2015. Extracción y Purificación de Compuestos Fenólicos a partir de subproductos de destilería de vino. de Tesis Doctorado. Universidad de Vigo. pp. 31–538.

Stein-Chisholm R, Beaulieu J, Grimm C, Lloyd S. 2017. LC–MS/MS and UPLC–UV Evaluation of Anthocyanins and Anthocyanidins during Rabbiteye Blueberry Juice Processing. Journal Beverages. 3:56-73.

Rababah T , Hettiarachchy N, Horax R. 2004. Total Phenolics and Antioxidant Activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Ginger, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts, Vitamin E, and tert-Butylhydroquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52:5183–5186

Torres-Ortiz D. 2017. Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios y evaluacion de la capacidad antioxidante de la flor de *Crataegus gracilior* PHIPPS. Maestria en Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 24-30.

This P, Lacombe T, Thomas M. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends in Genetics. 22:511:519.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. Food Chem. 60:73- 77.

Waterman P, Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. pp 44-55

Weia Z, Wanga X, Penga X, Wanga W, Zhaoa C, Zua Y, Fu Y. 2014. Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellaria*. Industrial Crops and Products. 63: 175-181.

Wei Z, Qi X, Li T, Luo M, Wang W, Zu Y, Fu Y. 2015. Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid chromatography. Purif. Technol. 149:237-244.

World Health Organization. 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio 3º edición.

http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf.

Xu C., Zhang Y, Cao L, Lu J. 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. Journal of Food Chemistry. 119: 1557-1565.

Yemis O, Bakkalbasi E, Artik N. 2008. Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. International Journal of Food Science & Technology 43:154–159.17C77854