



INFORME TECNICO FINAL

Nombre del proyecto	Aumento del valor agregado de orujos de uva país a través de la producción de cápsulas nutraceuticas con efecto regulador de la glicemia, en modelo de producción asociativo
Código del proyecto	PYT 2018-0329
Informe final	
Período informado (considerar todo el período de ejecución)	19 Marzo 2018- 30 junio 2020
Fecha de entrega	10 de Julio 2020

Nombre coordinador	Viana Beratto Villagra
Firma	

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
 - Debe dar cuenta de todas las actividades realizadas en el marco del proyecto, considerando todo el período de ejecución, incluyendo los resultados finales logrados del proyecto; la metodología utilizada y las modificaciones que se le introdujeron; y el uso y situación presente de los recursos utilizados, especialmente de aquellos provistos por FIA.
 - Debe estar basada en la última versión del Plan Operativo aprobada por FIA.
 - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
 - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
 - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero final y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
 - Deben incluir toda la información que complementa y/o respalda la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
 - Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
 - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.
- Sobre la presentación a FIA del informe:
 - Se deben entregar tres copias iguales, dos en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
 - La fecha de presentación debe ser la establecida en el Plan Operativo del proyecto, en la sección detalle administrativo. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
 - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.

- El FIA se reserva el derecho de publicar una versión del Informe Final editada especialmente para estos efectos.

CONTENIDO

1.	ANTECEDENTES GENERALES	5
2.	EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO.....	5
3.	RESUMEN EJECUTIVO	6
4.	OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO	7
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)	7
6.	RESULTADOS ESPERADOS (RE)	9
7.	CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO	16
8.	ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO	17
9.	POTENCIAL IMPACTO.....	18
10.	CAMBIOS EN EL ENTORNO	18
11.	DIFUSIÓN	19
12.	PRODUCTORES PARTICIPANTES.....	19
13.	CONSIDERACIONES GENERALES	21
14.	CONCLUSIONES.....	23
15.	RECOMENDACIONES	23
16.	ANEXOS	24
17.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	24

1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Bioingemar Ltda.
Nombre(s) Asociado(s):	
Coordinador del Proyecto:	Viana Beratto Villagra
Regiones de ejecución:	VIII Región del Bío Bío
Fecha de inicio iniciativa:	19 Marzo 2018
Fecha término Iniciativa:	30 junio 2020

2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

Costo total del proyecto	
Aporte total FIA	
Aporte Contraparte	Pecuniario
	No Pecuniario
	Total

Acumulados a la Fecha	
Aportes FIA del proyecto	
1. Total de aportes FIA entregados	
2. Total de aportes FIA gastados	
3. Saldo real disponible (Nº1 – Nº2) de aportes FIA	
Aportes Contraparte del proyecto	
1. Aportes Contraparte programado	Pecuniario
	No Pecuniario
2. Total de aportes Contraparte gastados	Pecuniario
	No Pecuniario
3. Saldo real disponible (Nº1 – Nº2) de aportes Contraparte	Pecuniario
	No Pecuniario

3. RESUMEN EJECUTIVO

3.1 Resumen del período no informado

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante el período comprendido entre el último informe técnico de avance y el informe final. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

Se realizó la extracción de los polifenoles desde los orujos en sistema de extracción de 50 lts, es decir se paso de escala de laboratorio con un sistema de extracción de 5lts a escala piloto con un sistema de 50 lts, se trabajo en las variables de extracción para lograr los rendimiento obtenidos en laboratorio lo cual se logro.

Posteriormente estos extractos fueron separados en HPLC con columna preparativa hasta obtener las fracciones de moleculas polifenolicas separadas, antocianos, acidos organicos. Se trabajo en la validación del efecto del extracto polifenolico a nivel celular y en la glicemia de individuos sanos y borderline.

Se desarrollo imagen de presentación del producto, se envaso en capsulas y se determino dosis recomendada.

3.2 Resumen del proyecto

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante todo el período de ejecución del proyecto. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

Se estudio la etapa de conservación de la materia prima (orujos de uva País) a traves de distintos métodos fisicos que no provocaran alteración de la capacidad antioxidante de los polifenoles, como segunda etapa se procedio a desarrollar metodos de extracción de los polifenoles , el producto obtenido (polifenoles) por los distintos métodos se testearon a nivel celular mediante ensayos invitro, encontrandose que algunas de las técnicas de extracción generaban moleculas oxidantes que dañabana las celulas lo que se evidencio por una respuesta inflamatoria.

Una vez seleccionada la mejor condición de extracción se procedio a purificar el concentrado polifenolico mediante columnas cromatograficas y/o sistema de filtración por membranas para separar los polifenoles de los polisacaridos, esto nos permitio obtener un extracto polifenolico libre de azucares que se pudo someter a proceso de secado.

Con el concentrado polifenolico en polvo se dio inicio a la etapa de separación de las distintas moleculas polifenolicas presentes en el extracto, esto se realizo mediante cromatografia HPLC Preparativa, obteniendose 41 fracciones.

Posteriormente se identificaron y cuantificaron las principales moleculas con acción antioxidante e hipoglicemiantes , donde el Resveratrol es la molecula más importante ya que existen multiples estudios que la respaldan y lo más importante es que se ha evidenciado una sinergia con el resto de los polifenoles que tambien se pudo comprobar en nuestros experimentos in vitro, ya que la molecula pura de resveratrol afecta la viabilidad celular a diferencia del concentrado polifenolico aumenta la viabilidad celular, esto es de gran importancia ya que el resveratrol en asociación con otros polifenoles lo encontramos en las uvas.

Con el producto final se realizaron experimentos de ingesta en ratones en la Universidad de Concepción, los resultados preliminares mostraron que los ratones sufrían una disminución de ingesta de alimento con respecto al control, estos experimentos se debieron suspender por las

condiciones de Pandemia.
 También establecimos una colaboración con el Dr. Ricardo Araneda Director PSYS Concentration Area, BISI Graduate Program Bioscience Research University of Maryland quien inicio experimentos para estudiar la regeneración neuronal, dichos experimentos se debieron interrumpir por la Pandemia.
 De acuerdo a los resultados obtenidos in vitro que respaldan las propiedades de nuestro producto y lo validan con la información científica disponible, se decidió finalizar la investigación para avanzar en la comercialización y cuando se retomaron las actividades académicas en las respectivas universidades podremos adjudicarle nuevas propiedades al producto.
 Dada la alta concentración de las moléculas claves en nuestro producto es posible realizar un proceso de menor complejidad y ahorrar costos de producción para obtener capsulas con acción antioxidante e hipoglicémica. Esta última condición es imposible incluirla en la presentación del producto ya que requiere ensayos clínicos validados en humanos, y un largo proceso de tramitación.
 En todo caso no era el objetivo del proyecto ya que lo que necesitábamos hacer era demostrar que el producto final contaba con las moléculas cuya acción está validada en la salud metabólica, y demostrar que el proceso y manejo no las dañaba.

4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Obtención de cápsulas nutraceuticas de polifenoles de frutos con efecto saludable en el metabolismo de los azúcares

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

5.1 Porcentaje de Avance

Grado de avance de los resultados asociados a éstos. El cumplimiento de un 100% de un objetivo específico se logra cuando el 100% de los resultados asociados son alcanzados.

Nº OE	Descripción del OE	% de avance al término del proyecto ¹
1	Obtención de polifenoles en polvo desde orujos de Uva País.	100
2	Identificación y cuantificación de las moléculas presentes en los polifenoles en polvo y obtención de moléculas puras y rangos de peso molecular acotados.	100
3	Ensayos in vitro para determinar la capacidad de las fracciones purificadas en la inhibición de la captación de glucosa	100
4	Obtención de un proceso optimo de producción de concentrados polifenolicos	100

¹ Para obtener el porcentaje de avance de cada Objetivo específico (OE) se promedian los porcentajes de avances de los resultados esperados ligados a cada objetivo específico para obtener el porcentaje de avance de éste último.

5	Formulación óptima de capsulas de concentrados poli fenólicos provenientes de orujos de uva país para tener un efecto saludable en el nivel de glicemia plasmática	100
6	Implementación de modelo productivo asociativo con agricultores proveedores de orujos	50

6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

Para cada resultado esperado debe completar la descripción del cumplimiento y la documentación de respaldo.

6.1 Cuantificación del avance de los RE al término del proyecto

El porcentaje de cumplimiento es el porcentaje de avance del resultado en relación con la línea base y la meta planteada. Se determina en función de los valores obtenidos en las mediciones realizadas para cada indicador de resultado.

El porcentaje de avance de un resultado no se define según el grado de avance que han tenido las actividades asociadas éste. Acorde a esta lógica, se puede realizar por completo una actividad sin lograr el resultado esperado que fue especificado en el Plan Operativo. En otros casos se puede estar en la mitad de la actividad y ya haber logrado el 100% del resultado esperado.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
1	1	Recolección de orujos	Kilos de orujo en envases de 1 kg con su respectiva ficha técnica congeladas		117 bolsas de 3 kilos	352 kg de cada orujo envasado etiquetado y congelado correspondiente a la temporada 2019	30 abril 2019	30 abril 2019	100 %
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									

Anexo 1

La vendimia del 2019 nos permitio comprar orujos a la Asociación de Viñateros de Yumbel, con la cual se trabajo durante 2019 y 2020.

La mitad de los orujos se sometio a maceración en etanol al 70% para iniciar la extracción de polifenoles y los 175 kilos restantes se congelaron ya que no existe capacidad para procesar todo en un solo proceso.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	
1	2	Validación de procesos extractivos	Puesta a punto de las técnicas extractivas de polifenoles	%polifenoles puros	0	47%	30 septiembre 2018	30 Enero 2019	100%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									
Se logro obtener un proceso que nos permitio obtener un rendimiento de polifenoles puros del 47%.									
Documentación de respaldo									
Anexo N°2									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	
1	3	Polifenoles en polvo de cada proceso extractivo	Gramos de polifenoles en polvo de distintos procesos extractivos de orujos de uva país	rendimiento	0	500 gr de polifenoles de cada proceso extractivo	30 de Diciembre 2018	30 Marzo 2019	70%
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									
La cantidad que se obtuvo de cada proceso extractivo fue de alrededor de 100 gramos ya que se priorizo la separación y caracterización de las moléculas presente y el tiempo de extracción se dedico al proceso analítico.									
Documentación de respaldo									
Anexo N°2									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
2	4	Fracciones de polifenoles monomericos	Flavonoides, antocianinas y flavanoles separados		0	100 gr de cada fracción en polvo	30 diciembre 2018	30 Julio 2019	100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

El trabajo de obtención de las distintas moléculas presentes en el concentrado polifenolico nos permitio obtener 20 fracciones aisladas, las que fueron concentradas y analizadas primero espectrofotométricamente en HPLC y posteriormente por cromatografía analítica con el uso de estándares. La cantidad que se obtuvo de cada fracción fue de 30 gramos los que se destinaron a los fines analíticos.

Documentación de respaldo
Anexo N°2

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
2	5	Fracciones de polifenoles poliméricos	Fracciones de polifenoles poliméricos separados		0	100 gr de cada fracción en polvo	30 diciembre 2018		100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

El trabajo de obtención de las distintas moléculas presentes en el concentrado polifenolico nos permitio obtener 20 fracciones aisladas, las que fueron concentradas y analizadas primero espectrofotométricamente en HPLC y posteriormente por cromatografía analítica con el uso de estándares. La cantidad que se obtuvo de cada fracción fue alrededor de 30 gramos los que se destinaron a los fines analíticos.

Documentación de respaldo
Anexo N°2

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada			
2	6	Muestras derivatizadas	Muestras solubles para análisis		0	100% de muestras en condiciones de análisis	30 diciembre 2018	30 Diciembre 2018	100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se uso un tipo de columna preparativa que no requiere derivatizar las muestras, por lo tanto se inyectan solubilizadas en etanol

Documentación de respaldo
Anexo N°2

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)						Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada			
2	7	Fracciones de polifenoles con rangos de masas moleculares definidos	Caracterización química de las distintas fracciones		0	Fracciones monoméricas y poliméricas caracterizadas	30 Marzo 2019	30 Septiembre 2019	100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se realizo la caracterización espectrofotométrica lo que nos permitio identificar 32 moléculas distintas , se pudieron separar las que estaban en mayor concentración y se cuantificaron mediante el uso de estándares con HPLC.

Documentación de respaldo
Anexo N°2

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
3	8	Identificación de la fracción o molécula específica con mayor capacidad inhibitoria de captación de glucosa	Caracterización química de las distintas fracciones		0	Gramos de producto con optimo resultado en ensayo in vitro	30 Junio 2019	100	
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									
De las fracciones moleculares separadas la que mostro mayor efectividad fue la fracción que contenia resveratrol, y ensayos posteriores validaron el extracto polifenolico total como el que contenia mayor capacidad inhibitoria de la captación de glucosa.									
Documentación de respaldo									
Anexo N°2									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta programada		
4	9	Proceso productivo optimo	rendimiento		1%	47%	30 Julio 2019	30 Septiembre 2019	100
Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.									
El rendimiento del proceso extrativo d epolifenoles mediante el uso de enzimas supero todas las expectativas ya que llego a un 47%.									
Documentación de respaldo									
Anexo N°2									

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
5	10	Composición porcentual de extracto polifenólico en la capsula	formula		0	Ficha técnica de la formula	30 Agosto 2019	30 Mayo 2020	100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se determino que el extracto polifenolico total es el que presenta mejor respuesta metabolica in vitro.

Documentación de respaldo

Anexo N°3

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
6	11	Proceso productivo a escala piloto	Diagrama flujo del proceso		0	1	30 septiembre 2019	30 Mayo 2020	100	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se adjunta diagrama del proceso optimo

Documentación de respaldo

Anexo N2

OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					Fecha alcance meta programada	Fecha alcance meta real	% de cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base	Meta del indicador (situación final)				
6	12	Modelo de asociatividad productiva	Acuerdo firmado		0	1	30 Octubre 2019		50	

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Debido a la situación causada por la pandemia, ha sido imposible reunirse con los agricultores , esperamos poder presentar los resultados del proyecto en cuanto se vuelva a la normalidad y programar el modelo de trabajo asociativo.

Documentación de respaldo

6.2 Análisis de brecha.

Cuando corresponda, justificar las discrepancias entre los resultados programados y los obtenidos.

El estudio analítico y validación de las fracciones polifenolicas a nivel in vitro nos permitio determinar que la fracción purificada de polifenoles totales es la que presenta la mejor respuesta metabolica, esto es respaldado por evidencia científica que describe la sociación sinérgica entre los distintos polifenoles. Este resultado nos permite desarrollar un control de calidad del proceso productivo que implica controlar el nivel de polifenoles totales y de resveratrol en el producto final. El uso de enzimas en el proceso extractivo nos permitio alcanzar un rendimiento que supero en más de 10 veces el programado.

No se ha podido concretar la formalización de un modelo de trabajo asociativo con los productores, debido a la situación actual por pandemia. Nuestra empresa esta comprometida en realizar un trabajo prodcutivo asociativo con la asociación de viñateros de Yumbel es por ello que en cuanto se pueda volver a efectuar reuniones presenciales, empezaremos a trabajar en el modelo productivo para sacar el producto al mercado con material de la próxima vendimia 2021.

7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO

Especificar los cambios y/o problemas enfrentados durante el desarrollo del proyecto. Se debe considerar aspectos como: conformación del equipo técnico, problemas metodológicos, adaptaciones y/o modificaciones de actividades, cambios de resultados, gestión y administrativos.

Describir cambios y/o problemas	Consecuencias (positivas o negativas), para el cumplimiento del objetivo general y/o específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y/o problemas
Menor cantidad de fracciones purificadas de polifenoles	Se priorizo el trabajo analítico y se obtuvo lo necesario para estos fines.	La menor producción fue una consecuencia de que se priorizo trabajar en la evaluación analítica del extracto.
Imposibilidad de realizar reuniones presenciales con los agricultores	Se posterga la presentación de los resultados .	Una vez que se vuelva a la normalidad avanzaremos con la implementación del modelo de trabajo asociativo.

8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

8.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

- 1.- Muestreo, tratamiento y conservación de muestras
- 2.- Puesta a punto técnicas extractivas de polifenoles de los orujos
- 3.- Obtención de polifenoles en polvo
- 4.- Fraccionamiento y purificación de monomeros
- 5.- Fraccionamiento y purificación de polimeros
- 6.- Análisis de monomeros y polimeros
- 7.- Caracterización química de las distintas fracciones
- 8.- Montaje de las distintas líneas celulares y controles de Ensayos In vitro
- 9.- Optimización de proceso Productivo
- 10.- Elaboración de fórmulas polifenólicas, determinación de uso de carrier.
- 11.- Determinación de equipos óptimos para proceso industrial, cálculo de costos de producción.
- 12.- Análisis y trabajo con modelo Canvas de elaboración de acuerdo productivo.

8.2 Actividades programadas y no realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

- 12.- Análisis y trabajo con modelo Canvas de elaboración de acuerdo productivo.

Esta actividad no se pudo realizar ya que debido a la situación generada por la pandemia Covid-19, no se pudo realizar trabajo interactivo con los agricultores.

8.3 Analizar las brechas entre las actividades programadas y realizadas durante el período de ejecución del proyecto.

9. POTENCIAL IMPACTO

9.1 Resultados intermedios y finales del proyecto.

Descripción y cuantificación de los resultados obtenidos al final del proyecto, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos permiten proyectar un proceso productivo altamente rentable para los orujos de uva País.

Estos antecedentes nos permiten estar muy satisfechos de los resultados de la investigación ya que nos permitirá posicionarnos en el mercado con una producto de alta calidad.

10. CAMBIOS EN EL ENTORNO

Indique si existieron cambios en el entorno que afectaron la ejecución del proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros, y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Desgraciadamente los cambios del entorno nos imposibilitaron las reuniones con los agricultores, en cuanto se pueda volver a la normalidad esperamos poder discutir con ellos los resultados y diseñar las líneas de acción para llevar este proceso a nivel productivo.

11. DIFUSIÓN

Describa las actividades de difusión realizadas durante la ejecución del proyecto. Considere como anexos el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares.

	Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Documentación Generada
1					
2					
3					
4					
5					
n					
			Total participantes		

12. PRODUCTORES PARTICIPANTES

Complete los siguientes cuadros con la información de los productores participantes del proyecto.

12.1 Antecedentes globales de participación de productores

Debe indicar el número de productores para cada Región de ejecución del proyecto.

Región	Tipo productor	Nº de mujeres	Nº de hombres	Etnia (Si corresponde, indicar el Nº de productores por etnia)	Totales
Bio Bio	Productores pequeños	4	16		20
	Productores medianos-grandes				
	Productores pequeños				
	Productores medianos-grandes				
Totales		4	16		

12.2 Antecedentes específicos de participación de productores

Nombre	Ubicación Predio			Superficie Há.	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
José Betancourt Cid	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
María Bravo Zañartu	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Juan Cabezas Fica	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
José Delgado Morales	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Héctor Fernandez Fernandez	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Jaime Morales Bascuñán	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Mercedes Muñoz Aguilera	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
José Rodríguez Cuevas	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Nelson Ruiz Veloso	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Mateo Saavedra Rivera	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Guillermo Vega Bermedo	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Carlos Pérez Sepúlveda	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Sara Hidalgo Paredes	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Eugenio Saavedra Tolosa	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Carlos Cid Hidalgo	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Arturo Escobar del Río	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Danilo Gonzales Fica	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
Arnaldo Herrera Godoy	Bio Bio	Cabrero			Agosto 2017
Pamela Zambrano Hidalgo	Bio Bio	Yumbel			Agosto 2017
José Luis Rosas Yáñez	Bio Bio	San Rosendo			Agosto 2017

13. CONSIDERACIONES GENERALES

13.1 ¿Considera que los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general del proyecto?

El objetivo general del proyecto se alcanzo en forma exitosa ya, que se logro obtener un producto validado científicamente, y un rendimiento de producción mucho mayor al que se proyecto.

13.2 ¿Cómo fue el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

El equipo ha funcionado bien, de manera planificada y coordinada, priorizando aquellas actividades que aseguren el cumplimiento del objetivo general del proyecto.

13.3 A su juicio, ¿Cuál fue la innovación más importante alcanzada por el proyecto?

La metodología que nos permitiera obtener un producto comercial validado es la innovación más importante, fue nuestro objetivo principal y a lo cual le dimos el mayor énfasis durante el desarrollo de este proyecto. A la metodología tradicional hemos agregado precisión para que cada variable involucrada en la obtención de los polifenoles de excelente actividad biológica y trabaje en las condiciones apropiadas. Además, hemos adicionado la validación in vitro que creemos es fundamental para estar seguros que estamos ofreciendo un producto de calidad a los consumidores.

En el mediano plazo, estos resultados establecen bases serias para una gran innovación, que es la producción de polifenoles a partir de una materia prima que en la actualidad era un desecho para los agricultores.

13.4 Mencione otros aspectos que considere relevante informar, (si los hubiere).

--

14. CONCLUSIONES

Realice un análisis global de las principales conclusiones obtenidas luego de la ejecución del proyecto.

Creemos que este proyecto ha sido exitoso, el objetivo principal se ha logrado de manera satisfactoria, es decir, tenemos un método para fabricar capsulas de polifenoles a partir de los orujos de uva País, validadas en cuanto a su composición química y el efecto in vitro de sus polifenoles, esto permitirá que a corto plazo podremos sacar un producto al mercado de productos naturales para la salud.

Teniendo en cuenta el impacto económico de la producción de Uva País en los agricultores del secano interior de la región del Bío Bío, el modelo cooperativo parece ser el más adecuado para enfrentar de manera colectiva el desafío de la industrialización de los orujos.

Desarrollamos una imagen , envasamos el producto a nivel de laboratorio, se realizo solicitud de registro de marca en INAPI.

15. RECOMENDACIONES

Señale si tiene sugerencias en relación a lo trabajado durante el proyecto (considere aspectos técnicos, financieros, administrativos u otro).

Con tenemos sugerencias, solo decir que se trabajo de forma muy fluida con FIA y los productores.

Tenemos grandes expectativas comerciales con la tecnología desarrollada ya que estamos a tiempo de ser lideres en la producción de un producto funcional a partir de orujos de Uva País.

Agradecemos a FIA, haber creído en este proyecto y esperamos poder participar los avances de la producción industrial con nuestra ejecutiva.

16. ANEXOS

17. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Bibliografía

Alexander, J., Bey, E., Whitcutt, J.M. and Gear, J.H. (1976). Adaptation of cells derived from human malignant tumours to growth in vitro. *S Afr J Med Sci* 41: 89-98.

Camacho, F., Capo, M., Toledo, R., de León, J., Talavera, A. and Pérez, E.M. (2006). Transferencia de genes in vitro por polímeros catiónicos. *VacciMonitor* 15: 17-21.

Carruthers, A. (1984). Sugar transport in animal cells: the passive hexose transfer system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 43: 33-69.

Cohen, M., Kitsberg, D., Tsytkin, S., Shulman, M., Aroeti, B. and Nahmias, Y. (2014). Live imaging of GLUT2 glucose-dependent trafficking and its inhibition in polarized epithelial cysts. *Open Biol* 4.

Gould, G.W. and Holman, G.D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *The Biochemical Journal* 295 (Pt 2): 329-341.

Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. and Bell, G.I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-5145.

Kellett, G., Brot-Laroche, E., Mace, O. and Leturque, A. (2008). Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annual Review of Nutrition* 28: 35-54.

Kellett, G.L. and Brot-Laroche, E. (2005). Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 54: 3056-3062.

Kellett, G.L. and Helliwell, P.A. (2000). The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350 Pt 1: 155-162. May, J.M. (1988). Reaction of an exofacial sulfhydryl group on the erythrocyte hexose carrier with an impermeant maleimide. Relevance to the mechanism of hexose transport. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 13635-13640.

May, J.M. (1989a). Differential labeling of the erythrocyte hexose carrier by N-ethylmaleimide: correlation of transport inhibition with reactive carrier sulfhydryl groups. *Biochimica Et Biophysica Acta* 986: 207-216. May, J.M. (1989b). Inhibition of hexose transport in the human erythrocyte by 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): role of an exofacial carrier sulfhydryl group. *The Journal of Membrane Biology* 108: 227-233.

Rencurel, F., Waeber, G., Antoine, B., Rocchiccioli, F., Maulard, P., Girard, J. and Leturque, A. (1996). Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *The Biochemical Journal* 314 (Pt 3): 903-909.

Salas, M., Obando, P., Ojeda, L., Ojeda, P., Pérez, A., Vargas-Urbe, M., Rivas, C.I., Vera, J.C. and Reyes, A.M. (2013). Resolution of the direct interaction with and inhibition of the human GLUT1 hexose transporter by resveratrol from its effect on glucose accumulation. *American journal of physiology. Cell physiology* 305: C90-99.

Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M. and Thorens, B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *Febs Letters* 524: 199-203.

Widdas, W.F. (1954). Facilitated transfer of hexoses across the human erythrocyte membrane. *Journal of Physiology* 125: 163-180.

Widdas, W.F. (1989). Sugar transport in red blood cells. *Methods in Enzymology* 173: 231-250.

Zambrano, A., Jara, E., Murgas, P., Jara, C., Castro, M.A., Angulo, C. and Concha, I (2010). Cytokine stimulation promotes increased glucose uptake via translocation at the plasma membrane of GLUT1 in HEK293 cells. *J Cell Biochem* 110: 1471-1480.

Zhu, Q. and Casey, J.R. (2007). Topology of transmembrane proteins by scanning cysteine accessibility mutagenesis methodology. *Methods* 41: 439-450.

ANEXO N°1

COMPRA DE ORUJOS A LA ASOCIACIÓN DE VIÑATEROS DE YUMBEL

RECOLECCIÓN DE ORUJOS



ALMACENAMIENTO DE ORUJOS



ANEXO Nº2

PYT-2018-0329

**Informe de procedimientos de extracción de polifenoles desde orujos de uva.
BIOINGEMAR.**

Contenido

Método:

- 1.-Extracción de polifenoles desde orujos de uva**
 - 1.1.-Extracción de polifenoles desde orujos enteros.**
 - 1.2.-Extracción de polifenoles desde orujos molidos.**
 - 1.3.-Extracción enzimática de polifenoles.**
 - 1.3.1.-Extracción enzimática de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.**
 - 1.3.2.-Evaluación de la dosis enzimática en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.**
 - 1.3.3.-Evaluación del pH en el tratamiento enzimático en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.**
 - 1.4.-Ensayos de secado de extracto acuoso mezclado con maltodextrina.**
 - 1.5.-Tratamiento de ultrasonido en orujos enteros y orujos molidos.**
 - 1.6.-Tratamiento de ultrasonido en orujos molidos en diferentes tiempos.**
 - 1.7.-Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimáticos en orujos molidos.**
- 2.-Análisis de polifenoles mediante cromatografía HPLC-DAD.**
 - 2.1.-Curvas de calibración para la determinación de polifenoles.**
 - 2.2.-Análisis de los extractos de polifenoles de orujos de uva.**
- 3.-Optimización del método de separación de polifenoles desde extracto de orujos por cromatografía HPLC-DAD preparativa.**
 - 3.1.-Parámetro Concentración.**
 - 3.2.-Parámetro Flujo.**
 - 3.3.-Parámetro Gradiente.**
- 4.- Separación de polifenoles de orujos de uva por cromatografía HPLC-DAD preparativa.**
- 5.- Análisis de polifenoles de orujos separados mediante cromatografía HPLC-DAD analítica.**
- 6.- Comparación de contenido de polifenoles totales en vino 12 generaciones y orujos.**

Resultados:

- 1.1.-Extracción de polifenoles desde orujos enteros.**
- 1.2.-Extracción de polifenoles desde orujos molidos.**
 - 1.3.1.-Evaluación de la dosis enzimática en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.**
 - 1.3.2.-Evaluación del pH en el tratamiento enzimático en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.**
- 1.4.-Ensayos de secado de extracto acuoso mezclado con maltodextrina.**
- 1.5.-Tratamiento de ultrasonido en orujos enteros y orujos molidos**

- 1.6.-Tratamiento de ultrasonido en frio en orujos molidos en diferentes tiempos.
- 1.7.-Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimáticos en orujos molidos.
- 2.-Análisis de polifenoles mediante cromatografía HPLC-DAD.
 - 2.1.-Curvas de calibración para la determinación de polifenoles.
 - 2.2.-Análisis de los extractos de polifenoles de orujos de uva.
- 3.-Optimización del método de separación de polifenoles desde extracto de orujos.
 - 3.1.-Parámetro Concentración.
 - 3.2.-Parámetro Flujo.
 - 3.3.-Parámetro Gradiente.
- 4.- Separación de polifenoles de orujos de uva por cromatografía HPLC-DAD preparativa.
 - 4.1.- Preparación e inyección de las muestras.
 - 4.2.- Secado de fracciones de polifenoles aislados.
 - 4.2.1.- Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles de orujos enteros obtenidos post secado.
 - 4.2.2.- Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles de orujos molidos obtenidos post secado.
- 5.- Análisis de polifenoles de orujos enteros separados mediante cromatografía HPLC-DAD analítica.
 - 5.1.1.- Tabla resumen de extractos de polifenoles de orujos enteros separados.
 - 5.1.2.- Espectros de absorbancia obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD analítica de extractos de polifenoles separados mediante cromatografía HPLC-DAD preparativa desde orujos enteros.
 - 5.2.1.- Tabla resumen de extracto de polifenoles de orujos molidos separados.
 - 5.2.2.- Espectros de absorbancia obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD analítica de extractos de polifenoles separados mediante cromatografía HPLC-DAD preparativa desde orujos molidos.
- 6.- Comparación de contenido de polifenoles totales en vino 12 generaciones y orujos.
 - 6.1.1.- Tabla de polifenoles de Vino 12 generaciones.
 - 6.1.2.- Espectro de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.
 - 6.1.3.- Cromatograma a 280nm para identificación de compuestos fenólicos de Vino 12 generaciones.
 - 6.1.4.- Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos cinámicos de Vino 12 generaciones.
 - 6.1.5.- Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas de Vino 12 generaciones.
 - 6.2.1.- Tabla de extracto de polifenoles de orujo entero.
 - 6.2.2.- Espectro de extracto de polifenoles de orujo entero.
 - 6.2.3.- Cromatograma a 280nm para identificación de compuestos fenólicos de orujo entero.
 - 6.2.4.- Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos cinámicos de orujo entero.
 - 6.2.5.- Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas de orujo entero.
 - 6.4.- Gráfico comparativo de cantidad de polifenoles totales en extractos de orujos y en muestra de vino en diferentes tiempos de retención.

Conclusiones

Protocolo de extracción de polifenoles de orujos en reactor

Método

1.-Extracción de polifenoles desde orujos de uva

1.1.-Extracción de polifenoles desde orujos enteros.

Los orujos enteros son mezclados con etanol al 70% en una relación 1:2 y son sometidos a ultrasonido a 20,2KHz durante 10 minutos. Posteriormente son filtrados al vacío, obteniéndose una fracción líquida donde se encuentran los polifenoles extraídos en etanol y una fracción sólida de orujos, la cual es guardada para repetir el procedimiento de extracción.

La fracción líquida que contiene los polifenoles es concentrada mediante un equipo de rotaevaporación y purificada de azúcares mediante cromatografía de intercambio iónico usando como eluyente etanol puro. Los polifenoles disueltos en etanol puro son nuevamente concentrados mediante rotaevaporación, obteniéndose los polifenoles concentrados y purificados (Imagen 1 y 2).

Imagen 1: Diagrama de procedimiento de extracción de polifenoles a partir de orujos de uva enteros.

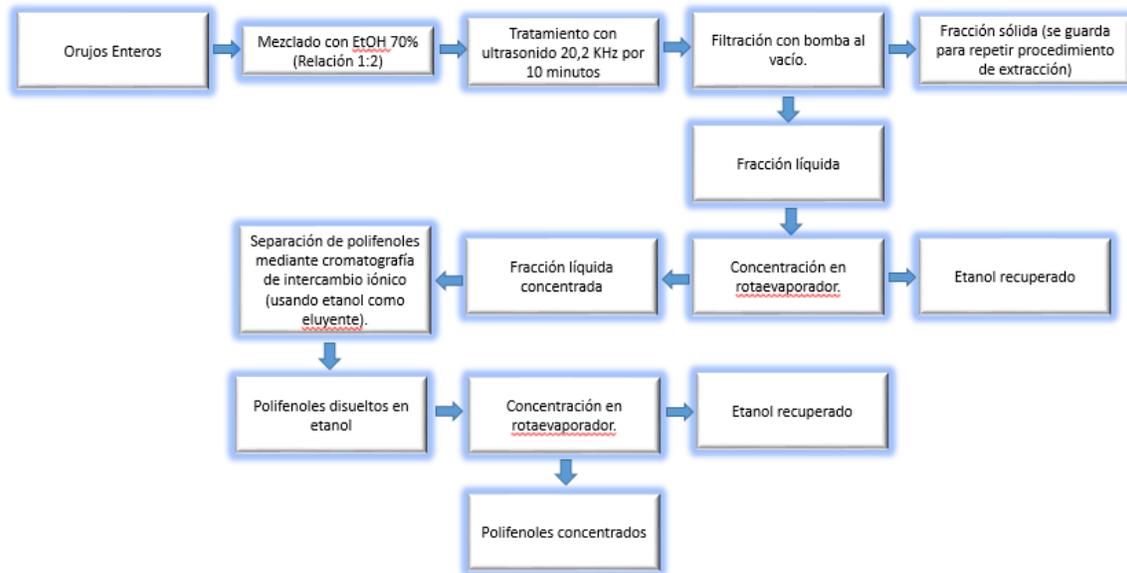


Imagen 2: Polifenoles purificados y concentrados.



1.2.-Extracción de polifenoles desde orujos molidos.

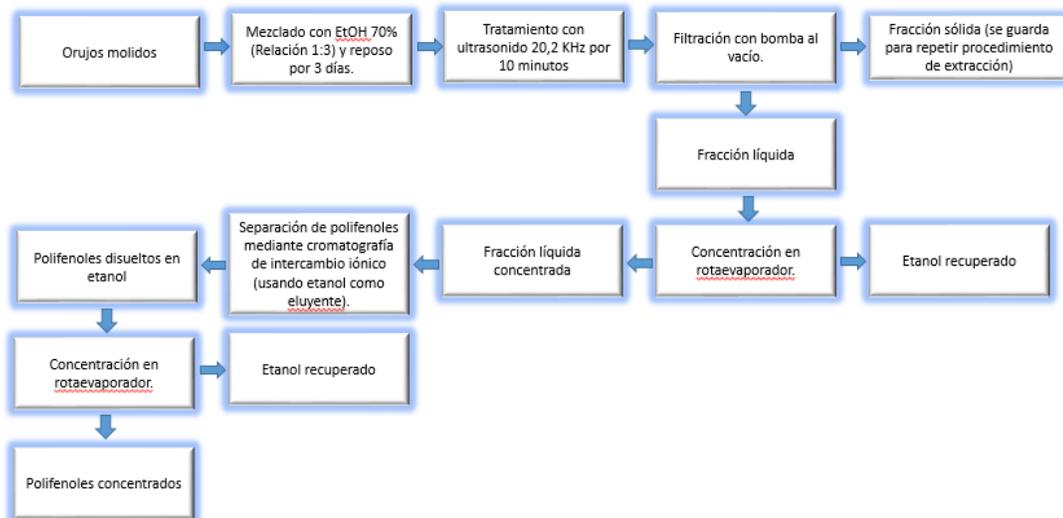
Los orujos luego de ser finamente molidos, son mezclados con etanol al 70% en una relación 1:3 y son dejados en reposo durante 3 días (Imagen 3). Posteriormente son sometidos a ultrasonido a 20,2KHz durante 10 minutos y filtrados al vacío, obteniéndose una fracción líquida donde se encuentran los polifenoles extraídos en etanol y una fracción sólida de orujos, la cual es guardada para repetir el procedimiento de extracción.

La fracción líquida que contiene los polifenoles es concentrada mediante un equipo de rotaevaporación y purificada de azúcares mediante cromatografía de intercambio iónico usando como eluyente etanol puro. Los polifenoles disueltos en etanol puro son nuevamente concentrados mediante rotaevaporación, obteniéndose los polifenoles concentrados y purificados (Imagen 4).

Imagen 3: Orujos molidos y mezclados con etanol al 70% para extracción de polifenoles.



Imagen 4: Diagrama de procedimiento de extracción de polifenoles a partir de orujos de uva molidos.

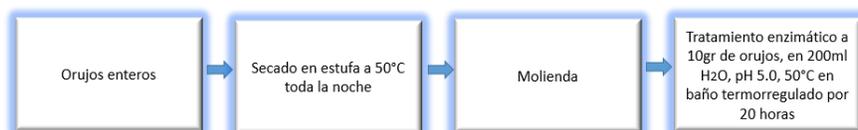


1.3.-Extracción enzimática de polifenoles.

1.3.1.-Extracción enzimática de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.

El remanente de orujos enteros al que previamente se le realizó extracción de polifenoles en etanol, es secado en estufa a 50°C durante la noche y al día siguiente es molido para ser tratado con diferentes enzimas, a través de una serie de ensayos enzimáticos con el fin de ver si aún quedan restos de polifenoles en los orujos ya tratados. En cada ensayo se mezclaron 10 gramos de orujo con 200ml de agua, pH 5.0 y a 50 °C en baño termostático durante 20 horas

Imagen 5: Diagrama de procedimiento de extracción de polifenoles a partir de remanentes de orujos de uva enteros.



Se realizaron los siguientes ensayos enzimáticos:

1. Pectinex al 1%.
2. Viscozyme al 1%.
3. Celluclast al 1%.
4. Amilasa al 1%.
5. Pectinex + viscozyme al 1% c/u.
6. Pectinex + celluclast al 1% c/u.
7. Pectinex + amilasa al 1% c/u.
8. Pectinex + viscozyme + celluclast al 1% c/u.
9. Pectinex + viscozyme + celluclast + amilasa al 1% c/u.

Posteriormente se realizaron otra serie de experimentos con enzimas:

1. Pectinex al 2%.
2. Celluclast al 2%.
3. Pectinex + celluclast al 2% c/u

1.3.2.-Evaluación de la dosis enzimática en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de evaluar la dosis óptima de enzima pectinasa comercial Pectinex Ultra Color BLUMOS para la recuperación de polifenoles de los orujos ya tratados con etanol. Para esto se mezclaron en seis matraces Erlenmeyer, 50 gramos de orujos molidos con 200 mL de buffer acetato 20mM pH 4.0 y a cada matraz se le añadieron 250 (0,1%), 500 (0,2%), 1000 (0,4%), 2500 (1,0%) y 5000 (2,0%) µL de enzima pectinasa respectivamente. Los matraces fueron dejados en baño termostático a 35°C durante 12 horas, agitándolos ocasionalmente. Cada muestra se centrifugó a 3500xg por 10 min y se guarda el sobrenadante para posteriormente analizar la presencia de polifenoles mediante HPLC-DAD.

1.3.3.-Evaluación del pH en el tratamiento enzimático en la extracción de polifenoles remanentes a partir de muestra de orujos enteros.

Se realizaron una serie de experimentos con el fin de evaluar el pH óptimo en el tratamiento enzimático con la enzima pectinasa comercial Pectinex Ultra Color BLUMOS. Para esto se mezclaron en tubos Falcon de 15mL, 1 gramo de muestra con 10ml de buffer acetato 20mM a los siguientes pH: 3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0 y 7.5. A cada tubo se añadieron 100µL de pectinex y se dejó en incubación por 12 horas a 35°C, agitándolos ocasionalmente. Cada muestra se centrifugó a 3500xg por 10 min y se guarda el sobrenadante para posteriormente analizar la presencia de polifenoles mediante HPLC-DAD.

1.4.-Ensayos de secado de extracto acuoso mezclado con maltodextrina.

Con el fin de obtener un extracto de polifenoles en polvo, sin necesidad de pasar por un proceso de separación de azúcares mediante cromatografía de intercambio iónico, se realizaron una serie de experimentos en el que el extracto acuoso de polifenoles es mezclado con soluciones de maltodextrina a diferentes concentraciones, para así determinar la relación óptima de mezclado extracto acuoso de polifenoles con la maltodextrina.

1.5.-Tratamiento de ultrasonido en orujos enteros y orujos molidos

Se estudió el efecto del ultrasonido en el proceso de extracción de polifenoles desde orujos enteros y orujos molidos. Luego de que los orujos fueron mezclados con el etanol al 70% estos se sometieron a ultrasonido a 20,2KHz durante 5 minutos.

1.6.-Tratamiento de ultrasonido en frío en orujos molidos en diferentes tiempos

Se estudió el efecto del ultrasonido en un baño en frío, con el fin de evitar el aumento de temperatura en este procedimiento, en el proceso de extracción de polifenoles desde orujos molidos. Luego de que los orujos fueron mezclados con el etanol al 70% estos se sometieron a ultrasonido a 20,2KHz durante 1, 2, 3 y 4 minutos.

1.7.-Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimáticos en orujos molidos

Se realizaron diferentes ensayos enzimáticos en orujos molidos estudiando diferentes variables, como el tipo de enzima, variaciones de conjunto de enzimas, concentración y tiempo de incubación, para así determinar las condiciones óptimas de extracción de polifenoles desde los orujos.

2.-Análisis de polifenoles mediante cromatografía HPLC-DAD

2.1.-Curvas de calibración para la determinación de polifenoles.

Se realiza una serie de curvas de calibración con el fin de identificar los polifenoles presentes en los orujos de uva y su concentración, mediante comparación con los tiempos de retención, la intensidad de señal y la longitud de onda de los peaks cromatográficos. Para esto se prepararon diferentes soluciones patrón de 1 mg/mL de trans-resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-coumárico y quercetina, en una solución matriz de etanol 15% y ácido tartárico de 3,0 g/L en agua. A partir de estas soluciones patrón se preparan distintas concentraciones de estándares en el rango de 0,01 a 0,05 mg/ml y se inyectan en el HPLC para posteriormente evaluar los extractos de polifenoles obtenidos de los orujos de uva.

2.2.-Análisis de los extractos de polifenoles de orujos de uva.

La preparación de los extractos de polifenoles para ser analizados por cromatografía HPLC-DAD se realiza de la siguiente manera:

- Se pesan 0,04g de extracto de polifenoles y se disuelven en 10ml de EtOH 12%.
- Para ayudar a la solubilización de los extractos se usa baño de ultrasonido.
- Una vez solubilizadas las muestras, son filtradas cuidadosamente (1ml/min aprox) en cartridge Oasis HLB 1cc de la siguiente manera:
 - 1ml de H₂O destilada grado HPLC.
 - 3ml de extracto de polifenoles.
 - 1ml de Metanol 5% grado HPLC.

Se eluye con Metanol 100% grado HPLC y se filtra en filtro de nylon de 0,45µm.

Imagen 6: Cartridge Oasis HLB 1cc (izquierda) y filtro de nylon de 0,45µm (derecha) usados en preparación de los extractos de polifenoles para ser analizados por cromatografía HPLC-DAD.



Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Equipo:
 - Bomba Hitachi L-2130, seteado a un flujo de 1ml/min.
 - Horno para columna Hitachi L-2300, seteado a una temperatura de 40°C.
 - Detector DAD Hitachi L-2455, seteado a un rango de longitud de onda de 200-400nm.
 - Software de adquisición de datos: EZChrom Elite.
- Columna:
 - Chromolith RP-18e, 100-3mm.
- Fase Móvil:
 - Disolvente A: Metanol/Ácido acético/ Agua, 10:2:88, v/v/v.
 - Disolvente B: Metanol/Ácido acético/ Agua, 90:2:8, v/v/v.
- Gradiente:

- 0min: 100% A
- 15min: 85% A, 15% B
- 25min: 50% A, 50% B
- 28min: 30% A, 70% B
- 30min: 100% A
- 40min: 100% A

Imagen 7: Equipo de HPLC-DAD usado para el análisis cromatográfico de los extractos polifenólicos.



3.-Optimización del método de separación de polifenoles desde extracto de orujos por cromatografía HPLC-DAD preparativa.

3.1.-Parámetro Concentración.

Se prepararon 3 disoluciones de extractos de polifenoles en MeOH al 100% grado HPLC a diferentes concentraciones (50mg/ml, 100mg/ml y 200mg/ml) con el objetivo de determinar la concentración óptima de muestra para ser analizada y separada mediante cromatografía HPLC-DAD semipreparativa.

3.2.-Parámetro Flujo.

Se preparó una disolución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml en MeOH al 100% grado HPLC y se corrió a un flujo de 2.5 ml/min y posteriormente a un flujo 3.0 ml/min

3.3.-Parámetro Gradiente.

Se preparó una disolución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml de MeOH al 100% grado HPLC y se corrió a un flujo de 3.0 ml/min de dos gradientes de fase móvil diferentes.

4.- Separación de polifenoles de orujos de uva por cromatografía HPLC-DAD preparativa.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de separación de los extractos polifenoles de los orujos, estos son separados de acuerdo a los diferentes tiempos de elución que estos poseen durante la corrida cromatográfica y colectados en frascos, para así obtener los polifenoles purificados.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo:
 - Bomba Hitachi L-2130, seteado a un flujo de 3.0 ml/min.
 - Horno para columna Hitachi L-2300, seteado a una temperatura de 40°C.
 - Detector DAD Hitachi L-2455, seteado a un rango de longitud de onda de 200-600nm.
 - Software de adquisición de datos: EZChrom Elite.
- Columna HPLC:
 - Chromolith SemiPrep RP-18e, 100-10mm.
 - Columna guardian Chromolith SemiPrep RP-18e, 10-10mm
- Fase Móvil:
 - A: Metanol / Agua, 10:90, v/v.
 - B: Metanol/ Agua, 90:10, v/v.

5.- Análisis de polifenoles de orujos separados mediante cromatografía HPLC-DAD analítica.

Una vez separados las distintas fracciones de polifenoles separados por cromatografía HPLC-DAD preparativa y secadas, estas se analizan mediante cromatografía HPLC-DAD analítica, para identificar los polifenoles presentes en cada fracción obtenida.

6.- Comparación de contenido de polifenoles totales en vino 12 generaciones y orujos.

Se analiza una muestra de vino 12 generaciones mediante cromatografía HPLC-DAD analítica con el fin de comparar los polifenoles presentes en esta muestra con los presentes en los extractos de polifenoles de orujos obtenidos en los experimentos.

Resultados

1.1.-Extracción de polifenoles desde orujos enteros.

El procedimiento de extracción en etanol al 70% se realizó a tres muestras de orujos enteros (orujos enteros 1 (sin agitación), 2 y 3 (con agitación)), repitiéndose la extracción en cada muestra. El porcentaje de peso seco de los orujos fue de un 28,53%. Los resultados se muestran en la Tabla 1, 2 y 3.

Tabla 1: Resultados de 3 extracciones de polifenoles obtenidos de muestra de orujos enteros 1 sin agitación.

Extracción de polifenoles desde orujos enteros 1			
Muestra	Cantidad de muestra inicial (gramos)	Polifenoles Extraídos (gramos)	Rendimiento polifenoles en base a peso seco (%)
1° Extracción	1313,2 (374,66g peso seco)	5,7	1,52
2° Extracción	1313,2 (374,66g peso seco)	4,5	1,20
3° Extracción	1313,2 (374,66g peso seco)	1,73	0,46
	Total:	11,93	3,18

Tabla 2: Resultados de 2 extracciones de polifenoles obtenidos de muestra de orujos enteros 2 con agitación.

Extracción de polifenoles desde orujos enteros 2			
Muestra	Cantidad de muestra inicial (gramos)	Polifenoles Extraídos (gramos)	Rendimiento polifenoles en base a peso seco (%)
1° Extracción	1666 (475,31g peso seco)	15,752	3,31
2° Extracción	1666 (475,31g peso seco)	8,21	1,73
	Total	23,962	5,04

Tabla 3: Resultados de 3 extracciones de polifenoles obtenidos de muestra de orujos enteros 3 con agitación.

Extracción de polifenoles desde orujos enteros 3			
---	--	--	--

Muestra	Cantidad de muestra inicial (gramos)	Polifenoles Extraídos (gramos)	Rendimiento polifenoles en base a peso seco (%)
1° Extracción	1734,6 (494,88g peso seco)	16,735	3,38
2° Extracción	1734,6 (494,88g peso seco)	8,578	1,73
3° Extracción	1734,6 (494,88g peso seco)	1,04	0,21
	Total:	26,353	5,32

1.2.-Extracción de polifenoles desde orujos molidos.

El procedimiento de extracción en etanol al 70% con agitación se realizó a una muestra de orujos molidos con repeticiones en el procedimiento de extracción. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de 5 extracciones de polifenoles obtenidos de muestra de orujos molidos con agitación.

Extracción de polifenoles desde orujos molidos			
Muestra	Cantidad de muestra inicial (gramos)	Polifenoles Extraídos (gramos)	Rendimiento polifenoles en base a peso seco (%)
1° Extracción	691,88 (197,39g peso seco)	5,73	2,90
2° Extracción	691,88 (197,39g peso seco)	3,55	1,80
3° Extracción	691,88 (197,39g peso seco)	3,74	1,89
4° Extracción	691,88 (197,39g peso seco)	2,6	1,32
5° Extracción	691,88 (197,39g peso seco)	2,34	1,19
	Total:	17,96	9,10

1.3.1.-Evaluación de la dosis enzimática.

Los resultados se aprecian en la Tabla 5. Se observó mediante análisis en HPLC-DAD cuatro señales de absorbancia a 280nm en los tiempos de retención 1,71 minutos, 2,52 minutos, 3,19 minutos y 4 minutos. A partir de la dosis enzimática de pectinasa de 1000 µL (0,4%) se puede observar un aumento en la intensidad de la señal en los cuatro tiempos de retención con poca variación con respecto a una dosis enzimática de 2500 µL (1,0%). Al Aumentar la dosis a 5000 µL (2,0%) se observa otro aumento en la intensidad de señal en los tiempos de retención de 1,71min, 2,52min y 4 min.

Tabla 5: Resultados de evaluación de la dosis enzimática de pectinasa en la extracción de polifenoles de orujos de uva.

Evaluación dosis de enzima (280nm)	
	Tiempos de retención (min)

Dosis de enzima (µL)	1,71	2,52	3,19	4
250 (0,1%)	12,268	8,860	7,523	4,369
500 (0,2%)	16,147	12,787	10,820	4,913
1000 (0,4%)	17,242	14,747	12,805	5,311
2500 (1,0%)	17,518	14,203	12,411	5,415
5000 (2,0%)	18,053	15,805	11,868	5,792
Intensidad de señal (mAU)				

1.3.2.-Evaluación del pH en el tratamiento enzimático.

Los resultados se aprecian en la Tabla 6. Se observó mediante análisis en HPLC-DAD añadiendo una dosis enzimática de pectinasa al 1% ya que a esta concentración se mantuvieron las señales constantes en el HPLC en la evaluación de la dosis enzimática. Se evaluaron cuatro señales de absorbancia a 280nm en los tiempos de retención 1,71 minutos, 2,52 minutos, 3,19 minutos y 4 minutos. Entre pH 4,0 y pH 5,5 se puede observar que la intensidad de la señal en los cuatro tiempos de retención es más alta y con poca variación en este rango de pH.

Tabla 6: Resultados de evaluación del pH en el tratamiento enzimático con pectinasa en la extracción de polifenoles de orujos de uva.

Evaluación pH (280nm, 1% enzima pectinex)				
	Tiempos de retención			
pH	1,71	2,52	3,19	4
3,0	10,334	8,887	6,893	2,430
3,5	10,871	9,287	7,022	2,572
4,0	11,178	9,106	7,124	2,364
4,5	11,073	9,418	7,204	2,352
5,0	11,480	10,073	7,623	2,672
5,5	11,109	9,682	7,742	2,495
6,0	9,031	8,308	6,402	1,951
6,5	9,845	8,902	6,320	2,199
7,0	9,624	7,115	6,010	1,877
7,5	11,051	9,949	6,423	2,564
Intensidad de señal (mAU)				

1.4.-Ensayos de secado de extracto acuoso mezclado con maltodextrina

Se prepara una solución acuosa de maltodextrina de igual °brix que el extracto acuoso de polifenoles el cual se había sido extraído en etanol al 70%, evaporando posteriormente el etanol para dejar los polifenoles suspendidos en agua obteniéndose una solución acuosa de 7,6°brix.

$$°brix = \frac{X * 100}{V}$$

- °brix= % de azúcares disueltos en solución.
- X= cantidad de maltodextrina en solución (gr).
- V=Volumen de solución (ml)



Imagen 8: Relación extracto acuoso polifenoles : Solución maltodextrina 1:1 (3,8% p/v maltodextrina; .8,15g orujo (51,75%); 7,6g maltodextrina (48,25%)



Imagen 9: Relación extracto acuoso polifenoles : Solución maltodextrina 1:2 (1,9% p/v maltodextrina; .6,51g orujo (63,11%); 3,8g maltodextrina (36,89%)



Imagen 10: Relación extracto acuoso polifenoles : Solución maltodextrina 1:3 (0,95% p/v maltodextrina; .5,19g orujo (63,11%); 1,9g maltodextrina (26,78%)



Imagen 11: Relación extracto acuoso polifenoles : Solución maltodextrina 1:4 (0,38% p/v maltodextrina; .5,17g orujo (63,11%); 0,76g maltodextrina (12,82%)

Se observó que para obtener un extracto de polifenoles en polvo seco sin necesidad de pasar por un proceso de separación de azúcares mediante cromatografía de intercambio iónico, el extracto de polifenoles debe ser mezclado con una solución de maltodextrina preparada con los mismos °brix que el extracto acuoso de polifenoles, en la misma relación volumen/volumen (1:1).

1.5.-Tratamiento de ultrasonido en orujos enteros y orujos molidos

Se estudió el efecto del ultrasonido en el proceso de extracción de polifenoles desde orujos enteros y orujos molidos. Luego de que los orujos fueron mezclados con el etanol al 70% estos se sometieron a ultrasonido a 20,2KHz durante 5 minutos. Se observó un mejor resultado en el proceso de extracción desde orujos molidos sin ultrasonido, como se observa en la Imagen 12.

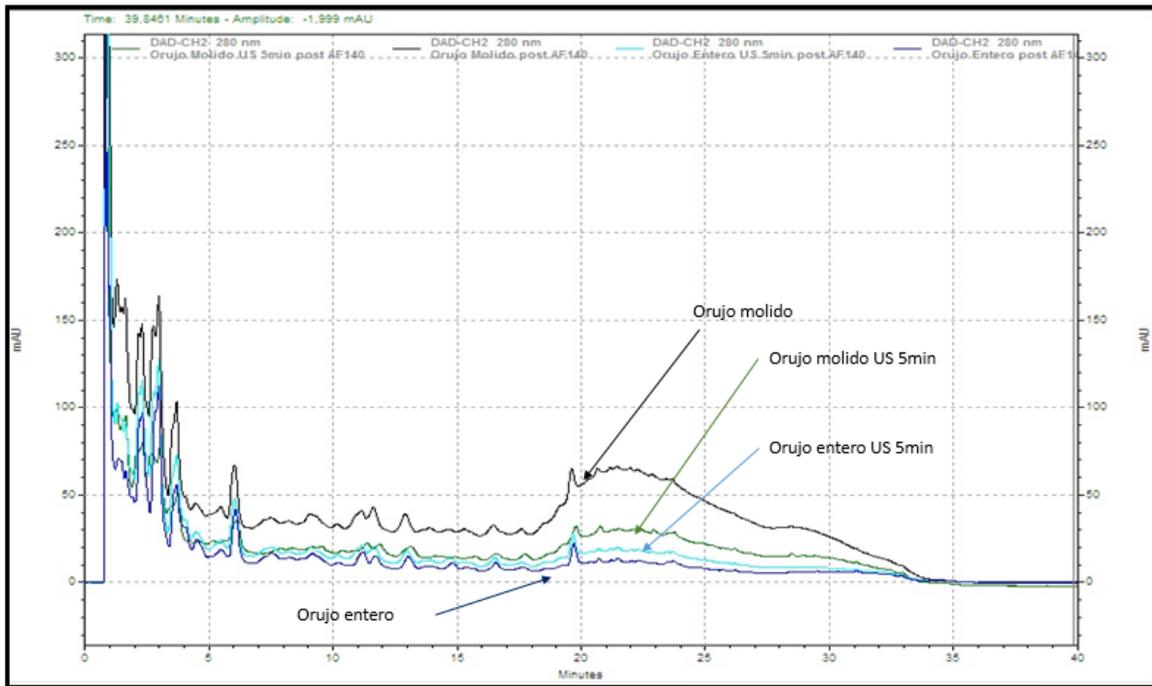


Imagen 12: Cromatogramas de ensayos de tratamiento de ultrasonido en orujos enteros y orujos molidos (US=ultrasonido).

Se observa una mayor absorbancia a 280nm en el ensayo de orujos molidos sin ultrasonido.

1.6.-Tratamiento de ultrasonido en orujos molidos en diferentes tiempos.

Se estudió el efecto del ultrasonido en un baño en frío, con el fin de evitar el aumento de temperatura en este procedimiento, en el proceso de extracción de polifenoles desde orujos molidos. Luego de que los orujos fueron mezclados con el etanol al 70% estos se sometieron a ultrasonido a 20,2KHz durante 1, 2, 3 y 4 minutos. Se observa una mayor absorbancia en el ensayo de ultrasonido durante 4 minutos, como se observa en la Imagen 13.

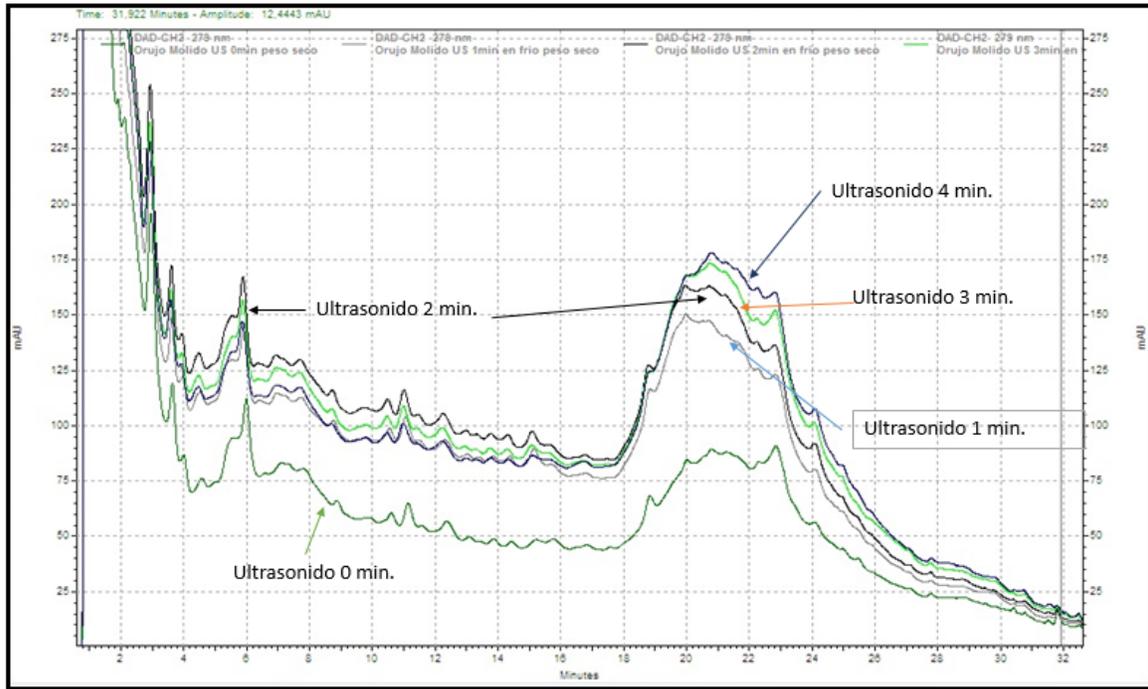


Imagen 13: Cromatogramas de ensayos de tratamiento de ultrasonido en orujos molidos durante diferentes tiempos de ultrasonido en baño en frío..

Se observa una mayor absorbancia a 280nm en el ensayo de ultrasonido durante 4 minutos. Se observa un aumento significativo al realizar ultrasonido en baño en frío al comparar el Cromatograma de Ultrasonido 0 min. con el resto de los cromatogramas.

1.7.-Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimáticos en orujos molidos previamente deshidratados (resultados en base a peso seco).

Se realizaron diferentes ensayos enzimáticos en orujos molidos estudiando diferentes variables, como el tipo de enzima, variaciones de conjunto de enzimas, concentración y tiempo de incubación, para así determinar las condiciones óptimas de extracción de polifenoles desde los orujos.

Ensayo 1:

- Condiciones de incubación: 45°C, 2horas, pH 4.0, concentración 1%
- Variable estudiada: tipo de enzima

Tabla 7: Tabla de Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático.

	Bco sin enzima	Pectinex 1%	Celluclast 1%	Viscozyme 1%	Pectinex 1% + Celluclast 1%	Pectinex 1%+ Viscozyme 1%	Pectinex 1% + Celluclast 1% + Viscozyme 1%
gramos de orujo (gr)	1,005	1,002	1,008	1,003	1,004	1,008	1,005
gramos de extracto de polifenoles (gr)	0,2009	0,2609	0,2207	0,225	0,2971	0,3054	0,3501
Rendimiento (%)	19,99	26,04	21,89	22,43	29,59	30,30	34,84

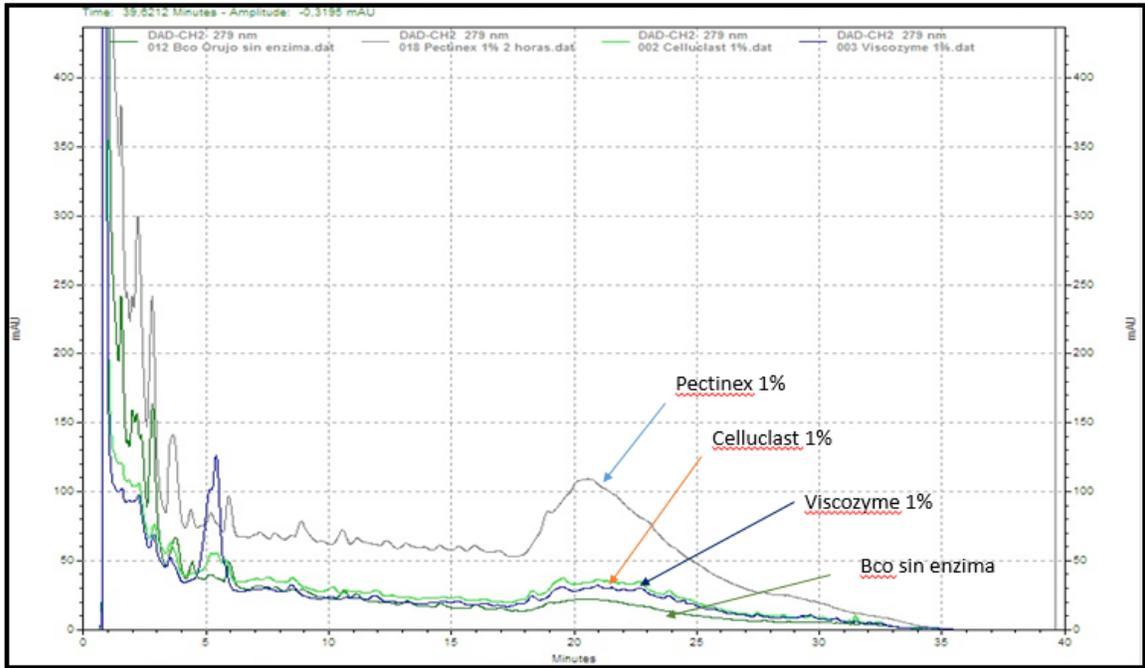


Imagen 14: Cromatogramas de ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: tipo de enzima.

Se observa un aumento significativo en la absorbancia a 280nm al usar pectinex al 1%.

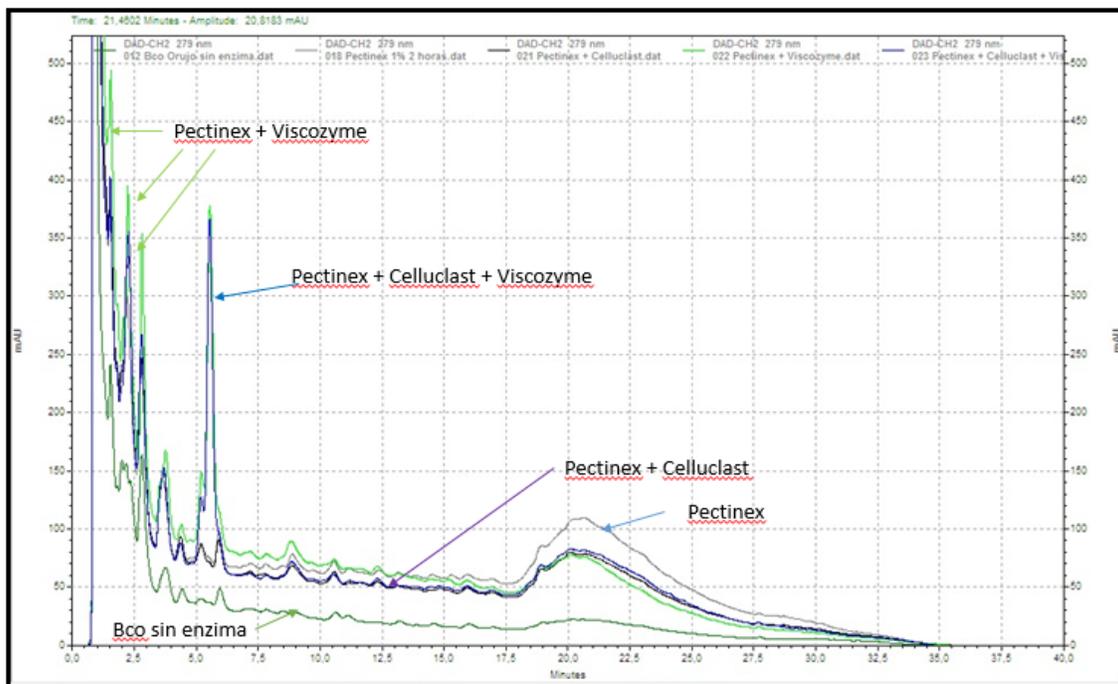


Imagen 15: Cromatogramas de ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: tratamiento con varias enzimas.

Se observa que alrededor de los 5 minutos de la corrida cromatográfica el ensayo con pectinex+celluclast+viscozyme muestra un peak de polifenoles, que no se observa en el resto de los experimentos.

Ensayo 2:

- Condiciones de incubación: 45°C, 2horas, pH 4.0
- Variable estudiada: Concentración de enzima

Tabla 8: Tabla de Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: Concentración de enzima

	Bco sin enzima	Pectinex 1%	Pectinex 2%	Pectinex 3%	Pectinex 4%	Pectinex 5%
gramos de orujo (gr)	1,005	1,002	1,001	1,001	1,001	1,001
gramos de extracto de polifenoles (gr)	0,2009	0,2609	0,2722	0,3905	0,4125	0,4747
Rendimiento (%)	19,99	26,04	27,19	39,01	41,21	47,42

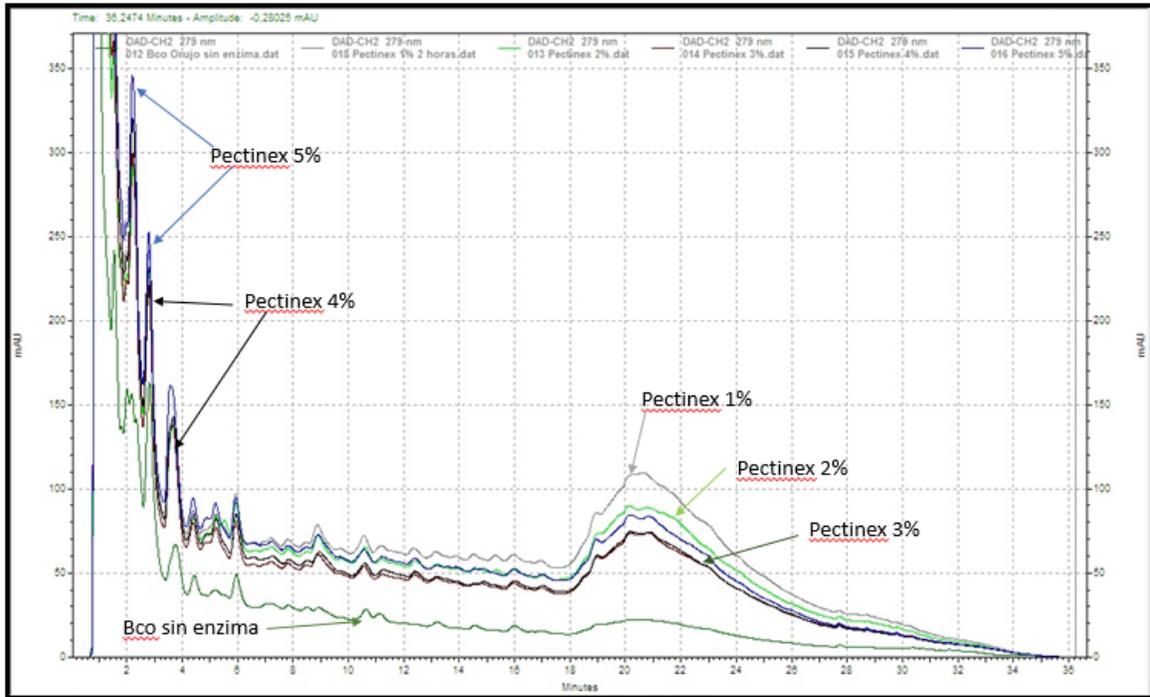


Imagen 9: Cromatogramas de ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: Concentración de enzima.

Se observa un aumento en la absorbancia a 280nm una concentración del 1% de Pectinex.

- Condiciones de incubación: 45°C, pH 4.0, concentración 1%
- Variable estudiada: Tiempo de incubación

Tabla 9: Tabla de Ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: Tiempo de incubación.

	Bco sin enzima	Pectinex 1 % 1h	Pectinex 1 % 1,5h	Pectinex 1 % 2h	Pectinex 1 % 4h	Pectinex 1 % Toda la noche
gramos de orujo (gr)	1,005	1,003	1,006	1,005	1,001	1,006
gramos de extracto de polifenoles (gr)	0,2009	0,2359	0,2704	0,2739	0,2866	0,3204
Rendimiento (%)	19,99	23,45	26,96	27,25	28,63	31,85

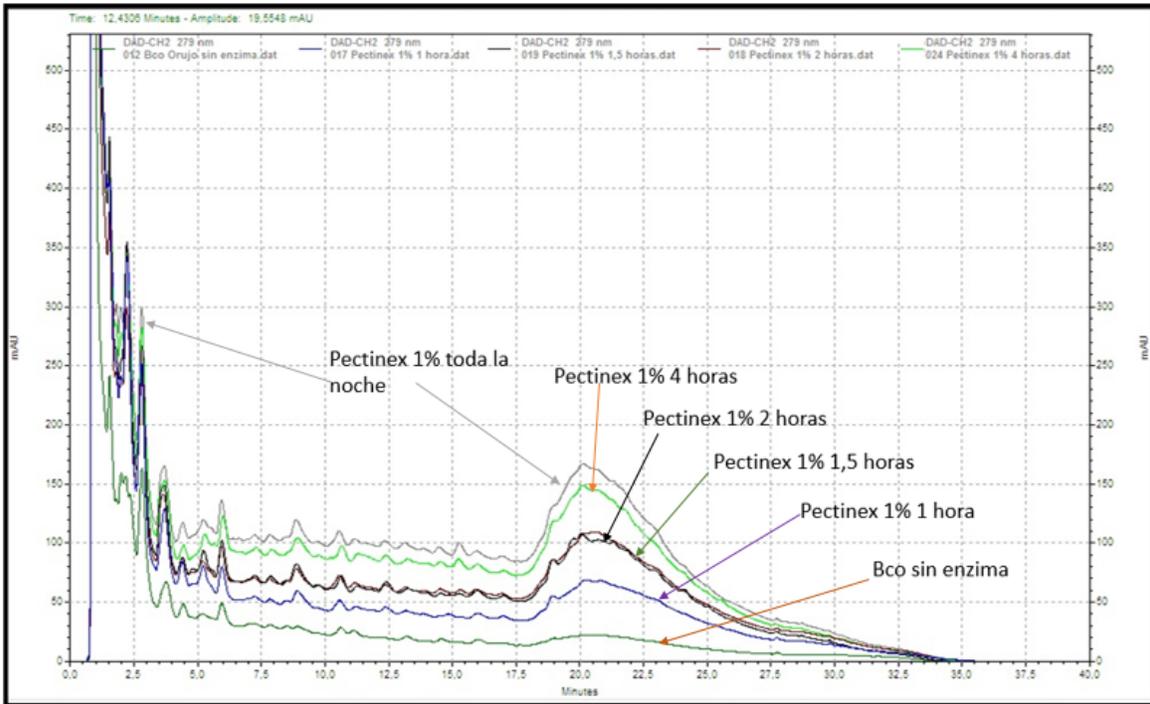


Imagen 10: Cromatogramas de ensayos de extracción de polifenoles mediante tratamientos enzimático. Variable estudiada: Tiempo de incubación.

Se observa un aumento en la absorbancia a 280nm a mayor tiempo de incubación. Se observa un aumento significativo al incubar durante 4 horas.

2.-Análisis de polifenoles mediante cromatografía HPLC-DAD.

2.1.-Curvas de calibración para la determinación de polifenoles.

Blanco Fase Móvil

Antes de inyectar las muestras, se inyecta una muestra blanco de fase móvil, para ver el comportamiento de esta a través de la corrida cromatográfica y compararla con las muestras a inyectar. No se observaron señales de absorbancia de posibles polifenoles durante el tiempo de corrida. En la imagen 7 se observa los resultados entregados por el HPLC-DAD junto con una descripción para la interpretación de datos posteriores.

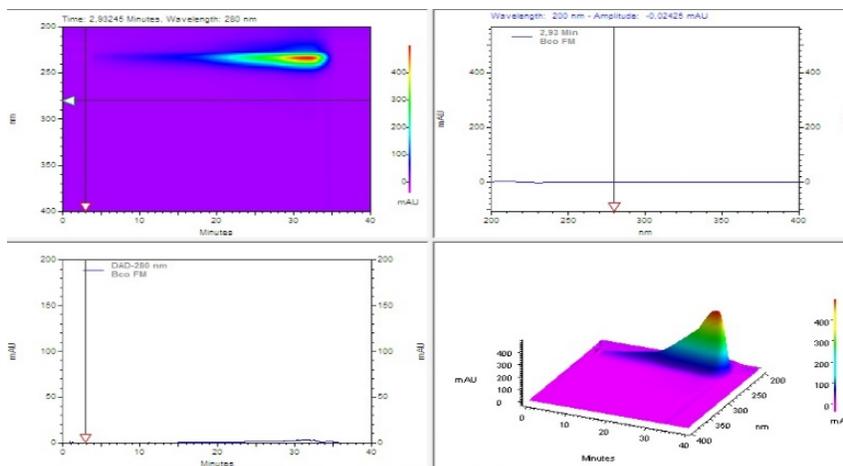


Imagen 18: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra blanco. **Gráfico superior izquierdo:** Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s Tiempo (minutos), el cual entrega curvas de nivel, cuyos colores (de frío a cálido) dan una idea de la altura (absorbancia en mAU) de los espectros a un tiempo determinado. Un cursor horizontal y otro vertical permiten seleccionar cromatogramas y/o espectros de absorbancia. **Gráfico superior derecho:** Espectro de absorbancia, Absorbancia (mUA) v/s Longitud de onda (nm) a un tiempo determinado. **Gráfico inferior izquierdo:** Cromatograma, Absorbancia (mUA) v/s Tiempo (minutos) a una longitud de onda determinada. **Gráfico inferior derecho:** Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s Tiempo (minutos) en vista tridimensional.

Curva de resveratrol.

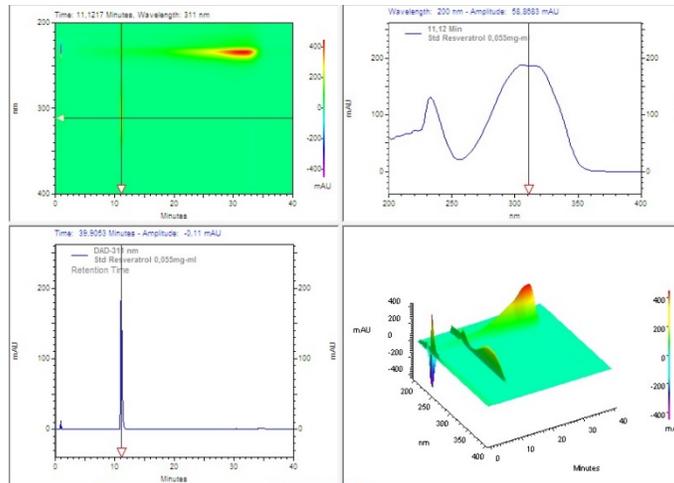


Imagen 19: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra estándar de resveratrol. Se observa que el resveratrol posee un peak de absorbancia máximo a 310 nm y 11,12 minutos.

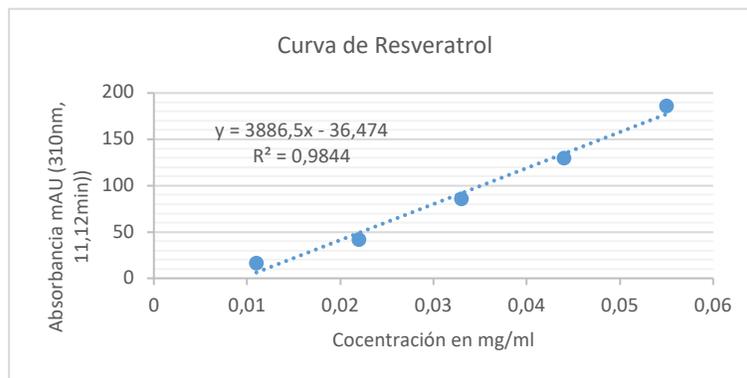


Imagen 20: Curva de calibración obtenida a partir de los resultados de HPLC-DAD para la determinación de resveratrol en las muestras de orujos de uva.

Curva de ácido gálico.

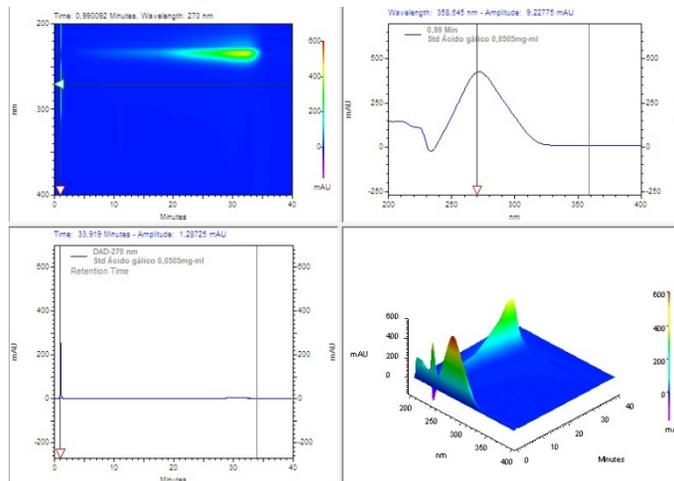


Imagen 21: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra estándar de ácido gálico. Se observa que el ácido gálico posee un peak de absorbancia máxima a 270 nm y 1 minuto.

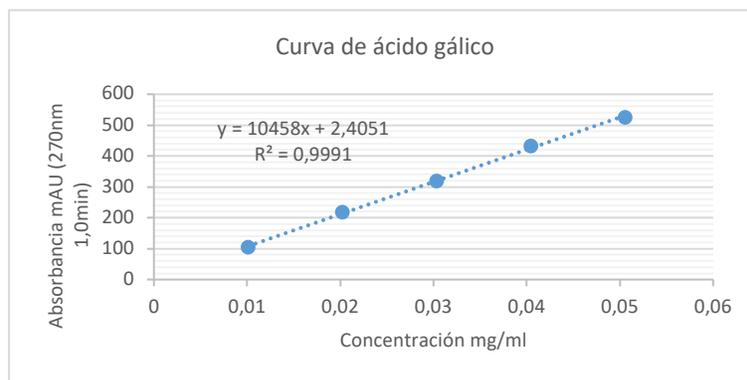


Imagen 22: Curva de calibración obtenida a partir de los resultados de HPLC-DAD para la determinación de ácido gálico en las muestras de orujos de uva.

Curva de ácido cafeico.

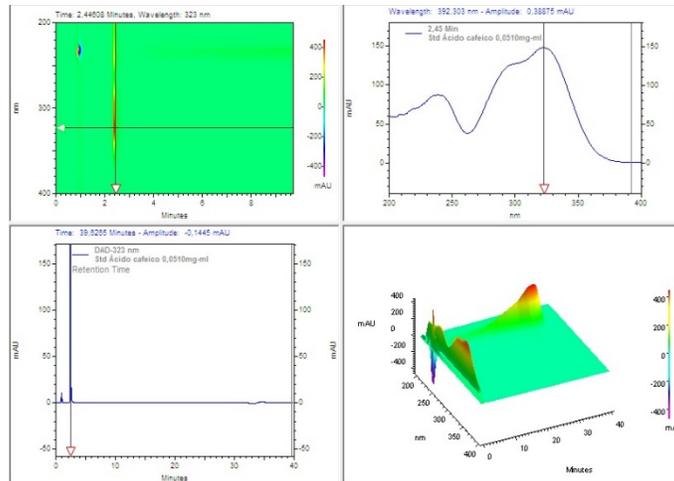


Imagen 23: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra estándar de ácido cafeico. Se observa que el ácido cafeico posee un peak de absorbancia máximo a 323nm y 2,45 minutos.

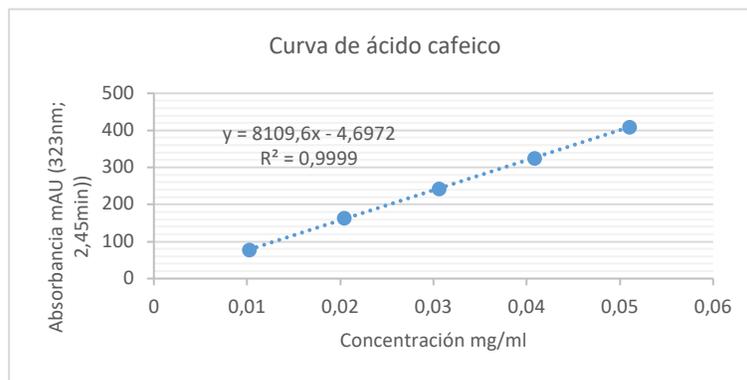


Imagen 24: Curva de calibración obtenida a partir de los resultados de HPLC-DAD para la determinación de ácido cafeico en las muestras de orujos de uva.

Ácido p-coumárico.

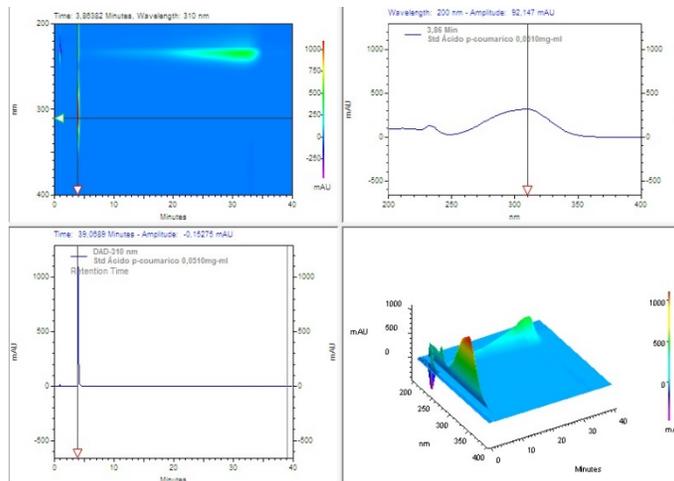


Imagen 25: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra estándar de ácido p-coumárico. Se observa que el ácido p-coumárico posee un peak de absorbancia máximo a 310 nm y 3,86 minutos.

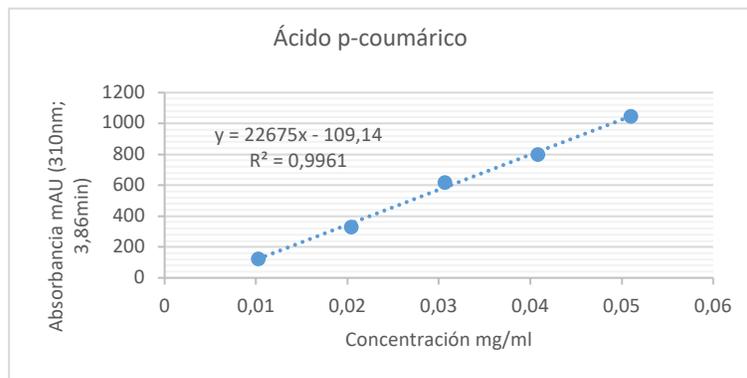


Imagen 26: Curva de calibración obtenida a partir de los resultados de HPLC-DAD para la determinación de ácido p-coumárico en las muestras de orujos de uva.

Curva de Quercetina.

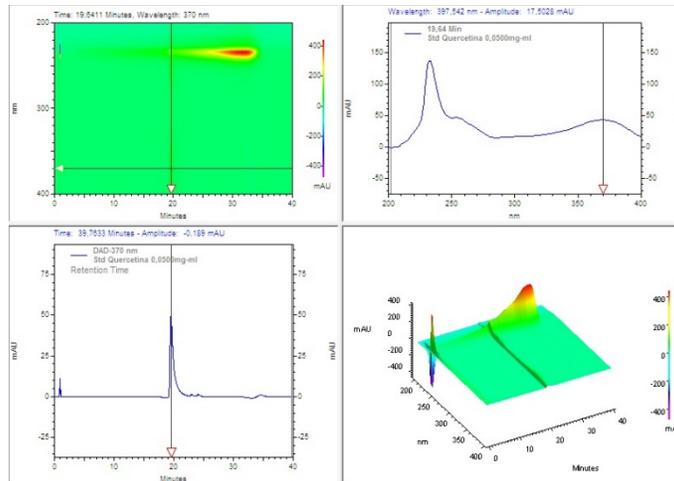


Imagen 27: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD para la muestra estándar de quercetina. Se observa que el quercetina posee un peak de absorbancia máximo a 370 nm y 19,64 minutos.

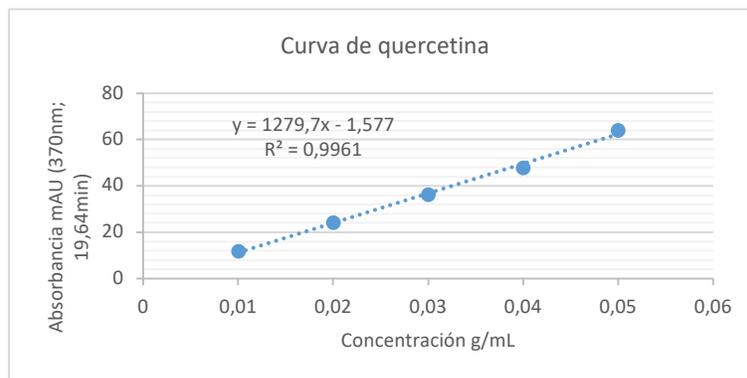


Imagen 28: Curva de calibración obtenida a partir de los resultados de HPLC-DAD para la determinación de quercetina en las muestras de orujos de uva.

2.2.-Análisis de los extractos de polifenoles de orujos de uva.

Imagen 29: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 1-1° extracción.

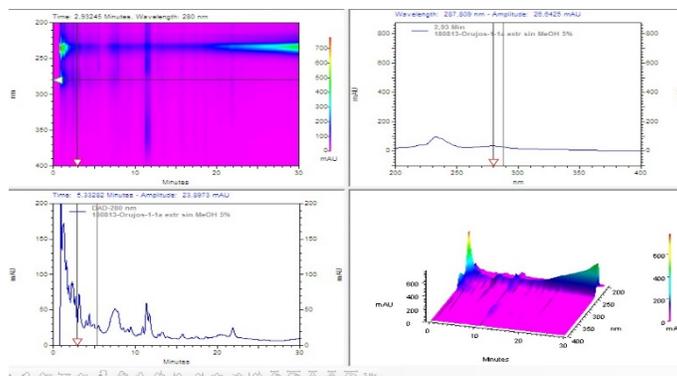


Imagen 30: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 1-2° extracción.

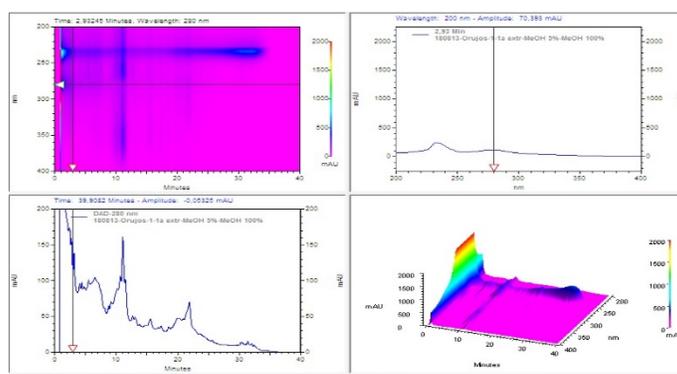


Imagen 31: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 1-3° extracción.

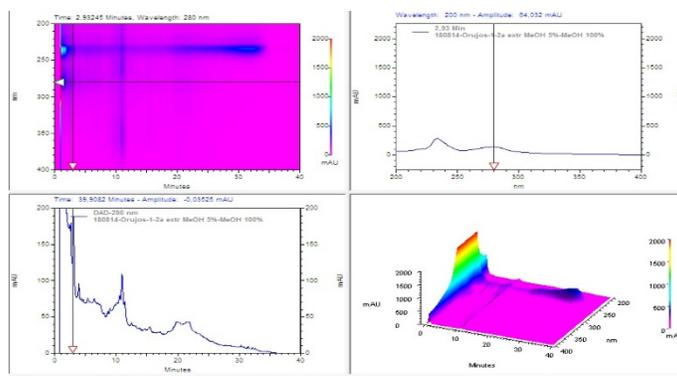


Imagen 32: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 2-1° extracción.

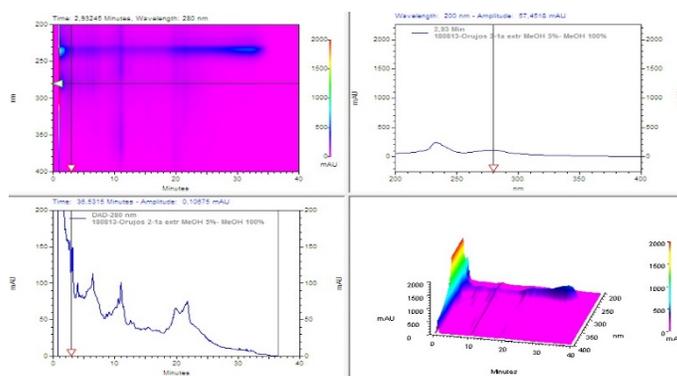


Imagen 33: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 2-2° extracción.

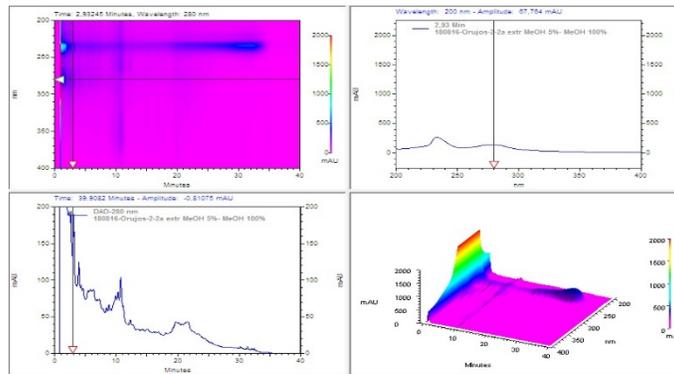


Imagen 34: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 3-1° extracción.

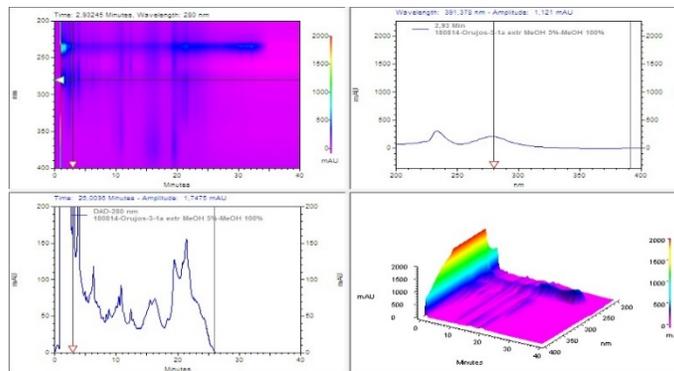


Imagen 35: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 3-2° extracción.

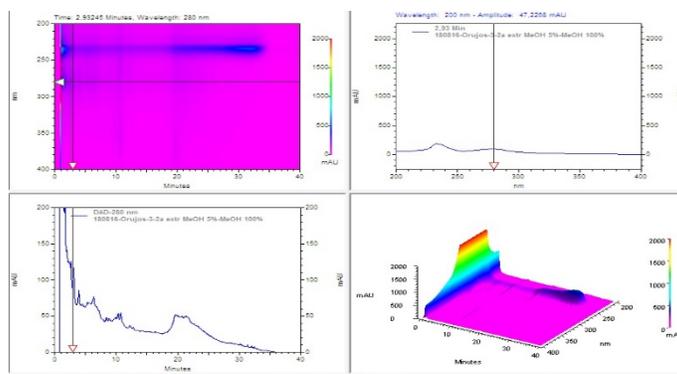


Imagen 36: Resultados HPLC-DAD, Orujos enteros 3-3° extracción.

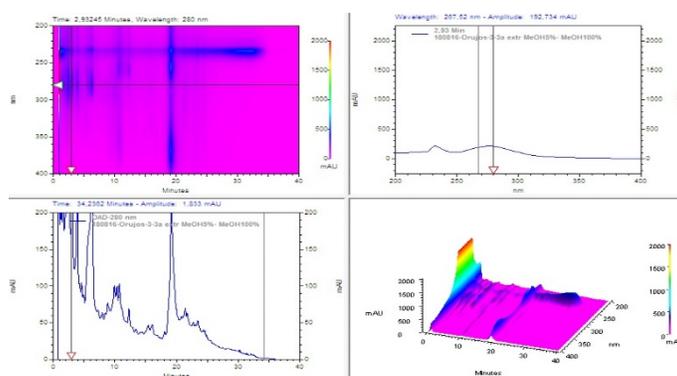


Tabla 10: Determinación de resveratrol a partir de la curva de calibración obtenida por HPLC-DAD, en los extractos de polifenoles de orujo de uva.

Resveratrol

Muestra	Absorbancia mAU (310nm, 11,12min)	Concentración en mg/ml	Concentración en mg/L (Factor de dilución=83,3)	Porcentaje en relación a la muestra preparada de 12mg/ml (%)	Cantidad en 12 mg de extracto polifenolico (mg)	Cantidad total (suma de todas las extracciones) (mg)	Cantidad total en 100mg de extracto polifenolico (mg)
Orujos 1-Primera Extracción	65,9458	0,0264	2199,12	18,33	2,20	9,63	26,75
Orujos 1-Segunda Extracción	170,808	0,0533	4439,89	37,00	4,44		
Orujos 1-Tercera Extracción	102,95	0,0359	2990,47	24,92	2,99		
Orujos 2-Primera Extracción	93,7343	0,0335	2790,55	23,25	2,79	5,68	23,67
Orujos 2-Segunda Extracción	98,3315	0,0347	2890,51	24,09	2,89		
Orujos 3-Primera Extracción	86,865	0,0317	2640,61	22,01	2,64	7,06	19,60
Orujos 3-Segunda Extracción	37,4605	0,019	1582,7	13,19	1,58		
Orujos 3-Tercera Extracción	95,7048	0,034	2832,2	23,60	2,83		

Tabla 11: Determinación de ácido gálico a partir de la curva de calibración obtenida por HPLC-DAD, en los extractos de polifenoles de orujo de uva.

Ácido gálico

Muestra	Absorbancia mAU (270nm, 1,0min)	Concentración en mg/ml	Concentración en mg/L (Factor de dilución=83,3)	Porcentaje en relación a la muestra preparada de 12mg/ml (%)	Cantidad en 12 mg de extracto polifenolico (mg)	Cantidad total (suma de todas las extracciones) (mg)	Cantidad total en 100mg de extracto polifenolico (mg)
Orujos 1-Primera Extracción	241,938	0,0229	1907,57	15,9	1,91	6,10	16,94
Orujos 1-Segunda Extracción	286,464	0,0272	2265,76	18,88	2,27		
Orujos 1-Tercera Extracción	244,218	0,0231	1924,23	16,04	1,92		
Orujos 2-Primera Extracción	545,808	0,052	4331,6	36,1	4,33	6,60	27,49
Orujos 2-Segunda Extracción	286,724	0,0272	2265,76	18,88	2,27		
Orujos 3-Primera Extracción	286,172	0,0271	2257,43	18,81	2,26	6,08	16,89
Orujos 3-Segunda Extracción	273,887	0,026	2165,8	18,05	2,17		
Orujos 3-Tercera Extracción	210,58	0,0199	1657,67	13,81	1,66		

Tabla 12: Determinación de ácido cafeico a partir de la curva de calibración obtenida por HPLC-DAD, en los extractos de polifenoles de orujo de uva.

Ácido cafeico

Muestra	Absorbancia mAU (323nm, 2,45min)	Concentración en mg/ml	Concentración en mg/L (Factor de dilución=83,3)	Porcentaje en relación a la muestra preparada de 12mg/ml (%)	Cantidad en 12 mg de extracto polifenolico (mg)	Cantidad total (suma de todas las extracciones) (mg)	Cantidad total en 100mg de extracto polifenolico (mg)
Orujos 1-Primera Extracción	34,8325	0,0049	408,17	3,4	0,41	1,67	4,65
Orujos 1-Segunda Extracción	68,456	0,009	749,7	6,25	0,75		
Orujos 1-Tercera Extracción	45,1943	0,0062	516,46	4,3	0,52		
Orujos 2-Primera Extracción	46,8555	0,0064	533,12	4,44	0,53	1,20	5,00
Orujos 2-Segunda Extracción	60,0095	0,008	666,4	5,55	0,67		
Orujos 3-Primera Extracción	98,8823	0,0128	1066,24	8,89	1,07	2,26	6,27
Orujos 3-Segunda Extracción	38,7175	0,0054	449,82	3,75	0,45		
Orujos 3-Tercera Extracción	67,444	0,0089	741,37	6,18	0,74		

Tabla 13: Determinación de ácido p-coumárico a partir de la curva de calibración obtenida por HPLC-DAD, en los extractos de polifenoles de orujo de uva.

Ácido p-coumárico

Muestra	Absorbancia mAU (310nm, 3,86min)	Concentración en mg/ml	Concentración en mg/L (Factor de dilución=83,3)	Porcentaje en relación a la muestra preparada de 12mg/ml (%)	Cantidad en 12 mg de extracto polifenolico (mg)	Cantidad total (suma de todas las extracciones) (mg)	Cantidad total en 100mg de extracto polifenolico (mg)
Orujos 1-Primera Extracción	12,631	0,0054	449,82	3,75	0,45	1,47	4,07
Orujos 1-Segunda Extracción	25,888	0,006	499,8	4,17	0,50		
Orujos 1-Tercera Extracción	31,2015	0,0062	516,46	4,3	0,52		
Orujos 2-Primera Extracción	24,1283	0,0059	491,47	4,1	0,49	1,04	4,34
Orujos 2-Segunda Extracción	40,223	0,0066	549,78	4,58	0,55		
Orujos 3-Primera Extracción	81,0225	0,0084	699,72	5,83	0,70	1,94	5,39
Orujos 3-Segunda Extracción	27,752	0,006	499,8	4,17	0,50		
Orujos 3-Tercera Extracción	93,258	0,0089	741,37	6,18	0,74		

Tabla 14: Determinación de quercetina a partir de la curva de calibración obtenida por HPLC-DAD, en los extractos de polifenoles de orujo de uva.

Quercetina

Muestra	Absorbancia mAU (370nm, 19,64min)	Concentración en mg/ml	Concentración en mg/L (Factor de dilución=83,3)	Porcentaje en relación a la muestra preparada de 12mg/ml (%)	Cantidad en 12 mg de extracto polifenolico (mg)	Cantidad total (suma de todas las extracciones) (mg)	Cantidad total en 100mg de extracto polifenolico (mg)
Orujos 1-Primera Extracción	1,7473	0	0	0	0,00	1,12	3,10
Orujos 1-Segunda Extracción	9,2325	0,006	499,8	4,17	0,50		
Orujos 1-Tercera Extracción	10,4185	0,0074	616,42	5,14	0,62		
Orujos 2-Primera Extracción	29,19	0,029	2415,7	20,13	2,42	3,51	14,65
Orujos 2-Segunda Extracción	15,4285	0,0132	1099,56	9,16	1,10		
Orujos 3-Primera Extracción	21,26	0,0182	1516,06	12,63	1,52	6,05	16,80
Orujos 3-Segunda Extracción	30,0573	0,03	2499	20,83	2,50		
Orujos 3-Tercera Extracción	24,44	0,0244	2032,52	16,94	2,03		

3.-Optimización del método de separación de polifenoles desde extracto de orujos.

3.1.-Parámetro Concentración.

Se prepararon 3 disoluciones de extractos de polifenoles en MeOH al 100% grado HPLC a diferentes concentraciones (50mg/ml, 100mg/ml y 200mg/ml) con el objetivo de determinar la concentración

óptima de muestra para ser analizada y separada mediante cromatografía HPLC-DAD semipreparativa como se muestra en las siguientes imágenes.

Espectro de absorbancias a 50mg/ml:

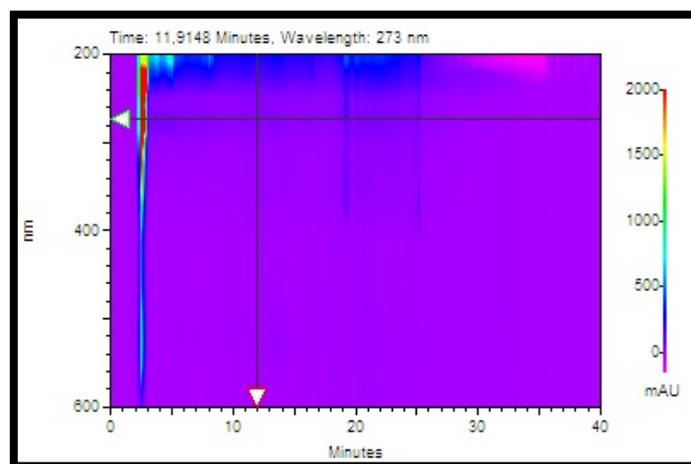


Imagen 37: Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 50mg/ml. El espectro entrega curvas de nivel, cuyos colores (de frío a cálido) dan una idea de la presencia de algún compuesto que absorbe a una cierta longitud de onda a un tiempo determinado, observándose una mayor intensidad entre 2 y 3 minutos de la corrida cromatográfica.

Espectro de absorbancias a 100mg/ml:

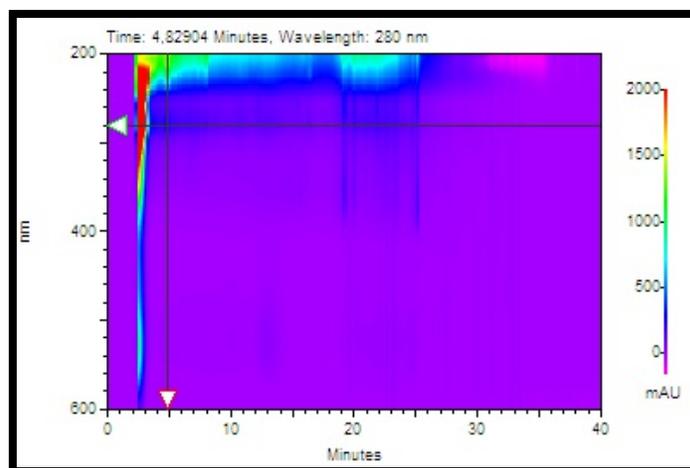


Imagen 38: Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 100mg/ml. El espectro entrega curvas de nivel, cuyos colores (de frío a cálido) dan una idea de la presencia de algún compuesto que absorbe a una cierta longitud de onda a un tiempo determinado, observándose un aumento de la intensidad de señal a lo largo de la corrida cromatográfica en comparación con la muestra de 50mg/ml.

Espectro de absorbancias a 200mg/ml:

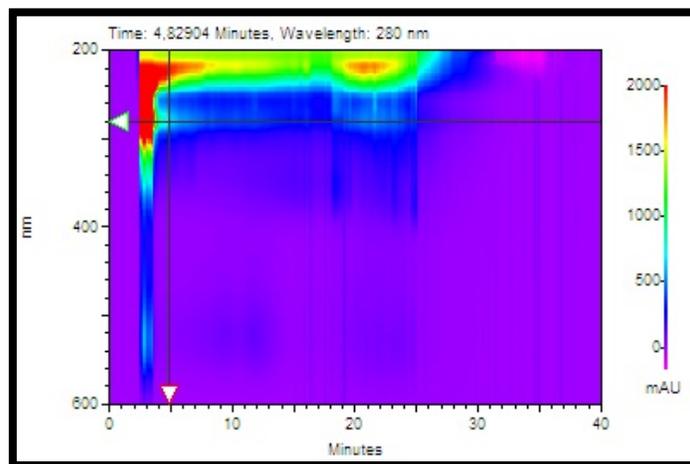


Imagen 39: Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 200mg/ml. El espectro entrega curvas de nivel, cuyos colores (de frío a cálido) dan una idea de la presencia de algún compuesto que absorbe a una cierta longitud de onda a un tiempo determinado, observándose un aumento de la intensidad y resolución de señal a lo largo de la corrida cromatográfica en comparación con la muestra de 50mg/ml y 100mg/ml.

En conclusión, se observó que una disolución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml presenta una mejor resolución e intensidad de señal de peaks cromatográficos,

facilitando de esta forma su identificación y posterior separación de los peaks a los diferentes tiempos de retención.

3.2.-Parámetro Flujo.

Se preparó una disolución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml en MeOH al 100% grado HPLC y se corrió a un flujo de 2.5 ml/min y posteriormente a un flujo 3.0 ml/min como se observa en las siguientes imágenes:

Espectro de absorbancias a Concentración 200mg/ml – Flujo 2.5ml/min:

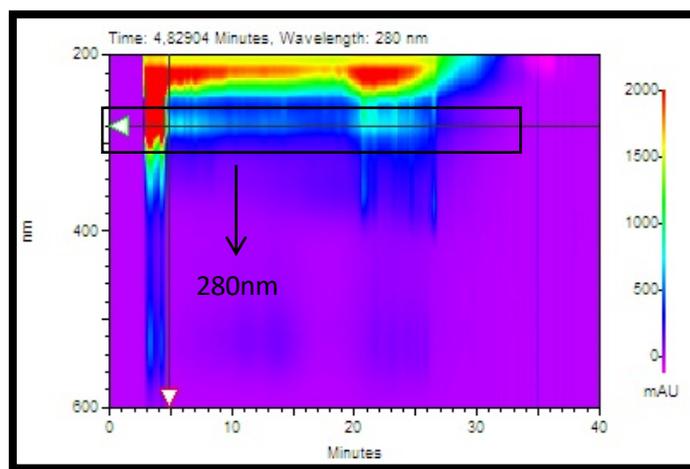


Imagen 40: Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 200mg/ml y un flujo de 2.5ml/min. Se observa a 280nm una agrupación de compuestos a los largo de la corrida cromatográfica.

Espectro de absorbancias a Concentración 200mg/ml - Flujo 3.0ml/min:

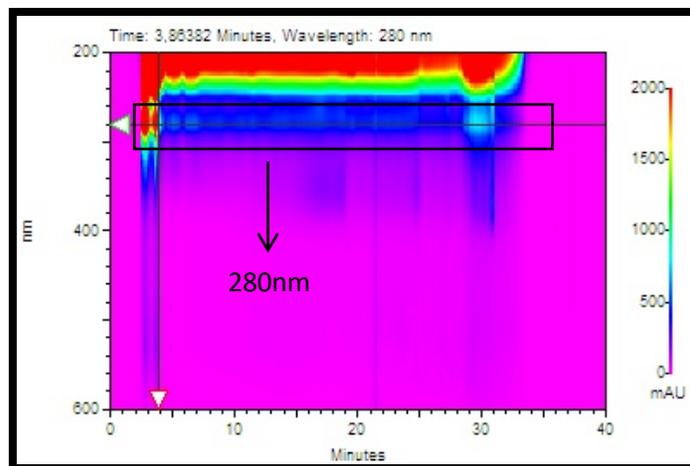


Imagen 41: Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 200mg/ml y un flujo de 3.0ml/min. Se observa una mejor resolución de las curvas de nivel a 280nm.

Se observó que a un flujo de 3.0 ml/min de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml presenta una mejor resolución de peaks cromatográficos, facilitando de esta forma su identificación y posterior separación de los peaks a los diferentes tiempos de retención.

3.3.-Parámetro Gradiente.

Se preparó una disolución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml de MeOH al 100% grado HPLC y se corrió a un flujo de 3.0 ml/min de dos gradientes de fase móvil diferentes (Gradiente 1 y Gradiente 2) como se observa en las siguientes tablas:

Tabla 15: Gradiente 1.

Tiempo (min)	A: MeOH/H₂O, 10/90, v/v	B: MeOH/H₂O, 90/10, v/v
0	100	0
15	85	15
25	50	50
28	30	70
30	30	70
32	100	0
40	100	0

Tabla 16: Gradiente 2.

Tiempo (min)	A: MeOH/H₂O, 10/90, v/v	B: MeOH/H₂O, 90/10, v/v
0	100	0
15	85	15
25	75	25
28	55	45
30	35	65
32	100	0
40	100	0

Espectro de absorbancias a Gradiente 1:

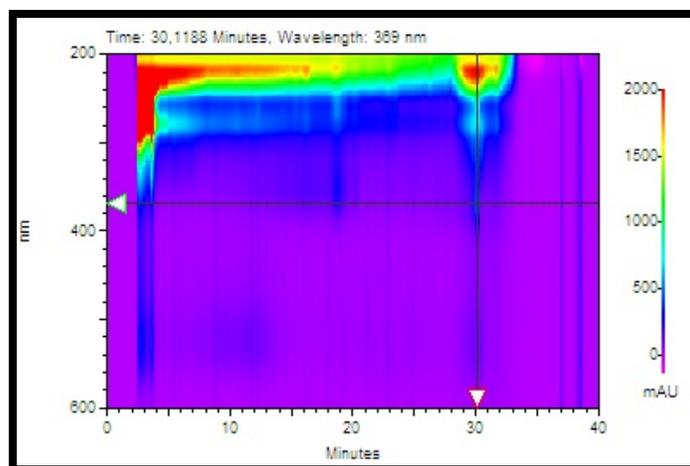


Imagen 42: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 200mg/ml y un flujo de 3.0ml/min para el Gradiente 1.

Espectro de absorancias a Gradiente 2:

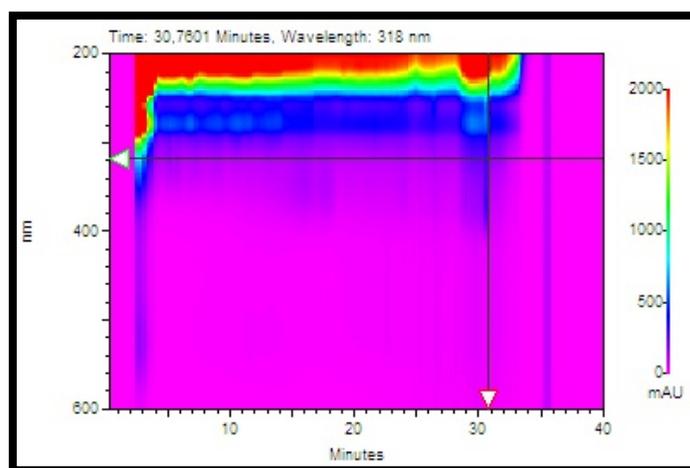


Imagen 43: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de extracto de polifenoles en MeOH al 100% a una concentración de 200mg/ml y un flujo de 3.0ml/min para el Gradiente 2.

Se observó en el Gradiente 2 una mejor separación e identificación de peaks a lo largo de la corrida cromatográfica, como se observa en el cuadro negro de la Imagen 7.

4.- Separación de polifenoles de orujos de uva por cromatografía HPLC-DAD preparativa.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo:
 - Bomba Hitachi L-2130, seteado a un flujo de 3.0 ml/min.
 - Horno para columna Hitachi L-2300, seteado a una temperatura de 40°C.
 - Detector DAD Hitachi L-2455, seteado a un rango de longitud de onda de 200-600nm.
 - Software de adquisición de datos: EZChrom Elite.
- Columna HPLC:
 - Chromolith SemiPrep RP-18e, 100-10mm.
 - Columna guardian Chromolith SemiPrep RP-18e, 10-10mm
- Fase Móvil:
 - A: Metanol / Agua, 10:90, v/v.
 - B: Metanol/ Agua, 90:10, v/v.
- Gradiente:
 - 0min: 100% A
 - 15min: 85% A, 15% B
 - 25min: 75% A, 25% B
 - 28min: 55% A, 45% B
 - 30min: 35% A, 65% B
 - 32min: 100%A
 - 40min:100% A

4.1.- Preparación e inyección de las muestras.

Se preparó una solución de 45ml de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml con MeOH al 100% grado HPLC y se filtra en filtro de 0,45µm para eliminar posibles partículas en suspensión.

La muestra es inyectada en equipo HPLC-DAD con columna semipreparativa, en volúmenes 0,5ml por inyección. Se realizó un total de 86 inyecciones de solución de extracto de polifenoles con un tiempo de corrida de 40 minutos cada una frente a un blanco de metanol al 100% grado HPLC.

Espectro de absorbancias de muestra blanco de MeOH al 100% grado HPLC:

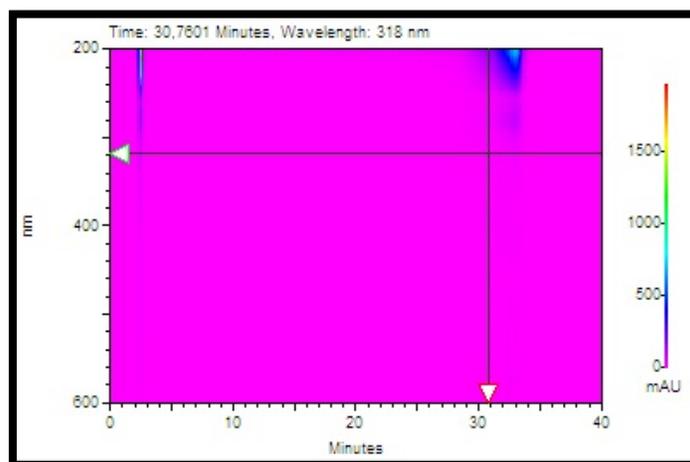


Imagen 44: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra blanco de metanol (MeOH) al 100%.

Espectro de absorbancias de muestra de extracto de polifenoles:

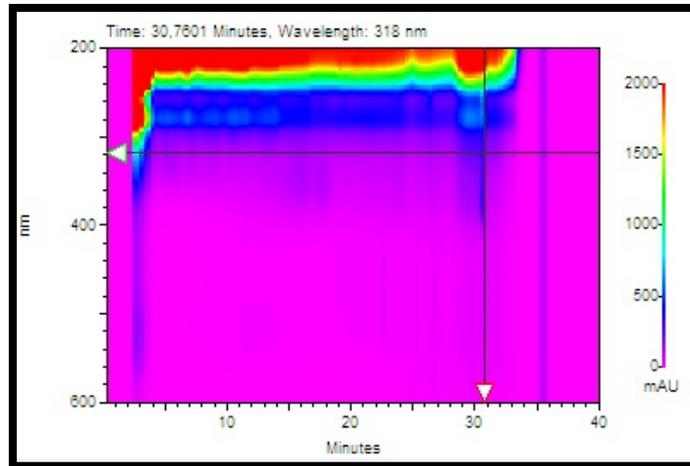


Imagen 45: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-preparativa para la muestra de solución de extracto de polifenoles a una concentración de 200mg/ml con un tiempo de corrida de 40 minutos

En total se separaron 20 extractos de polifenoles de acuerdo a los peak cromatograficos observados a diferentes tiempos de retención, los que posteriormente fueron concentrados y llevados a sequedad en sistema de evaporación de solvente RapidVap LABCONCO.

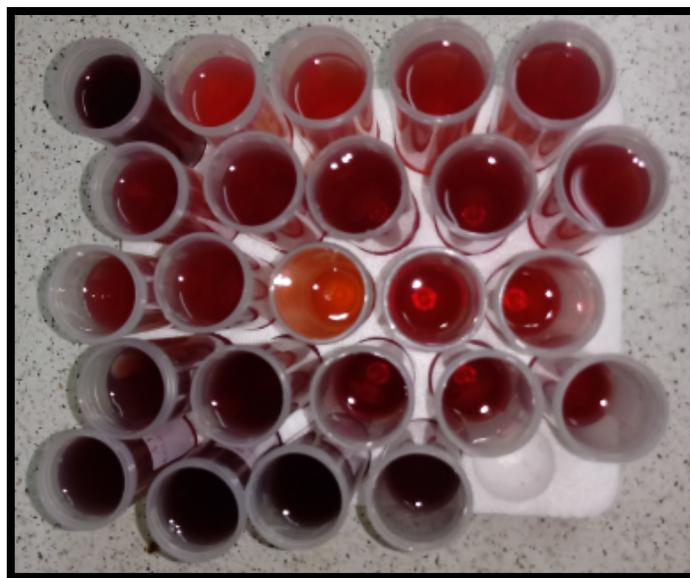


Imagen 46: Fracciones de extractos de polifenoles separados mediante cromatografía HPLC-preparativa. Se puede apreciar diferencias en la intensidad de color de los diferentes extractos, lo que indica diferencias en la concentración y peso molecular de los diferentes polifenoles presentes en la muestra.

4.2.- Secado de fracciones de polifenoles aislados.

Las fracciones de polifenoles separadas en equipo HPLC-DAD mediante la columna Chromolith SemiPrep RP-18e, 100-10mm, son concentradas y llevadas a sequedad en un sistema de evaporación de solvente RapidVap LABCONCO.



Imagen 47: Sistema de evaporación RapidVap LABCONCO.

Las fracciones de polifenoles secas son pesadas en balanza analítica para determinar el rendimiento de cada extracto y posteriormente fueron analizadas y mediante cromatografía HPLC-DAD analítica con columna Chromolith RP-18e, 100-3mm.

4.2.1.- Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles de orujos enteros obtenidos post secado.

Tabla 17: Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles puros a partir de los extractos de polifenoles totales desde orujos enteros obtenidos post secado.

Polifenoles orujos enteros (8,6g de extracto en 43ml MeOH)		
Fración de Polifenoles separada	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
1	2,0030	23,2907
2	0,2387	2,7756
3	0,2211	2,5709
4	0,3220	3,7442
5	0,1963	2,2826
6	0,2093	2,4337
7	0,3154	3,6674
8	0,1056	1,2279
9	0,3464	4,0279
10	0,0817	0,9500
11	0,1893	2,2012
12	0,1944	2,2605
13	0,3556	4,1349
14	0,1277	1,4849
15	0,1201	1,3965
16	0,1705	1,9826
17	0,1905	2,2151
18	0,3066	3,5651
19	0,2100	2,4419
20	0,2646	3,0767

4.2.2.- Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles de orujos molidos obtenidos post secado.

Tabla 18: Tabla de cantidad y rendimiento de extractos de polifenoles de orujos molidos obtenidos post secado.

Polifenoles orujos molidos (4,5g de extracto en 22,5ml MeOH)		
Fracción de Polifenoles separada	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
1	0,6279	13,9533
2	0,0811	1,8022
3	0,0277	0,6156
4	0,0137	0,3044
5	0,0409	0,9089
6	0,0245	0,5444
7	0,0142	0,3156
8	0,0323	0,7178
9	0,0500	1,1111
10	0,0330	0,7333
11	0,0585	1,3000
12	0,0391	0,8689
13	0,0544	1,2089
14	0,0444	0,9867
15	0,0334	0,7422
16	0,0485	1,0778
17	0,0328	0,7289
18	0,0297	0,6600
19	0,0609	1,3533
20	0,0401	0,8911
21	0,0309	0,6867
22	0,2607	5,7933
23	0,1082	2,4044
24	0,1462	3,2489

5.- Análisis de polifenoles de orujos enteros separados mediante cromatografía HPLC-DAD analítica.

Condiciones cromatográficas:

- Equipo:
 - Bomba Hitachi L-2130, seteado a un flujo de 1ml/min.
 - Horno para columna Hitachi L-2300, seteado a una temperatura de 40°C.
 - Detector DAD Hitachi L-2455, seteado a un rango de longitud de onda de 200-400nm.
 - Software de adquisición de datos: EZChrom Elite.
- Columna:
 - Chromolith RP-18e, 100-3mm.
- Fase Móvil:
 - A: Metanol/Ácido acético/ Agua, 10:2:88, v/v/v.
 - B: Metanol/Ácido acético/ Agua, 90:2:8, v/v/v.
- Gradiente:
 - 0min: 100% A
 - 15min: 85% A, 15% B
 - 25min: 50% A, 50% B
 - 28min: 30% A, 70% B
 - 30min: 100% A
 - 40min: 100% A

5.1.1.- Tabla resumen de extractos de polifenoles de orujos enteros separados.

Tabla 19: Tabla resumen de extractos de polifenoles de orujos enteros separados.

Polifenoles de Orujos Enteros					
Extracto de Polifenoles separados	Concentración (g/ml MeOH)	Tiempo de Retención (min)	Longitud de onda λ (nm) y compuesto antioxidante.	Unidades de absorbancia (mAU)	Porcentaje de compuesto antioxidante (%)
1	0,015	1,39	278 (Compuesto fenólico)	336,17	54,56
		1,85	279 (Compuesto fenólico)	279,94	45,44
2	0,0134	1,39	279 (Compuesto fenólico)	444,01	36,59
		1,83	279 (Compuesto fenólico)	471,26	38,83
		2,6	284 (Flavanol)	173,77	14,32
		3,08	284 (Flavanol)	124,58	10,27
3	0,016	1,73	279 (Compuesto fenólico)	606,15	34,86
		2,1	281 (Flavanol)	333,19	19,16
		2,54	281 (Flavanol)	318,38	18,31
		2,83	284 (Flavanol)	273,78	15,75
		3,28	281 (Flavanol)	207,18	11,92
4	0,0153	2,51	281 (Flavanol)	537,62	32,87
		2,75	283 (Flavanol)	471,85	28,85
		3,25	278 (Compuesto fenólico)	408,88	25,00
		4,13	278 (Compuesto fenólico)	217,42	13,29
5	0,0149	2,75	282 (Flavanol)	518,12	36,79
		3,25	277 (Compuesto fenólico)	505,03	35,86
		4,13	277 (Compuesto fenólico)	329,25	23,38
		11,96	353 (Ácido hidroxinámico)	55,76	3,96
6	0,0148	2,78	280 (Flavanol)	372,73	29,09
		3,27	279 (Compuesto fenólico)	430,03	33,56
		4,14	277 (Compuesto fenólico)	384,93	30,04
		11,81	353 (Ácido hidroxinámico)	93,77	7,32
7	0,0126	4,11	275 (Compuesto fenólico)	439,43	49,08
		5,02	278 (Compuesto fenólico)	269,79	30,13
		11,46	352 (Ácido hidroxinámico)	186,18	20,79
8	0,016	4,08	273 (Compuesto fenólico)	489,47	34,48
		5,63	262 (Compuesto fenólico)	368,61	25,97
		6,52	278 (Compuesto fenólico)	272,81	19,22
		11,37	353 (Ácido hidroxinámico)	288,65	20,33
9	0,0169	4,07	273 (Compuesto fenólico)	486,88	23,32
		5,62	261 (Compuesto fenólico)	377,2	18,07

		11,37	353 (Ácido hidroxinámico)	275,97	13,22
		6,56	279 (Compuesto fenólico)	375,28	17,97
		11,28	353 (Ácido hidroxinámico)	572,48	27,42
10	0,0158	5,65	262 (Compuesto fenólico)	439,61	22,20
		6,55	280 (Flavanol)	408,54	20,63
		10,08	353 (Ácido hidroxinámico)	294,82	14,89
		11,16	353 (Ácido hidroxinámico)	837,29	42,28
11	0,0148	6,54	277 (Compuesto fenólico)	176,84	19,99
		10,05	353 (Ácido hidroxinámico)	181,22	20,49
		11,24	353 (Ácido hidroxinámico)	526,52	59,52
12	0,015	6,52	280 (Flavanoles)	468,34	55,61
		11,3	353 (Ácido hidroxinámico)	373,82	44,39
13	0,0155	6,53	281 (Flavanol)	226,4	20,87
		9,25	283 (Flavanol)	234,37	21,60
		10,85	269 (Compuesto fenólico)	281,21	25,92
		11,69	353 (Ácido hidroxinámico)	255,27	23,53
		15,56	343 (Ácido hidroxinámico)	87,8	8,09
14	0,0152	11,96	353 (Ácido hidroxinámico)	212,8	78,88
		13,67	509 (Antocianina)	56,97	21,12
15	0,0151	11,89	353 (Ácido hidroxinámico)	490,47	49,83
		13,01	260 (Compuesto fenólico)	493,91	50,17
16	0,0152	11,94	353 (Ácido hidroxinámico)	175,94	34,20
		13,04	261 (Compuesto fenólico)	338,47	65,80
17	0,0158	12,99	261 (Compuesto fenólico)	598,03	37,69
		16,09	267 (Compuesto fenólico)	228,02	14,37
		17,72	351 (Ácido hidroxinámico)	142,43	8,98
		18,85	351 (Ácido hidroxinámico)	141,83	8,94
		20,21	276 (Compuesto fenólico)	259,06	16,33
		21,93	280 (Flavanol)	217,28	13,69
18	0,0149	16,05	267 (Compuesto fenólico)	136,85	49,70
		17,65	353 (Ácido hidroxinámico)	138,5	7,00
		18,81	354 (Ácido hidroxinámico)	148,63	7,52
		19,72	368 (Flavonol)	460,89	23,31
		21,17	282 (Flavanol)	430,94	21,79
		21,85	531 (Antocianina)	153,59	7,77
		21,85	281 (Flavanol)	508,13	25,70
19	0,0148	19,49	256 (Compuesto fenólico)	1078,79	41,54
		19,49	368 (Flavonol)	1002,72	38,61
		21,75	307 (Estilbenoide)	515,65	19,85
20	0,015	19,81	255 (Compuesto fenólico)	166,05	21,90

		19,81	369 (Flavonol)	142,84	18,84
		23,47	272 (Compuesto fenólico)	343,68	45,33
		23,47	506 (Antocianina)	105,68	13,94

Las imágenes de los espectros de los extractos obtenidos y descritos en esta tabla se observan en el punto 5.1.2 de este informe.

5.1.2.- Espectros de absorción obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD analítica de extractos de polifenoles separados mediante cromatografía HPLC-DAD preparativa desde orujos enteros.

1

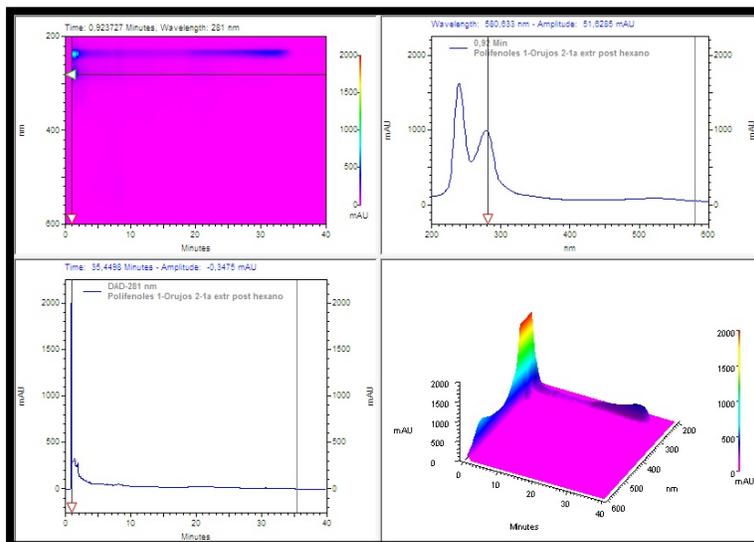


Imagen 48: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 1 de orujos enteros. El máximo de absorción se encuentra a 278nm con 336,17mAU a un tiempo de retención de 1,39 minutos.

2

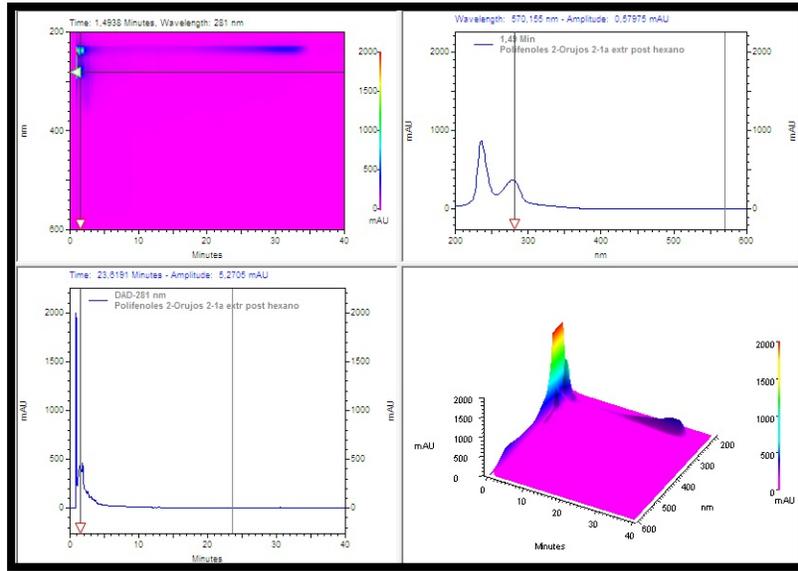


Imagen 49: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 2 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 279nm con 471,26mAU a un tiempo de retención de 1,83 minutos.

3

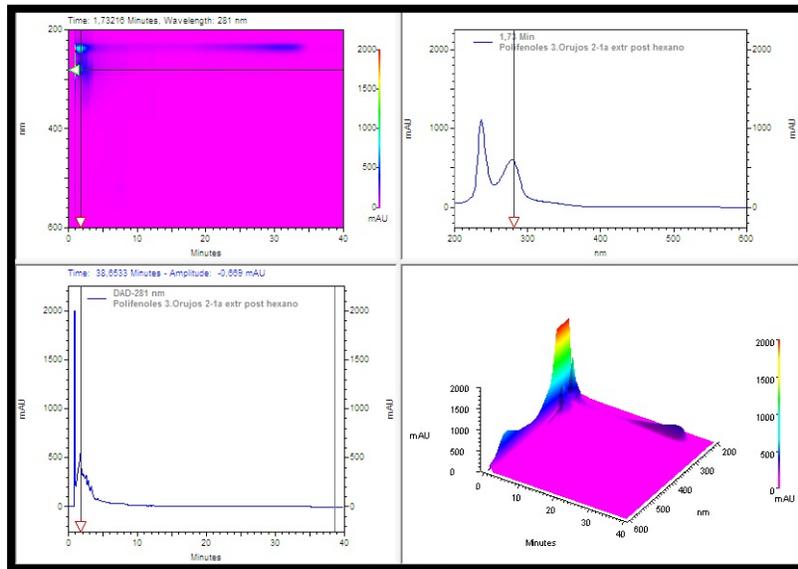


Imagen 50: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 3 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 279nm con 606mAU a un tiempo de retención de 1,73 minutos.

4

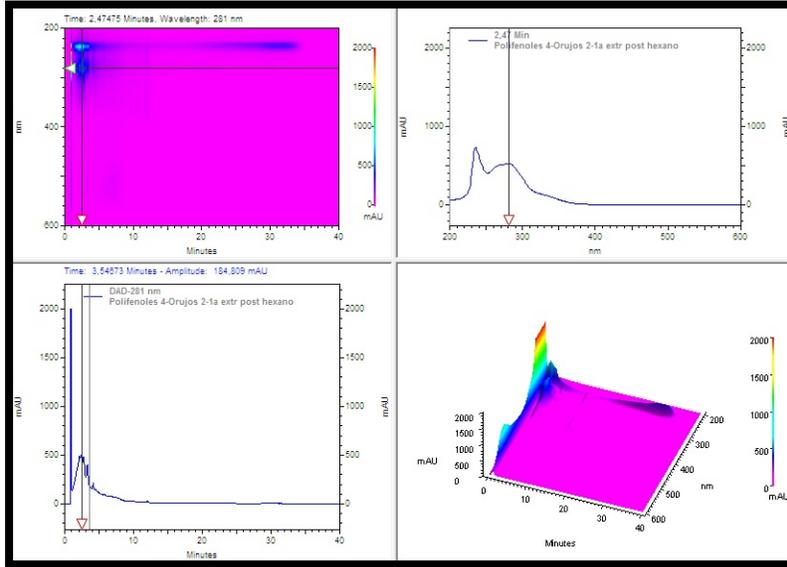


Imagen 51: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 4 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 281nm con 537,62mAU a un tiempo de retención de 2,51 minutos.

5

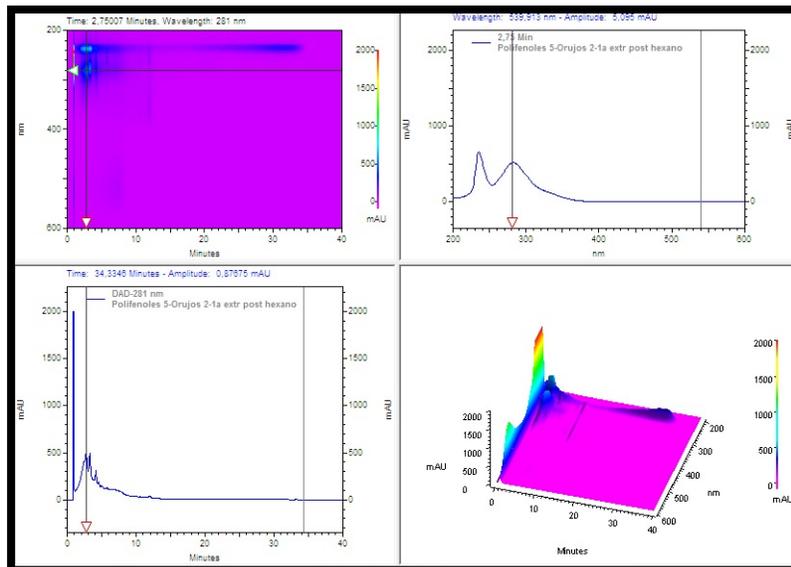


Imagen 52: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 5 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 282nm con 518,12mAU a un tiempo de retención de 2,75 minutos.

6

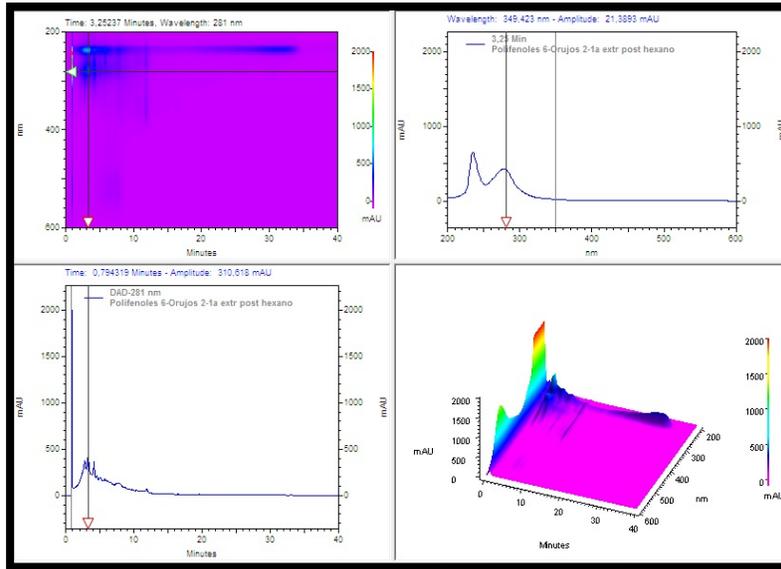


Imagen 53: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 6 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 279nm con 430,03mAU a un tiempo de retención de 3,27 minutos.

7

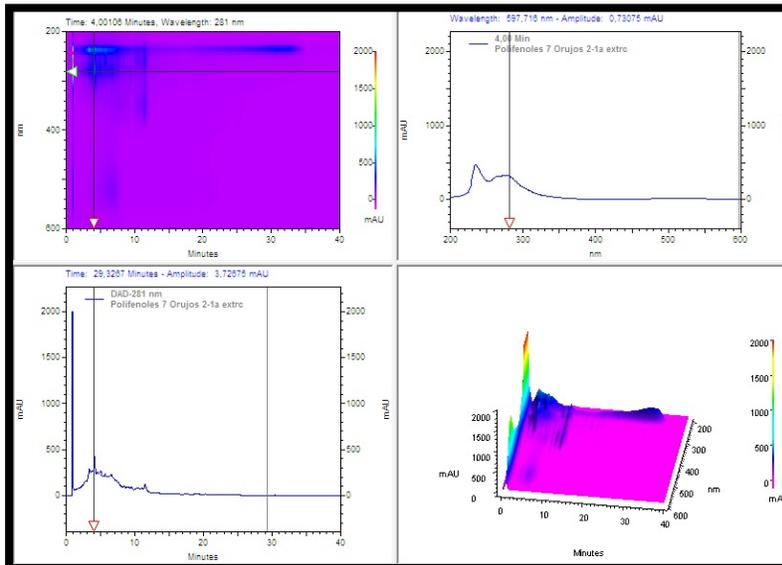


Imagen 54: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 7 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 275nm con 439,43mAU a un tiempo de retención de 4,11 minutos.

8

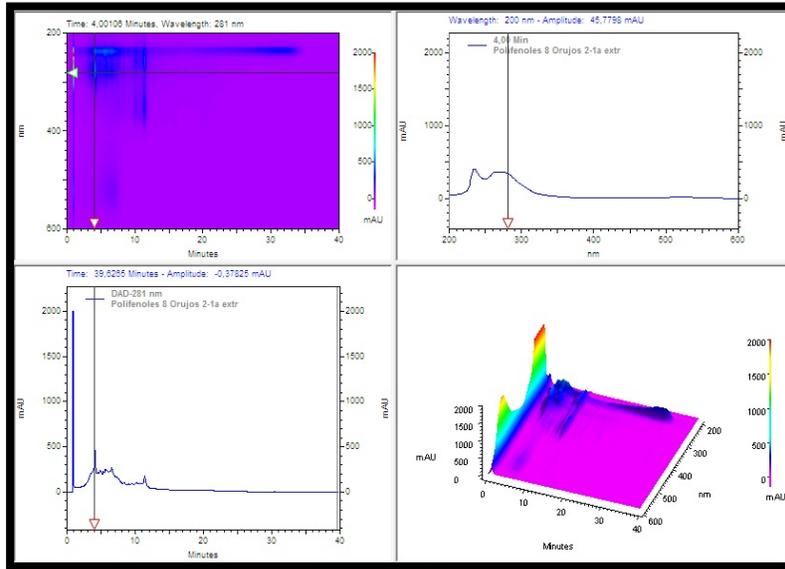


Imagen 55: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 8 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 273nm con 489,47mAU a un tiempo de retención de 4,08 minutos.

9

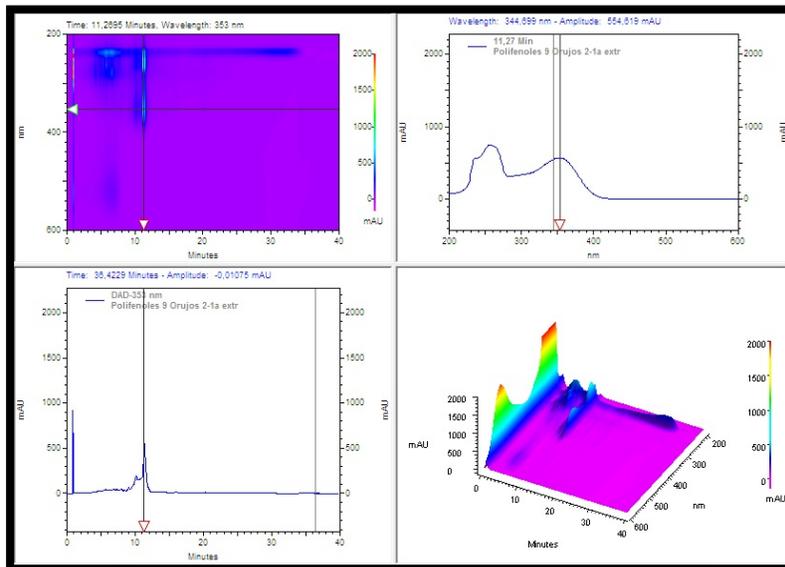


Imagen 56: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 9 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 353nm con 572,48mAU a un tiempo de retención de 11,28 minutos.

10

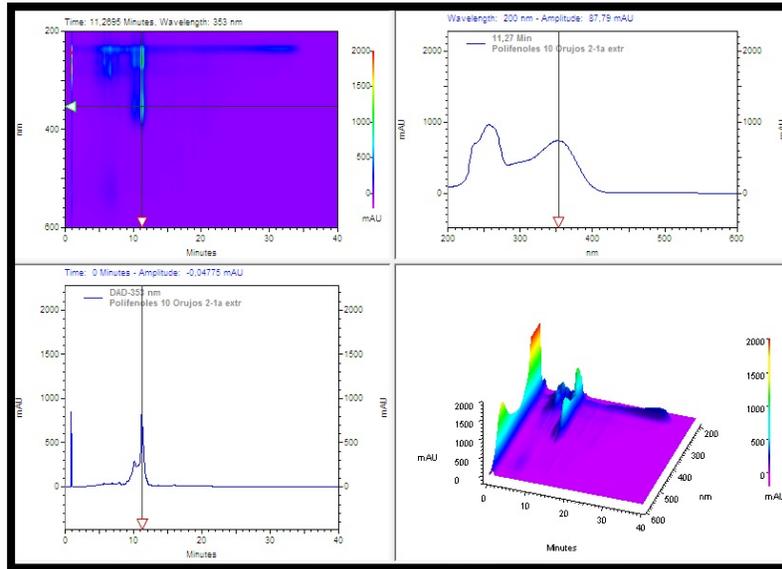


Imagen 57: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 10 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 353nm con 837,29mAU a un tiempo de retención de 11,16 minutos.

11

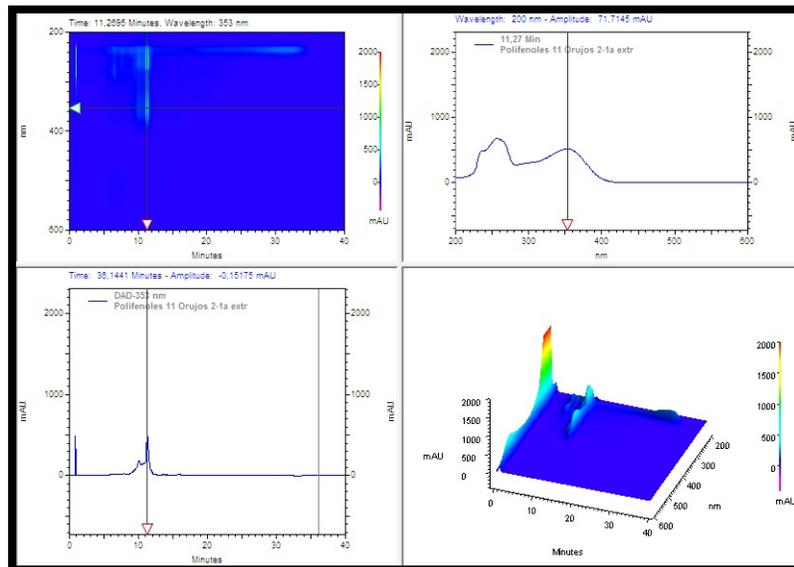


Imagen 58: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 11 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 353nm con 526,52mAU a un tiempo de retención de 11,24 minutos.

12

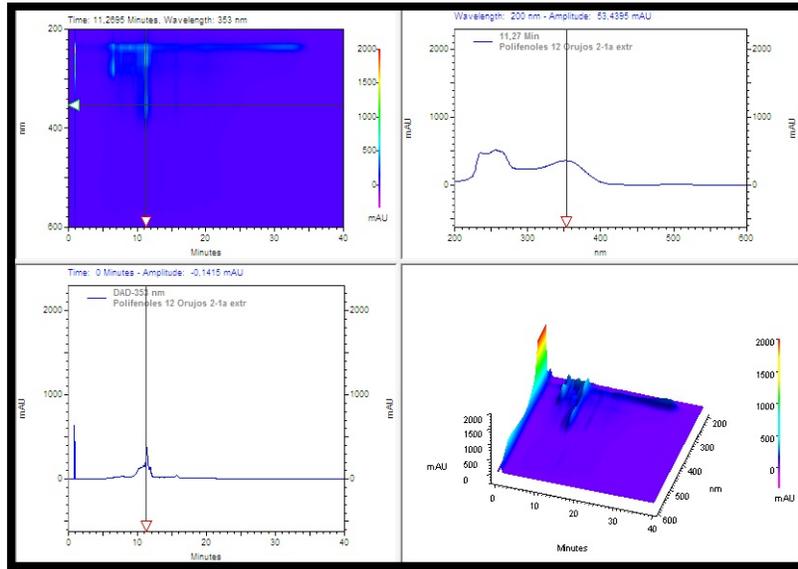


Imagen 59: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 12 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 280nm con 468,34mAU a un tiempo de retención de 6,52 minutos.

13

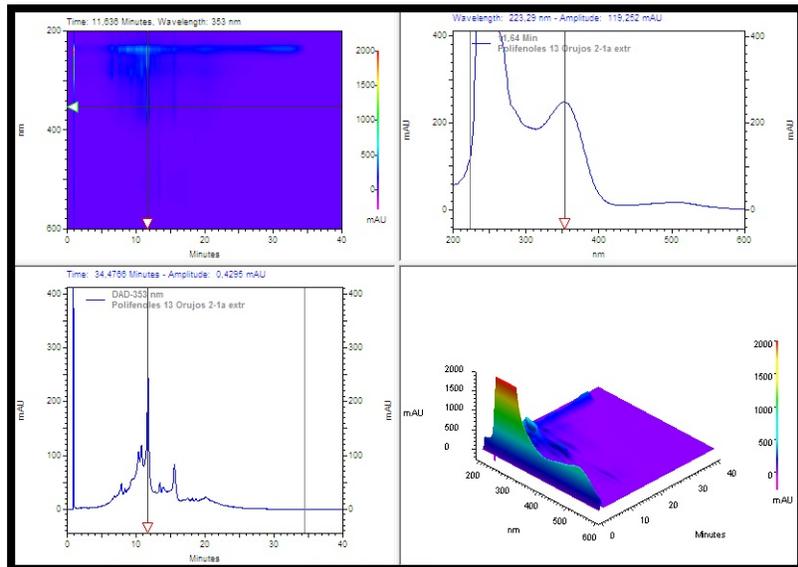


Imagen 60: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 13 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 269nm con 281,21mAU a un tiempo de retención de 10,85 minutos.

14

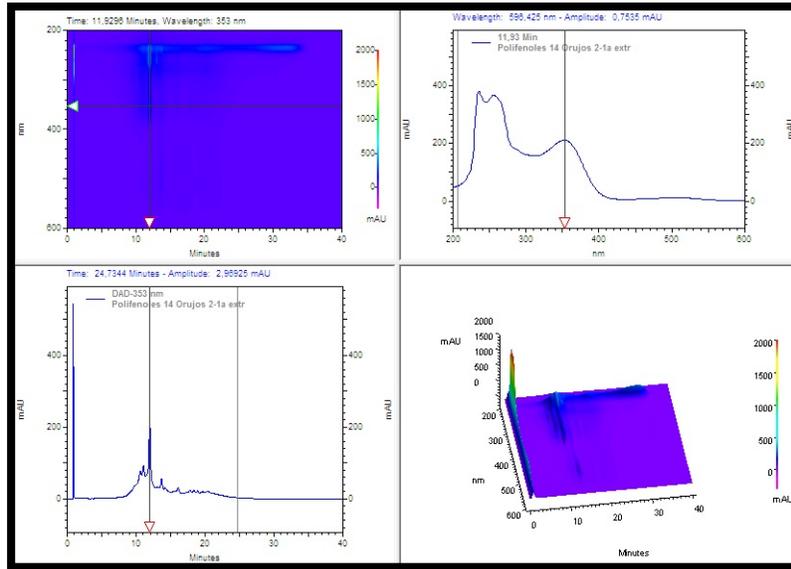


Imagen 61: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 14 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 353nm con 212,80mAU a un tiempo de retención de 11,96 minutos.

15

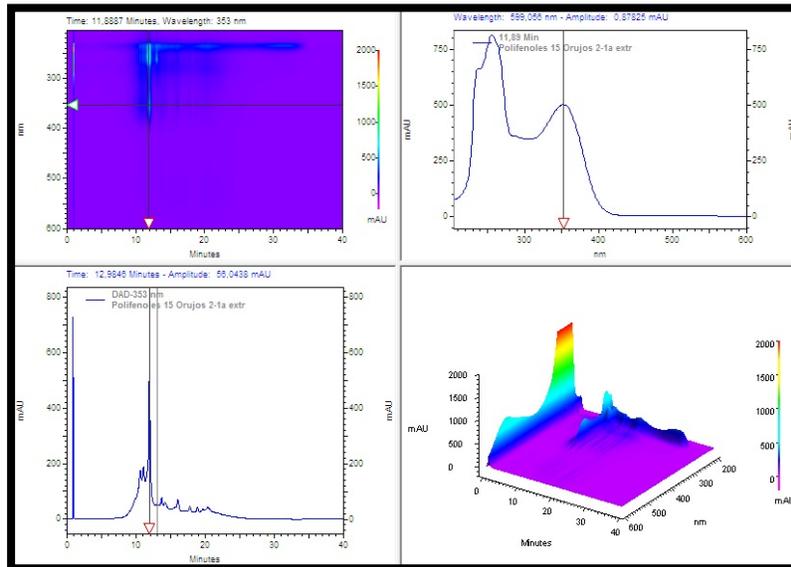


Imagen 62: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 15 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 260nm con 493,91mAU a un tiempo de retención de 13,01 minutos.

16

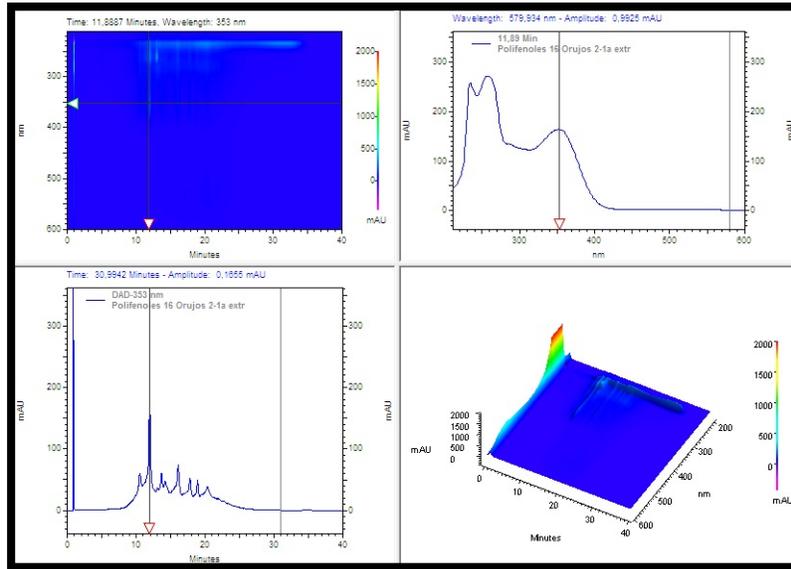


Imagen 63: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 16 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 261nm con 338,47mAU a un tiempo de retención de 13,04 minutos.

17

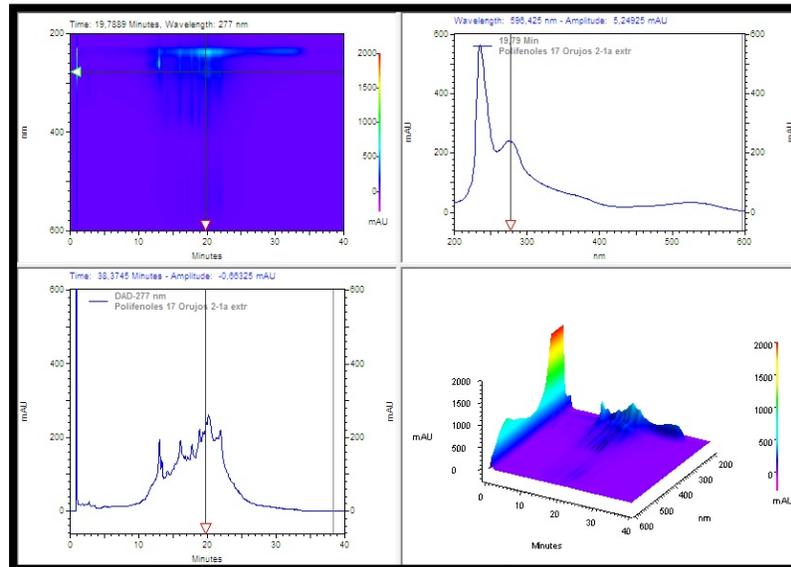


Imagen 64: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 17 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 261nm con 598,03mAU a un tiempo de retención de 12,99 minutos.

18

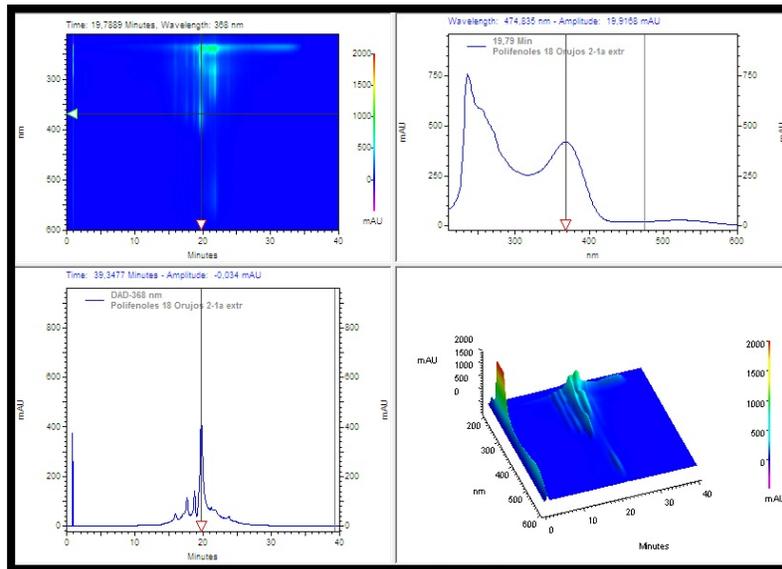


Imagen 65: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 18 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 282nm con 430,94mAU y 531nm con 153,59mAU a un tiempo de retención de 21,85 minutos.

19

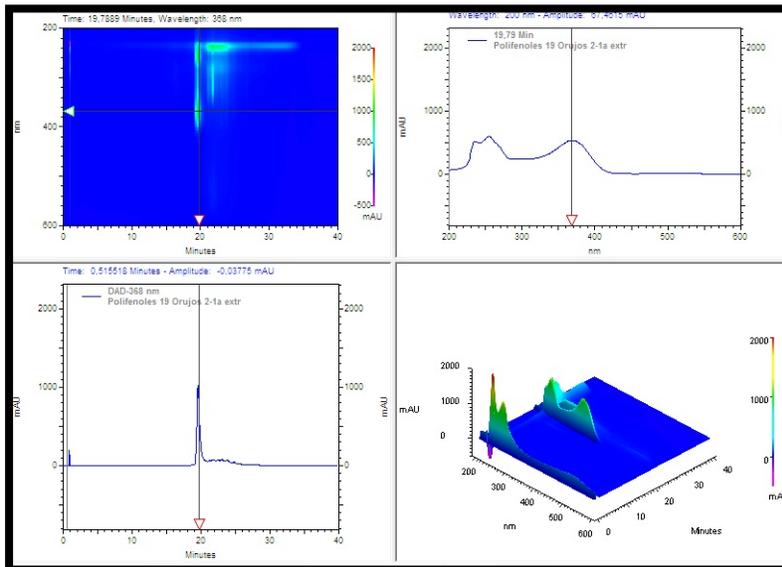


Imagen 66: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 19 de orujos enteros. El máximo de absorbanza se encuentra a 256nm con 1078,79mAU y 368nm con 1002,72mAU a un tiempo de retención de 11,28 minutos.

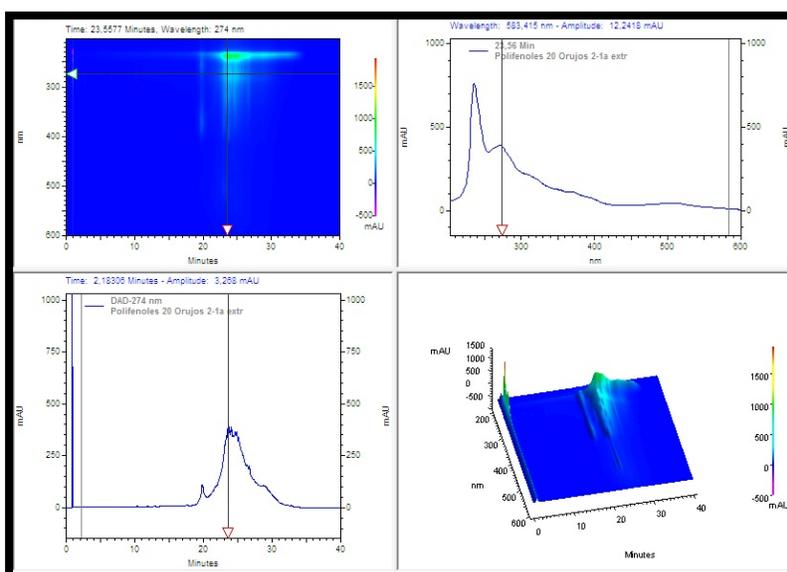


Imagen 67: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 20 de orujos enteros. El máximo de absorbancia se encuentra a 271nm con 343,68mAU a un tiempo de retención de 23,47 minutos.

5.2.1.- Tabla resumen de extracto de polifenoles de orujos molidos separados.

Tabla 20: Tabla resumen de extractos de polifenoles de orujos molidos separados.

Polifenoles de Orujos Molidos					
Extracto de Polifenoles separados	Concentración (g/ml MeOH)	Tiempo de Retención (min)	Longitud de onda λ (nm)	Unidades de absorbancia (mAU)	Porcentaje (%)
1	0,0153	1,2	273 (Compuesto fenólico)	300,89	31,81
2	0,0123	3,19	280 (Flavanol)	369,32	39,04
		4,29	280 (Flavanol)	275,7	29,15
3	0,015	3	278 (Compuesto fenólico)	1005,36	39,18
		3,46	278 (Compuesto fenólico)	608,68	23,72
		3,77	278 (Compuesto fenólico)	708,17	27,60
		8,09	278 (Compuesto fenólico)	243,89	9,50
4	0,0148	3,06	278 (Compuesto fenólico)	814,16	34,34
		3,52	278 (Compuesto fenólico)	557,12	23,50
		3,86	278 (Compuesto fenólico)	736,25	31,06
		8,25	278 (Compuesto fenólico)	263,2	11,10
5	0,0152	4,59	279 (Compuesto fenólico)	1006,2	55,57
		6,15	279 (Compuesto fenólico)	424,48	23,44
		9,39	279 (Compuesto fenólico)	379,91	20,98
6	0,0153	1,25	272 (Compuesto fenólico)	>2000	57,58
		4,86	279 (Compuesto fenólico)	492,33	14,17
		6,18	280 (Flavanol)	394,81	11,37
		9,43	278 (Compuesto fenólico)	433,5	12,48
		30,5	346 (Ácido hidroxinámico)	152,77	4,40
7	0,015	8,08	272 (Compuesto fenólico)	532,81	61,71
		26,35	524 (Antocianina)	54,73	6,34
		26,35	340 (Ácido hidroxinámico)	73,23	8,48
		29,22	350 (Ácido hidroxinámico)	202,69	23,47
8	0,015	1,25	278 (Compuesto fenólico)	>2000	73,70
		9,45	278 (Compuesto fenólico)	407,59	15,02
		30,3	350 (Ácido hidroxinámico)	306,29	11,29
9	0,0148	4,09	280 (Flavanol)	158,95	16,71
		10,65	280 (Flavanol)	201,02	21,14
		26,87	525 (Antocianina)	92,45	9,72
		26,87	343 (Ácido hidroxinámico)	98,41	10,35

		29,43	351 (Ácido hidroxinámico)	400,24	42,08
10	0,015	29,97	352 (Ácido hidroxinámico)	805,02	43,58
		26,89	523 (Antocianina)	104,51	5,66
		5,05	279 (Compuesto fenólico)	155,89	8,44
		12,68	279(Compuesto fenólico)	150,89	8,17
		1,25	279 (Compuesto fenólico)	631,12	34,16
11	0,015	30,32	352 (Ácido hidroxinámico)	893,99	88,51
		27,31	524 (Antocianina)	116,02	11,49
12	0,0153	29,45	352 (Ácido hidroxinámico)	557,99	83,00
		26,83	524 (Antocianina)	114,25	17,00
13	0,0114	27,56	524 (Antocianina)	46,34	12,35
		30,58	350 (Ácido hidroxinámico)	328,9	87,65
14	0,015	28,35	351 (Ácido hidroxinámico)	146,28	40,69
		29,19	349 (Ácido hidroxinámico)	88,41	24,59
		31,48	506 (Antocianina)	41,09	11,43
		32,55	346 (Ácido hidroxinámico)	83,69	23,28
15	0,0151	23,64	277 (Compuesto fenólico)	155,92	18,06
		28,34	351 (Ácido hidroxinámico)	194,42	22,52
		28,56	278 (Compuesto fenólico)	513,15	59,43
16	0,0151	23,64	260 (Compuesto fenólico)	352,9	54,67
		26,01	343 (Ácido hidroxinámico)	53,52	8,29
		28,36	350 (Ácido hidroxinámico)	95,46	14,79
		29,2	350 (Ácido hidroxinámico)	105,15	16,29
		31,49	511 (Antocianina)	38,47	5,96
17	0,015	29,14	350 (Ácido hidroxinámico)	154,55	16,56
		28,54	280 (Flavanol)	523,61	56,11
		23,67	260 (Compuesto fenólico)	254,98	27,32
18	0,0151	31,53	504 (Ácido hidroxinámico)	50,26	8,13
		29,15	350 (Ácido hidroxinámico)	191,59	30,99
		28,32	350 (Ácido hidroxinámico)	97,11	15,71
		26,3	280 (Flavanol)	279,36	45,18
19	0,0127	1,14	271 (Compuesto fenólico)	1674,18	86,39
		29,19	350 (Ácido hidroxinámico)	162,65	8,39
		31,53	507(Antocianina)	101,19	5,22
20	0,015	29,22	351 (Ácido hidroxinámico)	260,91	13,84
		27,83	353 (Ácido hidroxinámico)	109,35	5,80
		31,16	276 (Compuesto fenólico)	724,88	38,46
		31,16	353 (Ácido hidroxinámico)	98,96	5,25

		31,59	506 (Antocianina)	56,21	2,98
		31,59	278 (Compuesto fenólico)	634,68	33,67
21	0,0151	29,68	353 (Ácido hidroxinámico)	260,1	30,26
		31,56	353 (Ácido hidroxinámico)	66,15	7,70
		31,83	504 (Antocianina)	15,67	1,82
		31,83	279 (Compuesto fenólico)	419,4	48,79
		26,51	522 (Antocianina)	3,78	0,44
		26,51	279 (Compuesto fenólico)	94,52	11,00
22	0,011	30,99	351 (Ácido hidroxinámico)	187,01	20,78
		30,99	271 (Compuesto fenólico)	412,44	45,84
		32,55	278 (Compuesto fenólico)	281,73	31,31
		32,55	508 (Antocianina)	18,57	2,06
23	0,011	31,34	265 (Compuesto fenólico)	327,98	35,25
		30,95	275 (Compuesto fenólico)	281,73	30,28
		30,95	352 (Ácido hidroxinámico)	72,49	7,79
		32,67	352 (Ácido hidroxinámico)	37,59	4,04
		32,67	277 (Compuesto fenólico)	210,7	22,64
24	0,015	30,72	350 (Ácido hidroxinámico)	157,76	31,72
		30,72	280 (Flavanol)	339,66	68,28

Las imágenes de los espectros de los extractos obtenidos y descritos en esta tabla se observan en el punto 5.2.2 de este informe.

5.2.2.- Espectros de absorbanza obtenidos mediante cromatografía HPLC-DAD analítica de extractos de polifenoles separados mediante cromatografía HPLC-DAD preparativa desde orujos molidos.

1

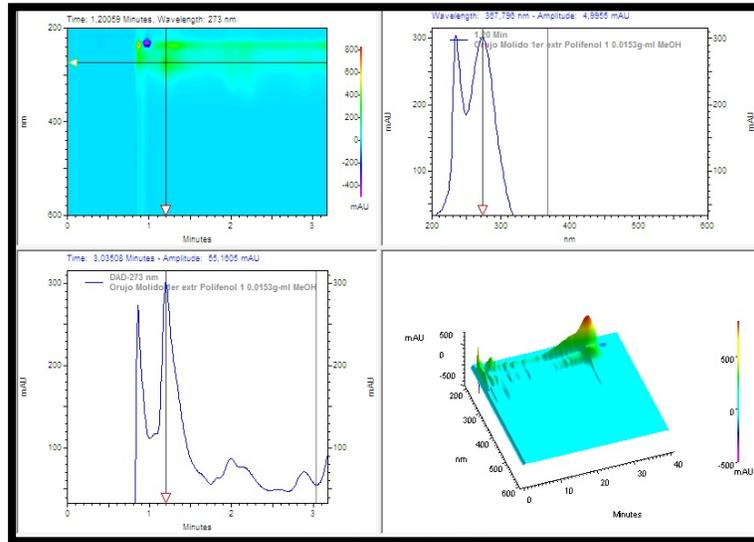


Imagen 68: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 1 de orujos molidos. El máximo de absorbanza se encuentra a 273nm con 300,89mAU a un tiempo de retención de 1,20 minutos.

2

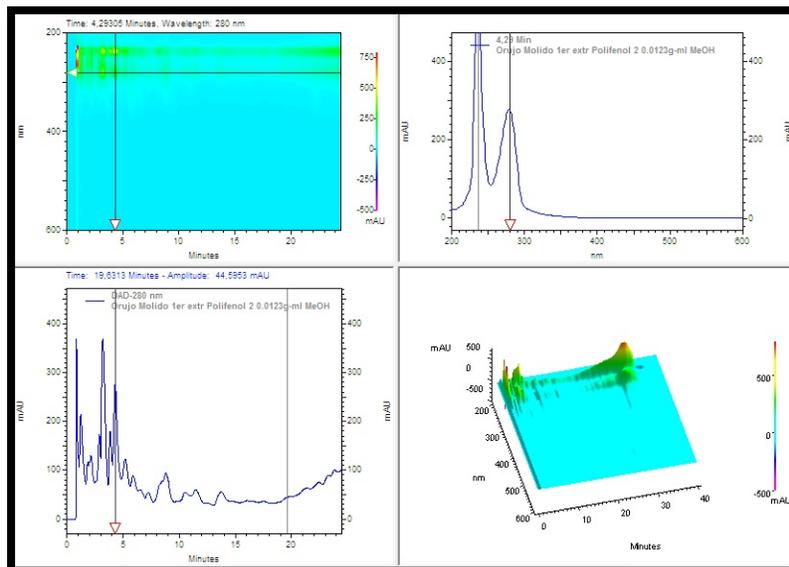


Imagen 69: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 2 de orujos molidos. . El máximo de absorbanza se encuentra a 280nm con 369,32mAU a un tiempo de retención de 3,19 minutos.

3

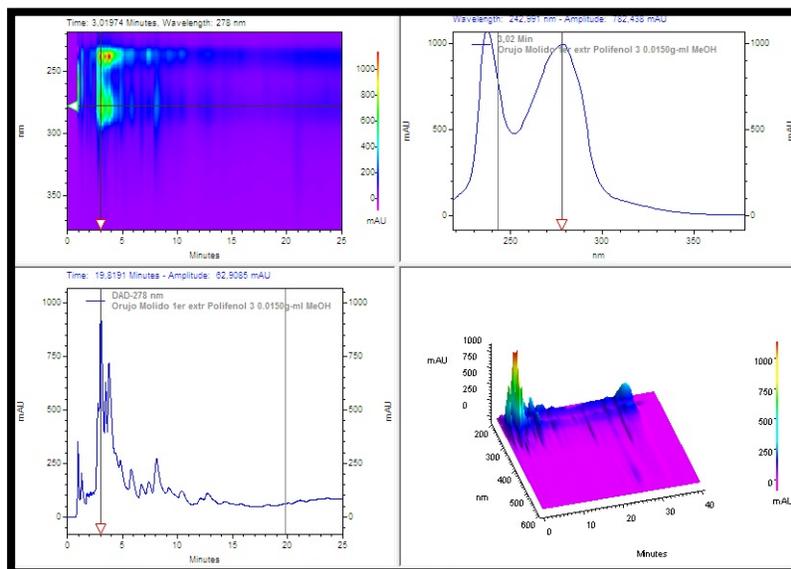


Imagen 70: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 3 de orujos molidos. . El máximo de absorbancia se encuentra a 278nm con 1005,36mAU a un tiempo de retención de 3,00 minutos.

4

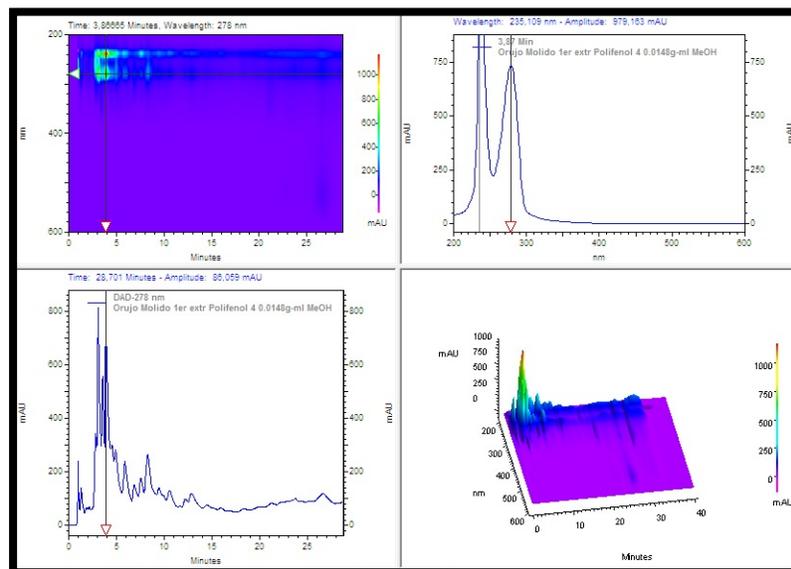


Imagen 71: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 4 de orujos molidos. . El máximo de absorbancia se encuentra a 278nm con 814,16mAU a un tiempo de retención de 3,06 minutos.

5

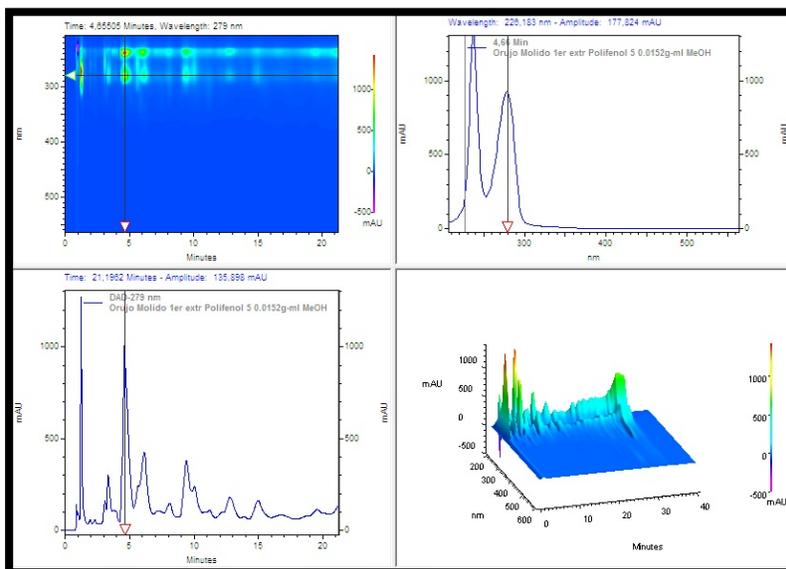


Imagen 72: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 5 de orujos molidos. . El máximo de absorbanca se encuentra a 279nm con 1006,20mAU a un tiempo de retención de 4,59 minutos.

6

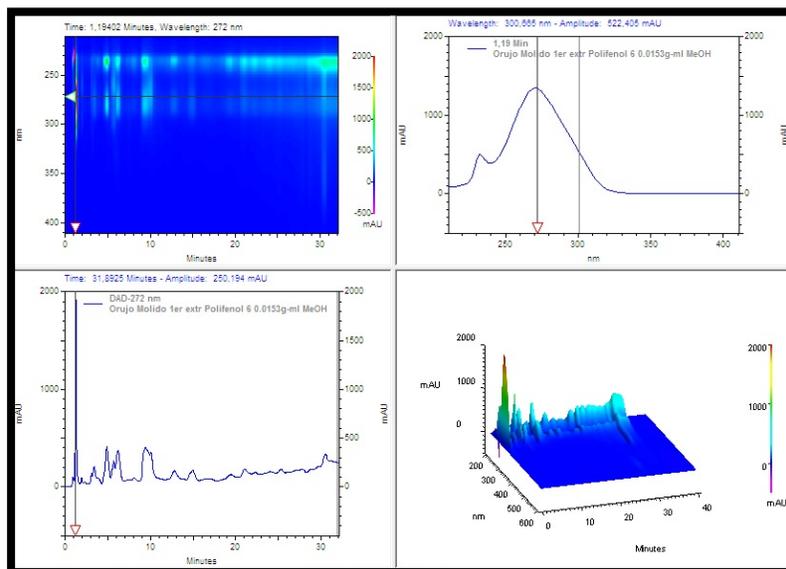


Imagen 73: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 6 de orujos molidos. . El máximo de absorbanca se encuentra a 272nm con >2000mAU a un tiempo de retención de 1,25 minutos.

7

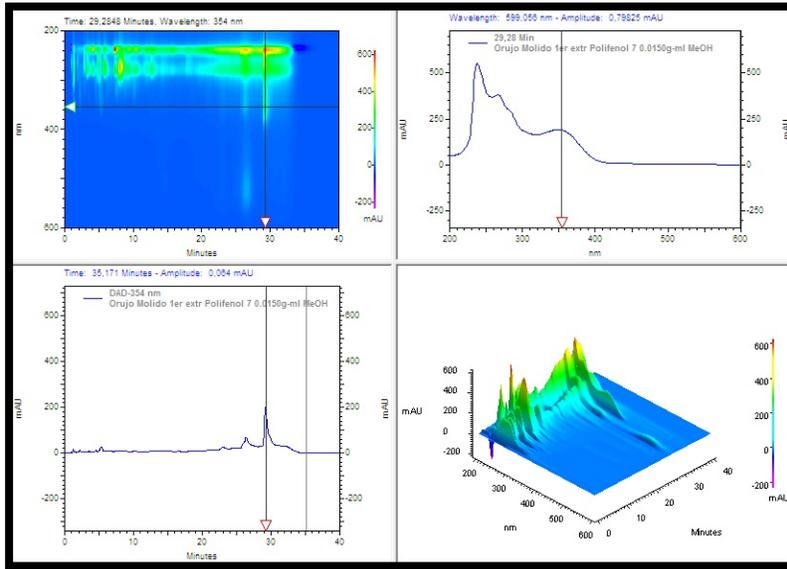


Imagen 74: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 7 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 272nm con 532,81mAU a un tiempo de retención de 8,08 minutos.

8

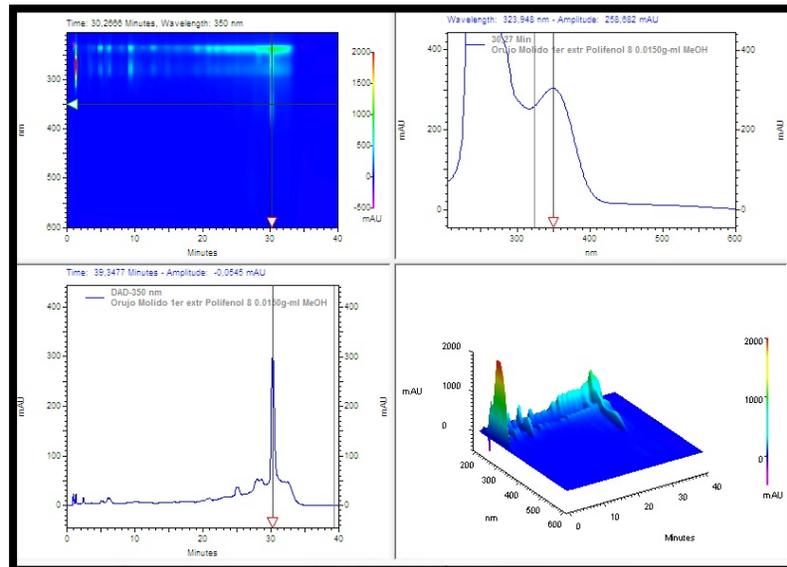


Imagen 75: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 8 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 278nm con >2000mAU a un tiempo de retención de 1,25 minutos.

9

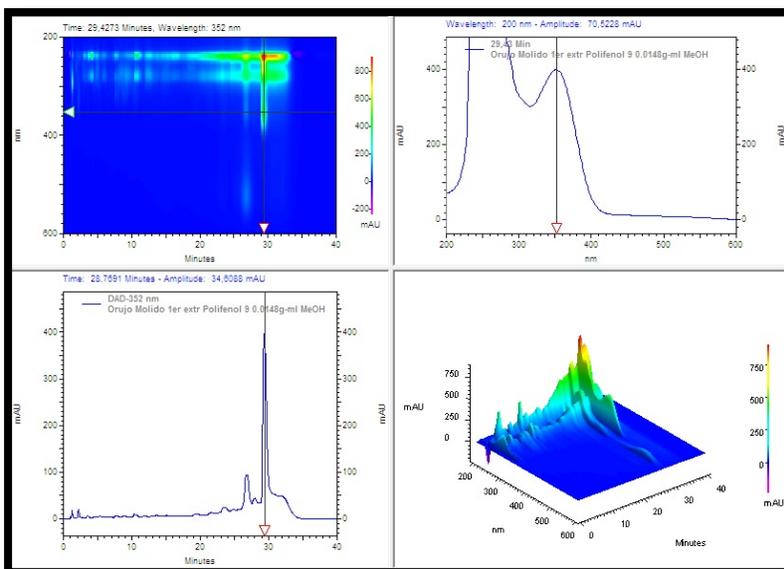


Imagen 76: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 9 de orujos molidos. El máximo de absorbanca se encuentra a 351nm con 400,24mAU a un tiempo de retención de 29,97 minutos.

10

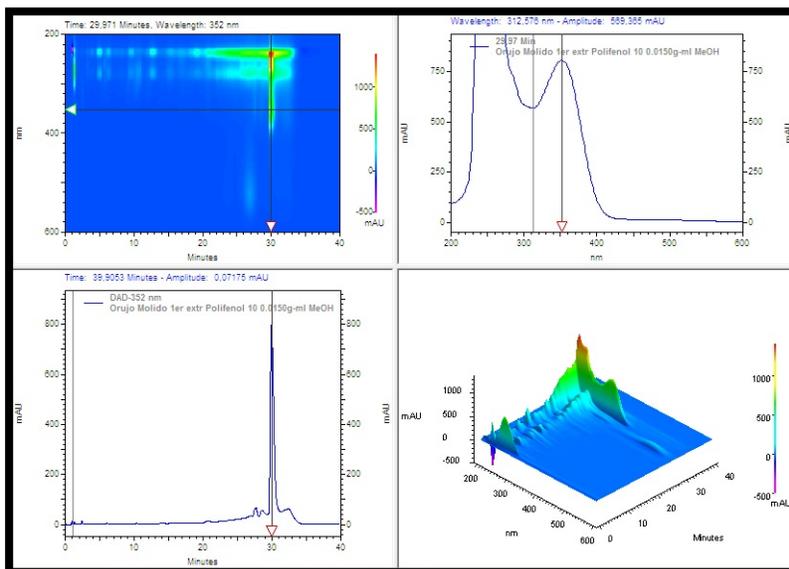


Imagen 77: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 10 de orujos molidos. El máximo de absorbanca se encuentra a 352nm con 805,024mAU a un tiempo de retención de 29,97 minutos.

11

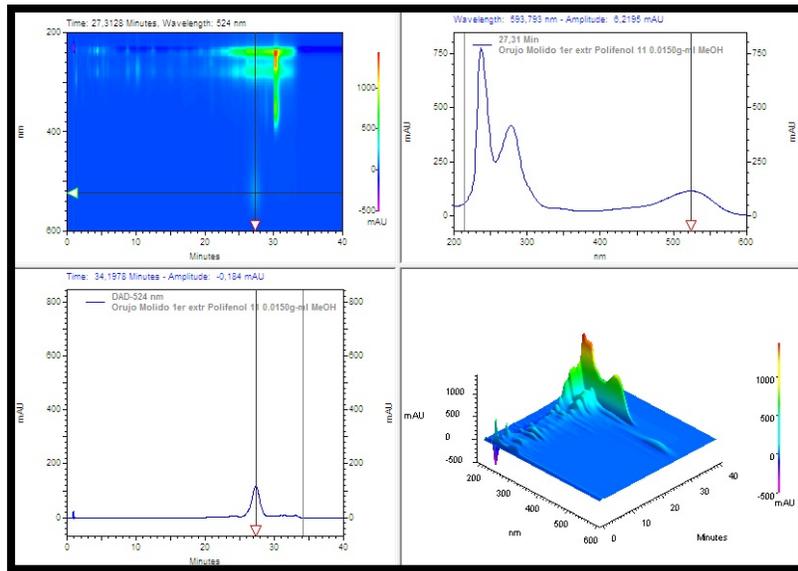


Imagen 78: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 11 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 352nm con 893,99mAU a un tiempo de retención de 30,32 minutos.

12

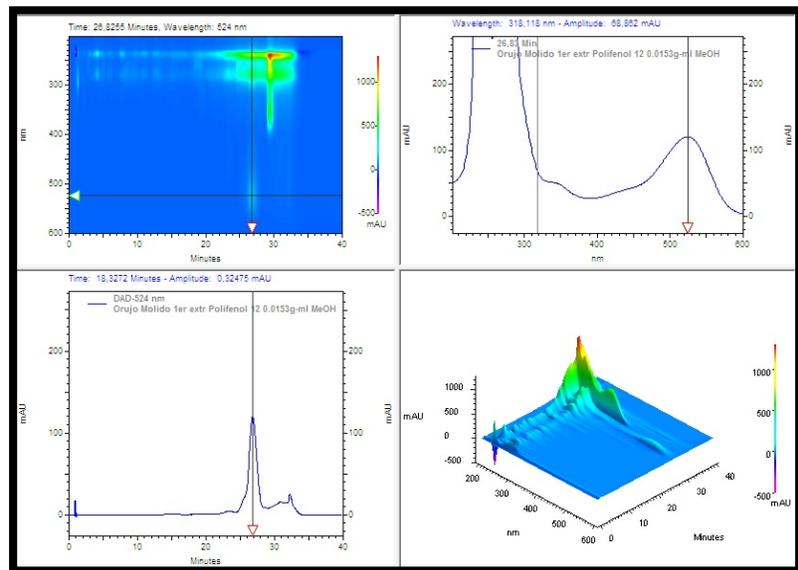


Imagen 79: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 12 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 352nm con 557,99mAU a un tiempo de retención de 29,45 minutos.

13

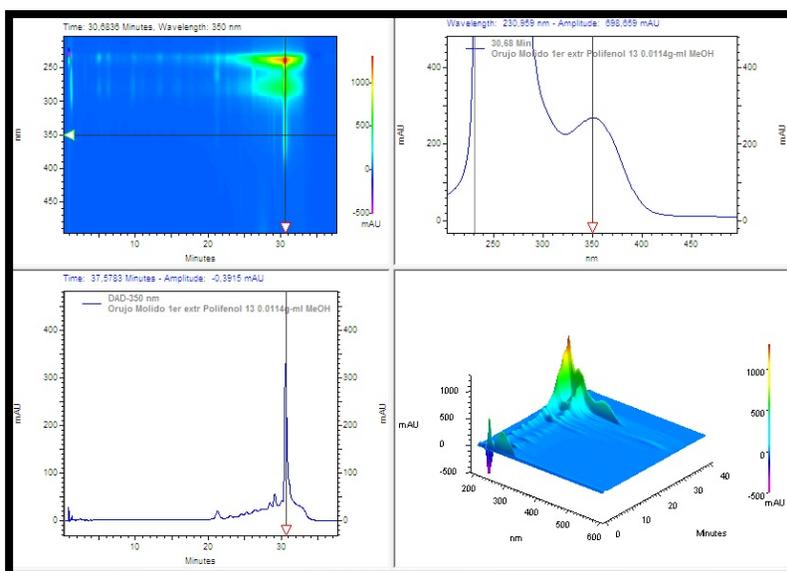


Imagen 80: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 13 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 350nm con 328,90mAU a un tiempo de retención de 30,58 minutos.

14

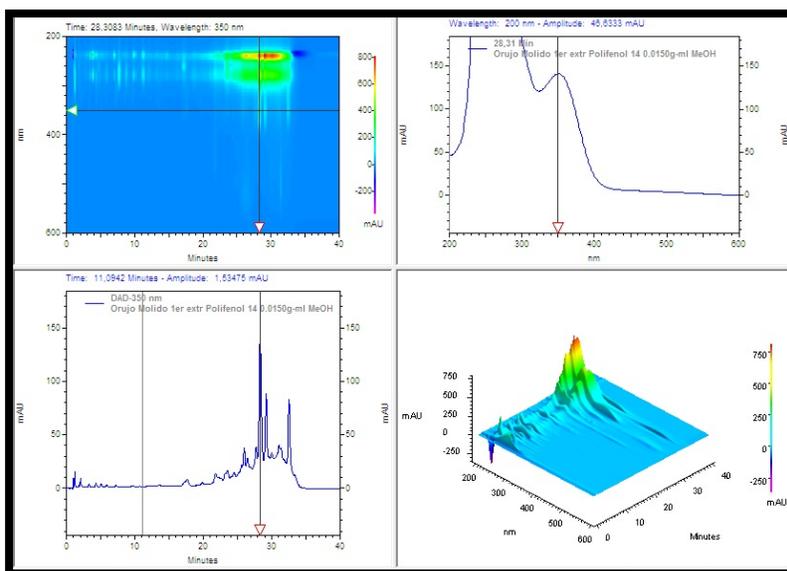


Imagen 81: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 14 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 351nm con 146,28mAU a un tiempo de retención de 28,35 minutos.

15

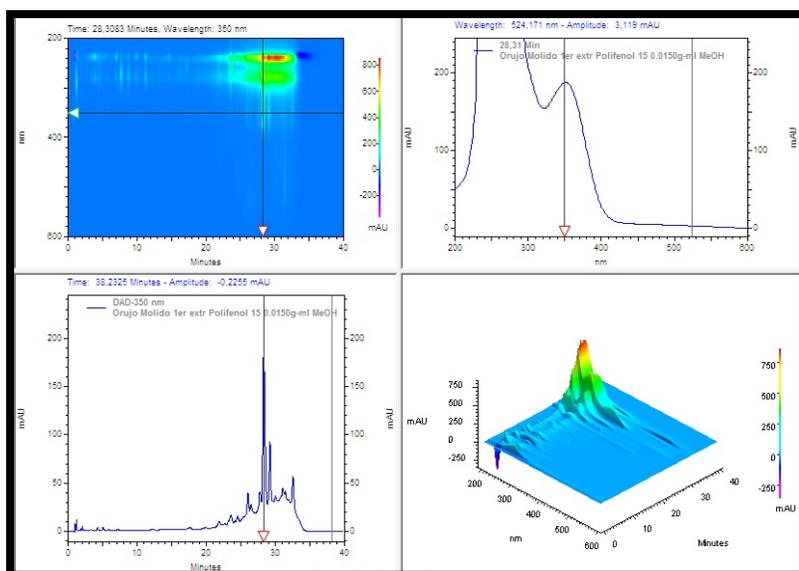


Imagen 82: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 15 de orujos molidos. El máximo de absorbanza se encuentra a 278nm con 513,15mAU a un tiempo de retención de 28,56 minutos.

16

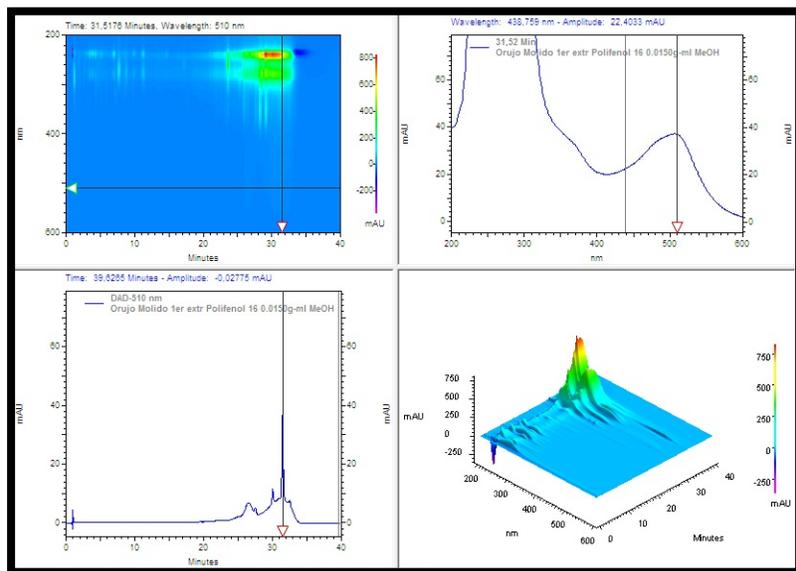


Imagen 83: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 16 de orujos molidos. El máximo de absorbanza se encuentra a 260nm con 352,90mAU a un tiempo de retención de 23,64 minutos.

17

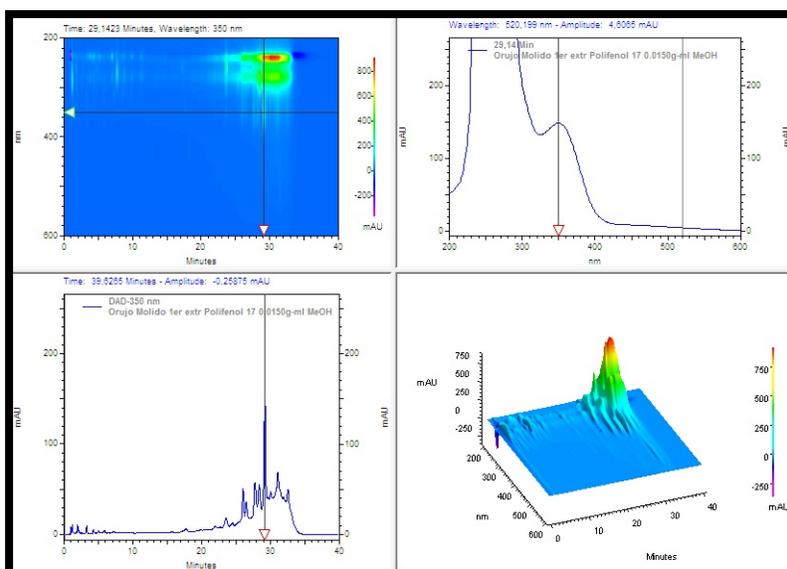


Imagen 84: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 17 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 280nm con 523,61mAU a un tiempo de retención de 28,54 minutos.

18

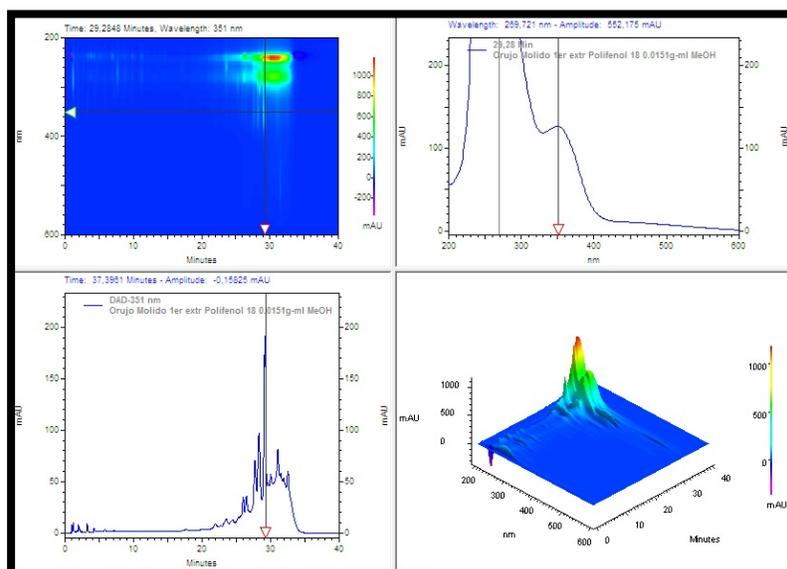


Imagen 85: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 18 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 280nm con 279,36mAU a un tiempo de retención de 26,30 minutos.

19

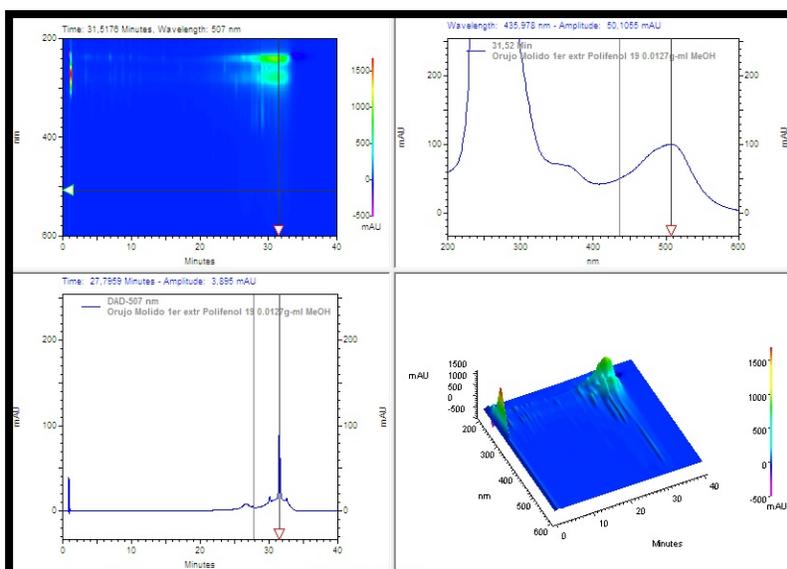


Imagen 86: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 19 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 271nm con 1674,18mAU a un tiempo de retención de 1,14 minutos.

20

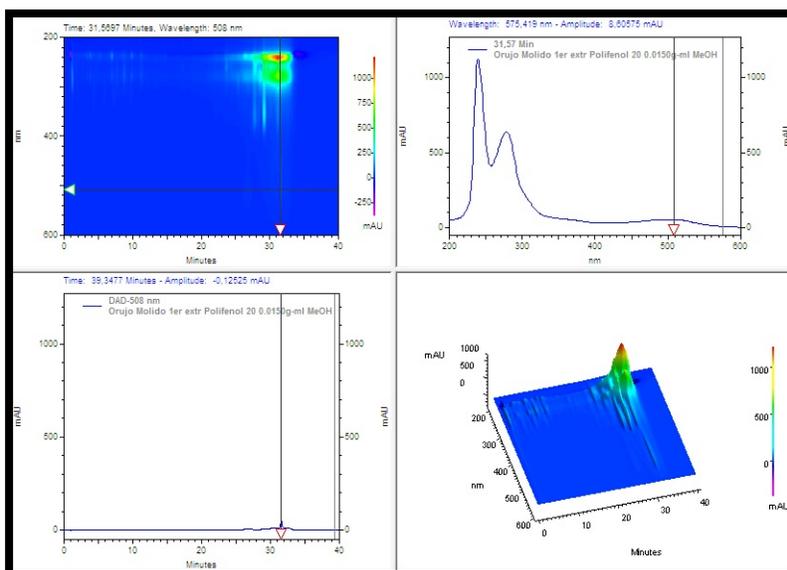


Imagen 87: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 20 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 276nm con 724,88mAU a un tiempo de retención de 31,16 minutos.

21

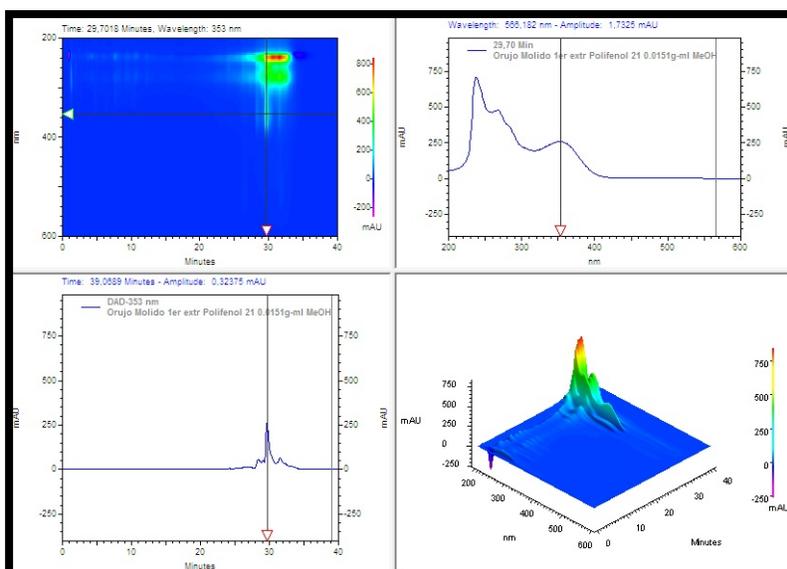


Imagen 88: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 21 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 279nm con 419,40mAU y a 504nm con 15,67mAU a un tiempo de retención de 31,83 minutos.

22

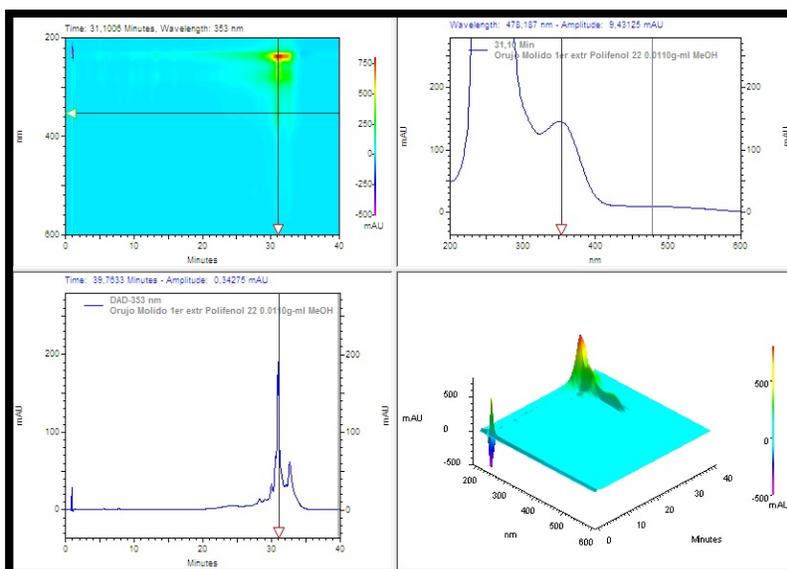


Imagen 89: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 22 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 271nm con 412,44mAU a un tiempo de retención de 30,99 minutos.

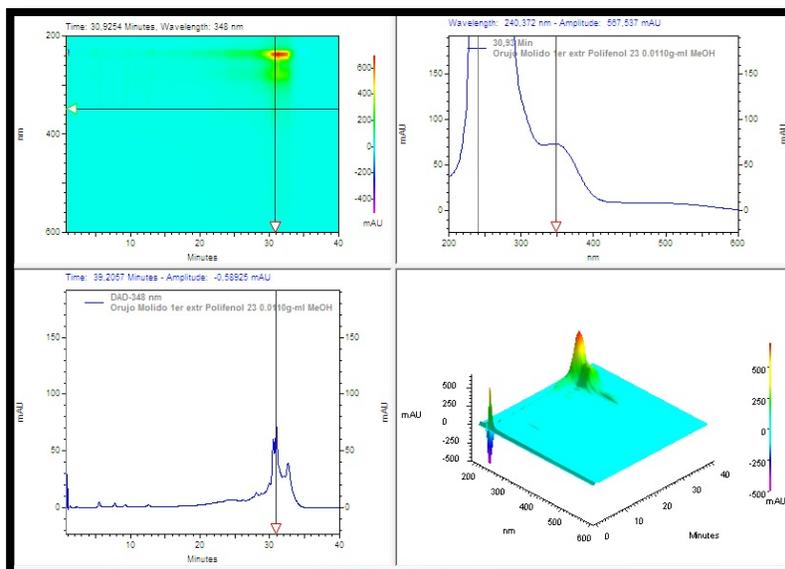


Imagen 90: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 23 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 265nm con 327,98mAU a un tiempo de retención de 31,34 minutos.

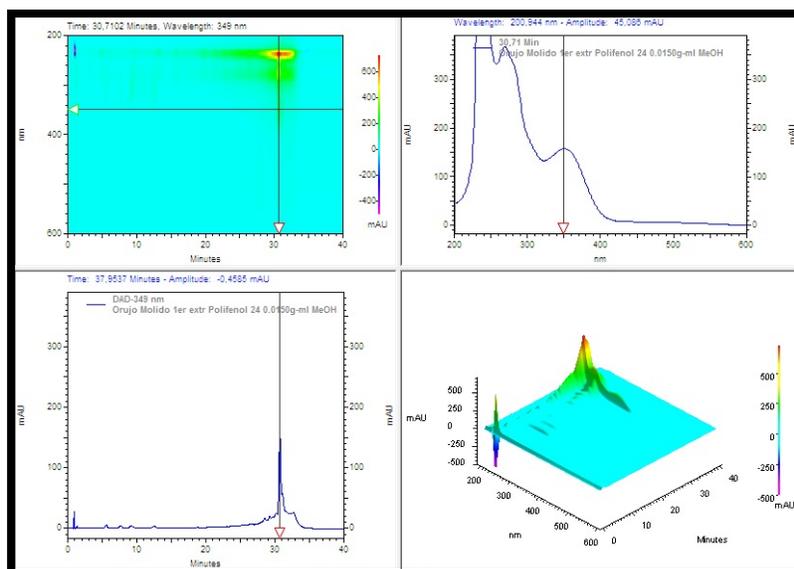


Imagen 91: Resultados obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para el extracto de polifenoles 24 de orujos molidos. El máximo de absorbancia se encuentra a 280nm con 339,66mAU a un tiempo de retención de 30,72 minutos.

6.- Comparación de contenido de polifenoles totales en vino 12 generaciones y orujos.

6.1.1.- Tabla de polifenoles de extracto seco de Vino 12 generaciones.

Tabla 21: Tabla de polifenoles de extracto seco de Vino 12 generaciones.

Vino 12 generaciones 0.0267g/ml			
Tiempo de retención (min)	Longitud de onda λ (nm)	Unidades de absorbancia (mAU)	Porcentaje de compuesto (%)
0,85	275 (Compuesto fenólico)	448,21	28,61
1,13	271 (Compuesto fenólico)	464,38	29,65
1,85	327 (Ácido hidroxinámico)	196,88	12,57
2,89	312 (Estilbenoide)	81,85	5,23
3,3	276 (Compuesto fenólico)	55,18	3,52
3,73	280 (Flavanol)	24,04	1,53
4,73	322 (Ácido hidroxinámico)	42,01	2,68
5,63	280 (Flavanol)	7,37	0,47
6,11	277 (Compuesto fenólico)	10,31	0,66
7,79	272 (Compuesto fenólico)	22,19	1,42
8,89	274 (Compuesto fenólico)	19,83	1,27
10,58	278 (Compuesto fenólico)	7,83	0,50
11,61	278 (Compuesto fenólico)	5,81	0,37
12,17	278 (Compuesto fenólico)	6,85	0,44
13,07	269 (Compuesto fenólico)	9,37	0,60
18,88	257 (Compuesto fenólico)	29,5	1,88
18,88	351 (Compuesto fenólico)	21,69	1,38
23,44	263 (Compuesto fenólico)	16,4	1,05
28,69	268 (Compuesto fenólico)	32,88	2,10
28,69	339 (Ácido hidroxinámico)	18	1,15
30,85	278 (Compuesto fenólico)	31,49	2,01
30,85	523 (Antocianina)	14,37	0,92
Porcentaje total de compuestos fenólicos:			75,45% (12072,42mg/L)
Porcentaje total de ácidos hidrocínámicos:			16,40% (2623,94/L)
Porcentaje total de estilbenoides:			5,23% (836,04/L)
Porcentaje total de flavanoles:			2,01% (320,83/L)
Porcentaje total de antocianinas:			0,92% (146,78/L)

6.1.2.- Espectro de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.

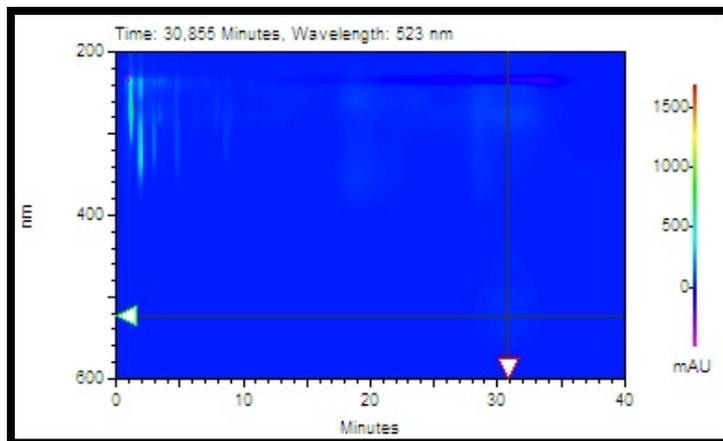


Imagen 92: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para la muestra de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.

6.1.3.- Cromatograma a 280nm para identificación de flavanoles de Vino 12 generaciones.

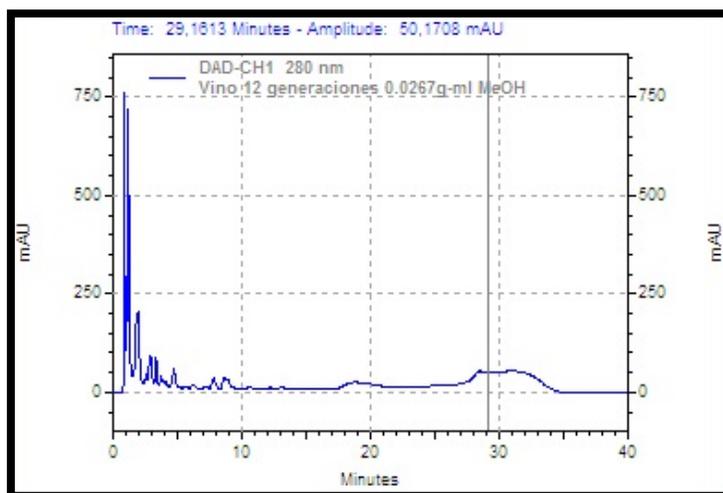


Imagen 93: Cromatograma a 280nm para identificación de compuestos fenólicos, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.

6.1.4.- Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos hidrocínámicos de Vino 12 generaciones.

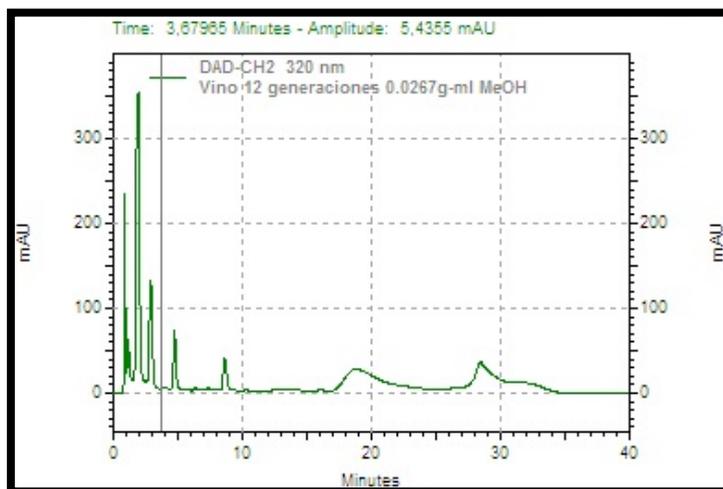


Imagen 94: Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos hidrocínámicos, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.

6.1.5.- Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas de Vino 12 generaciones.

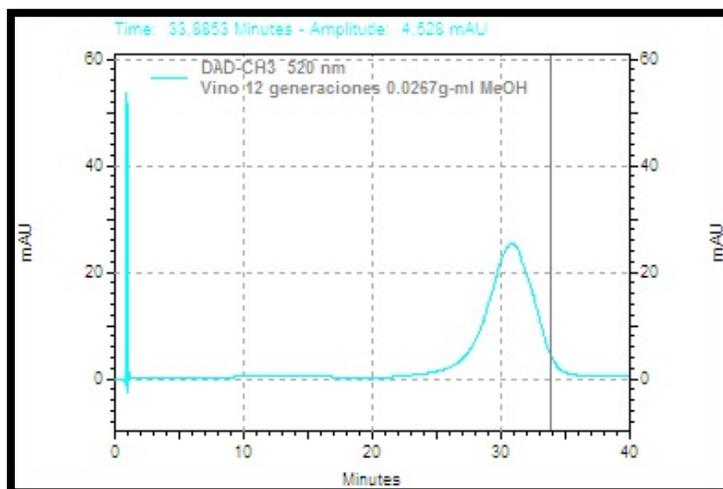


Imagen 95: Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de Vino 12 generaciones.

6.2.1.- Tabla de extracto de polifenoles de orujo entero.

Tabla 22: Tabla de extracto de polifenoles de orujo entero.

Orujo entero primera extracción 0.016g/ml			
Tr (min)	λ (nm)	mAU	Porcentaje de compuesto (%)
1,15	279 (Compuesto fenólico)	79,51	2,09
1,25	279 (Compuesto fenólico)	169,83	4,46
1,25	236 (Compuesto fenólico)	413,14	10,85
1,71	261 (Compuesto fenólico)	124,06	3,26
1,95	282 (Flavanol)	86,33	2,27
1,95	323 (Ácido hidroxinámico)	66,96	1,76
2,48	323 (Ácido hidroxinámico)	91,42	2,40
2,62	274 (Compuesto fenólico)	132,33	3,47
2,82	280 (Flavanol)	132,76	3,49
2,93	278 (Compuesto fenólico)	132,82	3,49
2,93	309 (Estilbenoide)	89,92	2,36
3,29	279 (Compuesto fenólico)	244,37	6,42
3,66	279 (Compuesto fenólico)	447,81	11,76
4,16	280 (Flavanol)	122,2	3,21
4,62	263 (Compuesto fenólico)	121,74	3,20
4,77	286 (Flavanol)	91,26	2,40
4,77	323 (Ácido hidroxinámico)	84,96	2,23
6,36	288 (Flavanol)	115,19	3,02
7,15	280 (Flavanol)	84,98	2,23
7,9	273 (Compuesto fenólico)	116,63	3,06
8,91	274 (Compuesto fenólico)	100,72	2,64
9,46	280 (Flavanol)	54,3	1,43
10,45	279 (Compuesto fenólico)	103,05	2,71
11,58	281 (Flavanol)	29,01	0,76
12,25	281 (Flavanol)	33,63	0,88
13,05	279 (Compuesto fenólico)	50,37	1,32
14,29	279 (Compuesto fenólico)	24,85	0,65
15,21	281 (Flavanol)	29,57	0,78
16,71	280 (Flavanol)	60,94	1,60
18,44	279 (Compuesto fenólico)	28,07	0,74
21,01	261 (Compuesto fenólico)	65,28	1,71
23,32	278 (Compuesto fenólico)	27,98	0,73
24,74	279 (Compuesto fenólico)	29,17	0,77

26,01	279 (Compuesto fenólico)	31,26	0,82
27,11	279 (Compuesto fenólico)	33,23	0,87
28,41	279 (Compuesto fenólico)	36,88	0,97
29,48	444	3,26	0,09
29,48	278 (Compuesto fenólico)	47,74	1,25
31,68	278 (Compuesto fenólico)	66,16	1,74
31,68	520 (Antocianina)	4,77	0,13
Porcentaje total de compuestos fenólicos:			68,98 (11036,48mg/L)
Porcentaje total de ácidos hidrocínámicos:			6,39 (1022,31mg/L)
Porcentaje total de estilbenoides:			2,36 (377,77mg/L)
Porcentaje total de flavanoles:			22,06 (3529,70mg/L)
Porcentaje total de antocianinas:			0,13 (20,04mg/L)

6.2.2.- Espectro de extracto de polifenoles de orujo entero.

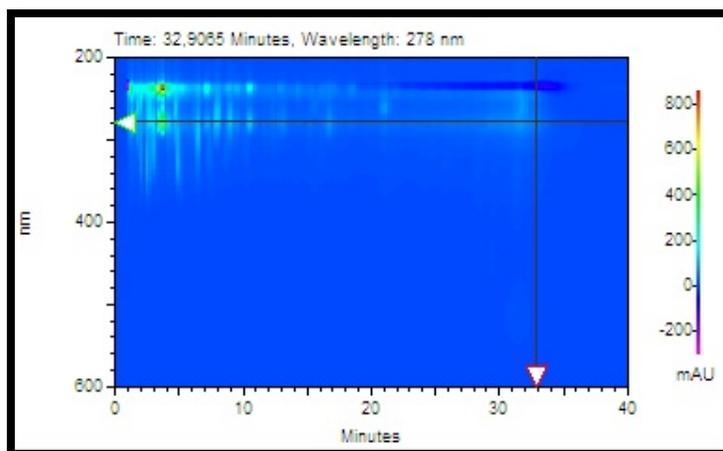


Imagen 96: Resultado de Espectro total de longitudes de onda (nm) v/s tiempo (minutos) obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica para la muestra de extracto de polifenoles de orujo entero.

6.2.3.- Cromatograma a 280nm para identificación de flavanoles de orujo entero.

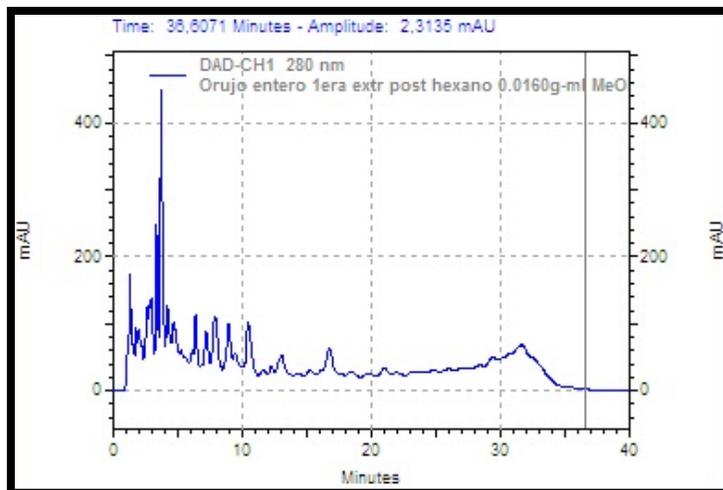


Imagen 97: Cromatograma a 280nm para identificación de compuestos fenólicos, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de orujo entero.

6.2.4.- Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos hidrocínámicos de orujo entero.

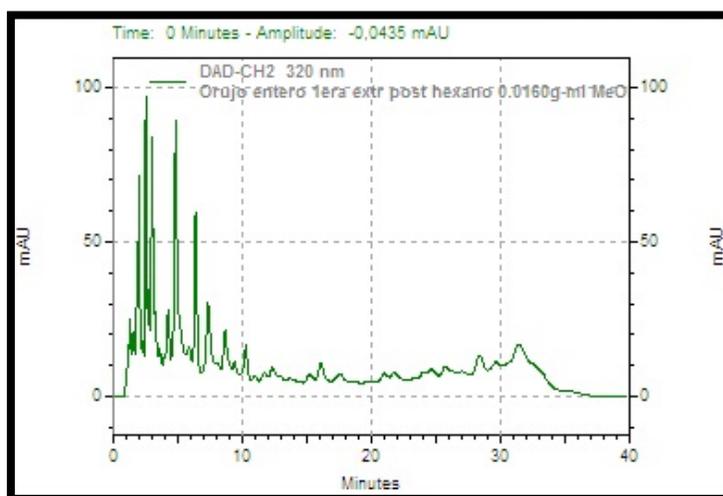


Imagen 98: Cromatograma a 320nm para identificación de ácidos cinámicos, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de orujo entero.

6.2.5.- Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas de orujo entero.

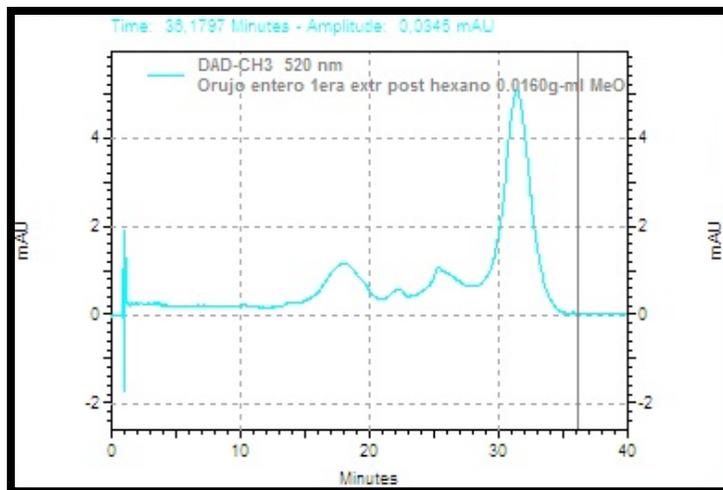


Imagen 99: Cromatograma a 520nm para identificación de antocianinas, obtenidos mediante cromatografía HPLC-analítica correspondiente a la muestra de extracto de polifenoles de orujo entero.

6.4.- Gráfico comparativo de cantidad de polifenoles totales en extractos de orujos y en muestra de vino en diferentes tiempos de retención.

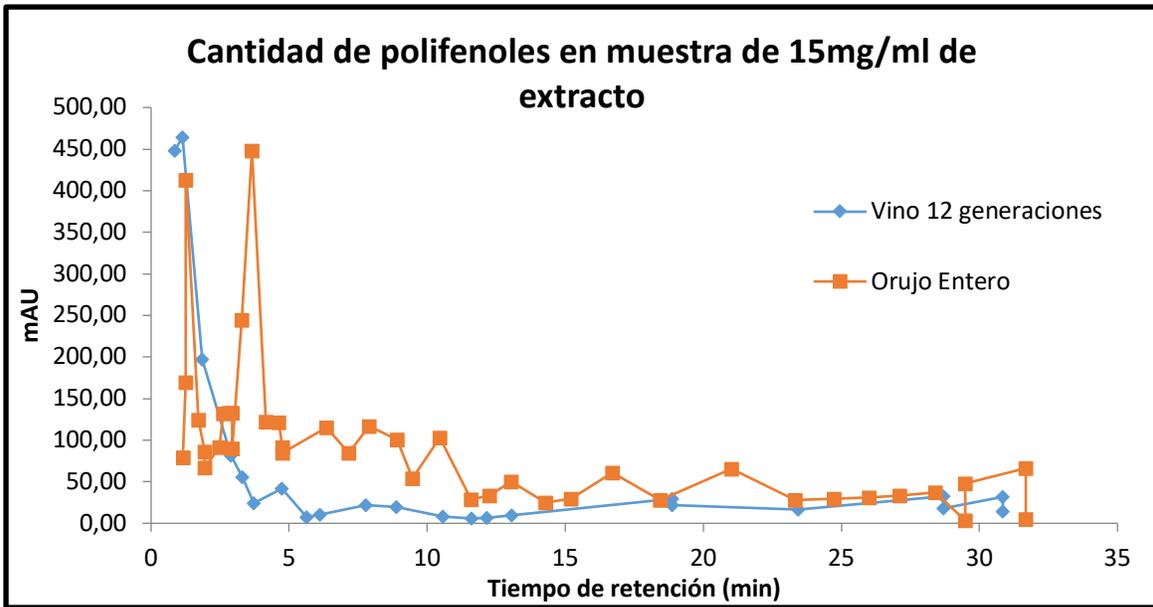


Imagen 104: Gráfico comparativo de cantidad de polifenoles totales. Se puede apreciar que la muestra de orujos enteros presenta una mayor cantidad de compuestos polifenólicos a lo largo de la corrida cromatográfica, en comparación con la muestra de vino que presenta una cantidad más baja de polifenoles totales.

Determinación de actividad antioxidante.

Preparación del radical DPPH.

Se pesó 1,95mg de radical DPPH en un matraz de 50ml y se disolvió con 50ml de MeOH 80%. La solución se dejó en ultrasonido durante 20 minutos con la finalidad de lograr una adecuada disolución.

Preparación de curva de calibración.

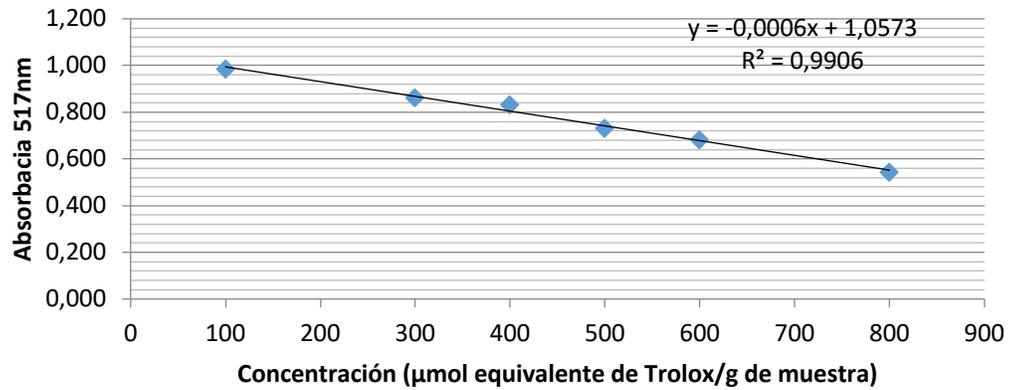
Se preparó una solución patrón disolviendo 2 mg de trolox en 10ml de MeOH 80% a partir de la cual se prepararon las diferentes diluciones para realizar la curva de calibración.

A 0,1ml de cada dilución estándar de y extracto de muestra se le adiciona 2,9ml de solución de DPPH y se agita en vortex por 30 segundos.

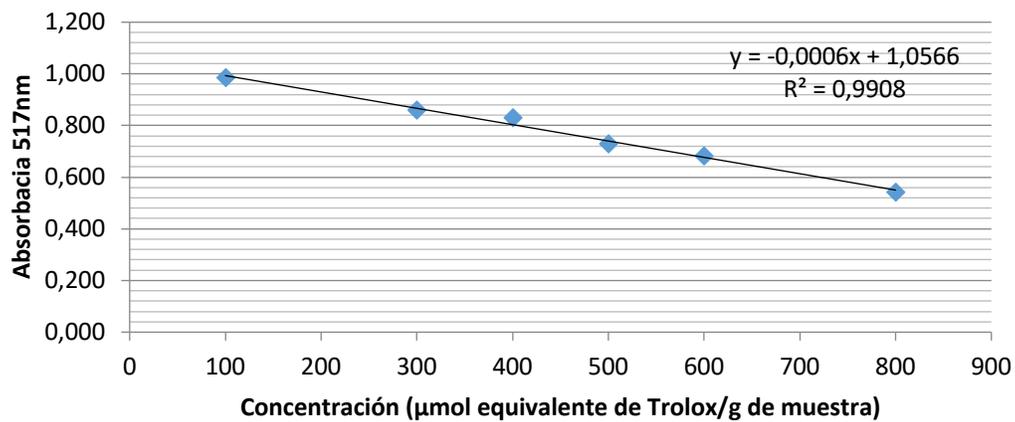
Se deja en oscuridad y se lee la absorbancia a 517nm luego de 30 minutos y de 60 minutos de haber realizado la reacción.

Curva de calibración de actividad antioxidante				
Concentración (μ mol equivalente de Trolox)	Absorbancia 517nm (30minutos de reacción)	Absorbancia Promedio 517nm (30 minutos de reacción)	Absorbancia 517nm (60minutos de reacción)	Absorbancia Promedio 517nm (60 minutos de reacción)
100	0,985	0,985	0,984	0,985
	0,985		0,985	
300	0,862	0,862	0,861	0,861
	0,862		0,860	
400	0,832	0,834	0,830	0,832
	0,835		0,833	
500	0,731	0,732	0,730	0,730
	0,732		0,730	
600	0,682	0,682	0,682	0,682
	0,681		0,681	
800	0,545	0,545	0,543	0,542
	0,544		0,541	

Curva de calibración de actividad antioxidante (30 minutos de reacción)



Curva de calibración de actividad antioxidante (60 minutos de reacción)

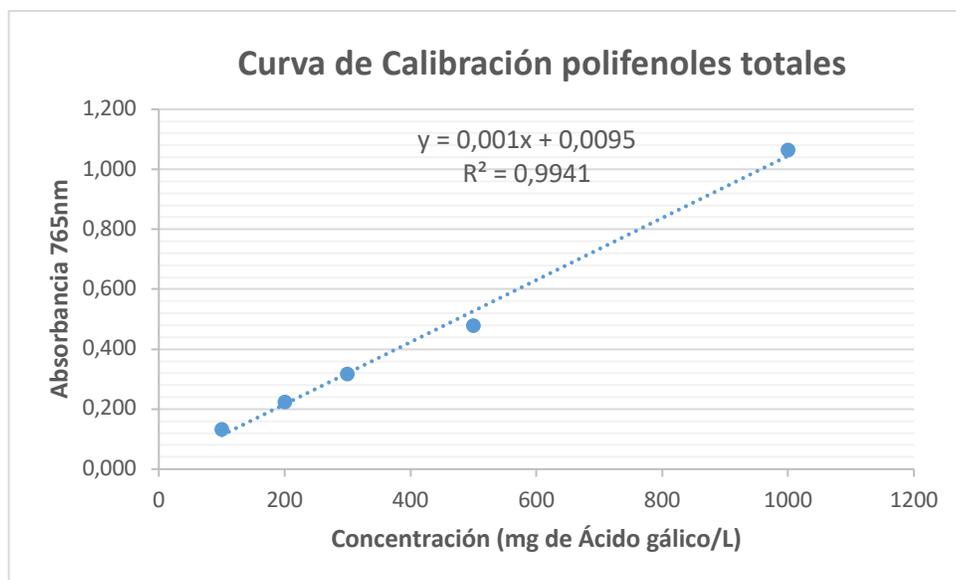


Muestra	Absorbancia Promedio 517nm (30 minutos de reacción)	% Inhibición (Abs0 =1,078) (30min de reacción)	Concentración (μmol equivalente de Trolox/g de muestra) (30 minutos de reacción)	Concentración (μmol equivalente de Trolox/g de muestra) (30 minutos de reacción) (Peso Seco)	Absorbancia Promedio 517nm (60 minutos de reacción)	% Inhibición (Abs0 =1,078) (60min de reacción)	Concentración (μmol equivalente de Trolox/g de muestra) (60 minutos de reacción)	Concentración (μmol equivalente de Trolox/g de muestra) (60 minutos de reacción) (Peso Seco)
A-1 Hollejos	0,083	92,301	1623,833	1736,101	0,081	92,532	1626,833	1739,309
A-1 Hollejos	0,085	92,161	1621,333	1733,428	0,082	92,393	1624,333	1736,636
A-2 Pepas	0,042	96,150	1693,000	1823,698	0,041	96,197	1692,667	1823,339
A-2 Pepas	0,044	95,965	1689,667	1820,108	0,044	95,965	1688,500	1818,851
Orujos molidos en Etanol al 70% post secado y molienda	0,068	93,738	1649,667	1817,815	0,064	94,109	1655,167	1823,875
Orujos molidos en Etanol al 70% post secado y molienda	0,063	94,202	1658,000	1826,997	0,061	94,341	1659,333	1828,466

Determinación de compuestos polifenólicos totales

La determinación de fenoles se realizó por el método colorimétrico de Follin-Ciocalteu. 0,1ml de muestra fueron adicionados a 6ml de agua destilada, 0,5ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, y 1,5ml de carbonato de sodio 20% (p/v), ajustando con agua destilada hasta 10ml. Se realizó la lectura espectrofotométrica a 765 nm y se comparó con la curva patrón usando como estándar ácido gálico (fenol). Los resultados fueron expresados como mg de Ácido gálico Equivalente /g de fruta fresca.

Curva de calibración polifenoles totales		
Concentración (mg de Ácido gálico/L)	Absorbancia 765nm	Absorbancia Promedio 765nm
100	0,133	0,134
	0,135	
200	0,224	0,225
	0,226	
300	0,317	0,318
	0,318	
500	0,478	0,480
	0,481	
1000	1,065	1,066
	1,066	



Muestra	Absorbancia 517nm(30 minutos de reacción)	Absorbancia Promedio 517nm (30 minutos de reacción)	Concentración (mg de Ácido gálico /L)	Concentración (mg de Ácido gálico /g de muestra)	Concentración (mg de Ácido gálico /g de muestra) (Peso Seco)
A-1 Hollejos	1,040	1,041	1031,500	147,848	158,070
	1,042				
A-1 Hollejos	1,046	1,046	1036,500	148,565	158,836
	1,046				
A-2 Pepas	0,821	0,823	813,000	116,530	125,526
	0,824				
A-2 Pepas	0,830	0,831	821,000	117,677	126,761
	0,831				
Orujos molidos en Etanol al 70% post secado y molienda	0,741	0,742	732,500	104,992	115,693
	0,743				
Orujos molidos en Etanol al 70% post secado y molienda	0,749	0,749	739,500	105,995	116,799
	0,749				

Conclusiones

Las muestras de orujos pueden ser sometidas hasta 5 procesos de extracción consecutivos de polifenoles. A partir de una cuarta extracción el rendimiento del extracto de polifenoles disminuye (Tabla 4), por lo que para efectos de gasto energético y ahorro de tiempo, no se debería hacer más de 3 extracciones de polifenoles a una muestra de orujos.

Se obtienen mejores resultados en la extracción de polifenoles desde orujos molidos tratados con ultrasonido en frío durante 2 minutos.

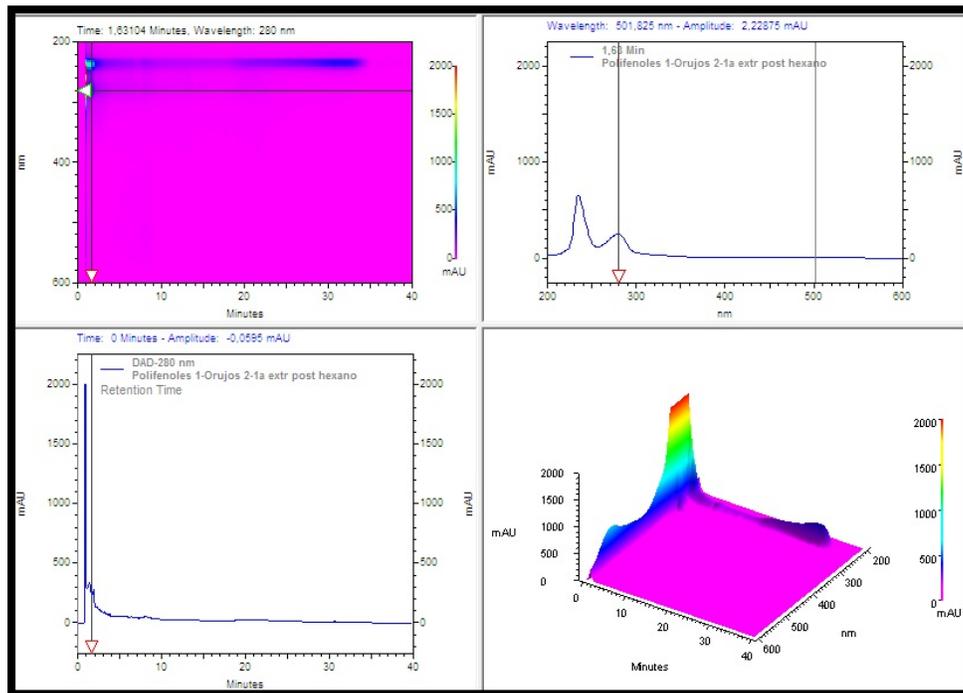
El uso de enzimas aumenta el rendimiento en la extracción de polifenoles, siendo pectinex al 1% a un pH entre 4.0-5.0 y 45°C la más efectiva para este propósito.

A mayor tiempo de incubación y concentración de enzima se observa un aumento en la extracción de polifenoles, pero para efectos de gasto energético y ahorro de tiempo, lo óptimo sería un tiempo de incubación entre 3 y 4 horas (Imagen 10) a una concentración de enzima del 1%.

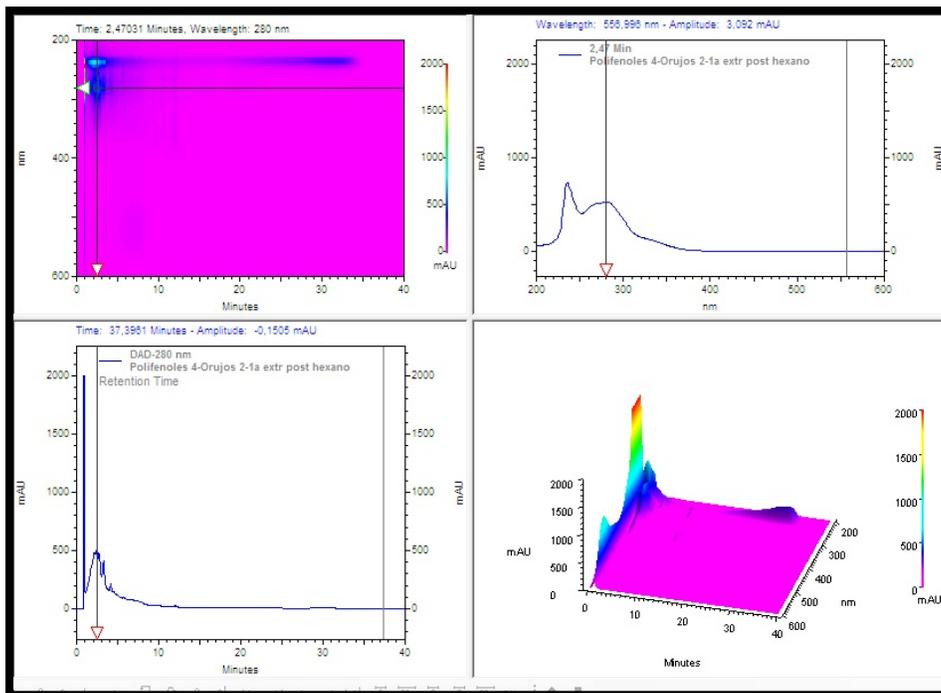
Algunos de los polifenoles que se lograron identificar y aislar por cromatografía HPLC-DAD preparativa fueron ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-coumárico, resveratrol, quercetina, los cuales fueron posteriormente analizados por cromatografía HPLC-DAD analítica. A continuación se muestra una lista con los polifenoles identificados junto a los resultados obtenidos por cromatografía HPLC-DAD analítica.

Lista de Polifenoles Identificados en orujos de uva:

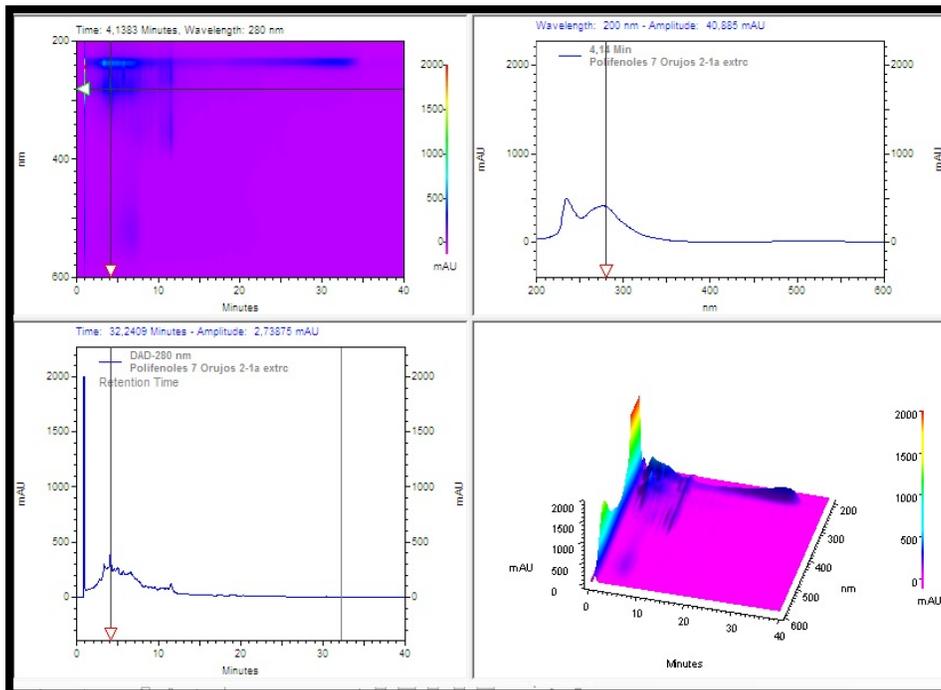
Ácido gálico



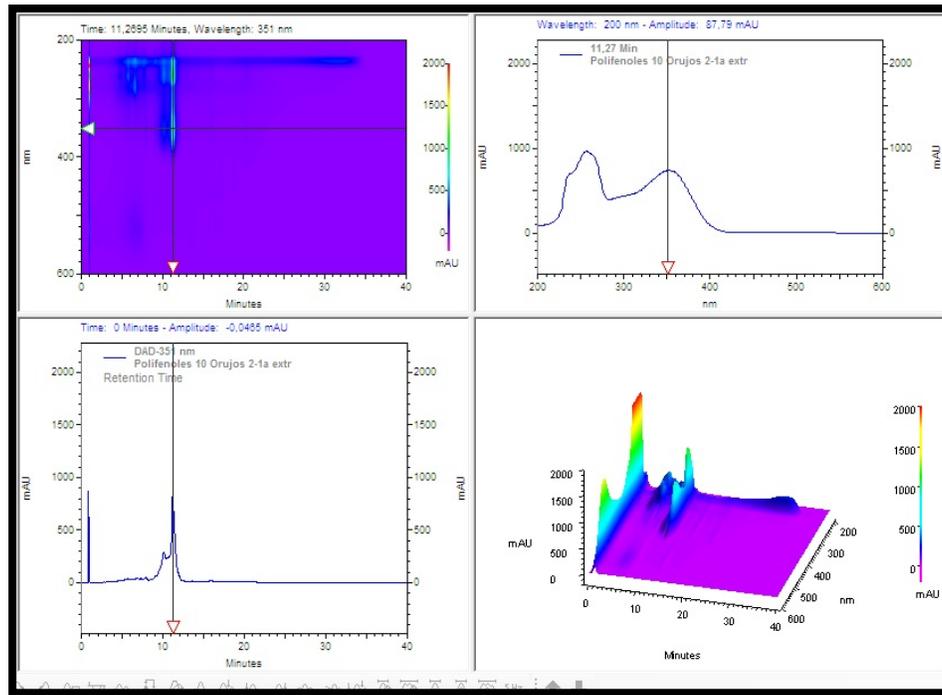
Ácido cafeico



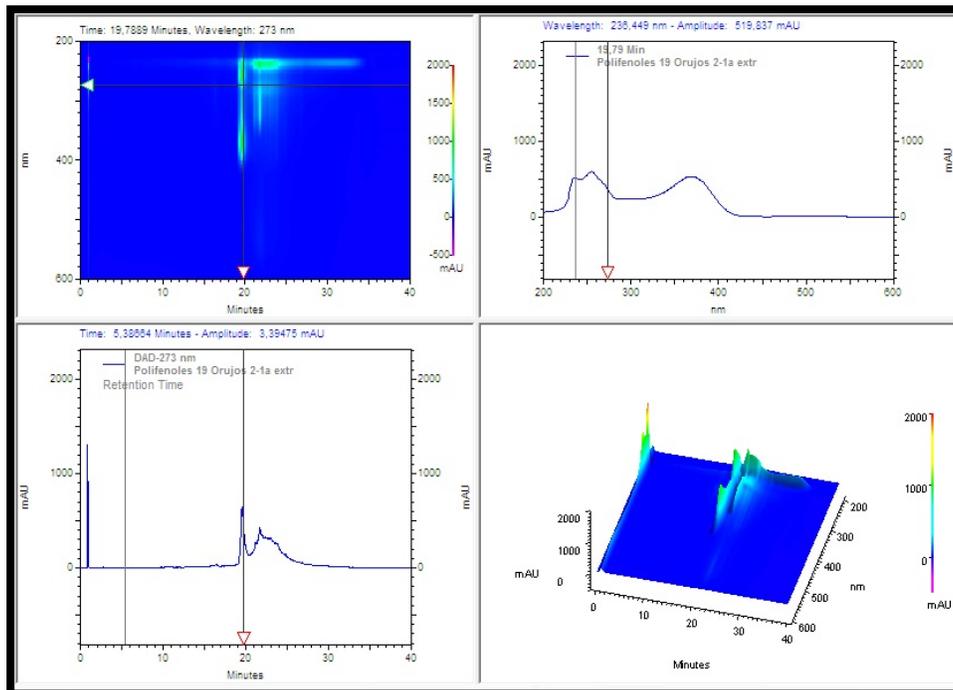
Ácido p-coumárico



Resveratrol



Quercetina



Se pudo demostrar que el extracto polifenólico de la muestra de orujos enteros presenta una mayor cantidad de polifenoles totales, específicamente del tipo flavanoles (3529mg/L (22,06%)) a lo largo de la corrida cromatográfica, en comparación con una muestra de vino 12 generaciones que presenta una cantidad más baja de polifenoles totales medidos a una longitud de onda de 280nm. Se logró una extracción más eficiente de polifenoles desde orujos molidos alcanzado un rendimiento total del 9,10% en base a peso seco de orujos (Tabla 4). Al extraer polifenoles mediante tratamiento enzimático se lograron rendimientos de entre 19,99% a un 47,42% dependiendo de las condiciones enzimáticas (Tablas 7, 8 y 9).

Comparando los resultados obtenidos con antecedentes bibliográficos (**Martínez- Valverde, Isabel, Periago, María Jesús, & Ros, Gaspar. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 50(1), 5-18. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00040622200000100001&lng=es&tlng=es**), estudios han mostrado que en legumbres y cereales el contenido de polifenoles es <1 %. En las judías y en los guisantes, se han encontrado concentraciones del 2% expresado como equivalentes de catequinas (flavanoles). En algunos vegetales como la cebolla el principal aporte de polifenoles es de quercitina que alcanza concentraciones de 347 mg/kg.

El principal flavonoide presente en las frutas es la quercitina, encontrándose altos contenidos en manzanas (36 mg/kg).

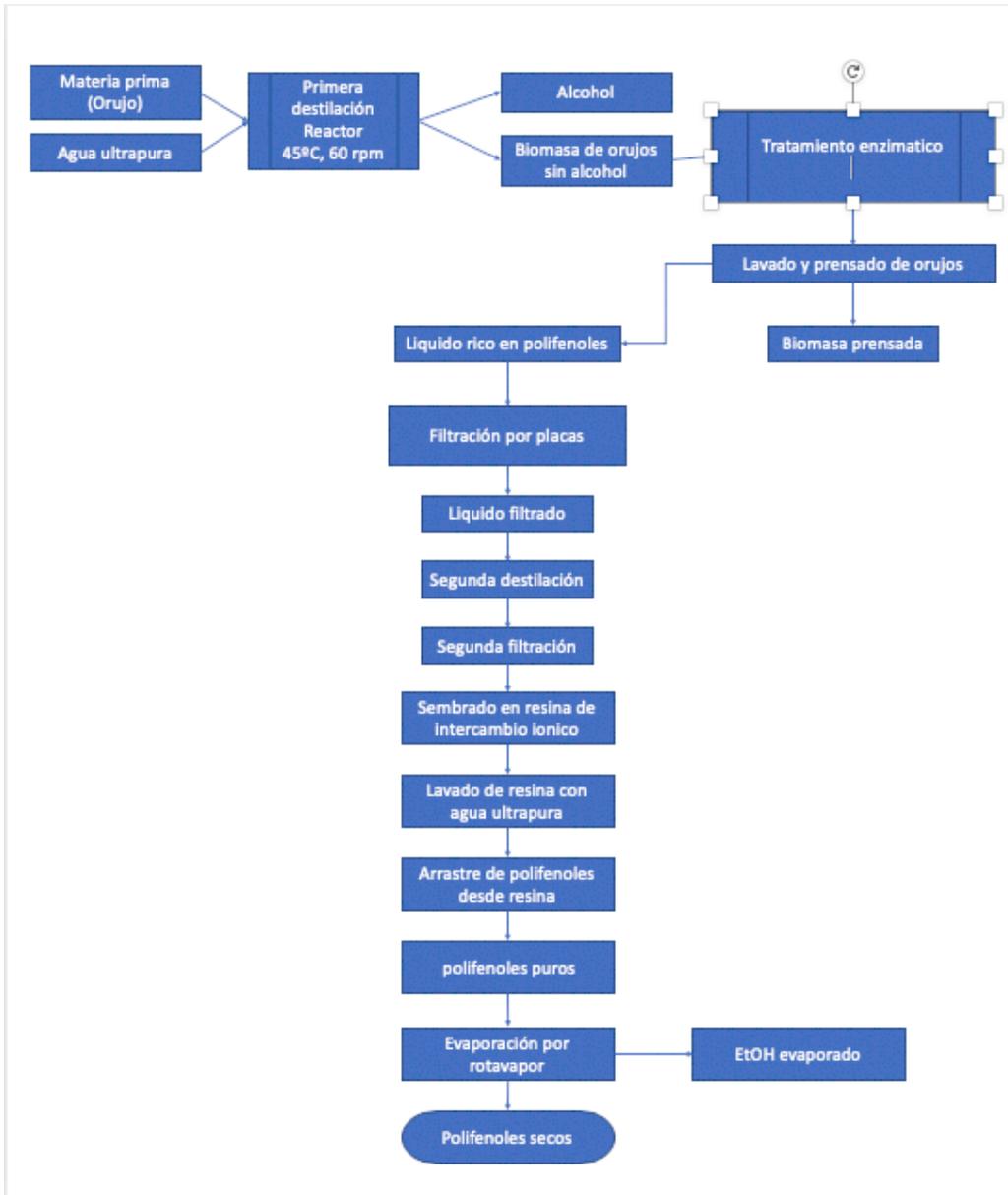
El contenido de polifenoles en los zumos de frutas oscila generalmente entre 2 y 500 mg/L, dependiendo del tipo analizado.

Existen diferencias entre el contenido de compuestos fenólicos en vino blanco y en vino tinto, siendo menor en el primer caso. Así, el contenido medio de compuestos fenólicos en un vino blanco típico es del orden de 250 mg/L, aunque se pueden encontrar algunos tipos con un contenido de 2000 mg/ L. Por el contrario, el contenido de compuestos fenólicos totales en un vino tinto típico oscila entre 1000 y 4000 mg/L.

El té es una de las bebidas con un mayor contenido en compuestos fenólicos de interés nutricional, destacando por su alta concentración en catequinas, las cuales constituyen más del 30% del peso seco de la hoja, flavonoles (quercitina, kaempferol y sus glicósidos), flavonas y ácidos fenólicos (ácido gálico y ácido clorogénico).

A partir de los resultados obtenidos en los distintos experimentos, se elabora el siguiente diagrama de extracción de polifenoles de orujos, ocupando para esto un reactor equipado con un balón de vidrio con una capacidad de 50 litros.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE OBTENCION DE POLIFENOLES



PRODUCCION DE CAPSULAS DE POLIFENOLES:

Cada frasco contiene 60 capsulas

Cada cápsula contine 0.3 gramos de polifenoles

Por lo tanto para la producción de un frasco se requieren 18 gramos de polifenoles.

Considerando que la produccion de orujos de los productores esta en el rango 100.000 Kg con un 70 % de humedad esto, nos permite obtenr 30.000 kg de orujos deshidratados.

El costo de producción de cada frasco debiera estar en el rango de \$3.000-\$4.000 /frasco, considerando la maquila en un laboratorio certificado y compra de envase.

El precio de venta directa debiera ser entre \$12.000 - \$16.000 /frasco.

Supplement Facts		
Serving Size 2 Capsules		
Servings Per Container 30		
Amount per Serving	% Daily Value	
Resveratrol	66 mg	*
Ácido Gálico	58 mg	*
Quecetina	44 mg	*
Ácido Cafeico	15 mg	*
Ácido p-coumárico	13 mg	*

* Daily Value not established

Distributed by Bioingemar Limitada
Avenida Collao 1691
Concepción, Región del Biobío, Chile



**VITA
GRAPE**

Cápsulas Antioxidantes

60 cápsulas



ANEXO N°3
PYT-2018-0329

Con el fin de estudiar la capacidad antiinflamatoria de diversos extractos de polifenoles obtenidos desde el hollejo de uva, estos fueron ensayados en experimentos de cultivo celular *in vitro*. Las líneas celulares utilizados fueron monocitos humanos THP-1, queratinocitos humanos HEK001, y fibroblastos humanos.

La línea celular fueron adquiridas desde ATCC. Todos los materiales y reactivos fueron adquiridos por Genexpress, Fermelo y Thermo Fisher, Merck.

Se comenzó el trabajo experimental utilizando las células monocíticas debido a que fue la línea de más rápida adquisición. El cultivo de estas células se realiza en medio RPMI 1640, suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, la preparación del medio se realizó por filtración con filtros de 0,2 μm en condiciones de esterilidad en cámara de bioseguridad.

Las células crio-preservedas fueron descongeladas en un baño de agua a 37°C, una vez descongeladas fueron resuspendidas en 9 ml de medio RPMI completo, y luego centrifugadas a 3500 RPMI por 5 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el pellet celular fue resuspendido nuevamente en 5 ml de medio de cultivo completo fresco. Las células fueron sembradas en un frasco T75, e incubadas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Las células se dejaron en incubación por 5 días hasta alcanzar una confluencia de 3×10^6 células/ml.

Las células THP-1 crecen en suspensión, por lo que una vez alcanzada la confluencia necesaria, las células fueron plaqueadas en placas de cultivo de 96 pocillos, a una densidad de 1×10^5 células/ml y tratadas con PMA a una concentración de 5 ng/ml por 16 horas, con el fin de generar su diferenciación a macrófagos adherentes.

Una vez las células fueron diferenciadas, se utilizaron en primera instancia para realizar una curva de respuesta a distintas concentraciones del agente inflamante LPS, se ensayó concentraciones de 0 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.50 $\mu\text{g/ml}$, 0.75 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, para determinar la concentración óptima de ensayo, las condiciones fueron ensayadas con un n=6. El tiempo de exposición a LPS fue de 12 horas, luego de las cuales se recolecto el medio de cultivo de cada pocillo para ser almacenado a -10°C durante la noche.

En paralelo se incubó el anticuerpo de captura para las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , cuya cuantificación permite el estudio de la respuesta de inflamación aguda. Los anticuerpos de captura fueron preparados por medio de una dilución en buffer fosfato salino estéril, e incubados en placas Costar High-Binding para ensayo ELISA de 96 pocillos, a 4°C durante toda la noche. Se utilizó placas distintas para la detección de IL-1 β y de TNF- α , preparando 6 pocillos para cada condición a probar.

Al día siguiente se preparó buffer de lavado en cantidad suficiente para realizar todos los lavados necesarios según el protocolo de ensayo ELISA, se preparó los anticuerpos específicos de detección para IL-1 β y TNF- α , por dilución en solución de bloqueo ELISPOT, previamente preparada por dilución en buffer fosfato salino; además se preparó una dilución de High Binding Protein Avidine (HBP-Avidina), y una solución de H₃PO₄ 1N.

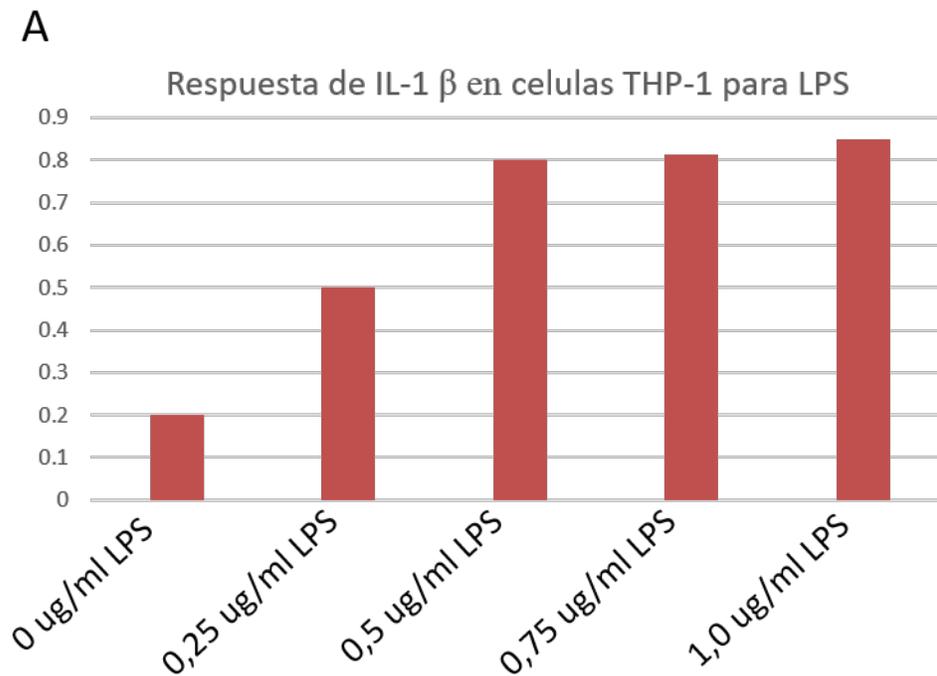
Una vez preparadas todas las soluciones, se lavó 3 veces cada pocillo con 300 μ l de buffer de lavado, por 1 minuto cada lavado. Se procedió a bloquear los pocillos con 300 μ l de solución ELISPOT, e incubar a temperatura ambiente por 1 hora. Durante este tiempo de incubación se descongeló las muestras de medio de cultivo tratado con distintas concentraciones de LPS.

Luego del bloqueo, se volvió a realizar 3 lavados de 1 minuto cada uno, para proceder con la incubación del medio de cultivo descongelado, se incubó 100 μ l de medio por pocillo, tanto en la placa para detección de IL-1 β , como en la placa para detección de TNF- α . El medio se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Luego del tiempo de incubación, las placas fueron lavadas 3 veces por 1 minutos cada lavado, y se incubó 100 μ l de los anticuerpos de detección respectivos en cada placa, durante una hora a temperatura ambiente. Se volvió a realizar 3 lavados de 1 minuto cada, antes de incubar 100 μ l de la solución de Avidina por pocillo, durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavó cada placa 6 veces, con lavados de 1,5 minutos cada uno. Se incubó la solución TMB por 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente, y luego de los 30 minutos transcurridos, se detuvo la reacción colorimétrica inducida por TMB, utilizando 50 μ l por pocillo de H₃PO₄ 1N. Las placas fueron leídas con un lector de placas a 450 nm (imagen 1).

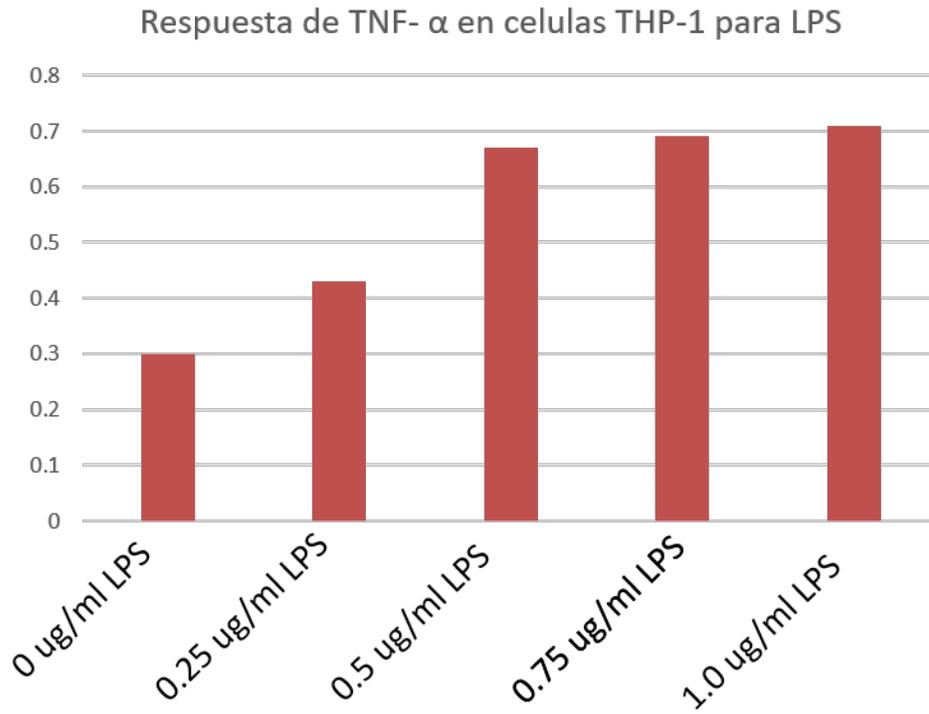
EXPERIMENTO N°1

Imagen 1. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL DE LPS PARA RESPUESTA DE IL-1 β IMAGEN 1.A, FACTOR NECROTICO TUMORAL TNF-ALFA IMAGEN 1.B

A) Curva de respuesta de IL-1 β en células THP-1 a concentraciones de LPS de 0 μ m/ml, 0.25 μ m/ml, 0.5 μ m/ml, 0.75 μ m/ml y 1 μ m/ml. B) Curva de respuesta de TNF- α en células THP-1 a concentraciones de LPS de 0 μ g/ml, 0.25 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.75 μ g/ml y 1 μ g/ml.



B

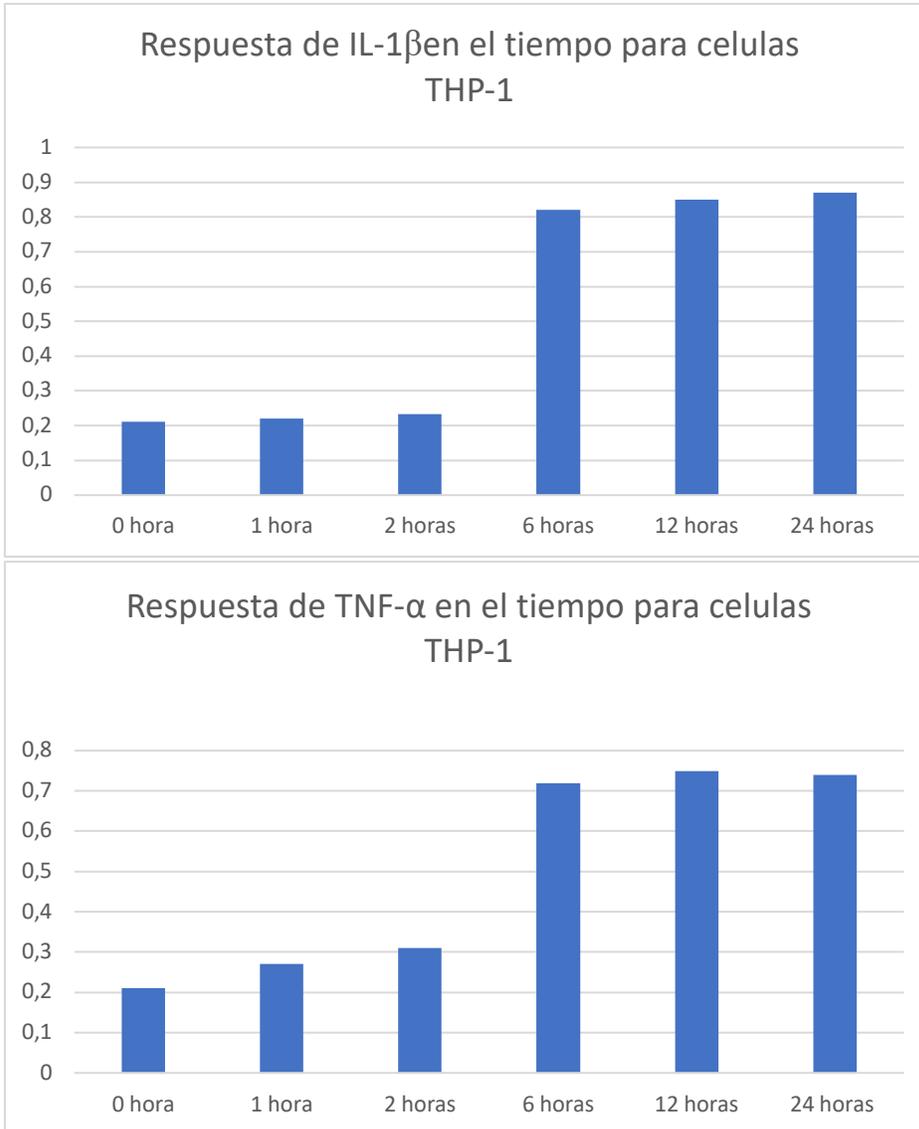


Se decidió utilizar LPS a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en subsiguientes ensayos con células THP-1.

Para determinar el tiempo óptimo de incubación con LPS, se repitió este procedimiento aplicando un tratamiento de exposición de LPS a concentración constante de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, en distintas condiciones de tiempo a 0,1,2,6,12 y 24 horas. (Imagen 2)

EXPERIMENTO N°2

Imagen 2. Respuesta a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS a intervalos de tiempo de 0,1,2,6,12 y 24 horas de exposición.



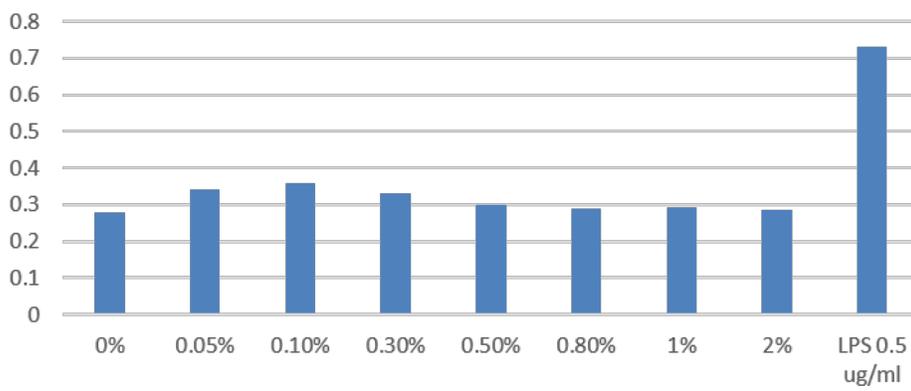
Se decidió trabajar con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, y una exposición de 5 horas, en subsiguientes ensayos.

EXPERIMENTO N°3

Imagen 3. Respuesta de IL-1 β y TNF- α en células THP-1, tratadas con concentraciones de 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1% y 2% de extracto de polifenoles totales extraídos desde hollejo entero de uva.

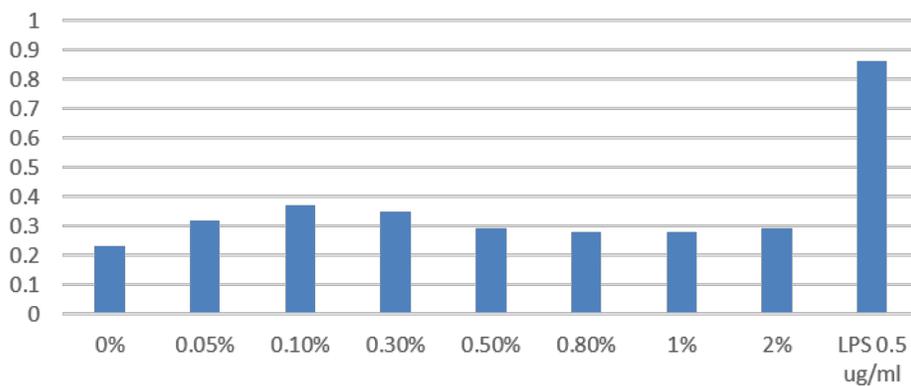
A

Respuesta de IL-1 β en celulas THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales, de hollejo entero.



B

Respuesta de TNF- α en celulas THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales, de hollejo entero.



Estos experimentos nos evidencian que el extracto de polifenoles totales extraido desde hollejos enteros no aumenta la expresión de citocinas pro-inflamatorias en celulas THP1 diferenciadas (macrofagos humanos) a concentraciones entre 0.8 a 2% peso/volumen.

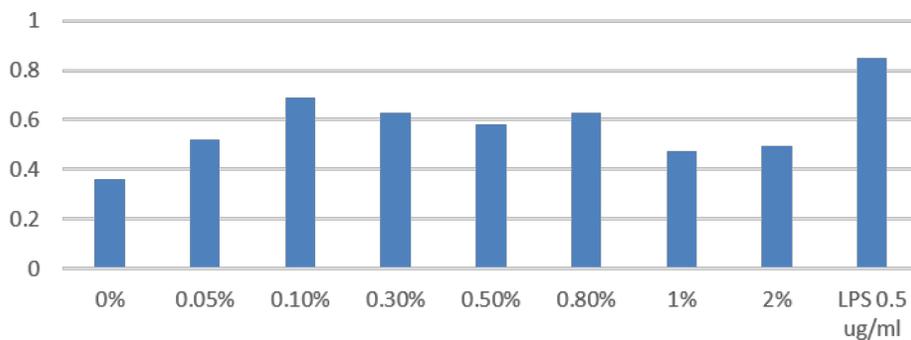
EXPERIMENTO N°4

El ensayo se realizó en extractos autoclavados de polifenoles totales obtenidos desde hollejo entero de uva, se utilizó las mismas concentraciones experimentales. Los resultados de cuantificación de IL-1 β y TNF- α , se muestran respectivamente en la Imagen 4A y 4B.

Imagen 4. Respuesta de IL-1 β y TNF- α en células THP-1, tratadas con concentraciones de 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1% y 2% de extracto autoclavados de polifenoles totales extraídos desde hollejo entero de uva.

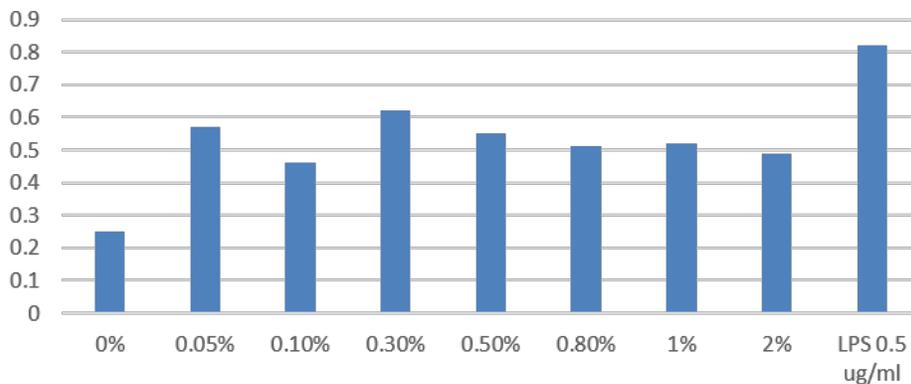
A

Respuesta de IL-1 β en células THP-1 tratadas con extracto autoclavado de polifenoles totales, de hollejo entero.



B

Respuesta de TNF- α en células THP-1 tratadas con extracto autoclavado de polifenoles totales, de hollejo entero.



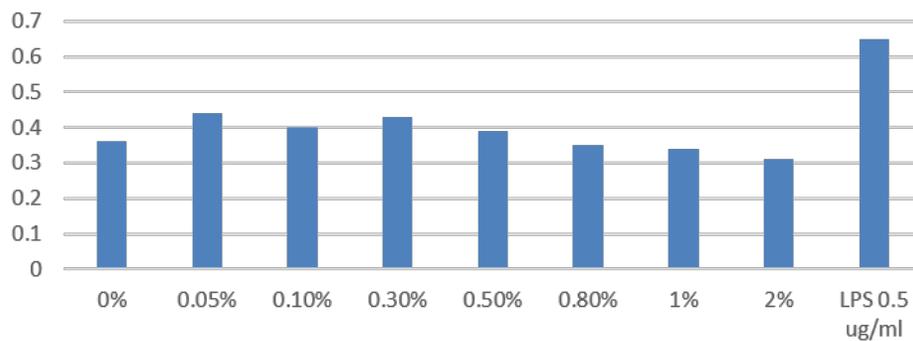
Estos experimentos nos evidencian que el extracto de polifenoles totales extraido desde hollejos enteros y autoclavados, provocan un aumento de citokinas pro-inflamatorias en celulas THP1 diferenciadas (macrofagos humanos) entre 0.05 y 2%

EXPERIMENTO N°5

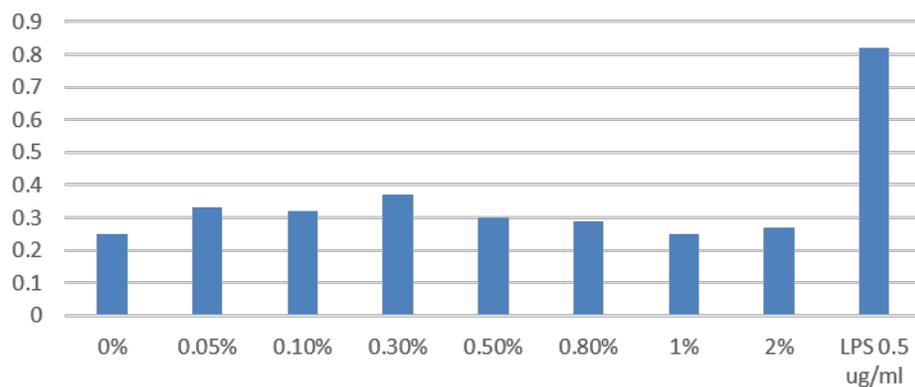
El ensayo se realizó en extractos de polifenoles totales obtenidos con agitación desde hollejo entero de uva, se utilizó las mismas concentraciones experimentales. Los resultados de cuantificación de IL-1 β y TNF- α , se muestran respectivamente en la Imagen 5A y 5B.

Imagen 5. Respuesta de IL-1 β y TNF- α en células THP-1, tratadas con concentraciones de 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1% y 2% de extracto de polifenoles totales extraídos con agitación desde hollejo entero de uva.

A Respuesta de IL-1 β en celulas THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales extraido con agitación, de hollejo entero.



B Respuesta de TNF- α en celulas THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales extraido con agitación, de hollejo entero.



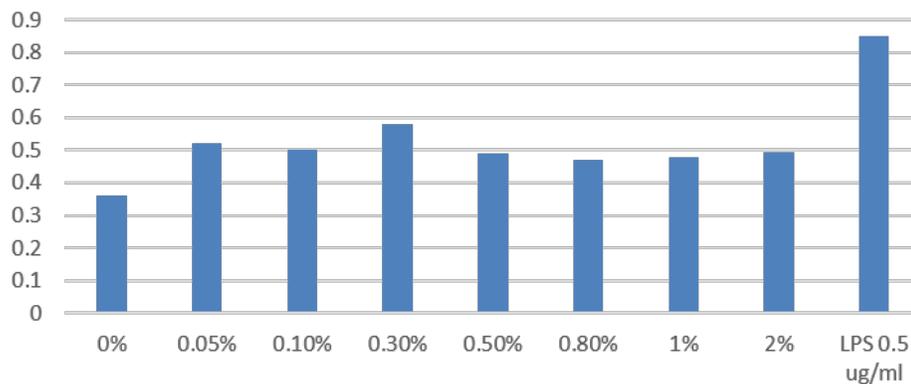
Estos experimentos nos evidencian que el extracto de polifenoles totales extraido con agitación desde hollejos enteros no aumenta la expresión de citokinas pro-inflamatorias en celulas THP1 diferenciadas (macrofagos humanos) a concentraciones entre 0.8 a 2% peso/volumen.

EXPERIMENTO N°6

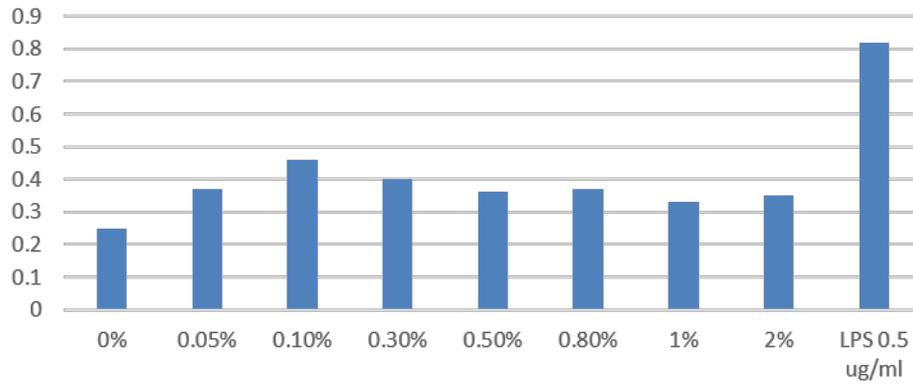
El ensayo se realizó en extractos de polifenoles totales obtenidos desde hollejo molido de uva, se utilizó las mismas concentraciones experimentales. Los resultados de cuantificación de IL-1 β y TNF- α , se muestran respectivamente en la Imagen 6A y 6B.

Imagen 6. Respuesta de IL-1 β y TNF- α en células THP-1, tratadas con concentraciones de 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1% y 2% de extracto de polifenoles totales extraídos desde hollejo molido de uva.

A Respuesta de IL-1 β en celulas THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales, de hollejo molido.



B Respuesta de TNF- α en células THP-1 tratadas con extracto de polifenoles totales, de hollejo molido.



Estos experimentos nos evidencian que el extracto de polifenoles totales extraido desde hollejos molidos, provocan un aumento de citokinas pro-inflamatorias en células THP1 diferenciadas (macrofagos humanos) entre 0.05 y 2%

Análisis de inhibidores de transportadores GLUT.

En este grupo de experimentos empleamos algunas de las plataformas desarrolladas por el Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Austral, para evaluar una batería de extractos obtenidos durante la ejecución del presente proyecto en cuanto a su capacidad para afectar el transporte de azúcares facilitado por transportadores GLUT. Los extractos corresponden a mezclas complejas de polifenoles aislados desde piel y semilla de uva País obtenidas desde el sindicato de viñateros de Yumbel. En primer lugar evaluamos si los extractos identificados como 660 (polifenoles de piel de uva País), 661 (polifenoles de orujo entero de uva País) y 662 (polifenoles de semilla de uva País) son capaces de modular a los transportadores GLUT1 y GLUT2 expresados en células HEK-293.

Para realizar la caracterización funcional del transporte en células PLC/PRF/5 realizamos ensayos de competencia del transporte de DOG (2- desoxi-D-glucosa) por diversos azúcares. Específicamente, se hizo competir el transporte de 2 mM DOG radiactivo en ausencia o presencia de una alta concentración (100 mM) de varios azúcares no radiactivos: DOG, OMG, glucosamina, galactosa, manosa, fructosa, metilglucósido y sorbitol. El panel F de la **imagen N°7** muestra que el transporte de DOG radiactivo es competido por DOG frío y por OMG, glucosamina, galactosa y manosa. En cambio, la adición de altos niveles de fructosa, α -metilglucósido o sorbitol no afectan la entrada de DOG. Es conocido que GLUT2 aparte de DOG o OMG permite la captación de galactosa y manosa (Gould et al., 1991). Es destacable resaltar que otra propiedad funcional distintiva de GLUT2 es que facilita el transporte de glucosamina con alta afinidad, en contraste con GLUT1 que lo transporta con menor avidez (Uldry et al., 2002).

Posteriormente se desarrollaron experimentos para probar la pertinencia de usar las células PLC/PRF/5 para detectar y caracterizar putativos agentes inhibidores de GLUT2, para lo cual realizamos ensayos de la sensibilidad del transporte de DOG (2-desoxi-D-glucosa) en células PLC/PRF/5 frente a diversos inhibidores reconocidos de GLUT2. Para ello seleccionamos a la fitoalexina resveratrol, la flavona quercetina, la chalcona citocalasina B y las metilxantinas pentoxifilina y cafeína. Asimismo, para mejorar la calidad de las determinaciones realizamos los experimentos usando células que fueron pretratadas con alta glucosa durante 30 min. La **Imagen N°8** muestra que la entrada de DOG fue inhibida por cada uno de estos compuestos. Los IC₅₀ aparentes fueron: resveratrol 93 μ M, quercetina 40 μ M, citocalasina B 14 μ M, pentoxifilina 4,6 mM y cafeína 6,3 μ M. Estos valores concuerdan favorablemente con los valores de IC₅₀ aparentes determinados en ensayos previos usando el transportador GLUT2 expresado en ovocitos de Xenopus. En particular, es conocido que el transportador GLUT2 es relativamente menos sensible que GLUT1 frente a citocalasina B, uno de los inhibidores característicos de los transportadores GLUT. Nosotros determinamos que los IC₅₀ aparentes para citocalasina B de GLUT1 y de GLUT2 expresados en ovocitos de Xenopus fueron 1,8 μ M y 17 μ M, respectivamente. Por tanto, la sensibilidad a citocalasina B demostrada por el transportador de hexosas presente en las células PLC/PRF/5 es concordante con lo esperado para la expresión predominante de GLUT2.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que las células PLC/PRF/5 son una plataforma adecuada para probar la sensibilidad del transportador GLUT2 humano frente a putativos moduladores o inhibidores de su actividad. Esta conclusión se apoya en que: 1) hemos establecido que el transportador GLUT2 es el transportador de hexosas funcionalmente predominante en estas células, 2) hemos demostrado que estas células

expresan niveles relativamente altos de mRNA para este transportador, 3) hemos probado que la proteína se encuentra presente en la membrana plasmática y en compartimientos intracelulares, 4) hemos obtenido pruebas que la exposición de las células a alta glucosa por un breve periodo de tiempo provoca el eficiente reclutamiento del transportador GLUT2 hacia la membrana plasmática y, 5) hemos demostrado que la actividad de transporte basal en estas células responde a inhibidores reconocidos de GLUT2 con la sensibilidad esperada para el transportador GLUT2.

Los paneles superiores de la **imagen N°9** muestran que todos los extractos exhiben una significativa capacidad para inhibir la actividad de GLUT1; los valores de IC₅₀ determinados en estas condiciones fueron 1,8, 1,7 y 1,5 g/L para extracto 660, 661 y 662, respectivamente. Además, como se muestra en los paneles inferiores, estos extractos también fueron capaces de afectar la actividad del transportador GLUT2. Los valores de IC₅₀ determinados para los extractos 661 y 662 fueron 1,8 y 1,1 g/L, respectivamente. El transporte basal en cada caso corresponde a células HEK- 293 transfectadas con cDNA para GLUT1 o GLUT2 según el caso, pero que no contienen codón de inicio. Los valores de IC₅₀ obtenidos en este sistema no se han corregido por la contribución del transporte basal de glucosa en células controles.

Para confirmar estos resultados, decidimos probar el efecto de estos extractos al expresar ambos transportadores GLUT en el sistema de ovocitos de *Xenopus laevis*. Los resultados en este sistema confirman que los extractos 660, 661 y 662 son eficientes inhibidores de ambos transportadores GLUT **Imagen N°10**. Los valores de IC₅₀ aparentes para la inhibición de GLUT1 fueron 0,2 g/L, 0,66 g/L y 0,35 g/L para los extractos 660, 661 y 662, respectivamente. En el caso del transportador GLUT2 los valores de IC₅₀ aparentes fueron 0,07 g/L, 0,07 g/L y 0,12 g/L para los extractos 660, 661 y 662, respectivamente. Es evidente que estos extractos contienen compuestos que son excelentes inhibidores de la actividad de ambos transportadores.

Una vez que hemos establecido que los extractos contienen compuestos con la habilidad de inhibir a GLUT1 y GLUT2 decidimos evaluar la capacidad citotóxica de estos extractos. La justificación de estos ensayos es que hemos probado e informado previamente que varios compuestos que son capaces de inhibir la actividad de los transportadores de glucosa, en particular de GLUT1, muestran a la vez la capacidad de inducir la muerte celular en células neoplásicas. Nosotros hemos empleado las líneas de células leucémicas humanas HL-60 y U937 para evaluar el efecto citotóxico de diversas sustancias. En los paneles A y B de la Imagen N°9 se muestra el efecto inducido por resveratrol y por NDGA en células U937 cuando se emplea el ensayo de captación de rojo neutro para estimar la viabilidad celular. Este ensayo se basa en la habilidad de las células viables de incorporar y retener el colorante rojo neutro en sus lisosomas. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana plasmática o lisosomal o cambios metabólicos que afecten la función lisosomal, como la depleción de ATP que impide la acción de la H-ATPasa lisosomal, resultan en una defectuosa captación y retención de la tinción. Es entonces posible distinguir entre células viables, dañadas o muertas al cuantificar la cantidad de colorante retenido en las células. Las células U937 expresan GLUT1 como el transportador de hexosas predominante; mientras resveratrol y NDGA son compuestos cuya acción inhibitoria es sobre GLUT1 y GLUT2. En el caso de los extractos 660, 661 y 662, encontramos que ninguno de los extractos

decrece la retención de rojo neutro en las células U937 en condiciones en las cuales ellos si afectan de manera significativa el transporte facilitado por GLUT1. Luego de 24 h **Imagen N°11** de exposición a niveles crecientes de los extractos, las células mostraron una mantención de su capacidad para retener rojo neutro e incluso en algunos casos la capacidad de retención fue aparentemente aumentada en presencia de los extractos. Concluimos entonces que los extractos son ricos en un compuesto o grupo de compuestos que muestran una elevada capacidad para inhibir la actividad funcional de los transportadores GLUT1 y GLUT2, pero que no muestran actividad citotóxica en células tumorales. De hecho, algunos extractos parecen mejorar la capacidad de retención lisosomal de las células.

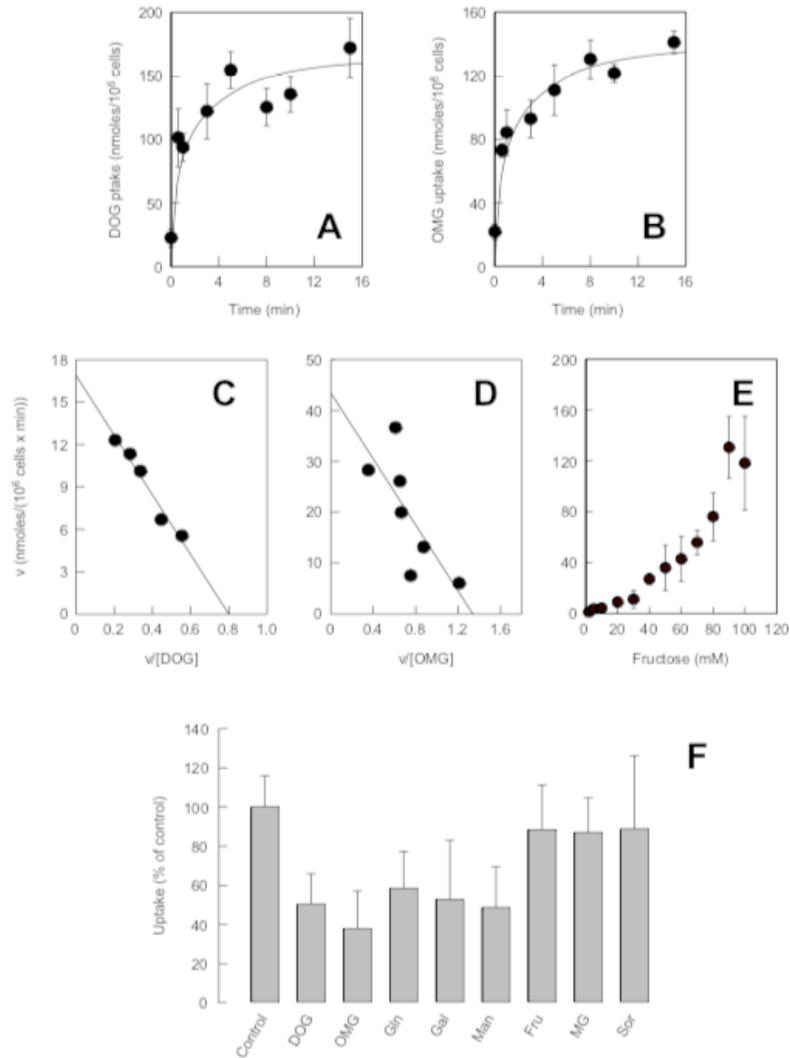


Imagen N°7. Caracterización de las células PLC/PRF/5 mediante ensayos funcionales de transporte de hexosas. A. Curvas de progreso para la entrada de DOG en condiciones cero-trans. B. Curvas de progreso para la entrada de OMG en condiciones de entrada cero-trans. C. Gráfico de Lineweaver-Burk de curva de saturación con DOG. D. Gráfico de Lineweaver-Burk de curva de saturación con OMG. E. Ensayos de competencia para el transporte de 2 mM DOG (radiactivo) con un exceso de 50 veces de diversos azúcares no marcados. Las abreviaturas corresponden a: OMG, 3-O-metilglucosa; Gln, glucosamina; Gal, D-galactosa; Man, D-manosa; Fru, D-fructosa; MG, α -metil-glucósido; Sor, D-sorbitol.

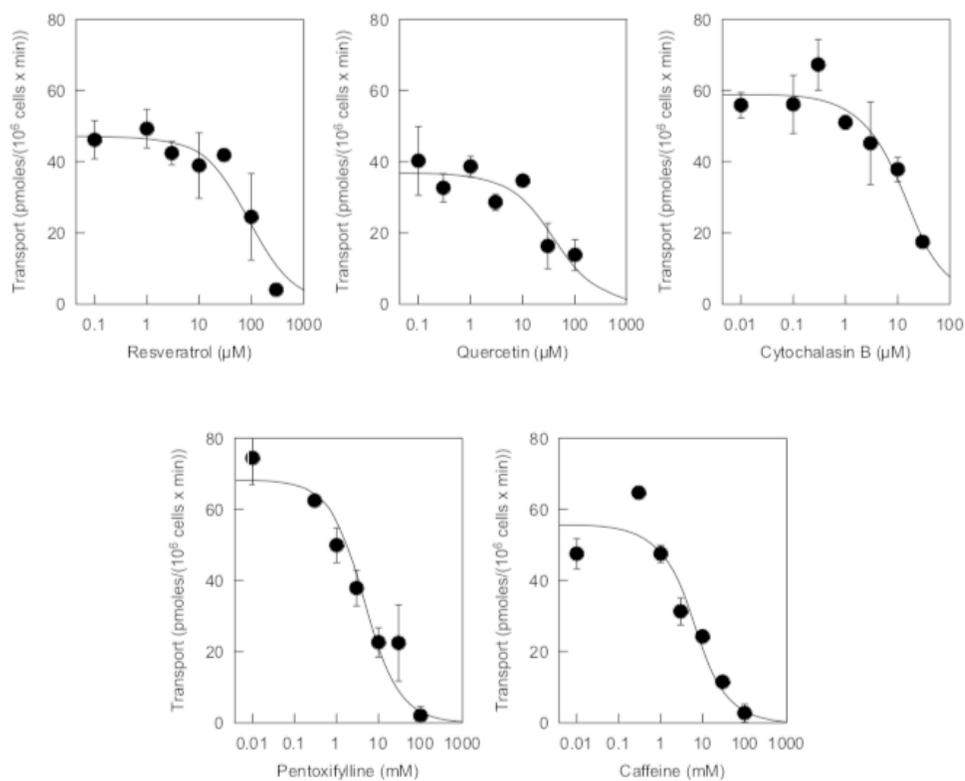


Imagen N°8 . *Ensayos de diversos inhibidores conocidos de GLUT2 en células PLC/PRF/5.* Las células PLC/PRF/5 se expusieron a 75mM glucosa durante 30 min y entonces los ensayos se realizaron utilizando 15mM DOG y en presencia de las concentraciones indicadas de los inhibidores. Los IC₅₀ aparentes fueron: resveratrol 93 μM, quercetina 40 μM, citocalasina B 14 μM, pentoxifilina 4,6 mM y cafeína 6,3 μM.

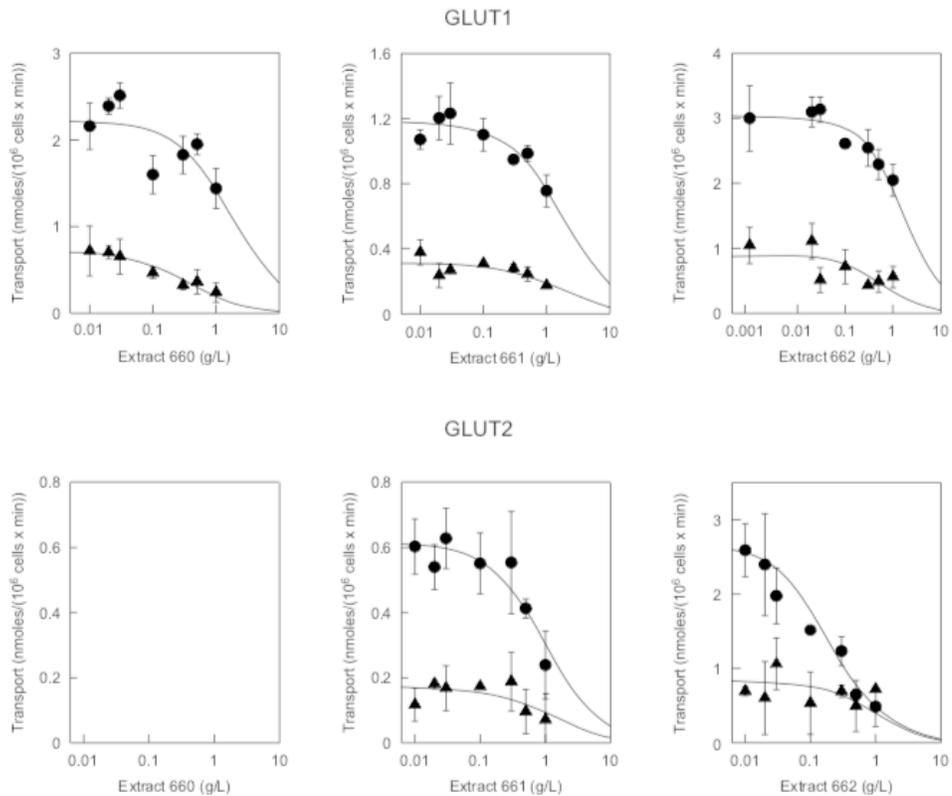


Imagen N°9. Evaluación de nuevos inhibidores de los transportadores GLUT en células HEK-293 transfectadas con GLUT1 o GLUT2. Se midió el transporte de 0,5 mM DOG (2-desoxi-D-glucosa) en células HEK-293 transfectadas con los transportadores GLUT1 (paneles superiores) y GLUT2 (paneles inferiores). Como control se emplearon células HEK-293 transfectadas con plásmidos que contenían las secuencias codificantes para GLUT1 y GLUT2 pero sin codón de inicio de la transcripción. Los símbolos corresponden a ensayos con las células transfectadas con GLUT funcionales (círculos llenos) y a las células controles (triángulos llenos). Los ensayos del extracto 666 con células que sobreexpresan GLUT2 no se han completado al momento de entrega del presente informe.

DOG es un sustrato que se utiliza regularmente para caracterizar las propiedades de los transportadores GLUT.

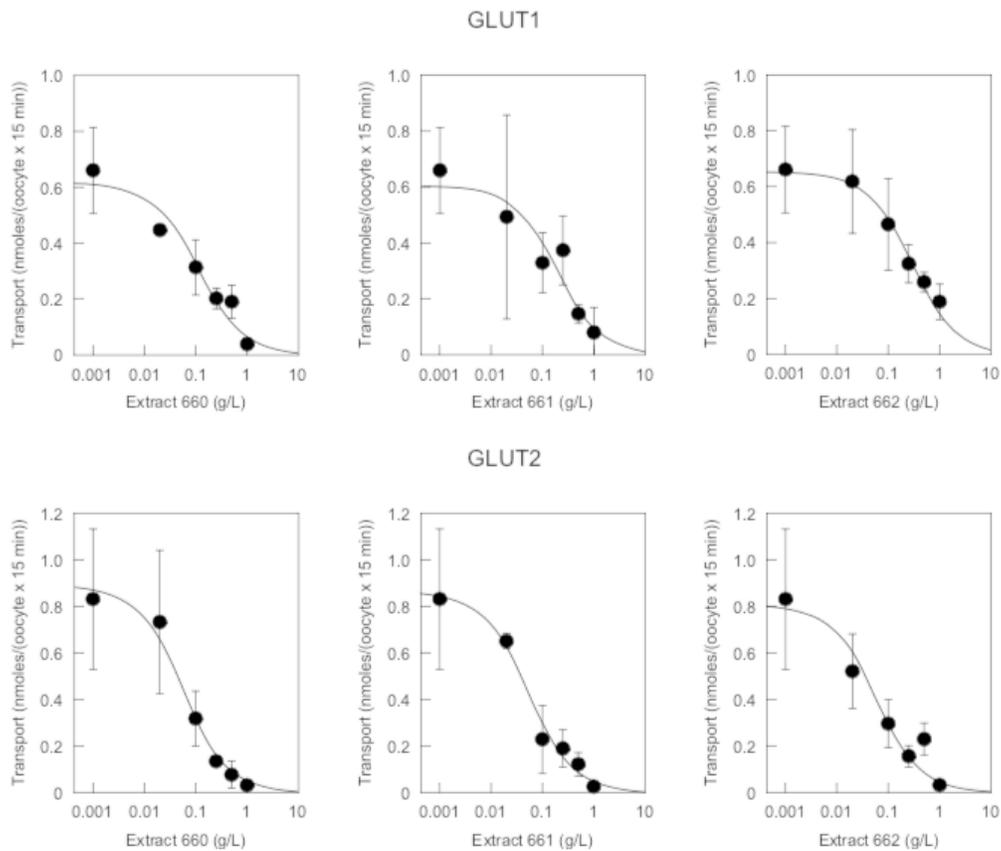


Imagen N°10. Evaluación de extractos polifenólicos como inhibidores de los transportadores GLUT en ovocitos de *Xenopus* que expresan GLUT1 o GLUT2. Se midió el transporte de 0,5 mM DOG en ovocitos inyectados con mRNA para los transportadores GLUT1 (paneles superiores) y GLUT2 (paneles inferiores). Para GLUT1 los IC50 aparentes fueron: extracto 660, 200 mg/L; extracto 661, 300 mg/L; extracto 662, 350 mg/L. Para GLUT2 los IC50 aparentes fueron: extracto 660, 70 mg/L; extracto 661, 70 mg/L; extracto 662, 120 mg/L.

IC50 : Es la concentración de un compuesto necesaria para obtener una reducción in vitro del 50%.

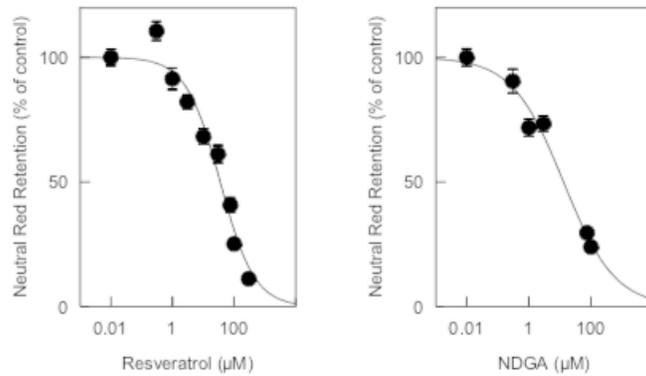
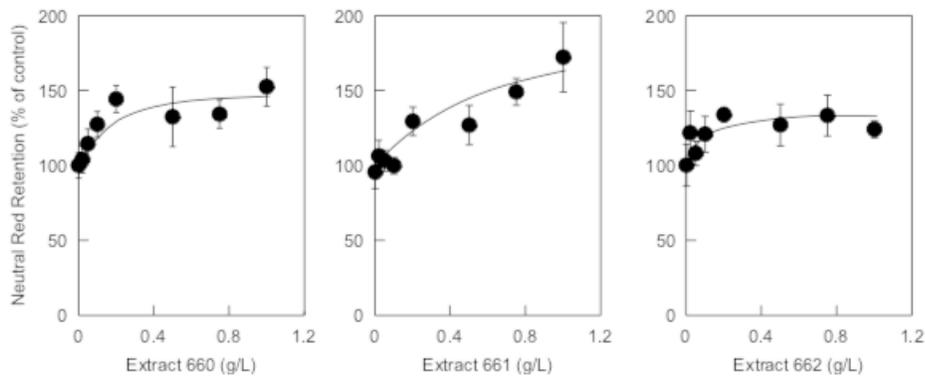
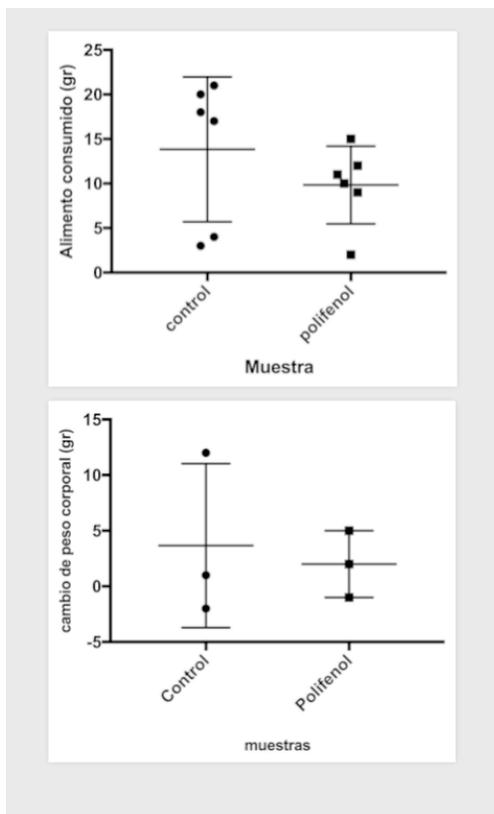
A**B**

Imagen N°11. *Ensayo de retención de rojo neutro para evaluar la viabilidad/citotoxicidad de compuestos que son inhibidores de transportadores GLUT.* Las células U937 son incubadas en presencia de las concentraciones indicadas de compuestos o extractos por un periodo de 24 h. El colorante rojo neutro se agrega 2 h antes del término del periodo de incubación. Las células se lavan, se solubilizan y se cuantifica espectrofotométricamente a 540 nm la cantidad de colorante remanente. Los valores corresponden al promedio \pm SD de ensayos realizados por triplicado.

Ensayos In Vivo:

Se inyectó 30 μ l de extracto polifenólico a una concentración de 12 ng/ml a ratas C57BL/6J Y BALB de 8 semanas de edad lo que le permite alcanzar una concentración final en el ventrículo de 1,2 ng/ml.

Se estudió su comportamiento con respecto a la ingesta de alimento, observándose una disminución de la ingesta con respecto a los ratones control.



Los experimentos no se han podido finalizar.

Ensayos in vivo

Se selecciono un grupo de 5 voluntarios entre 50 y 60 años sanos sin diagnostico de enfermedades metabolicas.

La glucosa en ayuna para todos estaba en el rango de 105 a 120 mg/dl

Después de una semana de ingerir 4 capsulas en ayuna los rangos de glicemia bajaron entre 10 y 20 mg/dl