

**Análisis de compuestos fenólicos y estabilidad  
del color en el jugo de cáscaras de uvas  
Muscadinas (*Vitis rotundifolia*)**

**Damir Dennis Torrico Arispe**

**Honduras**  
Diciembre, 2006

**ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA**

**Análisis de compuestos fenólicos y estabilidad  
del color en el jugo de cáscaras de uvas  
Muscadinas (*Vitis rotundifolia*)**

**Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria en el Grado  
Académico de Licenciatura**

**Presentado por:**

**Damir Dennis Torrico Arispe**

**Honduras  
Diciembre, 2006**

**El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.**

---

**Damir Dennis Torrico Arispe**

**Honduras**  
Diciembre, 2006

**Análisis de compuestos fenólicos y estabilidad del color en el jugo de cáscaras de uvas Muscadinas (*Vitis rotundifolia*)**

**Presentado por:**

**Damir Dennis Torrico Arispe**

**Aprobada:**

---

Stephen Talcott, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Director  
Carrera de Agroindustria

---

Wilfredo Domínguez, M.Sc.  
Asesor

---

George Pilz, Ph.D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios por acompañarme en todos los momentos de mi vida.

A mi mama Lidia Arispe que desde el cielo guía mis pasos e ilumina mi camino.

A mi papa Bladimir Torrico por haberme apoyado en mis estudios y por darme fuerzas en los momentos de debilidad.

A mis hermanos Willer y Danilo, que siempre me motivan a continuar y mejorar como persona.

A mi novia y amor Tatiana por haberme apoyado incondicionalmente en la realización de este proyecto y por alentarme siempre ha seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y mi novia por el apoyo que me brindan siempre.

Al Doctor Stephen Talcott y el Ingeniero Wilfredo Domínguez por toda su asesoría y dedicación.

A mis amigos.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

A la fundación Nippon por el apoyo financiero brindado.

A la Universidad de Florida por permitirme hacer la investigación.

A Zamorano por todo el aprendizaje que me ha brindado.

## RESUMEN

Torrigo, D. 2006. Análisis de compuestos fenólicos y estabilidad del color en el jugo de cáscaras de uvas Muscadinas (*Vitis rotundifolia*). Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 21 p.

Las uvas muscadinas son originarias del sur-este de los Estados Unidos; están muy adaptadas a las condiciones de humedad y calor existentes en esta región del país. La cáscara y semilla poseen altos contenidos de compuestos fenólicos y antocianinas con propiedades nutracéuticas. El objetivo del estudio fue medir compuestos fenólicos y estabilidad del color en extractos de cáscaras en uvas muscadinas. Se utilizó el cultivar Noble por el color oscuro de la cáscara. El jugo fue sometido a diferentes tratamientos y procesos industriales. Los tratamientos evaluados fueron: el jugo fermentado, el jugo fermentado con 200 ppm de SO<sub>2</sub> y el jugo sometido a una extracción de azúcares con resina amberlite. Adicionalmente, se probaron dos procesos de concentración: deshidratación utilizando calor y liofilización. Se midieron compuestos fenólicos y antocianinas en un período de almacenamiento de 20 días a 30°C. Para el análisis estadístico en la medición de las propiedades de las antocianinas y fenoles se empleó un diseño de BCA con un arreglo factorial de 4x3x5, además se utilizó otro diseño de BCA con un arreglo factorial de 4x3x3 para el análisis de HPLC. Los procesos de concentración incluyendo el control, no mostraron diferencias significativas entre ellos (P>0.05). Esto ocurrió en todas las variables medidas a través del tiempo en el experimento. El tratamiento de fermentación fue el que mostró significativamente una mayor reducción de los sólidos solubles iniciales del jugo en comparación con el proceso del lavado con amberlite (P<0.05). A lo largo del experimento se demostró que el SO<sub>2</sub> evitó la polimerización de las antocianinas y la pérdida de color. Las cantidades de ácido ellágico y quercetina en análisis de HPLC no tuvieron diferencias estadísticas en el tiempo (P>0.05), mostrando la estabilidad de estos compuestos fenólicos.

**Palabras claves:** antocianinas, amberlite, fermentación, fenoles, liofilización, SO<sub>2</sub>.



## CONTENIDO

	Portada.....	i
	Portadilla.....	ii
	Autoría.....	iii
	Página de firmas.....	iv
	Dedicatoria.....	v
	Agradecimientos.....	vi
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
	Resumen.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de cuadros.....	xi
	Índice de figuras.....	xii
	Índice de anexos.....	xiii
<b>1.</b>	<b>REVISION DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
1.1.	LAS UVAS MUSCADINAS.....	1
1.2.	COMPUESTOS FENOLICOS Y ANTOCIANINAS EN UVAS MUSCADINAS.....	1
1.3.	ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS EN UVAS MUSCADINAS.....	2
1.4.	COMPUESTOS FENOLICOS Y ANTOCIANINAS EN LA SALUD HUMANA.....	3
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>6</b>
3.1.	UVAS MUSCADINAS.....	6
3.2.	TRATAMIENTO DE REMOCIÓN DE AZÚCAR.....	6
3.3.	PROCESO DE CONCENTRACIÓN.....	6
3.4.	VARIABLES.....	7
3.4.1.	Medición del color.....	7
3.4.2.	Antocianinas poliméricas y monoméricas.....	7
3.4.3.	Antocianinas totales.....	7
3.4.4.	Fenoles totales.....	7
3.4.5.	Análisis en el HPLC.....	8
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	8
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>9</b>
4.1.	CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES.....	9
4.2.	FENOLES SOLUBLES TOTALES.....	10
4.3.	ANTOCIANINAS TOTALES.....	10
4.4.	DENSIDAD DE COLOR Y TONALIDAD/TINTE.....	11
4.5.	ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS.....	12

4.6.	ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN EN EL HPLC .....	13
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	15
6.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	16
7.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	17
8.	<b>ANEXOS</b> .....	19

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1.	Compuestos fenolicos en cáscaras de diferentes cultivares de uvas muscadinas. ....	1
2.	Fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidantes de las cáscaras de diferentes cultivares de uvas muscadinas. ....	2
3.	Contenido de sólidos solubles totales (Brix) de cada tratamiento. ....	9
4.	Cambios en la densidad de color y tonalidad / tinte a través del tiempo de almacenamiento. ....	12
5.	Concentraciones de ácido ellágico y quercetina entre cada tratamiento .....	14

**INDICE DE FIGURAS****Figura**

1.	Fenoles solubles totales de los cuatro tratamientos a través del tiempo determinados por el reactivo de Folin's Ciocalteau y expresados en equivalentes de ácido gálico (mg/l).....	10
2.	Cambios de antocianinas expresados como porcentaje de la concentración inicial a través del tiempo.....	11
3.	Cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas a través del tiempo de almacenamiento. ....	13

**INDICE DE ANEXOS****Anexo**

1.	Cuadro de fenoles solubles totales de los cuatro tratamientos a través del tiempo determinados por el reactivo de Folin's Ciocalteau y expresados en equivalentes de ácido gálico (mg/l).....	20
2.	Cuadro de cambios en antocianinas expresados como porcentaje de la concentración inicial a través del tiempo. ....	20
3.	Cambios en tonalidad / tinte a través del tiempo de almacenamiento.....	21
4.	Cuadro de cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas a través del tiempo de almacenamiento. ....	21

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. LAS UVAS MUSCADINAS

Las uvas muscadinas crecen en el sur de los Estados Unidos, poseen varias formas, tamaños y colores. Se encuentran en forma salvaje y se caracterizan por tener una piel gruesa y dura con una pulpa que rinde menos jugo que otro tipo de uvas. Tiene un aroma descrito como almizcleño (Braswell, 2002).

Estas uvas son altas en el contenido de compuestos fenolicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes que pueden resultar beneficiosos para la salud humana. Las uvas muscadinas contienen otros compuestos benéficos, tales como el ácido gálico y el ácido ellágico (Braswell, 2002). La mayoría de los compuestos fenólicos en las uvas se encuentran en las semillas y las cáscaras. La pulpa de uva muscadine tiene un contenido bajo de fenoles. Las semillas de esta uva muestran gran capacidad antioxidante al igual que las cáscaras, pueden ser utilizados en la elaboración de productos nutraceúticos (Pastrana-Bonilla y Sellappan, 2003).

## 1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ANTOCIANINAS EN UVAS MUSCADINAS

Estudios realizados por Pastrana-Bonilla y Sellappan (2003), determinaron las cantidades de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante de la cáscara de ciertos cultivares de uvas muscadinas (Cuadro 1 y 2).

**Cuadro 1.** Compuestos fenolicos en cáscaras de diferentes cultivares de uvas muscadinas (mg/100 g de peso húmedo)<sup>a</sup>.

Cultivar	Compuesto Fenólico <sup>1</sup>				
	Ácido ellágico	Myricetina	Quercetina	Kaempferol	Resveratrol
Paulk	14.7 ± 1.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.5	0.4 ± 0.0	ND <sup>2</sup>
Cwart	21.6 ± 1.7	6.4 ± 0.6	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Supreme	6.2 ± 0.3	2.0 ± 0.4	3.0 ± 0.6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Ison	22.2 ± 1.6	7.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0
Noble	14.6 ± 0.2	4.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0

Fuente: Pastrana-Bonilla y Sellappan (2003).

<sup>1</sup>Los valores de la tabla representan el promedio y las desviaciones estándares de tres repeticiones.

<sup>2</sup>No detectado.

**Cuadro 2.** Fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidantes de las cáscaras de diferentes cultivares de uvas muscadinas.

<b>Cultivar</b>	<b>Fenoles Totales (mg/100 g de P.H.<sup>2</sup>)</b>	<b>Antocianinas Totales (mg/100 g de P.H. como cyanidina 3-glucósido)</b>	<b>CAET<sup>1</sup> (<math>\mu</math>M/g de P.H.<sup>2</sup>)</b>
Paulk	363.6	177	12.1
Cwart	261.6	107.8	12.4
Supreme	329.9	135.5	12.2
Ison	365	174.5	13.3
Noble	355.1	655	12.4

Fuente: Pastrana-Bonilla y Sellappan (2003).

<sup>1</sup>Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox.

<sup>2</sup>P.H. Peso Húmedo.

El ácido ellágico y la myricetina fueron los compuestos fenólicos mas abundantes en la cáscara de uvas muscadinas, además los diferentes cultivares mostraron altos contenidos de antocianinas y capacidad antioxidante. El cultivar Noble presento una concentración de antocianinas de 655 mg/100g de peso húmedo expresado como cyanidina 3-glucósido y una capacidad antioxidante de 12.4  $\mu$ M/g de peso húmedo. (Pastrana-Bonilla y Sellappan, 2003).

### 1.3. ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS EN UVAS MUSCADINAS

Según estudios realizados por Flora (1977), ciertas variedades de uvas muscadinas de cultivares de cáscara oscura poseen antocianinas que son inestables durante el almacenaje, al descolorarse severamente a 21°C en un extracto de las mismas. El bronceado de las muestras de jugo ocurrió en el plazo de tres semanas. Se demostró también que la estabilidad de color depende del contenido inicial del pigmento y del cultivar.

Estudios realizados por Sims y Morris (1986) probaron que la adición de acetaldehído a vinos hechos con uvas muscadinas, puede acelerar la polimerización de algunas antocianinas con ciertos taninos, consecuentemente el color de la solución se mantendría estable por mas tiempo. Sin embargo, las cantidades de acetaldehído produjeron algunas perdidas de compuestos fenólicos en un periodo de ocho meses. El estudio sugiere que ciertas prácticas pueden incrementar la producción de acetaldehído y realzar la polimerización de antocianinas con ciertos taninos, mejorando la estabilidad de color del vino hecho con uvas muscadinas, haciendo que la oxidación no sea tan severa y que el polímero antocianina-tanino no se vuelva tan extenso que cause la precipitación del mismo. Otros estudios hechos por Bakker y otros (1997) sugieren, que la adición de SO<sub>2</sub> a las soluciones de vino puede, considerablemente, disminuir la pérdida de color en el tiempo, vía la formación de compuestos como las antocianinas-bisulfito, que son estables dentro de la matriz del vino.

#### **1.4. COMPUESTOS FENOLICOS Y ANTOCIANINAS EN LA SALUD HUMANA**

Los polifenoles son un grupo de compuestos químicos presentes de forma natural que presentan anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, en su mayoría son potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales. Se encuentran en frutas, verduras y bebidas (Kinsella, 1993).

En un estudio realizado por Ghiselli (1998) se analizaron tres sub-fracciones polifenólicas de un vino tinto. Evaluaron la capacidad de atrapar radicales hidroxilo y peroxilo que simula la inhibición de la oxidación *in vitro* de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la agregación plaquetaria, que se dan en la arterogénesis. La fracción de las antocianinas resulto ser la más efectiva tanto en su capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno como en su capacidad de inhibir la oxidación de LDL y la agregación plaquetaria.



## 2. INTRODUCCIÓN

Las uvas muscadinas (*Vitis rotundifolia*) son originarias del sur-este de los Estados Unidos, están bien adaptadas a las condiciones de humedad y calor existentes en esta región del país. Las muscadinas son vigorosas, los viñedos pueden crecer de 18 hasta 30 metros de longitud, la fruta son pequeños racimos que constan de 3 a 40 uvas cada uno. Los cultivares cuentan con diferentes variaciones de color que van desde bronce verdoso al rojo rosáceo y uvas de color casi negro. Los contenidos de azúcar varían de 16% a 25% en el cultivar más dulce (Olien, 1990). Estas variedades solo tienen uno de los dos tipos de flores que encontramos en las uvas, por lo que se considera una flor imperfecta y es necesario una polinización cruzada entre un cultivar con flor perfecta como el “Ison” o el “Granny Val” con flores femeninas muscadinas, para establecer una producción de estas uvas. Las muscadinas tienen la ventaja de no ser afectadas por enfermedades serias o insectos en comparación con otras uvas de la misma región. El período de maduración depende del cultivar. Las uvas son producidas usando variedades que se ajustan a parámetros de un nuevo mercado que demanda sabor, frutas libres de enfermedades y vida de anaquel más extensa del producto. Es muy importante para la industria de jaleas y vinos que la producción de jugo sea de alta calidad y rendimiento (Poling, 1985). En recientes años, estudios demostraron que la semilla y la cáscara de la uva tienen compuestos nutraceuticos que llevan beneficios para la salud humana, sustancias como fenoles son encontrados en este tipo de uvas (Morris, 2004; Ergönül y Bağdatlıoğlu, 2002).

En extractos de cáscaras de uva, la clase principal de fitoquímicos presentes son las antocianinas. Su concentración es influenciada por variedad y cultivar, así como otros compuestos fenólicos encontrados en la cáscara de muscadinas incluyen ácido elálgico, resveratrol y compuestos glucósidos como myricetina, quercetina y kaempferol (Gomez, 2004; Pastrana, 2003). Las antocianinas muestran gran actividad antioxidante que previene enfermedades cardiovasculares, además de tener propiedades anti-ulceras. Sin embargo, para las antocianinas, una de las principales limitaciones es la pobre estabilidad de almacenamiento que es afectada por su estructura química, el factor ambiental y la interacción con otros fitoquímicos en solución (Del Pozo, 2004).

Algunos estudios muestran el efecto del acetaldehído en el color y estabilidad física de las antocianinas que se da por la polimerización con otros fenoles o taninos presentes en la solución del vino (Sims, 1986; Bakker, 1998). Acetaldehído se considera como un producto de la fermentación alcohólica; factores como la temperatura, oxígeno y SO<sub>2</sub> afectan la producción de este compuesto metabolizado por las levaduras (Baker, 1998). La adición de SO<sub>2</sub> durante la fermentación ha demostrado levantar el nivel de acetaldehído

en vinos, probablemente por la inhibición de las enzimas deshidrogenasa del aldehído, sin embargo dependiendo de la concentración de SO<sub>2</sub> puede interferir con la polimerización entre el acetaldehído y fenoles causando efectos decolorantes (Bakker, 1998; Sims, 1984).

El objetivo del estudio fue medir la estabilidad de pigmentos de extractos de cáscara de uvas muscadinas a través de diferentes procesos industriales y cambios en el tiempo, además de medir algunos compuestos fenólicos presentes en las diferentes soluciones usando Cromatografía Líquida (HPLC).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. UVAS MUSCADINAS**

Las uvas muscadinas fueron donadas por productores locales de Florida central, Estados Unidos. Se utilizó la variedad Noble en el experimento por la oscuridad del color de la cáscara, las muestras fueron congeladas y mantenidas a una temperatura de -26°C. Las cáscaras se separaron de la pulpa manualmente y se dividieron en dos replicas (A y B), cada muestra fue sometida a un proceso de extracción para obtener jugo de cáscara, usando dos partes de agua caliente a 90°C y una parte de cáscara, el jugo resultante se filtró y clarificó usando Diatomaceous Earth a 90% de SiO (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). El jugo de cáscaras de uvas tiene ciertas cantidades de azúcar, estudios preliminares demostraron que posee alrededor de 6 % de sólidos solubles. Estas cantidades dificultan los procesos de concentración por lo cual se probaron varios tratamientos de remoción de azúcar previos a los procesos de concentración.

#### **3.2. TRATAMIENTO DE REMOCIÓN DE AZÚCAR**

Se usaron tres tratamientos de remoción de azúcar: fermentación, fermentación con SO<sub>2</sub> y extracción con la resina amberlite. Se añadió 4 g/l de levadura (*Saccharomyces cerevisiae spp*) a un volumen de 200 ml de jugo. El jugo fue fermentado anaerobicamente por una semana a 25°C. El mismo procedimiento descrito anteriormente se aplicó a otros 200 ml de jugo que incluía 200 ppm de SO<sub>2</sub>

La extracción con Amberlite XAD-4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) se usó para separar compuestos fenólicos y antocianinas de otras sustancias solubles en agua como azúcares. Las muestras de jugo fueron mezcladas con amberlite puro y lavadas varias veces con agua, después se procedió a lavar la mezcla con metanol para separar compuestos polifenólicos del puré de amberlite. El metanol se removió evaporando la mezcla a 60°C bajo presiones reducidas. El concentrado de jugo se reconstituyó con una solución buffer de ácido cítrico (pH=3.1) para el análisis.

#### **3.3. PROCESO DE CONCENTRACIÓN**

Después de cada tratamiento de remoción de azúcares, todas las muestras fueron expuestas a dos procesos de concentración diferentes. Una parte de las muestras de jugo fueron expuestas a una liofilizadora a 200 Pa de presión por 30 horas. Otra parte de las

muestras se concentraron usando un evaporador para la remoción del agua a 95°C. Todas las muestras fueron reconstituidas con una solución buffer de ácido cítrico (pH=3.3).

### 3.4. VARIABLES

#### 3.4.1. Medición del color

Como es descrito por Wrolstad (1976), las muestras de jugo fueron diluidas en un factor 1:5 usando una solución buffer de ácido cítrico con un pH de 3.5. Las absorbancias de las muestras fueron leídas a 420, 520 y 700 nm. Se calculó la densidad de color y la tonalidad / tinte.

$$\text{Densidad de color} = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \quad [1]$$

$$\text{Tonalidad / tinte} = (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) / (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \quad [2]$$

#### 3.4.2. Antocianinas poliméricas y monoméricas

Los porcentajes de antocianinas poliméricas y monoméricas fueron determinadas usando el método modificado de Boulton (2001). Las muestras de jugo fueron diluidas a un factor 1:5 usando una solución buffer de ácido cítrico con un pH de 3.5. Se añadió 25 µl de agua a 200 µl de muestra diluida ( $A_{\text{blanco}}$ ). Se añadieron 20 µl de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al 5% (p/v) a otros 200 µl de muestra diluida ( $A_{\text{SO}_2}$ ). Las absorbancias fueron leídas a 520 nm. Los porcentajes de antocianinas poliméricas y monoméricas fueron calculados como:

$$\% \text{ monoméricas: } [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{SO}_2}) / A_{\text{blanco}}] * 100 \quad [3]$$

$$\% \text{ poliméricas: } [A_{\text{SO}_2} / A_{\text{blanco}}] * 100 \quad [4]$$

#### 3.4.3. Antocianinas totales

El análisis de antocianinas totales fue desarrollado siguiendo el método modificado descrito por Giusti y Wrolstad (2001) utilizando el ajuste de la solución buffer. Las muestras de extractos de cáscaras fueron diluidas a una apropiada concentración con un buffer de ácido clorhídrico (pH=1) hasta que la absorbancia de la muestra estuviera en el rango lineal del espectrofotómetro (0-1.2 unidades de absorbancia). Las absorbancias fueron medidas a 520 y a 700 nm (para corregir el blanco) contra una celda blanca llena con buffer (pH=1) siguiendo el método diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2001).

#### 3.4.4. Fenoles totales

El extracto fue diluido con una solución buffer de ácido cítrico (pH=3). Los fenoles totales fueron medidos según el método del reactivo Folin-Ciocalteu (Singleton, 1965). Se

introdujo 100  $\mu$ l de muestra en un tubo de ensayo, se añadieron 1.0 ml del reactivo Folin-Ciocalteu y 1.0 ml de carbonato de sodio ( $\text{CaCO}_3$ ), el contenido fue mezclado y guardó reposo por 10 min. La absorción fue medida a 726 nm en el espectrofotómetro. Los fenoles totales fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (EAG) en miligramos por gramo de muestra, usando una curva estándar generada a partir de 25, 50, 100, 200, 400 y 800 mg/l de ácido gálico.

### **3.4.5. Análisis en el HPLC**

Para obtener compuestos fenólicos libres, las muestras fueron preparadas usando el método modificado de hidrólisis ácida que consiste en colocar la muestra al 50% (v/v) con metanol que tiene una concentración 4 N de HCl. La solución final es calentada a 95°C por 60 min, como es descrito por Lee y Talcott (2003). La mayoría de compuestos fenólicos y las antocianinas presentes en el jugo de cáscara de uvas muscadinas fueron separados por el HPLC usando las condiciones modificadas de cromatografía descrita por Talcott (2002). La separación fue desarrollada por una columna de 250 x 4.6 mm i.d. Acclaim 120-C18 (Dionex, Sunnyvale, CA) con una columna con cartucho de C18. Las fases móviles consistían de agua (fase B) y una fase de 60% de metanol (fase A) ambas ajustadas a un pH 2.4 con ácido fósfórico. Un programa de gradientes de solventes corrió la fase B de 100% a 50 % en 15 min, 50%-25% en 5 min, 25%-0% en 15 min y después se sostuvo por 10 min a un caudal de 0.8 ml/min. Polifenoles y antocianinas fueron identificadas por un interpretador espectropico, utilizando el tiempo de retención y comparando las muestras con los estándares auténticos (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las propiedades de las antocianinas y el análisis de los fenoles solubles totales utilizaron un diseño de BCA con un arreglo factorial de 4x3x5 que incluye cuatro tratamientos, tres procesos industriales de concentración cada uno con sus respectivos controles y se evaluó cinco puntos en el tiempo. El análisis del HPLC fue otro diseño de BCA con un arreglo factorial de 4x3x3 que incluyó cuatro tratamientos, tres procesos industriales de concentración cada uno con sus respectivos controles y se evaluó tres puntos en el tiempo. Se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas en el tiempo usando el programa SAS versión 8.2. Para la separación medias se usó la prueba de SNK ( $P < 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. CONTENIDO DE SÓLIDOS SOLUBLES

El contenido total de sólidos solubles en el jugo de cada muestra fue medido usando el refractómetro Abbe (Leica Mark II). Los tratamientos como la fermentación y la extracción con la resina amberlite fueron evaluados según su capacidad de remover azúcar.

**Cuadro 3.** Contenido de sólidos solubles totales (Brix) de cada tratamiento.

Tratamiento	Brix* (%)	
SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	2.52	c
Amberlite <sup>2</sup>	3.50	b
Control <sup>3</sup>	5.54	a
Fermentación <sup>4</sup>	2.60	c

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

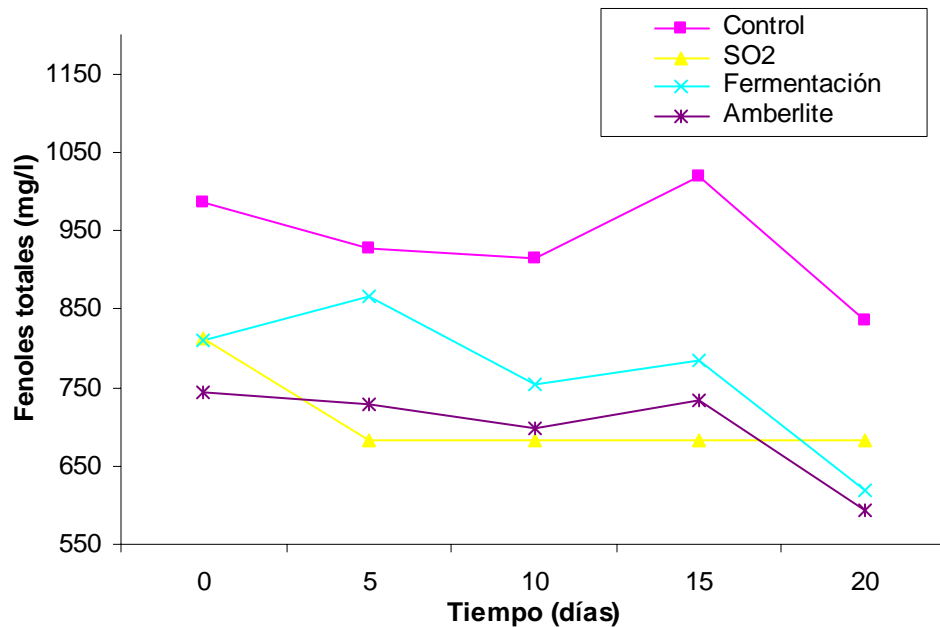
<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

Los procesos de concentración (deshidratación por calor y liofilización) no mostraron diferencias estadísticas significativas (P>0.05). El Cuadro 3 muestra los sólidos solubles de cada tratamiento, ambas fermentación tiene significativamente menores niveles de sólidos solubles en comparación con la extracción de resina amberlite y el jugo original. El promedio de los sólidos solubles en el jugo original fue de 5.5% y la fermentación redujo este valor a 2.5%. Es importante mencionar que el tiempo de duración de la fermentación fue de una semana.

## 4.2. FENOLES SOLUBLES TOTALES

El contenido de fenoles totales en cada proceso de concentración (deshidratación por calor y liofilización) no mostró diferencias estadísticas significativas entre ellos. A través del tiempo, la mayor concentración de fenoles se quedó en el control y los otros tratamientos mostraron similares comportamientos de decrecimiento. Los valores finales de la cantidad de fenoles alcanzados en el experimento van desde 836.25 mg/l en el control y 594.29 mg/l en la extracción con la resina amberlite. Sin embargo, el contenido total de fenoles en la matriz del jugo no mostró cambio radical en el tiempo de almacenamiento a 30°C. Es importante enfatizar que los tratamientos no empezaron con la misma cantidad de compuestos fenólicos: al día 0 del experimento, el control mostró, significativamente, mayor cantidad de compuestos fenólicos (985 mg/l) que otros tratamientos ( $P < 0.05$ ), esta superioridad se mantuvo a través de todo el tiempo del experimento. El rango de pérdidas expresadas como porcentajes de disminución inicial de compuestos fenólicos comprendía desde 17% en el control hasta un 30% en el tratamiento de fermentación sin  $\text{SO}_2$ .

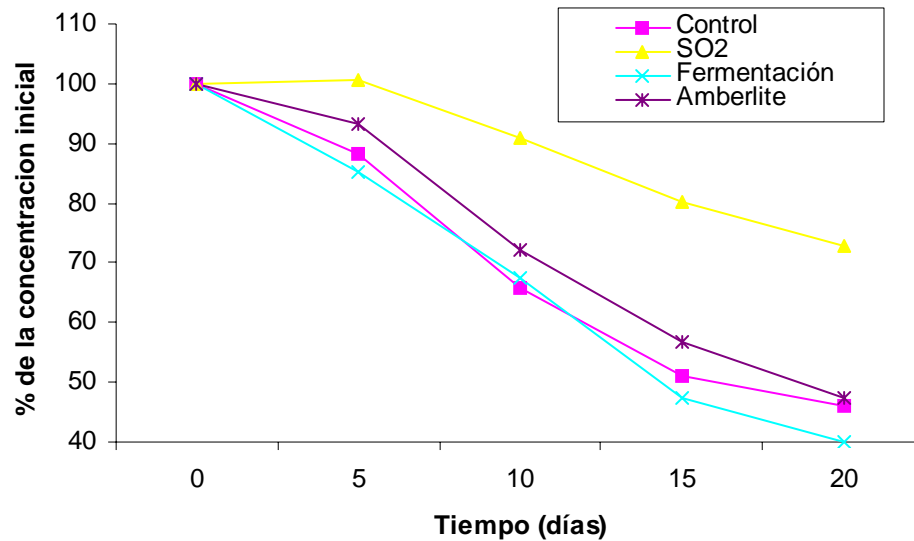


**Figura 1.** Fenoles solubles totales de los cuatro tratamientos a través del tiempo determinados por el reactivo de Folin's Ciocalteu y expresados en equivalentes de ácido gálico (mg/l).

## 4.3. ANTOCIANINAS TOTALES

Los porcentajes de la concentración inicial de antocianinas de cada proceso de concentración (deshidratación por calor y liofilización) no mostraron diferencias significativas entre ellos. Las antocianinas se mostraron más estables en los tratamientos de fermentación con  $\text{SO}_2$ . Los otros tratamientos mostraron un comportamiento similar de decrecimiento en el tiempo y al final del experimento, no mostraron diferencias

estadísticamente significativas entre ellos ( $P>0.05$ ). El resultado confirma que en la matriz del jugo, el  $\text{SO}_2$  reduce el grado de pérdida de color y la polimerización fenólica (Bakker y otros, 1997) y tiene efectos sobre la estabilización de las antocianinas a través del tiempo.



**Figura 2.** Cambios de antocianinas expresados como porcentaje de la concentración inicial a través del tiempo

#### 4.4 DENSIDAD DE COLOR Y TONALIDAD/TINTE

Los valores de la densidad de color en el Cuadro 4 muestran decrecimiento a través del tiempo de almacenamiento. Los valores Tonalidad/Tinte se mueven en dirección opuesta a la densidad de color. Decrecimientos en la densidad de color e incrementos en los valores Tonalidad/Tinte están correlacionados con la polimerización de largas cadenas de antocianinas (Bakker y otros, 1997). El tratamiento de fermentación con  $\text{SO}_2$  muestra, significativamente ( $P<0.05$ ), el valor más bajo en Tonalidad/Tinte al final del tiempo de almacenamiento (20 días) comparado con los otros tratamiento, posiblemente esto significa que el  $\text{SO}_2$  estabiliza algunas antocianinas para disminuir la polimerización de largas cadenas.



**Cuadro 4.** Cambios en la densidad de color y tonalidad / tinte a través del tiempo de almacenamiento.

Propiedad	Tratamiento	Tiempo (Días)				
		0	5	10	15	20
<b>Densidad de color</b> (Unidades de absorbancia)	SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	0.542	0.318	0.355	0.335	0.373
	Amberlite <sup>2</sup>	0.596	0.315	0.325	0.294	0.330
	Control <sup>3</sup>	0.780	0.422	0.431	0.398	0.457
	Fermentación <sup>4</sup>	0.658	0.348	0.365	0.338	0.383
<b>Tonalidad / Tinte*</b>	SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	0.423	0.453	0.504	0.585	0.658 a
	Amberlite <sup>2</sup>	0.407	0.59	0.799	1.056	1.288 b
	Control <sup>3</sup>	0.393	0.622	0.892	1.117	1.296 b
	Fermentación <sup>4</sup>	0.437	0.663	0.931	1.284	1.501 b

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

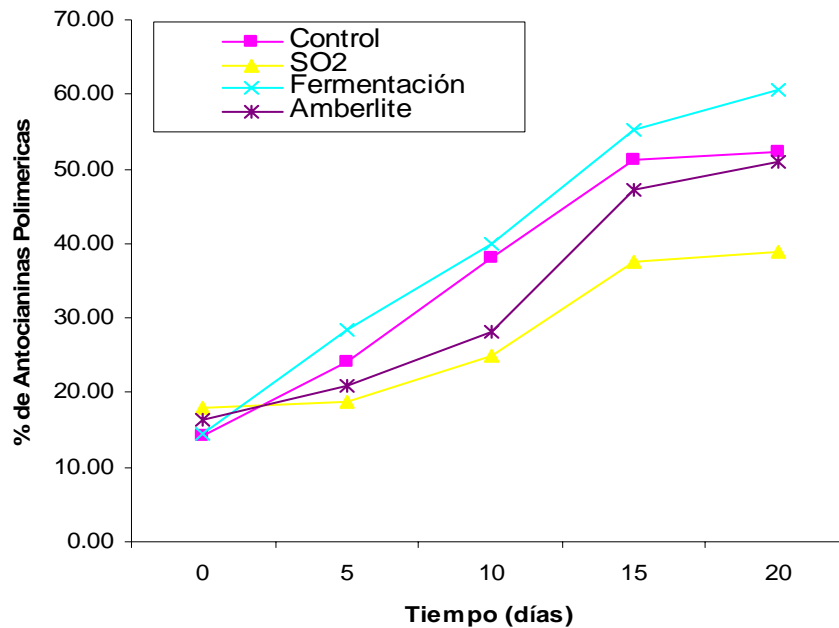
<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

#### 4.5. ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS

Todos los tratamientos a través del tiempo mostraron incrementos en el porcentaje de antocianinas poliméricas, posiblemente debido a que la temperatura de almacenamiento (30°C) aceleró la polimerización natural de las antocianinas. La Figura 3 muestra las diferencias entre los tratamientos en porcentajes de antocianinas poliméricas. La fermentación con SO<sub>2</sub> mostró, significativamente (P<0.05), el menor porcentaje de antocianinas poliméricas a través del tiempo en relación con los otros tratamientos, excepto en el tiempo 0, donde la fermentación con SO<sub>2</sub> mostró el más alto porcentaje de antocianinas poliméricas. El SO<sub>2</sub> probó tener efecto en disminuir la polimerización de las antocianinas totales, probablemente, por su efecto estabilizador. El tratamiento que mostró el valor más alto de polimerización fue la fermentación sin SO<sub>2</sub> que mostró un valor de 60.6% de polimerización al final del experimento, significativamente más alto que los otros tratamientos (P<0.05). Los procesos de deshidratación por calor y liofilización, no mostraron diferencias significativas entre ellos (P>0.05).



**Figura 3.** Cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas a través del tiempo de almacenamiento.

#### 4.6. ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN EN EL HPLC

El Cuadro 5 muestra la concentración de ácido ellágico y quercetina de cada tratamiento. La cantidad de ácido ellágico y quercetina no tuvieron, significativamente, diferencias entre cada proceso de concentración (deshidratación por calor y liofilización) y no mostraron diferencias en el tiempo de almacenamiento ( $P > 0.05$ ). El análisis en el HPLC mostró que los compuestos fenólicos como el ácido ellágico y la quercetina son estables en condiciones de almacenamiento a  $30^{\circ}\text{C}$ . En la cuadro es posible observar, que la cantidad de ácido ellágico es mayor, significativamente, en el control que en otros tratamientos ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, la cantidad de quercetina es mayor en el tratamiento de fermentación con  $\text{SO}_2$  que en el resto de los tratamientos. Los procesos de deshidratación por calor y liofilización no mostraron diferencias en el experimento ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 5.** Concentraciones de ácido ellágico y quercetina entre cada tratamiento\*.

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración de ácido ellágico (mg/l)</b>	<b>Concentración de quercetina (mg/l)</b>
SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	245.7 b	0.993 a
Amberlite <sup>2</sup>	223.1 b	0.774 b
Control <sup>3</sup>	325.1 a	0.080 b
Fermentación <sup>4</sup>	238.2 b	0.778 b

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

## 5. CONCLUSIONES

Los procesos de concentración del jugo de cáscaras de uvas muscadinas, en comparación con el control, no mostraron diferencias significativas entre ellos ( $P>0.05$ ). Esto ocurrió en todas las variables evaluadas y durante todo el tiempo del experimento.

El tratamiento de fermentación fue el que mostró significativamente, mayor reducción de los sólidos solubles iniciales del jugo en comparación con el proceso del lavado con amberlite. Sin embargo, el proceso de fermentación duró una semana usando una cantidad de 4g/l de levadura.

A través del tiempo de almacenamiento a 30°C se demostró que el SO<sub>2</sub> evitó la polimerización de las antocianinas en el experimento y la pérdida de color, estabilizando los pigmentos. El tratamiento de fermentación sin SO<sub>2</sub> mostró el más alto nivel de polimerización en el experimento.

Las cantidades de ácido ellágico y quercetina en análisis de HPLC no tuvieron diferencias estadísticas en el tiempo. El control tuvo la mayor concentración de ácido ellágico y el tratamiento de fermentación sin SO<sub>2</sub> tuvo la mayor concentración de quercetina en el experimento.

## **6. RECOMENDACIONES**

Cuantificar otros compuestos fenolicos en el extracto de cáscaras de uvas muscadinas para medir su estabilidad a través del tiempo.

Hacer un análisis de las posibles reacciones químicas que ocurren entre los fenoles, taninos y antocianinas cuando se someten a diferentes tratamientos industriales.

Realizar más ensayos para la extracción de compuestos fenólicos y antocianinas, evaluando diferentes solventes además del agua, como etanol y metanol para comparar la eficiencia de extracción.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., Garcia-Viguera, C. 1998. Effect of Sulphur Dioxide and Must Extraction on Colour, Phenolic Composition and Sensory Quality of Red Table Wine. *Journal of the science of food and agriculture* 78(3):297-307.
- Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American journal of enology and viticulture*. 52:67–87.
- Braswell, J., Stringer, S.J., Sampson, B.J., Ingram, D. 2002. Establishment and production of Muscadine grapes. *Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station Technical Bulletin*. pub.2290 pp. 1-16
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C.H., Talcott, S.T. 2004. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of agricultural and food chemistry* 52(6):1539-1545.
- Ergönül, B., Bağdatlıoğlu, N. 2002. Health benefits of flavonoids. *Ergönül & Bağdatlıoğlu* – pp. 158-161.
- Flora, L.F. 1997. Storage stability of juices and jellies made from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* Michx.). *American journal of enology and viticulture* 28:171-5.
- Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C. 1998. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 46:361-367
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Wrolstad, R. E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., Eds.; Wiley: New York. pp F1.2.1-F1.2.13.
- Gomez-Miguez, M., Heredia, F.J. 2004. Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(16):5117-5123.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. 1993. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. *Food Technology* 47:85-89.

Lee, J.H., Talcott, S.T. 2003. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in Muscadine grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:3971-3976.

Morris, J.R., Brady, P.L. 2004. The Muscadine Experience: Adding Value to Enhance Profits. Arkansas Agricultural Experiment Station, University of Arkansas System. Research Report 974.

Olien, W.C. 1990. The muscadine grape: Botany, viticulture, history and current industry. *HortScience* 25(7):732-739.

Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sellappan, S. y Krewer, G. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(18): 5497-5503.

Poling, E.B., Mainland, C.M., Earp, J.B. 1984. Muscadine grape production guide for North Carolina. N.C., Agric. Ext. Serv. AG-94.

Sims, C.A., Morris, J.R. 1984. Effects of pH, Sulfur Dioxide, Storage Time, and Temperature on the Color and Stability of Red Muscadine Grape Wine. *American journal of enology and viticulture* 35(1):35-39.

Sims, C.A., Morris, J.R. 1986. Effects of acetaldehyde and tannins on the color and chemical age of red Muscadine (*Vitis rotundifolia*) wine. *American journal of enology and viticulture* 37(2):163-165

Singleton, V.L., Rossi, J.A., Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture* 16:144-158.

Talcott, S.T., Lee, J.H. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of agricultural and food chemistry* 50:3186-3192.

Wrolstad, R.E. 1976. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Agricultural Experiment Station Bulletin 624; Oregon State University: Corvallis, OR.

## **8. ANEXOS**



**Anexo 1.** Cuadro de fenoles solubles totales de los cuatro tratamientos a través del tiempo determinados por el reactivo de Folin's Ciocalteau y expresados en equivalentes de ácido gálico (mg/l)\*.

Tratamientos	Tiempo (Días)				
	0	5	10	15	20
SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	811.49 b	681.47 a b	681.47 b	681.47 b	681.47 b
Amberlite <sup>2</sup>	743.19 b	727.9 c	696.83 b	732.98 b	594.29 b
Control <sup>3</sup>	984.98 a	927.93 a	914.6 a	1020.2 a	836.25 a
Fermentación <sup>4</sup>	808.83 b	866.24 b c	753.54 b	783.67 b	618.38 b

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

**Anexo 2.** Cuadro de cambios en antocianinas expresados como porcentaje de la concentración inicial a través del tiempo\*.

Tratamiento	Tiempo (Días)				
	0	5	10	15	20
SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	100	100.49 a	90.76 a	80.17 a	72.78 a
Amberlite <sup>2</sup>	100	93.3 a b	72.12 b	56.66 b	47.27 b
Control <sup>3</sup>	100	88.21 b c	65.87 b	51 b c	46.06 b
Fermentación <sup>4</sup>	100	85.34 c	67.36 b	47.28 c	39.9 b

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

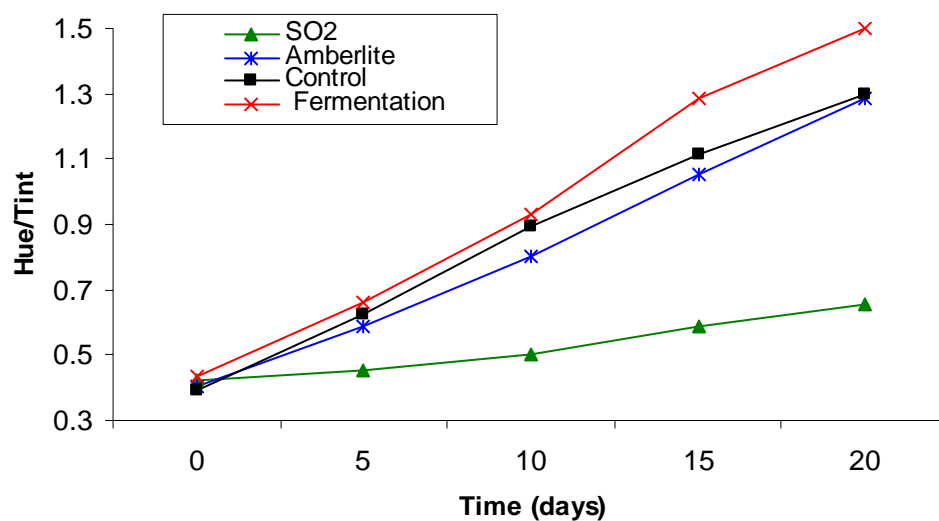
<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).

**Anexo 3.** Cambios en tonalidad / tinte a través del tiempo de almacenamiento.



**Anexo 4.** Cuadro de cambios en el porcentaje de antocianinas poliméricas a través del tiempo de almacenamiento\*.

Tratamiento	Tiempo (Días)				
	0	5	10	15	20
SO <sub>2</sub> <sup>1</sup>	17.92 a	18.77 c	25.00 b	37.61 b	38.89 c
Amberlite <sup>2</sup>	16.36 a b	20.96 b c	28.03 b	47.08 a	50.90 b
Control <sup>3</sup>	14.28 b	24.11 b	38.10 a	51.28 a	52.34 b
Fermentación <sup>4</sup>	14.49 b	28.35 a	39.93 a	55.24 a	60.66 a

<sup>1</sup>Fermentación alcohólica usando levadura y SO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Extracción con amberlite que consiste en remover el azúcar con varios lavados con agua.

<sup>3</sup>Jugo de extracto de cáscaras.

<sup>4</sup>Fermentación alcohólica usando levadura.

\*Valores con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).