



Determinación de la capacidad antioxidante de vinos tintos. Efecto de la maceración con subproductos de la industria enológica

Andrés Gutiérrez Lorenzo

Facultad de Farmacia



Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Determinación de la capacidad antioxidante de vinos tintos. Efecto de la maceración con subproductos de la industria enológica

Andrés Gutiérrez Lorenzo

Facultad de Farmacia, Sevilla. 21 de septiembre de 2017.

Departamento de Nutrición y Bromatología

Tutoras M^a Luisa Escudero Gilete, M^a José Jara Palacios

Trabajo Fin de Grado experimental

Resumen

La uva es una de las frutas con mayor producción en el mundo, debido a que cada año se elaboran millones de hectolitros de vino. Por lo tanto, es de interés estudiar el efecto en la salud del vino tinto y su posible optimización.

Los compuestos fenólicos del vino tinto son los responsables de su capacidad antioxidante y, por lo tanto, son los principales implicados en los beneficios en la salud que proporciona el vino. Las semillas procedentes del orujo, uno de los subproductos de la industria enológica, siguen conservando polifenoles tras la vinificación y es posible utilizarlas para mejorar las características antioxidantes del vino tinto. En este trabajo se han evaluado varios parámetros en muestras de vino tinto de Syrah a los que se les han añadido semillas durante la vinificación (Corto: adición de semillas una vez; Largo: adición de semillas en dos ocasiones). Se ha evaluado el contenido medio en fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu y la capacidad antioxidante mediante los métodos ABTS y FRAP.

El vino al que se le adiciona 12 gr/L de semillas en una sola fecha (Corto) presenta valores significativamente mayores ($p < 0,05$) de polifenoles totales con respecto a los valores del vino Testigo (1725 y 1019 mg/L respectivamente).

Los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad antioxidante fueron significativamente más elevados en los vinos del ensayo Largo con respecto a los vinos Corto y Testigo (1893, 1181 y 867 $\mu\text{moles TE/L}$ respectivamente). En el caso del FRAP, los vinos elaborados con adición de semillas (Corto y Largo) presentaron valores más elevados de capacidad antioxidante que los elaborados sin adición (Testigo).

Palabras claves:

Vino tinto, semillas, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, vinificación.

Índice

1. Introducción	8
1.1. La uva	8
1.2. El vino	9
1.3. El orujo	10
1.4. Compuestos fenólicos	11
1.5. Capacidad antioxidante de los polifenoles	13
1.6. Métodos para determinar la capacidad antioxidante	14
1.6.1. Método ABTS	16
1.6.2. Método FRAP	17
2. Objetivos	18
3. Materiales y métodos	20
3.1. Muestras	20
3.2. Equipos	21
3.3. Materiales	21
3.4. Reactivos	21
3.5. Determinación de fenoles totales: Método de Folin-Ciocalteau	22
3.6. Estudio de la capacidad antioxidante: Método ABTS	23
3.7. Estudio de la capacidad antioxidante: Método FRAP	24
4. Resultados y discusión	26
4.1. Fenoles totales	26
4.2. Capacidad antioxidante	28
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía	34

1. Introducción

1.1. La uva

La uva (*Vitis vinifera* L.) es una baya que se agrupa en la vid en forma de racimos. Presenta una estructura formada por una película exterior llamada hollejo, una masa que rellena interiormente la baya, conocida como pulpa y, en el centro de la misma, un número variable de semillas o pepitas. El hollejo representa entre el 8 y el 20% del peso de la baya y su misión es encerrar los tejidos vegetales que contienen las sustancias de reserva que acumula el fruto, proteger las semillas como elementos perpetuadores de la especie hasta llegar a su maduración, y defender estas estructuras de las agresiones externas. Se divide en tres capas claramente diferenciadas:

- Cutícula: es la capa más externa y está compuesta mayoritariamente por ácidos grasos hidroxilados y está cubierta por la pruina, un recubrimiento de ceras hidrofóbicas.
- Epidermis: es la capa intermedia y consiste en una o dos capas de células dispuestas de forma regular.
- Hipodermis: es la capa más cercana a la pulpa, sus capas más interiores se confunden con ésta.

En las dos últimas capas de células del hollejo es donde se ubica la mayor parte de los polifenoles y sustancias aromáticas que contiene la uva (Pinelo et al., 2006; Hidalgo, 2010; Nogales, 2017) (Figura 1).

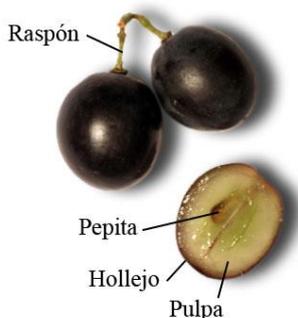


Figura 1. Partes de la uva

1.2. El vino

El vino se puede definir según la Ley de la Viña y el Vino Española, como: “el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”.

El proceso de vinificación se puede dividir en varias partes:

- La vendimia: se inicia según el grado de madurez de la uva, cuando su contenido en azúcar llega al máximo a la vez que disminuye su acidez.
- Despalillado: consiste en separar y desechar el raspón de las uvas, ya que este puede aportar sabores no deseados, afectaría a su contenido ácido y disminuir su grado alcohólico.
- Estrujado: consiste en aplastar la uva para obtener el mosto, respetando en la medida de lo posible la integridad del hollejo y las semillas ya que podría perjudicar la calidad del vino.
- Encubado: la masa que se ha formado pasa a las tinajas de fermentación, aunque en la elaboración de vino de blanco se realiza previamente una eliminación de las partes sólidas del mosto. En cambio para el vino tinto si se busca este contacto entre líquido y partes sólidas de la uva, ya que aporta fenoles como los antocianos, llamándose a este proceso maceración. Podemos diferenciar dos tipos de fermentación:
 - Fermentación espontánea o tumultuosa: debido a la propia uva o a levaduras artificiales seleccionadas.
 - Fermentación lenta o maloláctica: producida por bacterias que producen ácido láctico y gas carbónico a partir de ácido málico.
- Decube: consiste en separar el vino de las partes sólidas.
- Filtración: etapa opcional, sólo para vinos destinados a Denominación de Origen.

1.3. El orujo

La producción mundial de uva alcanzó los 75,8 millones de toneladas en 2016, y la producción mundial de vino (excluidos zumos y mostos) se estima en ese mismo año en 267 millones de hectolitros, lo cual implica que la industria vitivinícola produce millones de toneladas de residuos (orujo) el cual representa un problema de gestión de residuos tanto ecológico como económico (OIV, 2017; Kammerer et al., 2004; 2005). En realidad, la recuperación industrial de residuos es realizada por su empleo parcial para la extracción de ácido tartárico o la producción de etanol (Silva et al., 2000), y el residuo final sólido a veces es usado como fertilizante, aunque los altos niveles de fenoles constituyen un problema porque inhiben la germinación de semillas (Villalobos, 2001; Kammerer et al., 2004).

El orujo de uva es el principal y más abundante subproducto de la industria vitivinícola y está constituido por restos de pulpa, raspones, hollejos y semillas. Se obtiene tras el prensado de la uva, en la vinificación en blanco, y tras la fermentación, en la vinificación en tinto. El orujo obtenido de la vinificación en tinto no está constituido de raspones ya que estos son separados de la uva en la etapa de despalillado. En el caso del orujo de uva blanca, las semillas constituyen un 25-30 %, los hollejos un 45-50 % y los raspones un 25-30 % (Jara; 2015).

El orujo se utiliza como aditivo en la alimentación animal, pero la presencia de polifenoles poliméricos (lignina) reduce la digestibilidad porque inhiben enzimas celulolíticas y proteolíticas, así como el crecimiento de bacterias ruminales. Además, el alto contenido de fibra dietética, sobre todo glicanos, celulosa y pectinas, acentúan el posible valor nutritivo del orujo con una amplia gama de usos como ingrediente alimentario (Saura-Calixto et al., 1998; Kammerer et al., 2005; Llobera et al., 2007).

Desde hace unos años está aumentando la concienciación de los consumidores sobre el uso de aditivos en los alimentos, y se está prestando mayor atención a los alimentos funcionales, por lo que existe la necesidad de identificar fuentes naturales alternativas más seguras de antioxidantes alimentarios. De la misma manera, las industrias modernas se centran en la disminución del impacto ambiental de los

subproductos industriales. Por lo tanto, la mayor parte de la atención se ha prestado a la recuperación de bioactivos fenólicos procedentes de los derivados de la uva de la industria vitivinícola (Pinelo et al., 2006). Estos polifenoles que presenta el orujo tienen conocidos efectos promotores de la salud y otras propiedades en diferentes sistemas biológicos y alimenticios, con datos recientes sobre sus actividades antioxidante, antiradical, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerosa y cardioprotectora (Xia et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). Por lo tanto, el consumo de polifenoles se ha asociado con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y cáncer, por ejemplo, cáncer de colon; además de con la prevención de diabetes y osteoporosis (Vauzour et al., 2010; Scalbert, 2017). Estas características están relacionadas con las características antioxidantes tanto como agentes reductores, como inhibiendo y retrasando la oxidación lipídica en diversos sistemas alimenticios (Iacopini et al., 2008; Sánchez-Alonso et al., 2008; Yu y Ahmedna, 2013).

Como consecuencia, el orujo se considera una fuente valiosa de fitoquímicos que se pueden recuperar como compuestos funcionales para la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y nutracéutica. De esta manera, la recuperación de polifenoles a partir de materiales de desecho de la industria vitivinícola ha cobrado atraído una atención creciente en los últimos años, y las industrias están encontrando un alto valor y alternativa sostenible a sus residuos, representando una fuente atractiva y rentable de estos compuestos biológicos, que podrían incorporarse a los alimentos (Fontana et al., 2013; Jara-Palacios et al., 2015).

1.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (polifenoles) constituyen uno de los grupos de compuestos químicos más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son una extensa familia de metabolitos secundarios cuya función es la defensa frente a agentes externos. Además, los polifenoles son importantes en los alimentos ya que influyen sobre las propiedades organolépticas del mismo. Los compuestos fenólicos incluyen no sólo una amplia variedad de moléculas con una estructura polifenólica (es

decir, varios grupos hidroxilo en anillos aromáticos), sino también moléculas con un anillo fenólico, tales como ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos. Los compuestos fenólicos contenidos en las uvas pueden clasificarse en general en 2 grupos principales (Soto-Vaca, 2012; Martín-Peláez, 2013; Nogales, 2017;):

- Flavonoides:
 - Flavanoles
 - Flavonoles
 - Antocianos
 - Flavonas

- No flavonoides:
 - Ácidos fenólicos: hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos
 - Estilbenos
 - Fenoles volátiles
 - Lignanos y cumarinas

Se han identificado muchos compuestos fenólicos tanto en el vino como en el orujo, donde los más abundantes son los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, los flavanoles, los flavonoles, las antocianinas (en el caso de uvas tintas), y los estilbenos (Lu y Foo, 1999; Kammerer et al., 2004). Las figuras 2-6 resumen las estructuras químicas de los compuestos fenólicos mencionados.

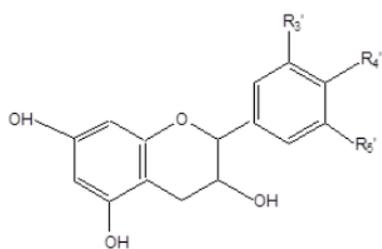


Figura 2. Estructura química general Flavanoles

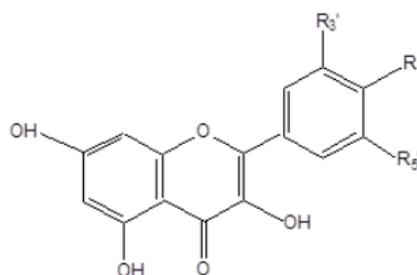


Figura 3. Estructura química general Flavonoles

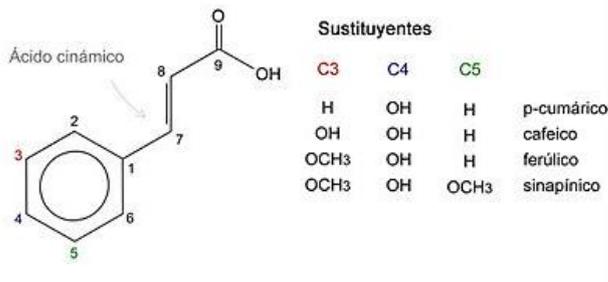


Figura 4. Estructura química general Ácidos hidroxicinámicos

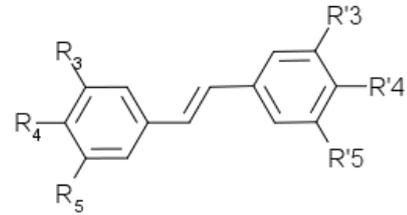
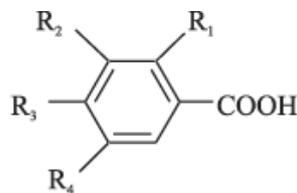


Figura 5. Estructura química general Estilbenos



Ácido salicílico: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$
 Ácido *p*-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{OH}$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$
 Ácido gálico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido siríngico: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH}$

Figura 6. Estructura química general Ácidos hidroxibenzoicos

1.5. Capacidad antioxidante de los polifenoles

Los antioxidantes son un amplio grupo de compuestos capaces de prevenir procesos degenerativos asociados a un exceso de radicales libres en el organismo (enfermedad cardiovascular, ciertos tipos de cáncer, patologías asociadas a un deterioro del sistema cognitivo como el Alzheimer, etc.) ya que impiden o retrasan que un prooxidante oxide el sustrato (Halliwell y Gutterige, 1989; Halliwell, 1997; De la Fuente, 2002; Stanner et al, 2004; Pérez, 2007).

Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados (Rybczynska, 1997). Las especies de oxígeno reactivo (ROS) pueden lesionar

macromoléculas como el ADN, los hidratos de carbono y las proteínas, pudiendo iniciar una cadena de eventos que dan como resultado lesión celular (Aldershvile, 1994).

Los antioxidantes pueden actuar:

- Previendo la formación de ROS, pudiendo modular las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo.
- Interceptando el ataque de ROS, oxidándose ellos.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos polifenólicos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. Tienen capacidad para capturar especies reactivas del oxígeno generadas químicamente (radical anión superóxido y radical lípidos peroxi) y de inhibir la oxidación, catalizada por el cobre, de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL). Además, la actividad antioxidante no depende de un solo compuesto fenólico, sino que está distribuida entre distintos compuestos. La contribución de cada componente depende de su calidad como antioxidante, concentración e interacción con su microambiente (Frankel et al, 1993; Frankel et al, 1995; Leighton et al, 1998; Velioglu et al, 1998; Kähkönen et al, 2001).

Los polifenoles pueden inhibir enzimas generadoras de ROS, como la xantina oxidasa y la nicotinamida- adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Dreosti, 1996; Orallo, 2002).

1.6. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

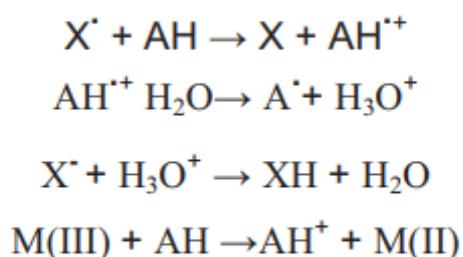
Los métodos *in vitro* pueden clasificarse según sus mecanismos en:

- Métodos HAT (Hydrogen Atom Transfer): transferencia de un átomo de hidrogeno.
- Métodos SET (Single Electron Transfer): transferencia de un electrón.

El resultado final es el mismo, pero la cinética y el potencial para el sitio de la reacción difieren. El método basado en HAT mide la clásica habilidad de los antioxidantes para atrapar radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno (AH = donante de hidrógeno):



Los métodos basados en SET detectan la habilidad del potencial antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales (Wright et al., 2001):



Ambas reacciones pueden ocurrir en paralelo, pero el mecanismo dominante en un sistema dado estará determinado por la estructura y las propiedades del antioxidante, la solubilidad, el coeficiente de partición y los disolventes empleados. La energía de disociación del enlace (BDE) y el potencial de ionización (IP). Estos son los principales factores que determinan el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes (Wright et al., 2001). A partir de estos mecanismos se han desarrollado varios métodos.

La validez de algunos de los métodos utilizados para medir la actividad antioxidante puede ser cuestionada por no tener en cuenta la complejidad de la acción de los antioxidantes.

La actividad antioxidante en alimentos y sistemas biológicos depende de múltiples factores, incluyendo las propiedades coloidales de los sustratos, las

condiciones y etapas de oxidación y la localización de los antioxidantes en diferentes fases. Cuando se determina la actividad antioxidante in vitro, es importante considerar además la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, los métodos para evaluar la oxidación y cómo cuantificar la actividad antioxidante (Frankel y Meyer, 2000).

En estudios recientes sobre compuestos fitoquímicos se han producido discrepancias en los resultados obtenidos por diferentes investigadores debido al uso de métodos poco específicos y uni-dimensionales para evaluar la actividad antioxidante, (Frankel y Meyer, 2000). En este contexto, debido precisamente a la selección de diferentes sustratos, composición del sistema y diferentes métodos analíticos, los datos obtenidos por diferentes investigadores son extremadamente difíciles de comparar e interpretar. Además, los niveles de antioxidantes de un alimento dado no reflejan necesariamente su capacidad antioxidante total debido a interacciones moleculares que tienen lugar en los alimentos (Pellegrini et al., 2003). Por todo esto, aún no existe un único método estandarizado que reúna, además de las características ya comentadas, otras como pueden ser: sencillez, instrumentación asequible, buena reproducibilidad entre días, adaptabilidad para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos, distintas fuentes de radicales, adaptabilidad para análisis rutinarios a gran escala y medir reacciones que ocurran en reacciones potenciales (Frankel y Meyer, 2000; Prior et al., 2005).

1.6.1. Método ABTS

También conocido como ensayo TEAC, por sus siglas en inglés "Trolox Equivalents Antioxidant Capacity", se trata de un método de tipo HAT y SET que consiste en la reducción del radical catiónico 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}) por parte de los antioxidantes presentes en la muestra.

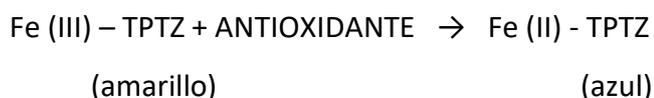
Esta reacción se lleva a cabo en medio acuoso, dando lugar a una decoloración y, por tanto, a una disminución de la absorbancia a 734 nm (Re et al., 1999). Es necesario comparar la capacidad para captar el radical ABTS^{•+} del antioxidante con respecto a un antioxidante de referencia o patrón, en este caso se trata de Trolox.

Las ventajas que aporta el método ABTS es que puede ser utilizado para antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, compuestos puros y extractos de alimentos. Además, la generación química del radical es directa, sin participación de un intermedirario, y están bien establecidas las estabilidades tanto del ABTS^{•+} como de las reacciones que lo generan (Re et al., 1999; Arnao, 2000; Arnao et al., 2001).

1.6.2. Método FRAP

El método FRAP, por sus siglas en inglés “Ferric Reducing Antioxidant Power”, fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en el plasma, pero ha sido subsecuentemente adaptado y utilizado para el análisis de antioxidantes en alimentos vegetales (Benzie y Szeto, 1999; Gil, 2000; Ou et al., 2002; Proteggente et al., 2002).

El método FRAP es un ensayo con mecanismo SET, mide directamente la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ión férrico a ferroso en medio acuoso. Para ello se provoca una reacción por la adición del compuesto TPTZ (2,4,6 tripiridyl-s-triazina), que a pH ácido (pH=3.6) se une al ión ferroso formando un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm durante 30 minutos, este color es considerado directamente relacionado con la capacidad reductora total del antioxidante y puede ser medido cuantitativamente por espectrofotometría.



Este método presenta algunos inconvenientes como, por ejemplo, que sólo mide la capacidad reductora de los antioxidantes, obviando otros mecanismos que puedan tener (Alañón, 2011). Además, se realiza a un pH no fisiológico y a 593 nm pueden absorber otros compuestos, lo cual aumentaría el valor del FRAP (Pulido et al., 2000; Prior y Cao, 1999). También, como el potencial de reducción del Fe³⁺ a Fe²⁺ es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al ión férrico, sobreestimando el valor del FRAP (Ou et al., 2002).

2. Objetivos

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado consiste en el estudio de la mejora del perfil antioxidante del vino tinto a través de maceración con semillas en diferentes etapas, comparado con vinos testigos. Los objetivos específicos son:

- Evaluación del contenido fenólico total en el vino tinto mediante el método Folin-Ciocalteu.
- Determinación de la capacidad antioxidante del vino tinto mediante los métodos ABTS y FRAP.
- Evaluar el potencial biofuncional que aportan las semillas como coadyuvante en la vinificación para enriquecer la composición fenólica de los vinos tintos de regiones de clima cálido.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras

Se utilizaron muestras de vino tinto de la variedad Syrah de la campaña 2016 proporcionadas por la “Cooperativa Nuestra Señora del Socorro” (Rociana del Condado, España) y amparada por D.O. Condado de Huelva. Los ensayos llevados a cabo fueron:

- T: Testigo. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah
- C: Corto. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah y adición de 12 gr/L de semillas procedentes de orujo de vinificación de uvas blancas Pedro Ximénez deshidratadas al sol y, por lo tanto, con alto nivel de maduración. La adición de semillas se produce tras la fermentación alcohólica y se retiran tras un periodo de 1 mes.
- L: Largo. Vinificación en tinto a partir de uva de la variedad Syrah y adición, en dos momentos del proceso, de 12 gr/L de semillas procedentes de orujo de vinificación de uvas blancas Pedro Ximénez deshidratadas al sol. La adición de semillas se produce tras la fermentación alcohólica, se retiran tras un periodo de 1 mes, y a continuación se añaden de nuevo 12g/L de semillas y se retiran un mes después.

Las muestras fueron obtenidas en diferentes momentos de la vinificación y de nueve depósitos de acero inoxidable de 50L cada uno (tres depósitos para cada ensayo). Una vez recogidas las muestras de vino, se transportaron al laboratorio y fueron congeladas. Se tomaron muestras de cada depósito en tres fechas diferentes del proceso de vinificación:

- 30/08/2016: Descubre
- 12/09/2016 : Se añadieron 12gr/L de semillas tanto en los depósitos del ensayo Corto como del Largo. Se dejan un mes macerando (se retiran el 13/10/2016).
- 13/09/2016: 1º muestreo
- 10/10/2016: 2º muestreo
- 13/10/2016: se retiran las semillas adicionadas

- 13/10/2016 : Se añadieron 12gr/L de semillas a los depósitos del ensayo Largo, y se dejan un mes macerando (se retiran el 14/11/2016).
- 14/11/2016: se retiran las semillas adicionadas
- 22/11/2016: 3ª muestreo

3.2. Equipos

- Agitador Vortex IKA Genios 3 (IKA®, Staufen, Alemania)
- Diluciones de referencia de pH 4.00, 7.00, 9.00 y disolución de mantenimiento del electrodo del pH-metro (KCl, 3 M) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Espectrofotómetro UV-Vis Agilent® 8453
- Micropipetas Eppendorf
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)

3.3. Materiales

- Cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico
- Cubeta de vidrio de 10 mm de camino óptico
- Matraces aforados (10, 25, 50, 100, 500, 1000 mL)

3.4. Reactivos

- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Acetato de sodio trihidratado (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Ácido acético (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

- Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España)
- Persulfato de potasio (Panreac, Barcelona, España)
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España)
- Solución HCl 40 mM
- Tampón fosfato salino (PBS)
- TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Tricloruro de hierro (Panreac, Barcelona, España)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

3.5. Determinación de fenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu

Se llevó a cabo según el protocolo de Singleton & Rossi (1965) con algunas modificaciones.

Para la recta de calibrado se realizaron 6 diluciones de ácido gálico (patrón) de diferentes concentraciones (0-500 mg/L). Se tomó 0,25 mL de cada disolución patrón, 1,25 mL de reactivo Follin-Ciocalteu y 3,75 mL de disolución de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 20%. La mezcla se homogenizó y se enrasó a un volumen de 25 mL con agua destilada, finalmente se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 765nm en cubeta de 10 mm. Cada disolución se analizó por triplicado. Para el análisis de las muestras (con una disolución previa adecuada) se procedió igual que para las disoluciones patrón.

La recta de calibrado se construyó representando la absorbancia frente a la concentración. El valor de la absorbancia obtenido para cada muestra se llevó a la recta de calibrado y, por interpolación, se calculó la cantidad de fenoles totales expresada en miligramos de ácido gálico por litro (mg/L).

3.6. Estudio de la capacidad antioxidante: Método ABTS

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

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

Para obtener la recta de calibrado, se preparó una disolución madre de Trolox (1mM), y a partir de ésta se prepararon 6 disoluciones patrón de distinta concentración (0.03125-1 mM).

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

La recta de calibrado se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración de las distintas disoluciones del patrón Trolox, y se calculó la pendiente de la recta. A continuación se representó la cantidad de muestra analizada frente a la absorbancia medida, obteniéndose así la pendiente de la recta de la muestra, que finalmente fue comparada con la pendiente obtenida para el patrón Trolox. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC: Trolox-equivalent antioxidant capacity, μ moles de Trolox con la misma actividad antioxidante que 1 L de vino).

3.7. Estudio de la capacidad antioxidante: Método FRAP

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

Para construir la recta de calibrado, se preparó una disolución madre de Trolox (1mM), y a partir de ésta, se prepararon 6 disoluciones patrón de distinta concentración (0,031-1mM). Para la medida de la actividad antioxidante de las disoluciones patrón se procedió de la misma forma que con las muestras.

La recta de calibrado se obtuvo representando la absorbancia frente a la concentración de las disoluciones del patrón Trolox, y se calculó la pendiente de la recta. A continuación, se representó la cantidad de muestra analizada frente a la absorbancia medida, obteniéndose así la pendiente de la recta de la muestra, que finalmente fue comparada con la pendiente obtenida para el patrón Trolox. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de trolox (TEAC: *Trolox-equivalent antioxidant capacity*, μ moles de Trolox con la misma actividad antioxidante que 1 L de vino).

4. Resultados y discusión

4.1. Fenoles totales

El resultado obtenido en el contenido total de fenoles de las muestras analizadas se muestra en la Figura 7. Se observa, de forma general, cierta tendencia al aumento del contenido fenólico total durante el proceso de vinificación.

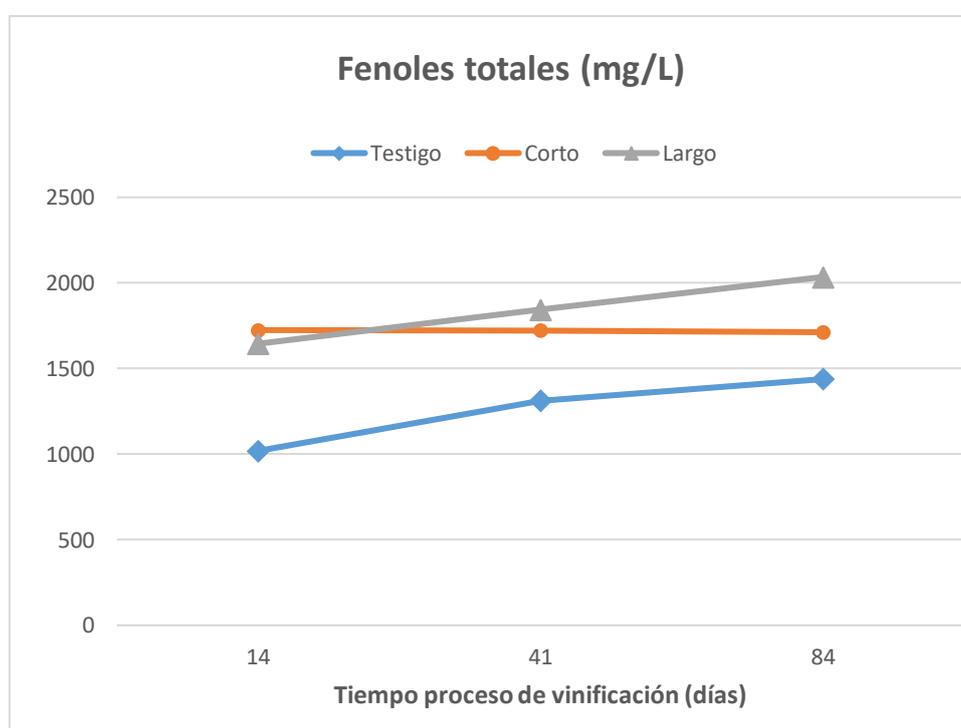


Figura 7. Media del contenido en fenoles totales. Testigo: depósito testigo sin adición de semillas; Corto: depósito con adición de 12gr/L de semillas el día 41 tras el descube; Largo: depósito con adición de 12gr/L de semillas los días 41 y 84 tras el descube.

En el primer punto de muestreo, correspondiente a un día después de haber añadido 12 gr/L de semillas a los depósitos de vinificación de los ensayos Corto y Largo (14 días tras el descube), las muestras de vino Testigo presentan una concentración de fenoles totales inferior a las de los vinos de los ensayos Corto y Largo (1019, 1725 y 1645 mg/L, respectivamente), los cuales presentan valores similares entre ellos, siendo significativa la diferencia entre el ensayo Testigo y el corto ($p < 0.05$). Tras las

fermentación maloláctica, el día 41, se puede observar que los valores de fenoles totales en el vino del ensayo Testigo y del ensayo Largo experimentan un aumento (1312 y 1844 mg/L, respectivamente), mientras que los valores de las muestras de vino en el ensayo Corto se mantienen estables en el tiempo (1773 mg/L). En el último punto de muestreo se observa que los fenoles totales en los vinos de los ensayos Testigo y Largo siguen aumentando, siendo ligeramente más elevado el incremento mostrado por los vinos del ensayo Largo que los vinos Testigo (10,3% y 9,6% respectivamente) mientras que los valores de los vinos pertenecientes al ensayo Corto siguen estables (1712 mg/L) (Figura 7, Tabla 2).

En un estudio similar sobre el efecto de la adición de semillas hidrolizadas en el perfil fenólico y cromático de los vinos, se observó que tras la adición de semillas durante la vinificación, los vinos tenían mayor cantidad de polifenoles totales (Cejudo-Bastante et al., 2016).

Tabla 1. Media \pm desviación estándar de fenoles totales (mg/L) de los ensayos Testigo, Corto y Largo durante el proceso de vinificación.

Fenoles Totales (mg/L)			
Tiempo	Ensayo		
	Testigo	Corto	Largo
14 días	1019 \pm 373 ^a	1725 \pm 232 ^b	1645 \pm 20 ^{a,b}
41 días	1312 \pm 144 ^a	1773 \pm 577 ^a	1844 \pm 344 ^a
84 días	1438 \pm 295 ^a	1712 \pm 367 ^a	2035 \pm 274 ^a
Total	1256 \pm 310 ^a	1737 \pm 362 ^b	1841 \pm 277 ^b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La cantidad de fenoles totales en el vino final (vino estable), es superior en los vinos que han tenido semillas durante más tiempo (ensayo Largo, 2035 mg/L), seguido de los vinos que han tenido semillas durante un periodo de tiempo más corto (ensayo Corto, 1712 mg/L), y los vinos testigos sin adición de semillas (1438 mg/L).

Podría concluirse que la primera adición de semillas da lugar a un aumento de los fenoles totales de los vinos con adición de subproducto con respecto a los vinos sin adición, produciéndose la cesión de los fenoles de las semillas al vino en los primeros días tras la adición. Por otro lado, la segunda vez que se adicionan semillas produce diferencias entre los vinos del ensayo Corto y Largo (Figura 7).

4.2. Capacidad antioxidante

En primer lugar, se evaluó la capacidad antioxidante de los vinos por el método ABTS. Los resultados, expresados en micromoles de Trolox/L de vino, se muestran en la Figura 8.

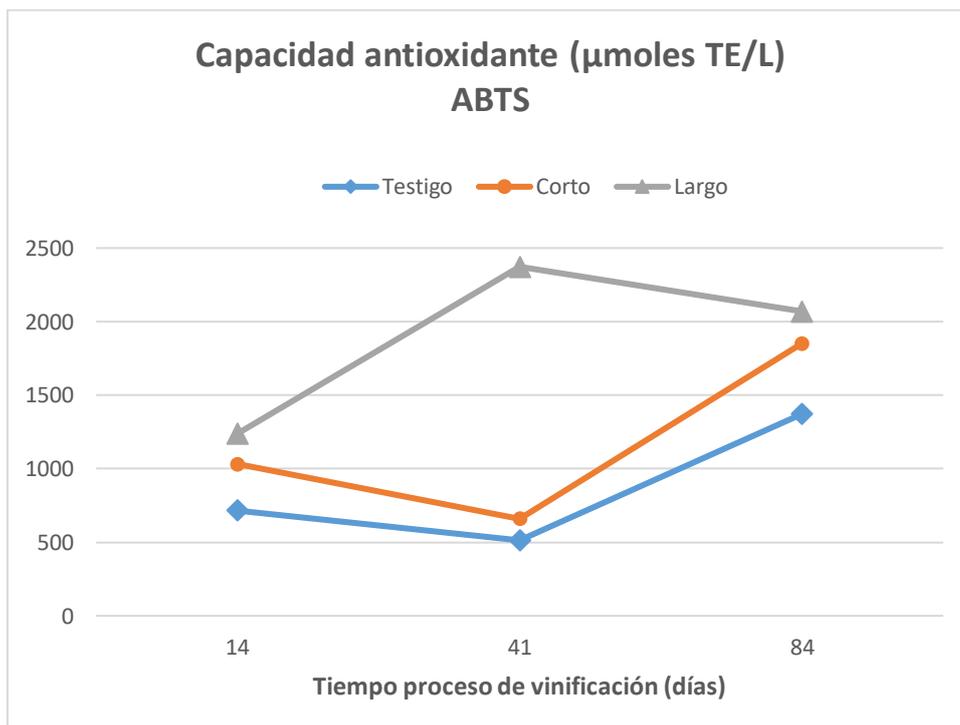


Figura 8. Media de la capacidad antioxidante medida mediante método ABTS. Testigo: depósito testigo sin adición de semillas; Corto: depósito con adición de 12gr/L de semillas el día 41 tras el descube; Largo: depósito con adición de 12gr/L de semillas los días 41 y 84 tras el descube.

Según los resultados obtenidos, en la primera etapa, un día después de la adición inicial de semillas, los vinos que presentan mayor capacidad antioxidante son los del ensayo Largo, seguido por el ensayo Corto y el Testigo (1238, 1032 y 717 $\mu\text{moles TE/L}$, respectivamente), siendo significativas las diferencias ($p < 0,05$) entre los vinos del ensayo Testigo y el Largo. Los vinos Testigo y Corto experimentan a continuación una disminución de su capacidad antioxidante, aunque en la última etapa (84 días) se observa un aumento considerable. En cambio el vino del ensayo Largo sufre primero un aumento importante de la capacidad antioxidante y luego una disminución (2373 y 2068 $\mu\text{moles TE/L}$, respectivamente), manteniendo sus valores en todo momento por encima de los otros dos ensayos. En el segundo punto de muestreo, la capacidad antioxidante de los vinos del ensayo Largo es significativamente ($p < 0,05$) superior a la de los vinos Testigo y Corto (2373, 513 y 659 $\mu\text{moles TE/L}$, respectivamente) (Figura 8, Tabla 3). En un estudio llevado a cabo por Jara-Palacios et al. (2016), en el que se empleó la adición de semillas de la variedad de uva Pedro Ximénez durante la vinificación, se observó un aumento de la actividad antioxidante de los vinos tintos obtenidos.

Tabla 3. Media \pm desviación estándar de la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS ($\mu\text{moles TE/L}$) de los ensayos Testigo, Corto y Largo durante el proceso de vinificación.

ABTS ($\mu\text{moles TE/L}$)			
Tiempo	Ensayo		
	Testigo	Corto	Largo
14 días	717 \pm 191 ^a	1032 \pm 164 ^{a,b}	1238 \pm 119 ^b
41 días	513 \pm 89 ^a	659 \pm 140 ^a	2373 \pm 739 ^b
84 días	1372 \pm 552 ^a	1852 \pm 879 ^a	2068 \pm 317 ^a
Total	867 \pm 488 ^a	1181 \pm 696 ^a	1893 \pm 651 ^b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Por otro lado, también se evaluó la capacidad antioxidante por el método FRAP. Los resultados expresados en micromoles de Trolox/L de vino se muestran en la Figura 9.

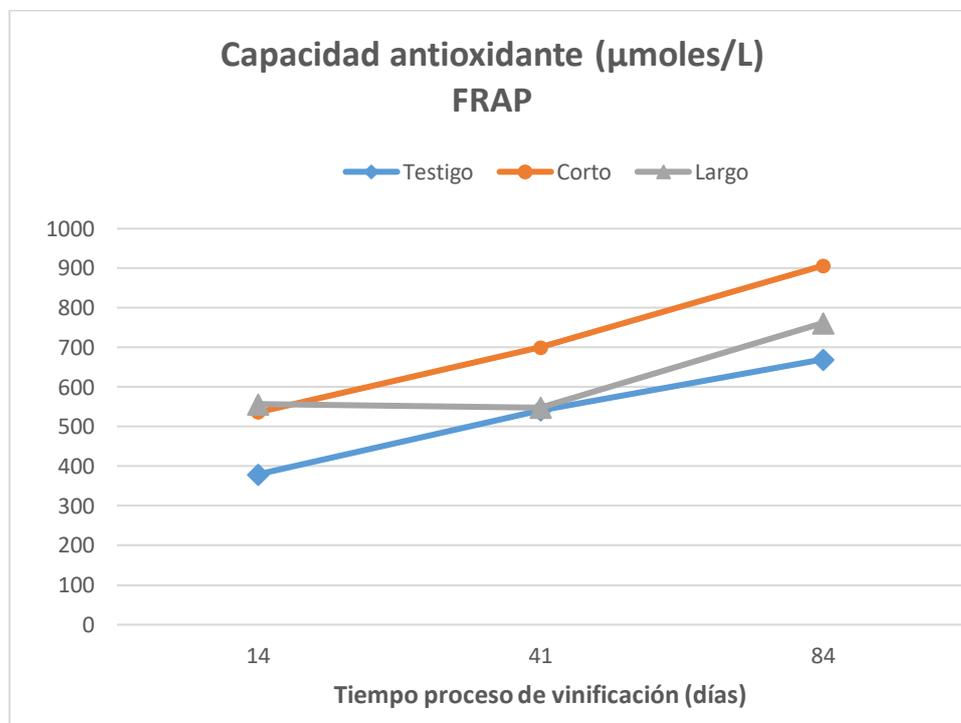


Figura 9. Media de la capacidad antioxidante medida mediante método FRAP. Testigo: depósito testigo sin adición de semillas; Corto: depósito con adición de 12gr/L de semillas el día 41 tras el descube; Largo: depósito con adición de 12gr/L de semillas los días 41 y 84 tras el descube.

Las muestras de los vinos de los ensayos Testigo y Corto presentan un aumento constante de su capacidad antioxidante en el tiempo, siendo los valores de los vinos del ensayo Corto mayores que los vinos del ensayo Testigo (41% mayor en el primer muestreo, 30% mayor en el segundo y 35% mayor en el tercero). La evolución de la capacidad antioxidante de los vinos del ensayo Largo es más irregular que la evolución de los vinos anteriores ya que, aunque comienza con unos valores similares a los de los vinos del ensayo Corto, estos valores se mantienen hasta el segundo punto de muestreo y a partir de ahí experimentan un aumento (sin llegar a equipararse de nuevo al ensayo Corto) (Figura 9, Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm desviación estándar de la capacidad antioxidante medida mediante el método FRAP (μ moles TE/L) de los ensayos Testigo, Corto y Largo durante el proceso de vinificación.

FRAP (μ moles TE/L)			
	Ensayo		
	T	C	L
14 días	380 \pm 77 ^a	536 \pm 321 ^a	557 \pm 80 ^a
41 días	541 \pm 211 ^a	701 \pm 35 ^a	548 \pm 252 ^a
84 días	670 \pm 192 ^a	906 \pm 374 ^a	762 \pm 180 ^a
Total	530 \pm 194 ^a	714 \pm 295 ^a	622 \pm 191 ^a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

De nuevo, al igual que los resultados obtenidos con la cantidad de fenoles totales, la adición de semillas la primera vez es la una diferencia en el aumento de la capacidad antioxidante de los vinos con adición de semillas con respecto a los vinos sin adición. Además, la capacidad antioxidante en el vino final (vino estable), es superior en los vinos que han tenido adición de subproductos durante el proceso de vinificación.

Según los resultados obtenidos en los tres ensayos, se podría concluir que la adición de semillas en avanzado estado de maduración fenólica tras la fermentación alcohólica mejora las propiedades antioxidantes del vino, ya que los vinos de los ensayos Corto y Largo han obtenido valores significativamente superiores ($p < 0,05$) que los del ensayo Testigo en el método ABTS. Los vinos del ensayo Largo fueron los que mayor capacidad antioxidante tuvieron y esto podría deberse a la adición de semillas en dos momentos diferentes de la vinificación.

5. Conclusiones

- El contenido en fenoles totales, evaluado mediante el método de Folin-Ciocalteu, aumenta en los vinos a los que se les ha adicionado semillas durante la vinificación (ensayos Corto y Largo).
- La capacidad antioxidante evaluada por métodos espectrofotométricos varía según el tipo de vino. Los vinos tintos a los que se les ha adicionado semillas (ensayos Corto y Largo) proporcionan mejores resultados que los vinos del ensayo testigo, siendo los vinos que han contenido semillas durante un periodo más largo de tiempo los que presentan los valores más elevados de actividad antioxidante.
- La adición de 12 gr/L de semillas 13 y 44 días después del descube (ensayos Corto y Largo) podría ser una buena técnica para mejorar el contenido fenólico y la capacidad antioxidante del vino tinto.
- La reutilización de subproductos de vinificación en blanco durante el proceso de vinificación en tinto podría proporcionar una mejora en valor biológico de los vinos.
- La reutilización de subproductos de vinificación para mejorar las características de los vinos está demostrando ser una solución factible para el problema ecológico que conlleva el orujo en el medio ambiente.

6. Bibliografía

- Alañón Pardo M. Chemical characterization and antioxidant capacity of extracts from enological woods obtained by accelerated solvent extraction. Universidad de Castilla La Mancha; 2011.
- Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés de Luna A, Badimon L, Bertrand ME, Cleand J, et al. Estrés oxidativo (especies de oxígeno reactivo), patología cardiovascular (Parte I) Eur Cardiol J 1998; 3(72).
- Arnao M. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology. 2000; 11(11):419-421.
- Arnao M, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry. 2001; 73(2):239-244.
- Benzie, I.F, Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Anal. Biochem. 1996; 239: 70 – 76.
- Benzie, I.F, Szeto, T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing /antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. 1999; 47: 633 – 636.
- Cejudo-Bastante M, Rodríguez-Morgado B, Jara-Palacios M, Rivas-Gonzalo J, Parrado J, Heredia F. Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. Food Chemistry. 2016;209: 348-357.
- De la Fuente M. “Effects of antioxidants on immune system aging” European Journal of Clinical Nutrition. 2002; 56, Supplement 3: S5-8
- Dreosti IE. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr Rev.* 1996; 54: S51-S58.
- Fontana A, Antonioli A, Bottini R. Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. J Agr Food Chem. 2013; 61(38):8987-9003.
- Frankel. E; German, J.; Kinsella, J. Parks, E. and J. Kanner. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. The Lancet. 1993; 341(8843): 454-457.

- Frankel, E.; Waterhouse, A. and P. Teissedre. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 890-894.
- Frankel, E., Meyer, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000; 80: 1925-1941.
- Gil, M.I., Tomás – Barberán, F. A., Hess, Pierce, B., Holeroft, D.T. y Kader, A. A. Antioxidant activity of Pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 4581– 4589.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. Nueva York: Oxford University Press; 1998.
- Halliwell, B. Oxidizing the genes Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences. *Trends in Biochemical Sciences.* 1997; 22 (10): 409.
- Hidalgo Togados J. *Tratado de enología.* 2nd ed. Madrid: Mundi-Prensa; 2011.
- Iacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P.; Sebastiani, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos. Anal.* 2008; 21: 589–598.
- Jara Palacios M. *Aprovechamiento de los constituyentes biofuncionales de subproductos de vinificación de uvas en el condado de Huelva.* Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia; 2015.
- Jara-Palacios M, Hernanz D, Cifuentes-Gomez T, Escudero-Gilete M, Heredia F, Spencer J. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.* 2015; 183:78-82.
- Jara-Palacios M, Hernanz D, Escudero-Gilete M, Heredia F. The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules.* 2016; 21(11):1526.
- Kähkönen, Marja; Anu I. Copia and Marina Heinonen. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4076–4082.

- Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 4360–4367.
- Kammerer, D.; Gajdos Kljusuric, J.; Carle, R.; Schieber, A. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *Eur. Food Res. Technol.* 2005; 220: 431–437.
- Kammerer, D. R.; Schieber, A.; Carle, R. Characterization and recovery of phenolic compounds from grape pomace – a review. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2005; 79: 189–196.
- Leighton, F.; Urquiaga, I. y M. Diez. Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes. *Bulletin de L'OIV.* 1998; 807-808: 463-490.
- Llobera, A.; Cañellas, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chem.* 2007; 101: 659–666.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* 1999; 65: 1–8.
- Martín-Peláez S, Covas M, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2013; 57(5): 760-771.
- Nogales Bueno, J. Estudio del estado de madurez y la aptitud enológica en uva mediante análisis de imagen hiperespectral [tesis doctoral en Internet]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2017 [citada 7 sep 2017]. 174 p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11441/55531>
- Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 294-302.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3122-3128.

- Pellegrini, P., Serafini, M., Colombi, B., del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 2003; 133: 2812-2819.
- Pérez Jiménez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias; 2007.
- Pinelo, M., Arnous, A., y Meyer, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology.* 2006; 17(11): 579-590.
- Prior R, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods¹. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999; 27(11-12): 1173-1181.
- Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005; 53(10): 4290-4302.
- Protopopova, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, F., Dacombe, C., Rice-Evans, C. A. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Res.* 2002; 36: 217-233.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2000; 48(8): 3396-3402.
- Re, R., Pellegrini, n., Protopopova, A., Pannala, A., Yang, M., and RiceEvans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biol Med.* 1999; 26: 1231-1237.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Justo, M. L., Claro, C. M., Vila, E., Parrado, J., Herrera, M. D., et al. Endothelium dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *Food Chemistry.* 2012; 135: 1044–1051.

- Rybczynska M. Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dows.* 1994; 48(4): 419-41.
- Sánchez-Alonso, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F.; Borderías, A. J. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT–Food Sci. Technol.* 2008; 41: 42–50.
- Saura-Calixto, F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4303–4306.
- Scalbert A , Manach C, Williamson G, Morand C, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies [Internet]. *Ajcn.nutrition.org.* 2017 [cited 7 September 2017]. Available from: <http://ajcn.nutrition.org/content/81/1/230S.long>
- Silva, M. L.; Macedo, A. C.; Malcata, F. X. Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Sci. Technol. Int.* 2000; 6: 285–300.
- Singleton, V. L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-158.
- Soto-Vaca A, Gutierrez A, Losso J, Xu Z, Finley J. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2012; 60(27): 6658-6677.
- Stanner S, Hughes J, Buttriss J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutrition.* 2004; 7(3): 407-22.
- Statistics department of the International Organisation of Vine and Wine (OIV) under the supervision of Director General Jean-Marie Aurand. 2017 World Vitiviniculture situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. 2017 [en línea]. [Consultado en Septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.oiv.int/js/lib/pdfjs/web/viewer.html?file=/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. E. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2010; 2: 1106–1131.

- Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. and B.D. Oomah. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46:
- Villalobos Rodríguez E. *Fisiología de la producción de los cultivos tropicales*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2001.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., Dilabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 1173- 1183.
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. Biological activities of polyphenols from grapes. *International. Journal of Molecular Sciences.* 2010; 11: 622–646.
- Yu, J.; Ahmedna, M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013; 48: 221–237.