

Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción

Antioxidant grape seed (*Vitis vinifera* L.) extracts: efficiency of different solvents on the extraction process

Silvia C. Paladino ¹

Carlos A. Zuritz ²

Originales: Recepción: 29/10/2010 - Aceptación: 09/04/2011

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron comparar la eficiencia de diferentes solventes en la extracción de compuestos fenólicos a partir de las semillas de vid; evaluar la actividad antioxidante a través del poder reductor de los extractos obtenidos y analizar el proceso de extracción a diferentes temperaturas, utilizando el solvente más eficiente. Se emplearon semillas de vid cv. Cabernet Sauvignon provenientes de vinificaciones. Los solventes ensayados y las temperaturas de tratamiento fueron los siguientes: agua destilada a 90°C, alcohol metílico al 70% a 30°C, acetona al 75% a 30°C y alcohol etílico al 20% a 30°C. La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu. La actividad antioxidante se determinó midiendo el poder reductor, por el método de Oyaizu. El agua a 90°C fue el solvente más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos de las semillas de la vid (12,587 mg/g de materia seca). La acetona 75% a 30°C extrajo 7,268 mg de compuestos fenólicos / g de materia seca, el metanol al 70% a 30°C extrajo 0,963 mg de compuestos fenólicos / g de materia seca y el etanol al 20% a 30°C extrajo 0,799 mg de compuestos fenólicos / g de materia seca. Se estudió el

SUMMARY

The objectives of this work were to compare the extracting efficiency of phenolic compounds from grape seeds of different solvents; to evaluate the antioxidant activity by means of the reducing power of the extracts obtained and to analyze the extraction process at different temperatures with the most efficient solvent. Seeds from grapes variety Cabernet Sauvignon from red-wine vinification were employed. The solvents and temperatures used to evaluate extracting efficiency were: distilled water at 90°C, a 70% methyl alcohol solution at 30°C, a 75% acetone solution at 30°C and a 20% ethyl alcohol solution at 30°C. The concentration of phenolic compounds was determined using a modified Folin-Ciocalteu method. The reducing power was determined using the method of Oyaizu. Water at 90°C was the most efficient solvent for extraction of grape seed phenolic compounds (12.587 mg/g dry matter); 75% acetone solution at 30°C extracted 7.268 mg phenolic compounds/g dry matter; 70% methyl alcohol at 30°C extracted 0.963 mg phenolic compounds/g dry matter and 20% ethyl alcohol at 30°C extracted 0.799 g phenolic compounds/g dry matter. The extraction process was evaluated with

-
1. Cát. de Enología I. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUYO. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. spaladino@fca.uncu.edu.ar
 2. Investigador, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUYO.

proceso de extracción empleando agua a 60 y a 90°C. El agua a 90°C extrajo aproximadamente cinco veces más polifenoles que el agua a 60°C, después de cinco horas de tratamiento.

water at 60 and 90°C. Water at 90°C extracted almost five times more polyphenols than water at 60°C after five hours of treatment.

Palabras clave

polifenoles • extractos de semillas de vid • antioxidantes • poder reductor • proceso de extracción

Keywords

polyphenols • grape seed extracts • antioxidants • reducing power • extraction process

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres originados en los sistemas biológicos son capaces de oxidar las proteínas celulares, los ácidos nucleicos y los lípidos. Debido a ello, estos compuestos están asociados con el envejecimiento, la mutagénesis y la carcinogénesis (21).

La peroxidación de los lípidos provoca el deterioro organoléptico de los alimentos durante el procesamiento y almacenaje (23). Por esto, es necesario el agregado de antioxidantes para preservar el sabor y el color de los alimentos, así como para evitar la destrucción de las vitaminas. Pero el uso de antioxidantes sintéticos está siendo cuestionado debido a su toxicidad (13, 16, 21, 23). Existe un creciente interés por la búsqueda de antioxidantes naturales capaces de sustituir los antioxidantes sintéticos (3, 7, 23).

La industria vitivinícola en Argentina procesó 2.619.690 toneladas de uvas en 2010 (10). Las semillas de uva son productos de desecho de la industria del vino y del jugo de uva. Estas semillas representan el 4-5% en peso del racimo de uva; contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y 5 a 8% de polifenoles, dependiendo de la variedad de vid. Los polifenoles de las semillas de vid son no flavonoides (ácido gálico) y flavonoides (monómeros: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatequin 3-O-galato; polímeros: dímeros, trímeros, y procianidinas con mayor grado de polimerización) (20).

Los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid presentan una variedad de efectos biológicos: antioxidantes, captadores de radicales libres, antiinflamatorios, antihipertensivos, antimutagénicos, antineoplásicos, antivirales, antibacterianos, antiúlceras estomacal, antitumorales, cicatrizantes, antihiperoglucémicos, cardioprotectores, antihepatotóxicos, anticataratas oculares y actúan también como filtros solares. Estas propiedades han sido comprobadas *in vitro*, *in vivo*, en animales, en seres humanos y en alimentos (2, 4, 7, 9, 12, 14, 17, 18, 24, 26).

Si bien se han realizado numerosos estudios de las propiedades de los extractos de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.), en la mayoría de ellos se emplean extractos de producción comercial protegidos por patentes. Por lo tanto, no existe información

disponible respecto del proceso de obtención de los extractos polifenólicos a partir de las semillas de uva, en las condiciones locales. No se han efectuado comparaciones entre diferentes solventes en cuanto a su eficiencia como disolventes de fenoles de las semillas de uva. Tampoco se han llevado a cabo estudios cinéticos acerca del proceso de extracción. Estos estudios son útiles para la optimización del proceso de producción del extracto antioxidante de semillas de vid. La obtención de extracto antioxidante a partir de las semillas de la vid permite agregar valor a un subproducto de la industria vitivinícola. Por otra parte, se reduce de este modo el potencial de contaminación de las semillas descartadas luego de la vinificación, debido a su alta concentración fenólica.

Objetivos

- Comparar la eficiencia de diferentes solventes en la extracción de compuestos fenólicos a partir de las semillas de vid.
- Evaluar la actividad antioxidante a través del poder reductor de los extractos obtenidos.
- Analizar el proceso de extracción a diferentes temperaturas, empleando el solvente más eficiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto

Se emplearon semillas de vid cv. Cabernet Sauvignon provenientes de vinificaciones realizadas en la Bodega Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Chacras de Coria, Mendoza, Argentina. Las semillas fueron obtenidas al momento de realizar el descube de los vinos tintos, por lo tanto, habían sido sometidas a los procesos de maceración y fermentación alcohólica, en forma previa a su utilización. Se obtuvieron semillas de aproximadamente 20 vasijas, alrededor de 20 kg por vasija. Las semillas obtenidas se mezclaron completamente y se secaron en estufa a 40°C, hasta constancia de peso. Posteriormente fueron almacenadas en la oscuridad, en envases de vidrio cerrados y a temperatura ambiente. A partir de esta población, se extrajeron al azar las diferentes muestras, sobre las que se realizó la extracción.

Cada ensayo se efectuó por cuadruplicado. Los solventes ensayados y las temperaturas de tratamiento fueron los siguientes: agua destilada a 90°C, alcohol metílico al 70% a 30°C, acetona al 75% a 30°C y alcohol etílico al 20% a 30°C. Los solventes fueron agregados a la temperatura de tratamiento seleccionada. En cada experimento, se colocó 1 g de semilla y 10 mL de solvente en tubo de ensayo de 15 mL de capacidad, con tapa a rosca. El tiempo de tratamiento fue de cuatro horas. La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu modificado (22). En un matraz de 25 mL de capacidad se colocaron 250 µL de extracto, 1250 µL de reactivo de Folin Ciocalteu, 5000 µL de CO_3Na_2 al 20%, y se enrasó con agua destilada hasta 25 mL. Luego de 30 minutos, se midió la absorbancia a 765 nm, en cubeta de 1 cm de paso óptico, como blanco se uso agua. El ácido gálico se usó para construir la curva de calibración (28).

Para evaluar la actividad antioxidante del extracto obtenido, se midió el poder reductor, ya que este parámetro es un indicador de la capacidad antioxidante del extracto (1, 26). El poder reductor fue determinado por el método de Oyaizu, empleando ferricianuro de potasio, que por acción del agente reductor se transforma en ferrocianuro de potasio. Este compuesto reacciona con cloruro férrico, originándose ferrocianuro férrico, de color azul. La intensidad del color azul se leyó como Abs. a 700 nm (25).

Los datos fueron procesados estadísticamente con el programa Statgraphics plus® 4.0. Cuando los datos siguieron una distribución normal y existió homogeneidad de varianzas, se aplicó el análisis de la varianza; cuando los datos no cumplieron con estas condiciones, se aplicó estadística no paramétrica utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

Análisis del proceso de extracción

Se realizaron dos ensayos de extracción de compuestos fenólicos, empleando agua destilada como solvente. Las temperaturas de tratamiento fueron 60 y 90°C. Ambos ensayos se llevaron a cabo por cuadruplicado, con extracción de muestras cada veinte minutos, durante cinco horas. Se colocó 1 g de semilla y 10 mL de solvente en tubo de ensayo de 15 mL de capacidad, con tapa a rosca. Se prepararon 120 tubos para realizar el muestreo mencionado. La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu modificado, empleando ácido gálico como estándar (22). También se determinó el poder reductor en los mismos extractos, por medio del método de Oyaizu (25).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del extracto

Influencia de los solventes sobre la concentración de compuestos fenólicos de los extractos.

El solvente más efectivo fue el agua a 90°C, que extrajo 12,587 mg de fenoles totales por gramo de materia seca, seguido por acetona 75% a 30°C, que extrajo 7,268 mg de fenoles totales por g de materia seca (tabla 1).

Tabla 1. Concentración de fenoles totales extraídos de semillas de vid por acción de distintos solventes (mg de ácido gálico por g de materia seca).

Table 1. Concentration of total phenols extracted from grape seeds by different solvents (mg of gallic acid by g of dry matter).

Tratamientos ⁽¹⁾	Fenoles totales mg/g de materia seca ⁽²⁾
Agua a 90°C	12,587 a ⁽³⁾ ± 0,880
Metanol 70% a 30°C	0,963 c ± 0,109
Acetona 75% a 30°C	7,268 b ± 0,860
Etanol 20% a 30°C	0,799 c ± 0,127

(1) Tiempo de tratamiento 4 horas. Treatment time 4 hours.

(2) Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica. Each value represents the means of 4 repetitions ± standard deviation.

(3) Letras distintas indican diferencias entre las medianas en la prueba de Kruskal-Wallis $p < 0,05$. Different letters indicate differences between medians in the Kruskal-Wallis test $p < 0.05$.

Dado que los datos no presentaban una distribución normal, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), que compara medianas, en lugar del análisis de la varianza, que compara las medias. Esta prueba indicó que existían diferencias significativas entre las extracciones realizadas con agua a 90°C y acetona 75% a 30°C. Las extracciones realizadas con metanol al 70% y etanol al 20%, ambas a 30°C, no presentaron diferencias significativas entre sí, pero fueron significativamente diferentes de los tratamientos que emplearon como solventes agua y acetona. El tratamiento que logró mayor extracción de fenoles totales fue el agua a 90°C, con una concentración de 12,587 mg equivalentes de ácido gálico cada 1 g de materia seca.

Influencia de los solventes sobre el poder reductor de los extractos

Con respecto al poder reductor, se verificó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con agua a 90°C y con acetona 75% a 30°C, pero existen diferencias significativas entre estos tratamientos y las extracciones realizadas con metanol al 70% y etanol al 20%, ambas a 30°C. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, por medio de la prueba de Kruskal- Wallis ($p < 0,05$). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Poder reductor de los extractos de semillas de vid obtenidos con distintos solventes.
Table 2. Reducing power of grape seed extracts obtained with different solvents.

Tratamientos ⁽¹⁾	Poder reductor (Abs. 700 nm) ⁽²⁾
Agua a 90°C	1,290 a ⁽³⁾ ± 0,015
Metanol 70% a 30°C	0,818 b ± 0,053
Acetona 75% a 30°C	1,399 a ± 0,019
Etanol 20% a 30°C	0,584 c ± 0,034

⁽¹⁾ Tiempo de tratamiento 4 horas. Treatment time 4 hours.

⁽²⁾ Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación típica. Each value represents the means of 4 repetitions ± standard deviation.

⁽³⁾ Letras distintas indican diferencias entre las medianas en la prueba de Kruskal-Wallis $p < 0,05$. Different letters indicate differences between medians in the Kruskal-Wallis test $p < 0.05$.

El método analítico empleado determina polifenoles totales, pero no es capaz de discriminar distintas sustancias dentro de este gran grupo de compuestos. Para una misma concentración de fenoles totales podrían existir distintas concentraciones de ácidos cinámicos y benzoicos, antocianos, catequinas, taninos y flavanoides. Cada uno de estos grupos fenólicos se comporta de forma diferente respecto de su poder reductor. Por ejemplo, Frankel *et al.* (5), en 1993, encontraron que la actividad antioxidante se correlacionaba con el contenido de polifenoles totales en el vino ($r = 0,94$); en cuanto a los fenoles individuales, cada uno de ellos mostraba una asociación muy diferente con el fenómeno antioxidante, con valores desde $r = 0,92$ para ácido gálico hasta $r = 0,38$ malvidina 3 glucósido.

Por otra parte, Landrault *et al.* (11), en 2001, establecieron una relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales en vinos, con un coeficiente de correlación $r = 0,959$ y con coeficientes de correlación para los compuestos fenólicos individuales entre 0,83 para el ácido gálico y 0,30 para los antocianos.

También Fuhrman *et al.* (6) sostienen que los distintos polifenoles poseen diferentes capacidades antioxidantes, las cuales están relacionadas con sus estructuras químicas.

Por lo tanto, para una misma concentración de fenoles totales pueden obtenerse diferentes valores de poder reductor en un extracto, dependiendo de cuáles grupos fenólicos se han extraído. Esta situación puede observarse cuando se comparan los extractos obtenidos empleando como solventes agua y acetona. El agua extrae mayor cantidad de polifenoles totales que la acetona, pero el poder reductor del extracto logrado con acetona es levemente mayor que el poder reductor del extracto acuoso.

Analizando los resultados experimentales, se advierte que los métodos de extracción de fenoles de las semillas afectan significativamente tanto la concentración fenólica como el poder antioxidante o reductor del extracto. Esto coincide con lo observado por otros autores en diferentes materiales vegetales. Kähkönen *et al.* (8) utilizaron diferentes solventes para obtener extractos de manzanas y bayas; demostraron que empleando agua caliente es posible preparar extractos muy activos, con altos contenidos fenólicos. Esto evita el empleo de solventes orgánicos, los cuales pueden ser problemáticos en las industrias de los alimentos y de los medicamentos.

Los datos de extracción obtenidos en este ensayo también son coincidentes con los de otros investigadores, en cuanto al escaso efecto del alcohol etílico sobre la extracción de los compuestos fenólicos de las semillas, así como también al efecto de las mayores temperaturas en la mayor intensidad de extracción (15). También Yilmaz y Toledo (27), experimentando con polvo de semillas de *Vitis rotundifolia*, Muscadinea, encontraron que la extracción de fenoles con una mezcla acuosa de 50 ó 75% de acetona fue superior a la extracción realizada con mezclas acuosas de etanol al 60% o metanol al 70%.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los de otros autores (1, 21, 25, 27) quienes establecieron que el poder reductor de diferentes extractos vegetales aumenta a medida que crece la concentración de compuestos fenólicos. Algunos de los autores mencionados (21, 25) establecieron que el poder reductor de los compuestos bioactivos está estrictamente relacionado con la actividad antioxidante.

Análisis del proceso de extracción

Considerando los fenoles extraídos empleando agua a 90°C, se realizó un estudio del proceso de extracción a 60°C y a 90°C, con el objetivo de reducir la temperatura o el tiempo de proceso.

Se comprobó que la temperatura tiene un efecto considerable sobre la capacidad de extracción del agua durante el proceso de obtención del extracto. La extracción a 90°C resultó siempre más eficiente, incluso cuando se consideraron los tiempos mínimos. Por ejemplo, considerando la extracción lograda en los primeros 20 minutos de tratamiento: a 90°C, se extrajeron 5,315 mg de fenoles totales/g de materia seca, mientras que a temperatura de 60°C se obtuvieron 0,589 mg de fenoles totales/g de materia seca.

Transcurridos 300 minutos de tratamiento, las cantidades de fenoles totales fueron: 13,012 mg/g de materia seca para el tratamiento a 90°C y 2,615 mg/g de materia seca para el tratamiento a 60°C, lo que representó sólo un 20,09% de la concentración lograda con el tratamiento a 90°C. La evolución del proceso de extracción se muestra en la figura 1.

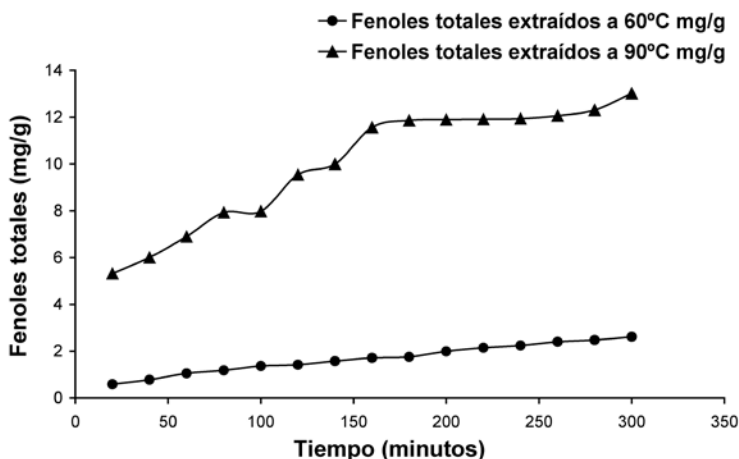


Figura 1. Proceso de extracción de fenoles totales de semillas de vid con agua a 60 y a 90°C. Las concentraciones de fenoles totales se expresan en mg de ácido gálico/g de materia seca.

Figure 1. Extraction process of total phenols from grape seeds with water at 60 and 90°C. Total phenols concentration are expressed as mg gallic acid/g dry matter.

Los resultados indican que una mayor temperatura favorece una mayor extracción fenólica. Otros autores obtuvieron resultados análogos. Oszmianski *et al.* (15) trabajaron con maceraciones de semillas de vid en soluciones acuosas ácidas a 20 y 35°C: la extracción fenólica fue más intensa a 35°C que a 20°C.

Analizando el proceso de extracción a 90°C, se observó que después de las 3 horas (180 minutos), los incrementos producidos en la concentración de fenoles extraídos ya no fueron significativos, como para justificar un mayor tiempo de tratamiento y el consiguiente gasto de energía.

Si bien la extracción total fue de 13,012 mg de fenoles totales/g de materia seca a los 300 minutos, a los 180 minutos ya se habían extraído 11,860 mg/g de materia seca, que representan el 91% de la extracción total. En dos horas más de tratamiento sólo se obtiene un incremento de 9% de fenoles totales.

Los datos obtenidos durante el proceso de extracción fueron sometidos a un ajuste cuadrático.

Para el tratamiento a 90°C se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 3,8257 + 0,0597 X - 0,0001 X^2 \quad [1]$$

$$R^2 = 0,9739$$

donde:

Y = mg de fenoles totales/g de materia seca

X = tiempo de extracción en minutos

Para el tratamiento a 60°C, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 0,4774 + 0,0086 X - 0,000006 X^2 \quad [2]$$

$$R^2 = 0,9942$$

Aplicando derivada respecto del tiempo a las ecuaciones [1] y [2] se obtuvo la velocidad de extracción para cada temperatura. Estas velocidades se grafican en la figura 2.

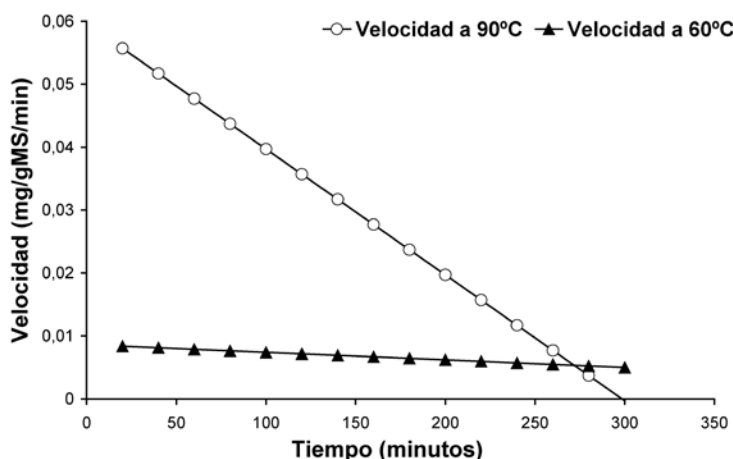


Figura 2. Velocidad de extracción de compuestos fenólicos de semillas de vid en agua a 90 y a 60°C. La velocidad se expresa en mg de equivalentes ácido gálico/g de materia seca por minuto.

Figure 2. Rate of extraction of phenolic compounds from grape seeds with water at 90 and 60°C. The rate is expressed as mg eq. gallic acid/g dry matter by minute.

La velocidad de extracción de fenoles totales fue notablemente mayor en el tratamiento de extracción a 90°C que en el tratamiento a 60°C. A los 20 minutos de tratamiento, la extracción obtenida a 90°C fue 6,7 veces mayor que la lograda a 60°C. En la extracción a 60°C, la velocidad fue mínima y permaneció prácticamente constante, mientras que en la extracción a 90°C, a los 180 minutos de tratamiento, la velocidad de extracción se redujo a un 42,6 % de la velocidad inicial.

En forma paralela al estudio de la variación de la composición fenólica en el tiempo, se analizó la variación del poder reductor de los extractos a medida que aumenta el tiempo de extracción.

Analizando el poder reductor de los extractos obtenidos a 60 y a 90°C, se observaron dos comportamientos diferentes:

- en la extracción a 60°C, el máximo poder reductor se obtuvo a los 120 minutos de tratamiento; a partir de este punto el poder reductor disminuyó, si bien la concentración fenólica siguió aumentando.
- en la extracción a 90°C, el poder reductor aumentó en forma continua a medida que aumentó la concentración fenólica (tabla 3).

Tabla 3. Poder reductor de compuestos fenólicos de semillas de vid durante la extracción con agua a 60 y 90°C.

Table 3. Reducing power of phenolic compounds from grape seeds during extraction with water at 60 and 90°C.

Tiempo (minutos)	Poder reductor para extracción a 60°C (Abs. 700 nm) ⁽¹⁾	Poder reductor para extracción a 90°C (Abs. 700 nm) ⁽¹⁾
20	0,630 ± 0,053	0,809 ± 0,044
40	0,738 ± 0,114	0,907 ± 0,027
60	0,811 ± 0,016	1,033 ± 0,076
80	0,823 ± 0,028	1,178 ± 0,072
100	0,847 ± 0,015	1,185 ± 0,070
120	0,900 ± 0,041	1,407 ± 0,064
140	0,894 ± 0,047	1,471 ± 0,025
160	0,823 ± 0,082	1,693 ± 0,058
180	0,822 ± 0,046	1,735 ± 0,092
200	0,610 ± 0,038	1,741 ± 0,081
220	0,474 ± 0,014	1,742 ± 0,061
240	0,463 ± 0,033	1,746 ± 0,037
260	0,446 ± 0,024	1,763 ± 0,095
280	0,430 ± 0,037	1,798 ± 0,112
300	0,423 ± 0,031	1,898 ± 0,137

(1) Cada valor representa la media de 4 repeticiones ± la desviación estándar.
Each value represents the average of 4 repetitions ± standard deviation.

Este comportamiento diferente en el poder reductor de los extractos obtenidos a 60 y 90°C puede ser explicado por la actividad enzimática de la polifenoloxidasas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se infiere que en el tratamiento a 90°C el aumento de temperatura favoreció la extracción porque incrementó la solubilidad del soluto y también el coeficiente de difusión (16). Por otra parte, las polifenoloxidasas fueron inactivadas por la temperatura, de modo que los compuestos fenólicos no fueron degradados enzimáticamente.

En consecuencia, se obtuvo mayor concentración de compuestos fenólicos y mayor poder reductor que en la extracción a 60°C.

En el tratamiento a 60°C, la extracción de fenoles totales fue menor. El poder reductor de este extracto fue máximo a los 120 minutos y luego disminuyó.

El rango de temperatura óptimo para la actividad cresolasa de la polifenoloxidas EC 1.14.18.1 (obtenida de *Vitis vinifera* cultivar Monastrell) es de 40-60°C. La actividad cresolasa de esta enzima produce la hidroxilación de monofenoles ubicados en posición orto, generando orto-di-fenoles (19).

Por lo tanto, puede considerarse que la temperatura de 60°C permite una intensa actividad enzimática cresolasa de la polifenoloxidas. Los monofenoles fueron transformados a orto-di-fenoles; fueron oxidados y, por ende, perdieron su poder antioxidante, de modo que el tratamiento a 60°C no sólo extrajo menor cantidad de fenoles que la extracción a 90°C, sino que además estos fenoles fueron degradados enzimáticamente durante la misma extracción, determinándose un poder antioxidante menor que en la extracción a 90°C.

Los datos obtenidos en la extracción a 90°C, fenoles totales y poder reductor (figura 1, pág. 193 y tabla 3, pág. 195) fueron sometidos a un análisis estadístico de regresión lineal simple, con el objeto de obtener la ecuación que vincula las dos variables. Esta función se grafica en la figura 3.

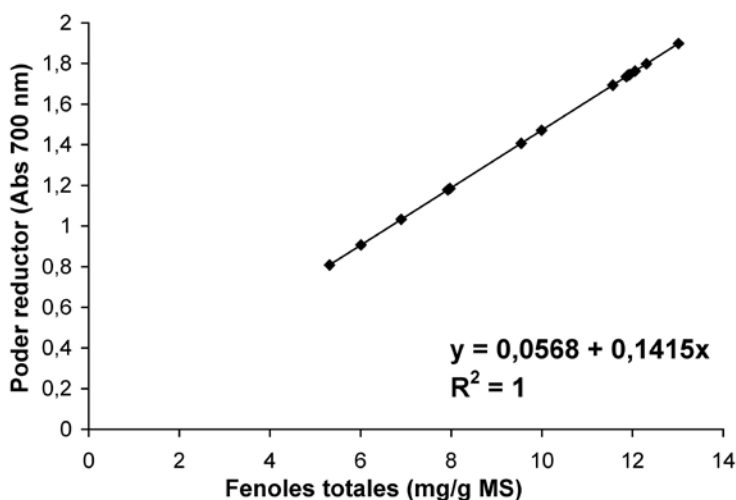


Figura 3. Regresión lineal entre concentración fenólica y poder reductor en extracto de semillas de vid extractado con agua a 90°C.

Figure 3. Linear regression between total phenol concentration and reducing power in grape seed extract obtained with water a 90°C.

La variable fenoles totales permitió explicar en un 100% la variable poder reductor del extracto. A medida que aumentó la concentración fenólica, aumentó el poder reductor del extracto. Esta relación está dada por la ecuación:

$$\text{Poder reductor} = 0,0568 + 0,1415 * \text{Fenoles totales (mg/g MS)}$$

CONCLUSIONES

Entre los solventes ensayados, el agua a 90°C fue el solvente con mayor capacidad de extracción de compuestos fenólicos de las semillas de vid; extrajo 12,588 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca después de 4 horas de tratamiento, seguido por la solución de acetona al 75% a 30°C, con 7,628 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca después de 4 horas de tratamiento.

Si bien el agua a 90°C extrajo 1,73 veces más compuestos fenólicos que la solución de acetona al 75% a 30°C, no existieron diferencias significativas en el poder reductor de ambos extractos.

El agua a 90°C extrajo aproximadamente 5 veces más compuestos fenólicos que el agua a 60°C después de 5 horas (300 minutos) de tratamiento (13,012 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca *versus* 2,615 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca, respectivamente).

Después de 180 minutos de tratamiento con agua a 90°C, la concentración de compuestos fenólicos alcanzó el 91% del total de compuestos fenólicos extraídos.

En el tratamiento con agua a 60°C, el poder reductor alcanzó un valor máximo de 0,9 unidades de absorbancia a 700 nm a los 120 minutos de extracción; a partir de ese momento decreció continuamente hasta el fin del proceso de extracción. En forma opuesta, en el tratamiento con agua a 90°C, el poder reductor aumentó continuamente durante todo el tiempo de extracción, a medida que aumentó la concentración de compuestos fenólicos.

Es posible reducir el tiempo de tratamiento de 5 horas a 3 horas, pero no es conveniente reducir la temperatura de tratamiento.

En extractos de compuestos fenólicos de semillas de vid obtenidos con agua a 90°C existe una correlación entre los fenoles totales y el poder reductor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alma, M. H.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Digrak, M.; Hirata, T. 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.* 26(12): 1725-1729.
2. Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.; Das, D.; Ray, S.; Kuszynski, C.; Joshi, S.; Pruess, H. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148:187-197.
3. Bucic-Kojic, A.; Mirela Planinic; Srecko Tomas; Mate Bilis, Darko Velic. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81: 236-242.

4. Castillo, J.; Benavente-García, O.; Lorente, J.; Alcaraz, M.; Redondo, A.; Ortuño, A.; Del Río, J. A. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced *in vivo* by X-rays of Flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1738-1745.
5. Frankel, E.; German, J.; Kinsella, J.; Parks, E.; Kanner, J. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*. Vol. 341, N° 8843, 454-457.
6. Fuhrman, B.; Volkova, N.; Suraski, A.; Aviram, M. 2001. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 3164-3168.
7. Jayaprakasha, G. K.; Singh, R. P.; Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
8. Kähkönen, Marja; Anu I. Copia and Marina Heinonen. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, 4076-4082.
9. Khanna, S.; Venojarvi, M.; Roy, S.; Sharma, N.; Trikha, P.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C. 2002. Dermal wound properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(8): 1089-1096.
10. Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). 2010. Estadísticas. <http://www.inv.gov.ar/principal>. Fecha de consulta: 26 de octubre de 2010.
11. Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49: 3341-3348.
12. Llopiz, N.; Puiggrós, F.; Céspedes, E.; Arola, L.; Ardévol, A.; Bladé, C.; Salvadó, M. J. 2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidins extract in FAO cells submitted to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.*, 52(5): 1083-1087.
13. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Manuel Domínguez, J.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J.; Carlos Pajaró, J. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
14. Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J. 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3408-3412.
15. Oszmianski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J.; Macheix, J. 1986. Grape seed fenolics: extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 37, N° 1, 7-12.
16. Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Seneiro, J.; Núñez, M. J. 2005. Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of the extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2111-2117.
17. Pinent, M.; Bladé, M.; Salvadó, M.; Arola, L.; Ardévol, A. 2005. Metabolic fate of glucose on 3T3-L1 adipocytes treated with grape seed derived procyanidin extract (GSPE). Comparison with the effects of insulin. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5932-5935.
18. Saito, M.; Hosoyama, H.; Ariga, T.; Kataoka, S.; Yamaji, N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1460-1464.
19. Sánchez Ferrer, A.; Bru, R.; Cabanes, J.; García Carmona, F. 1988. Characterization of catecholasa and cresolasa activities of Monastrell grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*. Vol. 27, 319-321.
20. Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J. E.; Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds: biochemistry and functionality. *J. Medicinal Food*, 6(4): 291-299.

21. Siddhuraju, Perumal; Klaus Becker. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2144-2155.
22. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolibdic - phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol.16, 144-158.
23. So-Young Kim; Seok-Moon Jeong; Woo-Po Park, Nam, K. C.; Ahn, D. U.; Seug- Cheol Lee. 2006. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 97: 472-479.
24. Yamaguchi, F.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; Ariga, T. 1999. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO System. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2544-2548.
25. Yen, G. H.; Chen, H. Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 27-32.
26. Yildirim, A.; Mavi, A.; Kara, A. A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49: 4083-4089.
27. Yilmaz, Y.; Toledo, R. 2004. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in food science & technology*, 15: 422-433.
28. Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Nury, F. 1994. *Wine analysis and production*. Chapter 20: Laboratory procedures. 455-458. New York. Editorial Chapman &Hall.