



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Efecto del tratamiento con plasma frío atmosférico sobre la extracción de fenoles desde  
orujos de vino Cabernet Sauvignon**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**JOSSELIN VIVIANA GUAJARDO QUINTULEM**

**TALCA, CHILE  
2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

**APROBACIÓN**



---

**Profesor Guía: Felipe Laurie Gleisner, Ing. Agrónomo, M.S, Ph.D.  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad de Talca**



---

**Profesor Co – Guía: Anibal Concha Meyer, Ing. en Alimentos, Ph.D.  
Facultad de Ciencias Agrarias y Alimentarias  
Universidad Austral de Chile**

**Fecha de presentación de Memoria de Título: 29 de septiembre del 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Dios por su fidelidad en todos los momentos de mi vida, y en el desarrollo de mi trabajo de memoria de título.

Dar gracias igualmente a mi familia, las personas más importantes en mi vida, por su apoyo, esfuerzo y confianza durante todo este proceso de aprendizaje. Sin su apoyo nada hubiera sido posible. También a mi novio Angel Maureira por acompañarme, alentarme y ayudarme en este importante proceso de mi vida entregándome amor incondicional y una gran paciencia.

Sin lugar a duda, a mis profesores guías Felipe Laurie y Aníbal Concha, por sus orientaciones, consejos y disposición con el fin de ayudarme a terminar con éxito este trabajo.

Finalmente, agradezco al equipo del Laboratorio de Química Enológica de la Universidad de Talca, por acogerme y entregarme los instrumentos para realizar esta memoria. Y de manera especial a María Navarro por enseñarme y apoyarme cada vez que requerí de su ayuda.

## RESUMEN

En la actualidad, la producción de vino genera una gran cantidad de residuos orgánicos, siendo uno de ellos el orujo de las uvas (pieles y semillas), el cual suele acabar como un desecho sólido con poco valor económico. Sin embargo, este material contiene un alto valor en compuestos fenólicos no extraídos en su totalidad. Recientemente, diversas investigaciones han estudiado diferentes métodos de extracción no convencionales a partir del uso de tecnologías más eficientes, con el objetivo de obtener compuestos bioactivos con alto rendimiento.

Para este estudio se evaluó el efecto de la exposición del orujo de uvas Cabernet Sauvignon a plasma frío atmosférico, a partir de la aplicación de 1 ó 5 pulsos de 1 min cada uno, utilizando agua o una mezcla al 50% de agua con etanol como solventes para la extracción de compuestos fenólicos.

Los resultados mostraron que el plasma frío atmosférico no produjo un cambio significativo en la extracción de fenoles, acidez titulable y en el color de los extractos, a la longitud de onda a 420, 520 y 620 nm, pero sí provocó cambios significativos en la absorbancia a 316 y 375 nm. Además, el plasma sí afectó variables como el pH y contenidos sólidos solubles, los que aumentaron en los tratamientos expuestos a 5 pulsos. Además, en el transcurso del trabajo se observó que el uso de la tecnología de plasma produjo una disminución de volumen y variación de temperatura en las muestras (aumento en algunos casos y disminución en otros), dependiente del tiempo de tratamiento y el tipo de solvente. Como consecuencia de lo anterior se sugiere desarrollar una investigación más extensa de los efectos del uso de plasma frío sobre el orujo de uva.

## ABSTRACT

Currently, wine production generates a large amount of organic waste, one of which is the grape pomace (grape skins and seeds), that usually end up as a solid waste with less economic value. However, this material contains a high amount of phenolic compounds that are not fully extracted during the winemaking process. Various investigations have researched different non-conventional methods of extraction that may improve the goal of obtaining bioactive compounds with high performance.

This study evaluated the effects of the exposure of grape pomace of Cabernet Sauvignon variety to cold atmospheric plasma using 1 or 5 pulses of 1 min each, using water or 50% of water with ethanol, as extraction media for phenolic compounds.

The results showed that the cold atmospheric plasma did not produce a significant change in the extraction of phenols, titratable acidity and in the color the extracts at 420, 520 and 620 nm, but some variations were observed a 316 and 375 nm. Besides, the plasma treatments effected the pH and soluble solids, which increased its concentrations in the 5 pulses treatment. As an important note, it was observed that the use of plasma technology produced a decrease in sample the volume and a temperature variation of the samples (increase in some cases and decrease in others) depending on the treatment time and the type of solvent. For this reason, it is suggested that further research on the effects of using cold plasma on grape pomace should conducted.

# ÍNDICE

Página

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
1.1. Hipótesis .....	5
1.2. Objetivo general .....	5
1.3. Objetivos específicos.....	6
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1. Antecedentes generales de la uva .....	7
2.2. Importancia del orujo de la vid .....	8
2.2.1 Generalidades sobre el residuo de la vinificación .....	8
2.2.2. Composición del orujo de uva .....	8
2.2.3. Valorización del subproducto de la vinificación .....	9
2.3. Compuestos fenólicos de interés .....	9
2.3.1. Flavonoides .....	10
2.3.1.1. Flavonoles .....	11
2.3.1.2. Flavanoles .....	11
2.3.1.3. Flavonas .....	12
2.3.1.4. Flavononoles.....	12
2.3.1.5. Antocianinas .....	12
2.3.2. No flavonoides .....	13
2.3.2.1. Ácidos fenólicos .....	13
2.3.2.2. Estilbenos .....	15
2.3.2.3. Taninos.....	15
2.4. Técnicas de extracción de compuestos fenólicos .....	15
2.5. Tecnología para asistir la extracción de compuestos fenólicos .....	17
2.5.1. Plasma frío atmosférico (PFA) .....	17
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Establecimiento y lugar del ensayo .....	19
3.2. Material vegetal .....	19
3.3. Reactivos .....	19

3.4. Métodos de extracción.....	20
3.4.2. Tratamiento de extracción con plasma frío atmosférico (PFA) sobre orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	20
3.5. Evaluaciones físicas post- tratamiento de extracción.....	22
3.6. Evaluaciones.....	22
3.6.1. Determinación del efecto del PFA sobre el contenido de fenoles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	22
3.6.2. Determinación del color en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon....	22
3.6.3. Otras determinaciones.....	23
3.6.3.1. Sólidos solubles.....	23
3.6.3.2. Acidez real (pH) y acidez titulable.....	23
3.7. Diseño experimental y análisis estadísticos.....	23
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
4.1. Determinaciones de características químicas.....	24
4.2. Determinación del efecto de PFA el sobre contenido de fenoles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	27
4.3. Determinación de intensidad de color (420 + 520 + 620 nm) en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	30
4.4. Determinación del color en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	32
4.5. Análisis de la masa de las placas.....	35
4.6. Análisis de temperatura.....	37
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 2.1.</b> Partes de una baya de uva (Puig i Vayreda, 2016) .....	7
<b>Figura 2.2.</b> Distribución de compuestos fenológicos en la uva (Soler Fernández, 2017) .....	9
<b>Figura 2.3.</b> Estructura básica de los compuestos fenólicos (Soler Fernández, 2017).....	10
<b>Figura 2.4.</b> Estructura química general de los flavonoides presentes en uvas y vinos (Fanzone, 2012). .....	11
<b>Figura 2.5.</b> Estructura básica de antocianina (Adaptado de Fanzone, 2012).....	13
<b>Figura 2. 6.</b> Estructura básica de ácidos hidroxibenzoicos (Adaptado de García Ossandón, 2016).....	14
<b>Figura 2.7.</b> Estructura básica de ácido hidroxicinámico (Adaptado de García Ossandón, 2016).....	14
<b>Figura 3.1.</b> Muestras en polvo de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon con un tamaño de partícula < 1mm aproximadamente.....	19
<b>Figura 3.2.</b> Ejemplo del tratamiento de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon expuesta a la aplicación de plasma frío atmosférico (PFA).....	21
<b>Figura 4.1.</b> Masa de placa Petri con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después en muestras de controles, sin aplicación del PFA.....	36
<b>Figura 4.2.</b> Masa de placa Petri con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después del efecto del plasma frío atmosférico. ....	36
<b>Figura 4.3.</b> Temperatura (°C) promedio de muestras con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después, sin aplicación del PFA.....	38
<b>Figura 4.4.</b> Temperatura (°C) promedio de muestras con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después del efecto del plasma frío atmosférico.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

### Página

<b>Cuadro 3.1.</b> Tratamiento control utilizados para la determinación basal extracción de fenoles del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon bajo estudio.....	20
<b>Cuadro 3.2.</b> Tratamientos para la determinación de los efectos del plasma frío atmosférico sobre la extracción de fenoles del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon bajo estudio.....	21
<b>Cuadro 4.1.</b> Valores de medias y desviación estándar del contenido de solidos solubles, pH y acidez titulable para controles sometidos al efecto del tipo de solvente. ....	24
<b>Cuadro 4.2.</b> Efecto de los tratamientos con plasma frío atmosférico y tipo de solvente sobre características químicas en el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	24
<b>Cuadro 4.3.</b> Efecto del solvente sobre la extracción de fenoles totales desde orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	28
<b>Cuadro 4.4.</b> Efecto del tratamiento con plasma frío atmosférico y solvente sobre la extracción de fenoles desde orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	28
<b>Cuadro 4.5.</b> Intensidad de color (promedios y desviación estándar) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos tipos de solvente.....	31
<b>Cuadro 4.6.</b> Intensidad de color (promedios y desviación estándar) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frío atmosférico y tipo de solvente escogidos.....	31
<b>Cuadro 4.7.</b> Análisis de color a diferentes longitudes de ondas (316, 375, 420, 520 y 620 nm) en los controles aplicados para el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.....	33
<b>Cuadro 4.8.</b> Análisis de color a diferentes longitudes de ondas (316, 375, 420, 520 y 620 nm) en los tratamientos aplicados para el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon. ....	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Página

<b>Anexo 7.1.</b> Cuadro de comparación múltiple para determinar las medias significativas de las variables masa de placas (g), Test Tukey (HSD).....	45
<b>Anexo 7.2.</b> Cuadro masa de placas (promedios) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frío atmosférico y tipo de solvente escogidos.....	45
<b>Anexo 7.3.</b> Cuadro temperatura (promedios y desviación estándar) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos solventes.....	46
<b>Anexo 7.4.</b> Cuadro Test de Levene's de análisis estadístico de la variable temperatura (°C) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos tipos de solvente.....	47
<b>Anexo 7.5.</b> Cuadro temperatura (promedios) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frío atmosférico y tipo de solvente escogidos.....	47

## 1. INTRODUCCIÓN

*Vitis vinífera* L. es una especie vegetal ampliamente cultivada en el mundo, principalmente por la industria vitivinícola, dado los distinguibles productos obtenidos a partir del procesamiento de sus frutos, (ej. vino, vinagre, destilados, etc). En año 2018, se estimó que la superficie vitícola mundial alcanzó a los 7,4 millones de hectáreas en el mundo, siendo uno de los años más productivos de las últimas dos décadas, y el cual se explica por el aumento de los rendimientos y de las mejoras continuas de las tecnologías vitícolas (OIV, 2019). Con respecto a la producción de vino a nivel global (excluidos jugos y mostos), en el 2018 se alcanzó un volumen de 292 millones de hectólitros; lo que representa un aumento del 17 % con respecto a 2017 (OIV, 2019).

En Chile la superficie total destinada a la producción de uvas para vinificación alcanza las 141 mil hectáreas, con un total de vino producido de alrededor de 1200 millones de litro por año (ODEPA, 2020).

Durante la producción de vino la industria vitivinícola genera una gran cantidad de residuos, muchos de los cuales no son para aprovechados o valorizarlos. Según datos de la organización de viña y el vino (OIV, 2015), se estima que por cada 100 kg de uva procesada se genera alrededor de 25 kg de subproductos, principalmente orujos, cifra significativa para países productores como Chile.

Este desecho sólido o subproducto obtenido de la elaboración de vinos está compuesto por pieles y semillas que corresponden aproximadamente a un 20 – 30% en peso de la masa total de las uvas procesadas. Si estos no se disponen o se tratan adecuadamente, pueden ser fácilmente atacados por microorganismos, generando gases de efecto invernadero, malos olores y problemas de contaminación con su consiguiente impacto ambiental negativo (Casazza et al., 2010). Sin embargo, no todo lo referente a la generación de orujos es desfavorable, por cuanto dichos subproductos contienen un valor potencial tanto como biomasa, o debido a su contenido de antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos de tipo flavonoides (Bulnes del Valle, 2012). Durante el proceso de fermentación alcohólica y el presando en la elaboración de vinos, no se extraen todos los compuestos de alto valor presente en el orujo de la uva (Bulnes del Valle, 2012). Del mismo modo, el orujo de uva es también rico en compuestos fenólicos simples (no flavonoides), con alto contenido de ácido gálico y ácido protocatequico en semillas, y de ácidos hidroxicinámicos con interesantes efectos bioactivos (Teixeira et al., 2014).

Una de las principales vías de aprovechamiento de los orujos ha sido su uso en alimentación de animal, especialmente para rumiantes (Famuyiwa & Ough, 1982), o el compostaje y

reincorporación a los viñedos. Sin embargo, en los últimos años ha surgido nuevas vías de valorización de estos residuos extrayendo su contenido de polifenoles y propiedades antioxidantes para usarlos como nuevas materias primas en la industria alimentaria, cosmética, ganadera, agrícola, farmacéutica, además de su uso como biomasa para la generación de energía (Martinez et al., 2015; Tournour et al., 2015; Yu & Ahmedna, 2013).

Para conseguir la extracción de compuestos fenólicos de los orujos de la uva de una forma más eficiente se han estudiado una serie de métodos no convencionales de extracción, con la finalidad de reducir tiempos de operación, maximizar la extracción, y disminuir el uso de solventes (Casazza et al., 2010). Dentro de estas técnicas encontramos el uso de pulsos eléctricos, microondas, fluidos sub-críticos, fluidos supercríticos, procesamientos a altas presiones, ultrasonido y extracción asistida por plasma frío atmosférico (PFA) entre otros. Esta última técnica basada en tecnología de plasma frío atmosférico, actualmente se ocupa en el área de postcosecha para asegurar la inocuidad alimentaria y extender la vida útil de hortalizas o frutas a bajas temperaturas (Ramazzina et al., 2016). Además, en los últimos años se han realizado investigaciones con la premisa de que este método podría favorecer la extracción de fenoles; debido a que esta técnica puede convertir el medio gaseoso a un estado de alta reacción con bajo costo energético, generando especies reactivas que son capaces de modificar las estructuras celulares, permitiendo la recuperación de compuestos bioactivos a partir de subproductos obtenidos de frutas procesadas (Bao, 2020 a).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se propuso las siguientes hipótesis y objetivos:

### **1.1. Hipótesis**

El pretratamiento del orujo de uva vinífera con plasma frío atmosférico permite un aumento del contenido de compuestos fenólicos y otros metabolitos extraídos en medio líquido.

### **1.2. Objetivo general**

Evaluar el efecto de tratamientos con plasma frío atmosférico sobre la extracción de compuestos fenólicos del orujo de uva vinífera en un medio acuoso e hidroalcohólico.

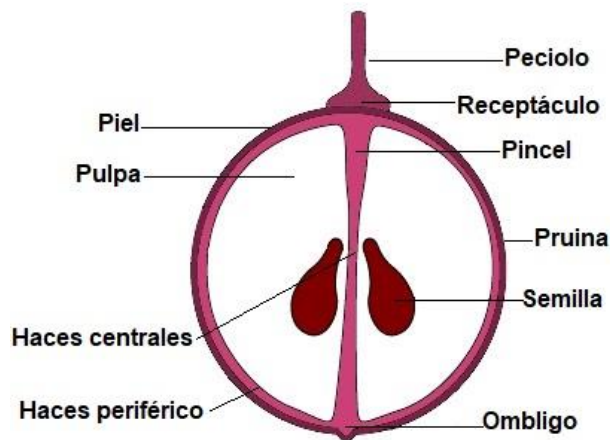
### **1.3. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto del pretratamiento con plasma frío atmosférico sobre la extracción de fenoles utilizando dos tipos de solventes: agua y 50% etanol.
- Analizar la acidez titulable, color, pH y sólidos solubles del medio luego de los tratamientos con plasma frío atmosférico en orujo de uvas de la variedad Cabernet Sauvignon en solvente acuoso y orgánico.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Antecedentes generales de la uva

La materia prima para la obtención del vino son los frutos de la vid, que corresponden a un conjunto de bayas agrupadas en racimos. La morfología del fruto está constituida por partes muy diferenciadas: la piel o hollejo, la pulpa y las semillas o pepitas (Puig i Vayreda, 2016). Es por esta razón que las bayas tienen una distribución heterogénea, como se muestra en la Figura 2.1. En la primera parte se encuentra la piel que está conformado por epidermis que es una barrera celular que está recubierta en su superficie por una cutícula y sobre ella existe una capa de cera llamada pruina que le permite por ejemplo retener el ingreso de microorganismos a la fruta. La subcapa siguiente corresponde a la hipodermis que está conformada por varias capas de células que acumulan las sustancias colorantes como antocianinas (en el caso de las variedades tintas), taninos, flavonoles y sustancias aromáticas. En la región intermedia de la baya de uva se encuentra la pulpa, segmento que representa el 80% aproximadamente del peso total del grano de uva, que está formada por el tejido vegetal, el parénquima, donde se acumulan sustancia elaboradas por la misma planta como: agua, concentración de azúcar, ácido tartárico, entre otros. (Puig i Vayreda, 2016). Finalmente, en la zona más interior del grano de la uva se encuentran las semillas, su número es variable y su función es proteger el embrión. Las pepitas están compuestas por taninos de gusto astringentes, aceites y flavanoles. (Casares et al.,2010).



**Figura 2.1.** Partes de una baya de uva (Adaptado de Puig i Vayreda, 2016).

## **2.2. Importancia del orujo de la vid**

### **2.2.1 Generalidades sobre el residuo de la vinificación**

Las uvas son una de las frutas más cultivadas en todo el mundo y aproximadamente el 80% de la cosecha es utilizado por la industria de elaboración del vino. Una vez cosechada la uva, ésta se destina al proceso de vinificación. En el caso del vino tinto, se fermentan las bayas completas, incluyendo pieles y semillas. Durante la fermentación alcohólica, los compuestos fenólicos provenientes de las bayas son transferidos al vino, mientras que los escobajos generalmente son eliminados antes del proceso de molienda (Ribéreau et al., 2000). Se ha estudiado que la extracción de compuestos fenólicos a partir de las uvas durante el proceso de fermentación alcohólica se extrae alrededor de un 30 a 40% de los compuestos (Van Balen, 1984; Mazza, 1995). Esto significa que solo una parte de los compuestos fenólicos en las bayas son transferidos al vino. Por otro lado, este proceso fermentativo genera uno de los principales desechos vegetales del proceso de vinificación que es el orujo.

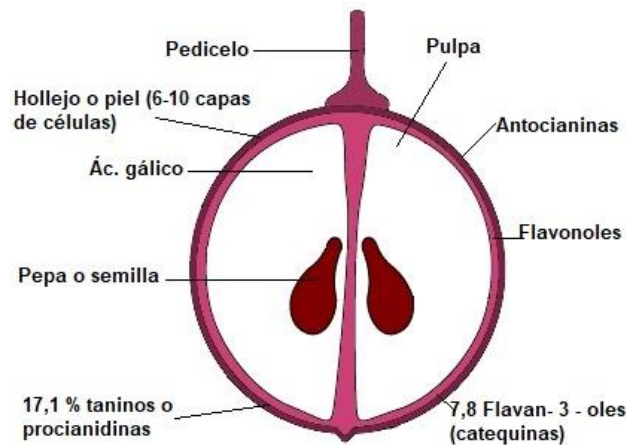
Se estima que por cada 100 kg de uva procesada para la elaboración de vino se generan alrededor de 25 kg de subproducto, cifra significativa para países productores de vinos que en el caso de Chile ronda 1200 millones de litros al año (ODEPA, 2020) que además se calcula que se necesita 1,3 K de uva para obtener 1 L de vino aproximadamente, lo que supondría una producción de orujos de 3900 millones de toneladas. Por otra parte, a nivel global el orujo representa el 20% del total de 69 millones de toneladas de uva destinadas anualmente a la producción de vino, generándose entre 13 y 14 millones de toneladas de orujo de uva (Davidov et al., 2014).

### **2.2.2. Composición del orujo de uva**

El principal subproducto de la vinificación es el orujo de uva, formado por semillas, hollejos, escobajos y restos de pulpa que se generan después de las operaciones de prensado de la uva. En general, tiene un contenido en materia seca de entre un 20 – 30% (Teixeira et al., 2014). La composición del orujo de uva es en fibras (47,2 - 50 %), proteínas (10 – 16,4 %), taninos (5 %), cenizas (6,5 – 6,8 %) y los lípidos (6 – 11,4 %) que se encuentran en las semillas y están formados principalmente por ácidos grasos poliinsaturados. A su vez también contiene carbohidratos (29,2 g/100 g) en forma de pectina (4 g/100 g), fructosa (9 g/100 g) y principalmente glucosa (8 g/100 g) (Yu & Ahmedna, 2013; Fedna, 2016; Sousa et al., 2014). Aparte de todo lo anterior, este subproducto es rico en fuentes de compuesto fenólicos, principalmente antocianinas, flavonoles, ácidos fenólicos, taninos que permanecen en el orujo (Bulnes del Valle, 2012), donde



aproximadamente el 10 % de polifenoles se encuentran en la pulpa, el 30% en la piel y el 60% en las semillas (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Distribución de compuestos fenológicos en la uva (Adaptado de Soler Fernández, 2017).

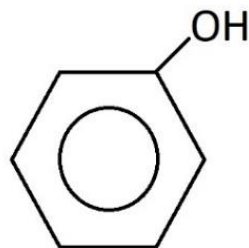
### **2.2.3. Valorización del subproducto de la vinificación**

El orujo de la vid es uno de los principales desechos sólidos que se obtiene después de la elaboración del vino, produciendo una gran cantidad de residuos. Por lo general, estos residuos son usados como abono, quemados, aprovechados como alimento para ganado especialmente para rumiantes (Famuyiwa & Ough, 1982). Sin embargo, en la actualidad este subproducto de la uva también está comenzando a ser utilizado como materia prima, debido a que productos naturales como compuestos fenólicos que pueden ser totalmente aprovechables por su capacidad de antioxidantes o agente reductor, y que son atractivos para industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria y como uso para generar energía de combustión (Martinez et al., 2015; Tournour et al., 2015; Yu & Ahmedna, 2013). Lo anterior permite su reutilización y ofrece una reducción de su impacto ambiental.

### **2.3. Compuestos fenólicos de interés**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que están presentes en las plantas y en la vid procedentes de diferentes partes de racimo de la uva y consecuentemente en el vino (Garrido & Borges, 2013), estas sustancias químicas se distribuyen en todas las partes de las plantas y su concentración es muy variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos

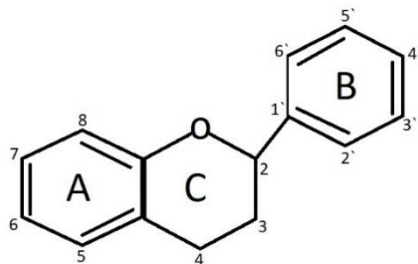
actúan en diversas partes en las plantas como: estructura (ligninas), pigmentos, fitoalexinas, entre otros. También los polifenoles están asociados a las características sensoriales como sabor, color, dureza, astringencias entre otros (Scalbert et al., 2005). De acuerdo con la naturaleza de los fenoles se pueden clasificar de varias formas y una de ellas corresponde a compuestos extraíbles o no extraíbles. Los fenoles extraíbles son aquellos compuestos que presentan pesos moleculares bajos o medios que se logran extraer en diferentes tipos de disolventes acuoso o acuoso orgánicos, en cambio, los compuestos no extraíbles son aquellos que tienen un elevado peso molecular o son polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se puede encontrar en los residuos de las extracciones. Sin embargo, en todos los fenoles parte de su estructura química contienen un anillo aromático común unido a un grupo de hidroxilo (Figura 2.3) y permitir clasificarlo de la forma más relevante en dos tipos de grupos de fenoles: los flavonoides y no flavonoides (Flamini et al., 2013).



**Figura 2.3.** Estructura básica de los compuestos fenólicos (Adaptado de Soler Fernández, 2017).

### 2.3.1. Flavonoides

Son compuestos químicos naturales de las plantas que corresponden a un grupo de diversos polifenoles de mayor importancia en uvas y vinos, aportando en la calidad como cantidad. En su estructura son moléculas que poseen al menos dos subunidades fenólicas, con una cadena de tres carbonos (C6-C3-C6) (Dueñas Zurita, 2017). Estas moléculas pueden dar origen a diferentes compuestos dentro de este grupo, entre ellos están los flavonoles, flavanoles, antocianinas y taninos, entre otros (Flamini et al., 2013).



**Figura 2.4.** Estructura química general de los flavonoides presente en uvas y vinos (Adaptado de Fanzone, 2012).

### 2.3.1.1. Flavonoles

Los flavonoles que están presente en la vid se encuentran ubicados principalmente en partes estructurales de la planta como los hollejos de las uvas (variedades tintas y blancas), semillas, hojas y algunos compuestos de la pulpa, brotes e inflorescencias que juegan un rol protector contra los rayos UV (Hernández, 2016). La estructura molecular de estos compuestos químicos contiene un doble enlace entre el carbono 2 y 3, la cual se denominan 3- hidroxiflavonas (García Ossandón, 2016). Se caracterizan por ser pigmentos naturales que presentan una coloración amarilla, su concentración es muy variable dependiendo del tipo de uva. Los principales flavonoles que predomina en el vino y en el jugo son la quercetina, kaemferol y miricetina (García Ossandón, 2016).

### 2.3.1.2. Flavanoles

Estos compuestos se caracterizan por estar presentes, principalmente en las semillas de las uvas y de menor cantidad en los hollejos; sin embargo, también se encuentran en otros tejidos de la planta de la vid como en la madera, hojas y escobajo, dando origen a los taninos condensados o proantocianidinas. Por lo tanto, están presentes en abundancia en la composición del vino y desde un aspecto sensorial los flavanoles poseen propiedades gustativas como amargor y astringencia. También intervienen en la estabilización de color a través de reacciones de condensación con antocianinas (Fanzone, 2012), y a su vez forma parte en las reacciones de pardeamiento oxidativo químico y enzimático en interacciones con otras moléculas del vino y en la formación de turbidez o precipitados (Dueñas Zurita, 2017). La estructura química de estos compuestos está constituida por dos carbonos asimétricos (C2 y C3) y además por no tener un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 3. Los flavanoles mayoritarios

son el grupo de las catequinas, y están presentes en el vino en forma de monómeros o polímeros, ya que se deriva de la piel y semillas de las uvas (García Ossandón, 2016).

### **2.3.1.3. Flavonas**

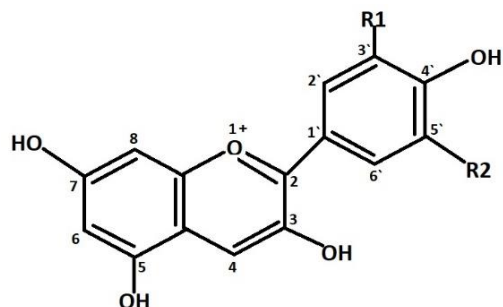
Estas moléculas pertenecen al tipo de compuestos fenólicos que está presente en la *Vitis vinífera*, pero con una concentración menor a los anteriores flavonoides. Se caracteriza por poseer una estructura doble enlace entre carbonos C2 y C3, también por no tener presente un grupo de hidroxilo en el carbono posición 3. Este tipo de flavonoide no es muy abundante en las uvas, con excepto por la luteolina (García Ossandón, 2016).

### **2.3.1.4. Flavonoles**

Son compuestos químicos que pertenecen al grupo de flavonoides, en lo particular a diferencia de las otras moléculas anteriores, está se caracterizan por no presentar un doble enlace en los C2 y C3. Además, posee un grupo hidroxilo en el carbono 3, algunos de estos flavonoles están presentes en el vino como: taxifolia, astilbina, entre otras (García Ossandón, 2016).

### **2.3.1.5. Antocianinas**

Las antocianinas o antocianas son compuestos fenólicos que pertenece a la familia de los flavonoides, responsables de otorgar el color rojo al azul de vinos tintos y uvas, estos pigmentos se encuentran ubicadas en las vacuolas de las tres o cuatro capas de células que forman la hipodermis de las pieles de las uvas y a su vez presentes en la pulpa de algunas variedades de cepas tintoreras (García Ossandón, 2016). Estos flavonoides actúan como parte del sistema antioxidante que ayuda a proteger a la planta contra el estrés lumínico y también durante procesos metabólicos. En su estructura se caracterizan por presentar a dos anillos de 6 átomos de carbono unidos por un heterociclo central de 3 átomos de carbono, lo que en forma esquemática se puede resumir como una estructura C6-C3-C6 (Peña & Grupo de Investigación Enológica, 2005). Las antocianinas principales que se ha detectado en las uvas son: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales entre ellas se diferencian en el número y posición de los sustituyentes hidroxilos y metaxilos localizados en su estructura básica (Figura 2.6).



**Figura 2.5.** Estructura básica de antocianina (Adaptado de Fanzone, 2012).

El color de las antocianinas en una solución de extracción depende de varios factores, como el tipo de sustitución del anillo B, el pH de la solución, las interacciones con otros constituyentes del medio (copigmentación y pigmentos poliméricos) y la formación de complejos con los iones metálicos. Entonces el color rojo de estos compuestos fenólicos depende del sustituyente químicos que contenga y la posición de estos anillos B de la molécula, por ejemplo, aumenta los grupos hidroxilos de los anillos fenólicos se intensifica el color azul, mientras que la presencia de metóxilos provoca la formación de compuestos más rojizos (Hernández, 2016).

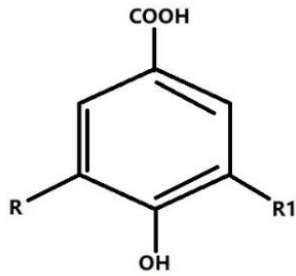
### **2.3.2. No flavonoides**

#### **2.3.2.1. Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenoles están presentes en todas las partes del grano de uva y están constituido por un solo anillo de seis átomos de carbono, esto incluye a los ácidos hidroxibenzoicos, con una estructura del tipo C6-C1 y los ácidos hidroxicinámicos con una estructura C6-C3 (Dueñas Zurita, 2017).

##### **2.3.2.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos**

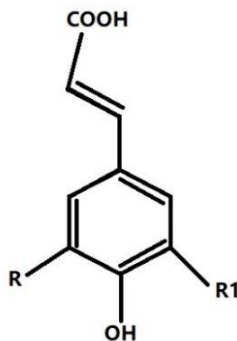
Este tipo de ácidos fenólicos se caracteriza por tener en su estructura siete átomos de carbono (García Ossandón, 2016). Del grupo ácido hidroxibenzoicos que más se destaca en la uva y en el vino es el ácido gálico, encontrándose en la pulpa y en las partes sólidas de la baya de la uva en forma libre o como éster de flavanol ((- epicatequina -3- galato). También el ácido gálico se destaca por presentar propiedades como gustativas como amargas, astringentes y por ser uno de los polifenoles precursor de taninos hidrolizables en el vino (Kallithraka et al., 2009).



**Figura 2.6.** Estructura básica de ácidos hidroxibenzoicos (Adaptado de García Ossandón, 2016).

#### 2.3.2.1.2. Ácido hidroxicinámico

Se caracterizan por estar ubicados principalmente en las vacuolas de las células de las pieles y de la pulpa de las bayas, bajo en la condición de ésteres tartáricos (Dueñas Zurita, 2017). Los ácidos hidroxicinámico son compuestos fenólicos permiten promover el oscurecimiento del vino y en la formación de compuestos volátiles (García Ossandón, 2016). También están relacionada a las propiedades gustativas como: amargor, astringencias y acidez. Dentro de los principales compuestos presentes en las uvas son ácido caftártico, cutárico y fertárico (Fanzone,2012).



**Figura 2.7.** Estructura básica de ácido hidroxicinámico (Adaptado de García Ossandón, 2016).

### **2.3.2.2. Estilbenos**

Dentro de los compuestos no flavonoides se encuentran los estilbenos, los cuales están formados por dos anillos aromáticos unidos por un puente eteno. En este grupo, el que más se destaca es el resveratrol que se encuentra en las pieles de las uvas, donde su concentración disminuye a medida que madura la baya (García Ossandón, 2016). Estos polifenoles son conocidos como fitoalexinas que están presentes en la vid, como una defensa cuando la planta se ve afectada y atacada por insectos o factores abióticos como daños físicos, confiriendo mayor resistencia a la planta frente a enfermedades (Pussa et al., 2006). Además, también están presentes en el proceso de vinificación, aportando propiedades antioxidantes en los vinos, permitiendo ofrecer propiedades benéficas para la salud humana por entregar efectos antioxidantes, anticancerígenos, cardioprotectivo y neuroprotectivo (Fanzone, 2012 & Saiko et al., 2008).

### **2.3.2.3. Taninos**

Son compuestos fenólicos que se pueden dividir en dos grupos: taninos hidrolizables y condensados o proantocianidinas. Los taninos hidrolizables estos compuestos provienen de barricas de roble en el proceso de vinificación que principalmente en presencia de cambio de pH o hidrólisis enzimática pueden ser degradados en partículas de azúcares y ácidos fenólicos (García Ossandón, 2016). Con respecto a este último grupo, se destacan por estar presentes en los vinos teniendo un rol importante en sus propiedades gustativas porque contribuyen en la formación del cuerpo del vino, la astringencia, color, sabor y el amargor, además de participar en la maduración del vino, debido a su poder de oxidación, condensación y polimerización (García Ossandón, 2016). Los taninos condensados están ubicados en la estructura sólida de la uva (piel y semillas) y en la pulpa; además químicamente se forman por condensación de catequinas o diferente número de unidades de los diversos flavanoles con uniones directas mediante enlaces C4 – C8 ó C4-C8 entre las moléculas y no contienen azúcares en su estructura (Guayas et al., 2021).

## **2.4. Técnicas de extracción de compuestos fenólicos**

La extracción de compuestos fenólicos unidos es difícil, ya que se ven obstaculizados por la estructura de la pared celular del orujo de uva, que incluso puede atrapar también compuestos fenólicos libres (Bao, 2020). Por lo tanto, la elección correcta del método, o la técnica de extracción, puede influir en gran medida en la recuperación de fenoles, acompañado con otros factores como: la temperatura, que influye en la velocidad de la extracción; el tiempo empleado

de contacto, para el proceso de recuperación de contenido de fenoles; el solvente, que debe ser un líquido selectivo y a su vez eficaz para obtener mayor rendimiento; y también considerar la relación de la muestra /solvente que va a determinar la calidad de los compuestos fenólicos extraídos (Ullari, 2010).

En lo que respecta al solvente a utilizar, su elección representa un factor esencial dado que afecta directamente en la eficacia de extracción del proceso. En cuanto a la naturaleza de los polifenoles, debido a que varios presentan una naturaleza polar, permite solubilizarse fácilmente en medio polar aprótico como las soluciones hidroalcohólicas (Muñoz, 2019). Esto en el último tiempo ha conllevado a que los investigadores prefieran solventes como: metanol, acetona, etanol, agua o mezclas entre ellos para alcanzar mayores rendimientos de obtención de fenoles de subproducto derivado de la uva. Por ejemplo, el metanol es efectivo en la extracción de catequinas, epicatequinas y epigallocatequinas (Filgueira, 2017), pero se debe considerar que el uso de metanol es incompatible para la extracción de compuestos de elaboración de alimento, debido a que puede provocar por ingestión alteraciones digestivas, metabólicas, neurofísicas y oculares en la salud humana (Masschelein-Kleiner, 2004) a diferencia del etanol. Sin embargo, en términos de recuperación del contenido total de fenoles en material orgánicos de desechos, la combinación agua/etanol muestran mejores resultados de rendimiento comparado con las mezclas de metanol / agua. Esto se debe a que el solvente etanol da lugar a extractos que predominan las catequinas, flavonoides y antocianidinas, que a su vez permite sustituir algunos disolventes orgánicos tóxicos o peligrosos (Fontana et al., 2013).

Entre los diferentes tipos de técnicas que hacen posible la extracción de compuestos fenólicos, los métodos convencionales consisten en el proceso de extracción de muestras solidas con solventes capaces de disolver la muestra. Como lo es el caso de la “extracción solida – líquido”, es un proceso de transferencia de materia en el que el compuesto de interés pasa desde la matriz solida hacia una matriz liquida (Ullari, 2010). Este proceso consta de dos etapas: la primera se produce una transferencia del compuesto desde una superficie del solido al solvente; la segunda etapa se produce una transferencia mediante difusión desde el interior del sólido y es en esta última etapa limitante del proceso debido a la resistencia que ofrece la fase solida a la transferencia de materia o penetración de líquidos (Navajas, 2019). A una escala nivel industrial su uso no es muy interesante, debido a que este proceso es más lento, menos eficiente y requiere mayor cantidad de energía y solvente. Sin embargo, en el último tiempo se han desarrollado estudios con métodos no convencionales que emplea el uso de tecnologías avanzadas y que ofrecen una serie de ventajas, como: selectividad, rapidez, productividad y menores tiempo de extracción que favorece el rendimiento del proceso de recuperación de compuestos fenólicos. Algunas propuestas de tecnologías utilizadas en la última década son: el uso de extracción



asistida por ultrasonidos (EAU), por microondas (MAE), y el más reciente es el uso del plasma frío atmosférico (PFA).

## **2.5. Tecnología para asistir la extracción de compuestos fenólicos**

### **2.5.1. Plasma frío atmosférico (PFA)**

La tecnología del plasma frío atmosférico (PFA), es una herramienta que actualmente tiene mayor uso en el área de postcosecha, para asegurar la inocuidad alimentaria y extender la vida útil de vegetales o frutas a bajas temperaturas (Ramazzina et al., 2016). El plasma frío puede describirse como una electricidad de gas neutro con una porción significativa de partículas ionizadas. En esta condición el gas puede ser sometido a un campo eléctrico entre dos electrodos, también en un campo de corriente constante (corriente continua) o en un campo de corriente alterna que generalmente son de alta frecuencia, a través de energía que se puede obtener por campos térmicos, eléctrico, frecuencia de radio y microondas, que permite incrementar la energía cinética de los electrones para provocar un aumento del número de colisiones en los productos de plasma formadores de gas como electrones, iones y radiación de longitudes de ondas variables, incluyendo los de rangos de UV (Thirumdas et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, el uso más común del equipo de plasma frío atmosférico, es aplicarlo a los tratamientos de reducción de contaminación microbiana en varios tipos de productos alimenticios, principalmente en productos frescos. También, son utilizados en el procesamiento de alimentos para lograr la inactivación microbiana en el producto y así a su vez mantener las cualidades sensoriales del alimento como su apariencia, calidad y frescura hasta que llegue al consumidor final (Thirumdas et al., 2015). Sin embargo, en el último tiempo se ha tratado de investigar nuevos usos de esta tecnología (PFA), para conseguir la extracción de compuestos bioactivos de frutas, hortalizas o subproductos obtenidos de vegetales, ya que permite convertir el medio gaseoso a un estado de alta reacción con un bajo costo energético, generando especies reactivas capaces de interrumpir las estructuras celulares, permitiendo así la recuperación de compuestos fenólicos de los productos o subproductos obtenidos de frutas procesadas (Bao, 2020a). Algunos antecedentes han demostrado que la aplicación del PFA en el jugo de granada aumentó el contenido de antocianinas entre un 21% y 35% (Kovacevic et al., 2016) y el trabajo realizado por Won et al. (2017) concluyó que el efecto del plasma frío atmosférico aumentó la capacidad de actividad antioxidantes en muestras de cáscara de mandarina. A su vez, Bao et al. (2020b) observaron que los tratamientos con PFA alteraron la estructura de la pared celular del orujo de tomate con la formación de superficies más hidrófilas,

lo que resultó en una mayor extracción de compuestos fenólicos. Por último, y de manera más reciente, se ha demostrado que el pretratamiento aplicado al efecto del plasma es prometedor para aumentar la eficiencia de extracción de fenoles al cambiar las propiedades de la superficie del orujo de uva (Bao, 2020c).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1. Establecimiento y lugar del ensayo**

El estudio se desarrolló en el Laboratorio Química Enológica, ubicado en la Universidad de Talca, Campus Lircay, Talca, Chile.

#### **3.2. Material vegetal**

El trabajo se desarrolló con orujos fermentados de Cabernet Sauvignon obtenidos luego de su vinificación en Viña Concha y Toro, comuna de Penco, Región del Maule, Chile. El orujo se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  y antes de su utilización, las muestras fueron descongeladas y secado con estufa universal (UN55, Memmert, Alemania) a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Posterior a esto, se separaron manualmente las pieles junto con las semillas y se molieron con una batidora de inmersión manual, marca Oster (FPSTHB5103R-052, China) a máxima velocidad (220v;600 W; 50 Hz), hasta obtener una muestra homogénea, con un tamaño de partícula  $< 1$  mm aproximadamente (Figura 3.1.). La muestra en polvo de 1 kg aproximadamente se guardó en una bolsa hermética a temperatura ambiente en un lugar seco y de poca luz hasta su uso.



**Figura 3.1.** Muestras en polvo de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon con un tamaño de partícula  $< 1$ mm aproximadamente.

#### **3.3. Reactivos**

Los solventes utilizados en las extracciones fueron: agua destilada, etanol al 98%, todos los cuales fueron adquiridos de la empresa Merck (Darmstadt, Alemania).

### **3.4. Métodos de extracción**

#### **3.4.1. Tratamientos control**

Para la obtención de compuestos fenólicos derivado del orujo de uva, se prepararon muestras testigo sin exposición al plasma frío atmosférico (PFA), con el fin de evaluar la diferencia de comportamiento de las muestras tratadas con y sin plasma (Cuadro 3.1.)

**Cuadro 3.1. Tratamiento control utilizados para la determinación basal extracción de fenoles del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

<b>Controles</b>	<b>Descripción</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>C1= H<sub>2</sub>O</b>	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 30 mL de agua destilada (sin exposición al PFA)	6
<b>C2= H<sub>2</sub>O: EtOH</b>	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 15 mL de agua y 15 mL de etanol (sin exposición al PFA)	6

#### **3.4.2. Tratamiento de extracción con plasma frío atmosférico (PFA) sobre orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

Para la evaluación de la extracción de compuestos fenólicos derivados de la uva utilizando PFA, se utilizó el equipo Surface SAP 2 (Brasil) con parámetros fijos de voltaje de 15 kV, potencia de 1500 W, flujo de gas de 10 L/ min y corriente de 5 A. La extracción se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de tiempo (min) y tipo de solvente (mL), de acuerdo con lo indicado cuadro 3.1.

Cada ensayo se realizó con cuatro repeticiones más su tratamiento testigo para cada medición. Las muestras se colocaron en una cápsula de Petri de 9 cm de diámetro y 15,6 mm de alto y estas se ubicaron bajo el equipo PFA a una distancia de trabajo de 4,5 cm desde el electrodo hasta la superficie de la muestra (Fig. 3.2.).

Una vez preparada las muestras, de acuerdo con su tratamiento, se midió su masa (g) con una balanza analítica de la marca Shimadzu modelo (Aux 120 Kyoto, Japón) y a su vez, se registró la temperatura con termómetro infrarrojo de la marca Proimeq (Providencia, Chile), antes y después de someterlas al efecto del PFA.

**Cuadro 3.2. Tratamientos para la determinación de los efectos del plasma frío atmosférico sobre la extracción de fenoles del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon bajo estudio.**

Tratamientos	Descripción	Repeticiones
T1= H <sub>2</sub> O + PFA-1	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 30 mL de agua destilada con pulso de 1 min de exposición al PFA.	12
T2= H <sub>2</sub> O + PFA-5	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 30 mL de agua destilada con 5 pulsos de 1 min de exposición al PFA con pausas intermedias de 1 min.	12
T3= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 15 mL de agua y 15 mL de etanol con 1 pulso de 1 min de exposición al PFA.	12
T4= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5	En una capsula de Petri se agregó 1g de polvo orujo de uva junto con 15 mL de agua y 15 mL de etanol con 5 pulsos de 1 min de exposición al PFA con pausas intermedias de 1 min.	12



**Figura 3.2.** Ejemplo del tratamiento de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon expuesta a la aplicación de plasma frío atmosférico (PFA).

### **3.5. Evaluaciones físicas post- tratamiento de extracción**

Se utilizó balanza analítica (Shimadzu, Aux 120, Kyoto, Japón) para determinar la diferencia de masa de cada placa Petri, de forma de evaluar posibles pérdidas de volumen en las muestras que fueron sometidas al equipo de plasma frío atmosférico como aquellas sin exposición (controles). Se midió la masa exacta (g) de cada prueba antes y después del tratamiento, para evaluar la pérdida de solvente a través de la relación de diferencia de masa (masa inicial – masa final) que puede causar el equipo PFA. De esta misma forma se procedió con la medición de temperatura con termómetro infrarrojo Proimeq (Providencia, Chile).

Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando una bomba de vacío de la marca HAHSHIN (Diaphragm vacuum pump HS-0153 (CE), Corea del Sur) con el fin de conseguir un líquido más homogéneo y permitir la separación del orujo de uva en polvo del solvente, y la evaluación química de los extractos líquidos

### **3.6. Evaluaciones**

#### **3.6.1. Determinación del efecto del PFA sobre el contenido de fenoles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

El contenido de compuestos fenólicos de los extractos se determinó por la medida de la absorbancia a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda. Esta evaluación fue cuantificada mediante el equipo de mesa lector de microplacas multimodo Synergy HTX multi - mode reader marca BioTek (Winooski, EE. UU.).

#### **3.6.2. Determinación del color en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

Para la obtención del color, se utilizaron las muestras derivadas de los tratamientos (Cuadro 3.2.) sometida al efecto PFA, y controles (Cuadro 3.1.) con el fin de analizar el comportamiento de las muestras a diferentes longitudes de onda que componen el espectro visible. Las empleadas para la evaluación corresponden a 316, 375, 420, 520 y 620 nm medida por el equipo de mesa lector de microplacas multimodo Synergy HTX multi - mode reader marca BioTek (Winooski, EE. UU.). Para el caso de la evaluación de intensidad de color (IC) se considera los valores obtenidos a través de las densidades ópticas de 420nm, 520 nm y 620 nm, que corresponde a las tonalidades amarillo, rojo y azul, a través de un espectrofotómetro, y la posterior sumatoria de cada medida generada.

$$IC= 420 \text{ nm} + 520 \text{ nm} + 620 \text{ nm}$$

Para todas las muestras se preparó una dilución en una solución de agua con una proporción 1:10 que permitió determinar las lecturas de las absorbancias y se multiplicó por un factor de dilución de 10 para la comparación de los resultados.

### **3.6.3. Otras determinaciones**

#### **3.6.3.1. Sólidos solubles**

El contenido de sólidos solubles, o grados Brix, ofrece una buena estimación del contenido de azúcares en los jugos de frutas o mostos (Osterloh et al., 1996).

Para el caso de este ensayo cada muestra sometida al efecto del equipo del plasma frío atmosférico se le determinó la cantidad de sólidos solubles disueltos en escala de porcentaje de azúcar a través del instrumento refractómetro manual de la marca General Tools modelo (REF113ATC, (Shenzhen, China) que se basa en los cambios del índice de refracción que sufre una sustancia cuando es disuelta en ella.

#### **3.6.3.2. Acidez real (pH) y acidez titulable**

Para la determinación del pH se extrajo 10 mL con una pipeta y se depositó en un vaso precipitado de 50 mL, luego se introdujo el electrodo del instrumento pHmetro de la marca Hanna Instruments (HI2002, Woonsocket, EE. UU.) para la lectura de cada muestra.

La evaluación de acidez titulable o total se realizó titulado una cantidad de la muestra (10 mL) con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) de 0,1 M en el titulador automático de la marca Hanna Instruments (HI2002, Woonsocket, EE. UU.), hasta llegar a pH 7. La acidez total se calcula con el volumen (mL) de hidróxido de sodio gastado en la titulación.

### **3.7. Diseño experimental y análisis estadísticos**

Los datos se analizaron en el software estadístico *Statgraphics Centurion* versión XVIII. Inicialmente se compararon los controles y luego por otra parte los cuatro tratamientos con ANDEVA. Posteriormente se realizó un análisis factorial, relacionando tipo de solvente y el tiempo de empleo de plasma frío atmosférico. Se trabajó con un nivel de confianza del 95% y se realizaron pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (HSD,  $p \leq 0,05$ ) cuando existieron diferencias estadísticas significativas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinaciones de características químicas

Para los controles y tratamientos se llevaron cabo evaluaciones químicas como: sólidos solubles, acidez real (pH) y acidez titulable. El cuadro 4.1. presenta los resultados obtenidos de los controles en los que se evaluó el efecto de los solventes contenedores de muestras de orujo de uva sin exposición al efecto del PFA. También el cuadro 4.2. expresa los resultados de los tratamientos donde se evaluó el efecto de ambos factores en conjunto (tipos de solventes y tiempo sometido a PFA).

**Cuadro 4.1. Valores de medias y desviación estándar del contenido de sólidos solubles, pH y acidez titulable para controles sometidos al efecto del tipo de solvente**

	Sólidos solubles <sup>(z)</sup> (°Brix)	pH <sup>(z)</sup>	Ac. Titulable <sup>(z)</sup>
<b>Tipo de solvente</b>			
<b>C1= H<sub>2</sub>O</b>	0,37 ± 0,32 <b>a</b>	3,71 ± 0,17 <b>b</b>	1,49 ± 0,51 <b>a</b>
<b>C2= H<sub>2</sub>O: EtOH</b>	16,57 ± 0,54 <b>b</b>	4,60 ± 0,19 <b>a</b>	0,73 ± 0,55 <b>b</b>
Significancia (valor - p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0329</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05). C1: Orujo de uva con agua; C2: Orujo de uva con agua.

(x): p > 0.05= no significativo; p ≤ 0.05= significativo.

**Cuadro 4.2. Efecto de los tratamientos con plasma frío atmosférico y tipo de solvente sobre características químicas en el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

	Sólidos solubles <sup>(z)(y)</sup> (°Brix)	pH <sup>(z)</sup>	Ac. Titulable <sup>(z)</sup>
<b>Tipo de solvente</b>			
H <sub>2</sub> O	0,39 <b>a</b>	3,79 <b>a</b>	1,28 <b>b</b>
H <sub>2</sub> O: EtOH	13,04 <b>b</b>	4,38 <b>b</b>	0,68 <b>a</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
<b>Tiempo PFA</b>			



PFA-1	7,83 <b>b</b>	4,15 <b>b</b>	0,85 <b>a</b>
PFA-5	5,61 <b>a</b>	4,03 <b>a</b>	1,11 <b>b</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0086</b>
<b>Tratamientos: Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>			
<b>T1=</b> H <sub>2</sub> O + PFA -1	0,32 ± 0,29 <b>a</b>	3,80 ± 0,14 <b>a</b>	1,23 ± 0,42
<b>T2=</b> H <sub>2</sub> O + PFA-5	0,47 ± 0,20 <b>a</b>	3,79 ± 0,12 <b>a</b>	1,32 ± 0,22
<b>T3=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1	15,33 ± 0,62 <b>c</b>	4,49 ± 0,11 <b>c</b>	0,46 ± 0,12
<b>T4=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5	10,75 ± 1,91 <b>b</b>	4,27 ± 0,10 <b>b</b>	0,89 ± 0,43
Significancia (valor-p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,0749</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p = 0,05$ ).

T1: Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, T2: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, T3: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, T4: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos.

(y): Análisis en base a Kruskal- Wallis.

(x):  $p > 0,05 =$  no significativo;  $p \leq 0,05 =$  significativo.

#### 4.1.1. Sólidos solubles (°Brix)

Los °Brix se describen como la medida de sólidos solubles, principalmente azúcares, incluyendo pigmentos, glicerol, pectinas, taninos, ácidos y sus sales (Jofré, 2004).

Los resultados de los sólidos solubles obtenidos del ANDEVA, muestra que existe una diferencia significativa entre los tratamientos, siendo los tratamientos T3 y T4 los que presentaron un mayor contenido de sólidos, con promedios de 15,33 y 10,75°Brix (Cuadro 4.2). En este último, se observó un menor contenido de sólidos solubles luego de 5 pulsos de 1 min de tratamiento con plasma.

A pesar de que no hay muchos estudios que hayan investigado el efecto del plasma sobre los sólidos solubles, la disminución en la concentración de azúcar, también se ve reflejado en el estudio de Rodríguez et al., (2017) donde observaron que para el jugo de anacardo hubo una degradación de la sacarosa cuando las muestras fueron tratadas con un flujo de plasma de N<sub>2</sub> de 10 mL/ min, con una degradación notoria (56%) después de 15 min de tratamiento y a su vez los

azúcares reductores, fructosa y glucosa exhibieron una degradación general causada por el tratamiento con plasma independientemente del flujo de plasma de N<sub>2</sub> y el tiempo de tratamiento.

Otra explicación que puede dar cuenta de un menor contenido de sólidos solubles en el tratamiento T4, puede deberse a la disminución de volumen de solvente agua:etanol por volatilización. En una muestra más concentrada para de los pudieron insolubilizarse y precipitar, quedando fuera de las disoluciones que fueron evaluadas.

Por otro lado, en un estudio desarrollado con manzanas (Alvarado, 2019) se menciona que no se detectaron diferencias en la variable sólidos solubles en las manzanas sometidas a PFA y las manzanas controles (sin aplicación de PFA).

#### **4.1.2. Determinación de Acidez real (pH)**

El pH se define como una medida logarítmica con base diez, de signo negativo a la concentración de hidrogeno hidratado o de contenido de protones libres que se encuentra en una solución (Concha, 2010). La medición pH realizada en este estudio corresponde a los ácidos que posee el orujo de uva.

De acuerdo con los resultados del ANDEVA, en los tratamientos realizados existe una diferencia significativa entre algunos tratamientos. En los tratamientos T3 y T4 se obtuvieron valores promedios de 4,49 y 4,27 de pH (Cuadro 4.2.). A diferencia de los tratamientos T1 y T2, donde estos no demostraron diferencia significativa entre ellos, obteniendo resultados de valores de pH menores correspondientes a un pH 3,80 y 3,79. Además, se observa un menor valor de pH a medida que el tiempo empleado del PFA aumentó, por lo que los tratamientos con exposición a 5 pulsos con duración de 1 min cada uno alcanzaron valores menores de pH en comparación con las muestras sometidas 1 pulso al PFA (Cuadro 4.2). Desde una visión enológica este parámetro es importante, ya que ejerce influencia sobre la presencia de microorganismo, el matiz del vino o el potencial redox (Jofré, 2004). Del mismo modo, el pH también es relevante en las reacciones químicas, donde los compuestos antocianos ubicados en las vacuolas, presentes en las pieles de la uva (moléculas de pigmentación roja), otorgan la tonalidad de una solución fenólica debido a que su comportamiento o estabilidad. Por lo tanto, se puede esperar que los tratamientos con valores pH más bajo debieran presentar una tonalidad más fuerte de color rojizo, y a medida que el pH aumente la solución debiera perder o modificar su coloración por motivo de que las moléculas de antocianos experimenta cambios químicos en su estructura (Peña, 2006).

#### **4.1.3. Acidez titulable**

La acidez titulable es un parámetro usado comúnmente para expresar la acidez de los vinos. El vino contiene varios ácidos orgánicos, principalmente los ácidos málico y tartárico que están presentes en el orujo de la uva, la cual describe su acidez total (Fragos, 2016).

De los resultados expuestos en el cuadro 4.2. se puede observar que los valores de acidez titulable obtenidos de los diferentes tratamientos (T1, T2, T3 y T4), interacción de ambos factores (tipo solvente y tiempo PFA), no fueron significativos. Sin embargo, se observa que los valores de las medias de los tratamientos expresan que T1= 1,23 y el T2=1,32 son los resultados más elevados en acidez titulable a comparación de T3= 0,46 y T4= 0,89, que demuestran una relación inversa con los resultados observados en el pH (Cuadro 4.2.), esto se debe a que son medidas muy relacionadas entre sí, donde la acidez mide la concentración de ácidos mientras que el pH mide las fuerzas relativas de esos ácidos, es decir, a mayor acidez, menor va a ser el valor del pH o viceversa (Lujan, 2017).

A la vista de lo anterior, con los resultados basados en el análisis factorial, ambos factores por separado presentaron efectos significativos sobre la acidez titulable (Cuadro 4.2.). Donde se puede observar que los tratamientos (T2 y T3) que se sometieron al efecto de plasma a 5 pulsos consiguieron valores superiores de acidez titulable a comparación con los tratamientos de 1 pulso. Esto puede indicar que el efecto del plasma por separado influyó levemente sobre la acidez total y que a mayor tiempo de duración puede conseguir resultados significativos. También se puede evaluar que el factor tipo de solvente en las muestras que contenía agua (H<sub>2</sub>O) obtuvo mayor acidez titulable en comparación con las muestras con solvente agua:etanol (1:1) (Cuadro 4.2.). Por otro lado, este resultado se refleja en los análisis de los controles, que corresponde a muestras que no fueron expuesta al efecto del plasma frío atmosférico (Cuadro 4.1.).

#### **4.2. Determinación del efecto de PFA el sobre contenido de fenoles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

El análisis de contenido fenólico se llevó a cabo por medio de la medición de absorbancia a 280 nm. El Cuadro 4.3. presenta los resultados obtenidos de los controles en que se evaluó el efecto de los solventes contenedores de muestras de orujo de uva sin exposición al efecto del PFA sobre el contenido de fenoles. A su vez, el Cuadro 4.4. expresa los resultados de los tratamientos en que se evaluó el efecto de ambos factores en conjunto (tipos de solventes y tiempo sometido a PFA) a los diferentes niveles establecidos en el capítulo de materiales y métodos Cuadro 3.2.

**Cuadro 4.3. Efecto del solvente sobre la extracción de fenoles totales desde orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

<b>280 nm <sup>(z)</sup></b>	
<b>Tipo de solvente</b>	
<b>C1= H<sub>2</sub>O</b>	2,898 ± 0,387 <b>b</b>
<b>C2= H<sub>2</sub>O: EtOH</b>	13,630 ± 1,378 <b>a</b>
Significancia (valor - <i>p</i> ) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p= 0,05$ ). C1: Orujo de uva con agua; C2: Orujo de uva con agua.

(x):  $p > 0.05$ = no significativo;  $p \leq 0.05$ = significativo.

**Cuadro 4.4. Efecto del tratamiento con plasma frío atmosférico y solvente sobre la extracción de fenoles desde orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

<b>280 nm <sup>(z)(y)</sup></b>	
<b>Tipo de solvente</b>	
H <sub>2</sub> O	3,312 <b>b</b>
H <sub>2</sub> O: EtOH	15,774 <b>a</b>
Significancia (valor - <i>p</i> ) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>
<b>Tiempo PFA</b>	
PFA-1	8,961
PFA-5	10,124
Significancia (valor - <i>p</i> ) <sup>(x)</sup>	0,0956
<b>Tratamientos: Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>	
<b>T1= H<sub>2</sub>O + PFA -1</b>	3,207 ± 0,319
<b>T2= H<sub>2</sub>O + PFA-5</b>	3,416 ± 0,334
<b>T3= H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1</b>	14,715 ± 2,410

<b>T4= H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5</b>	<b>16,832 ± 5,381</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	0,7129

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05).

T1: Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, T2: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, T3: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, T4: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos.

(y): Análisis en base a datos transformados a la función  $(1/\sqrt{(280 \text{ nm})})$ .

(x):  $p > 0.05$ = no significativo;  $p \leq 0.05$ = significativo.

En estudios previos, se ha demostrado que los tratamientos con plasma han aumentado el rendimiento de extracto fenólicos en el orujo de uva (Bao et al., 2020 b). En cambio, los resultados obtenidos del ANDEVA de este estudio (Cuadro 4.4.) no mostraron significancia entre los tratamientos (T1, T2, T3 y T4). En el estudio de Bao et al., (2020 c) se menciona que los primeros minutos de interacción del plasma con el orujo de uva solo modificó la superficie del orujo facilitando la liberación de fenoles libres durante la extracción, pero que la extensión del tratamiento hizo que algunas especies reactivas se difundieran a través de las paredes celulares rotas y se oxidaran parte de los compuestos fenólicos libres en las células de orujo de uva.

El resultado del estudio actual (Cuadro 4.4) sugiere que el efecto no significativo del PFA en la extracción de compuestos fenólicos podría deberse a la oxidación causada por especies reactivas del plasma, considerando su fuerte poder oxidante (Kim et al., 2019). Otra investigación de Grzegorzewski et al. (2010) que utilizó plasma a baja presión, obtuvo resultados de degradación para los compuestos flavonoides, en el que concluye que es provocado por el tiempo y la estructura de la aplicación del plasma, producto de las especies reactivas que se generan a partir del plasma, como el oxígeno o los radicales hidroxilos. Además, Baoshan e Isabel Spranger (2005) propusieron que la presencia del oxígeno en el disolvente de extracción puede ser perjudicial y conducir una degradación de los polifenoles y por lo tanto posiblemente contribuir a bajos rendimientos de extracción de interés de compuestos fenólicos. Alternativamente, la concentración de las muestras por evaporación del solvente pudo provocar un aumento de la concentración de fenoles que permanecieron en solución o su precipitado lo que pudo redundar en su disminución.

Otro punto desfavorable que dificulta obtener una discusión más acabada es a causa de los pocos estudios realizados que traten específicamente el tema de la extracción de fenoles en orujo de uva por medio de tecnología de PFA. Así mismo, considerando el uso de diversas fuentes de plasma y parámetros de procesos en numerosas investigaciones, es difícil comparar los mecanismos de plasma y sus efectos finales.

En cuanto al análisis factorial realizado, el factor tipo de solvente tiene efectos significativos sobre los parámetros de extracción de fenoles en comparación con el efecto del tiempo de PFA aplicado en las muestras. Los resultados de los tratamientos obtenidos a partir de la lectura de absorbancia a 280 nm determinaron que los tratamientos (T1, T2, T3, y T4) como los controles (C1 y C2) con contenido de solvente de agua con etanol (H<sub>2</sub>O: EtOH) presentan mayor rendimiento de extracción de polifenoles totales en comparación en las muestras con solo solvente de agua (H<sub>2</sub>O). Este último resultado concuerda con varios otros estudios que han indicado que la obtención de un mejor rendimiento se consigue de las mezclas alcohólicas acuosos, y recomiendan el uso de agua- etanol al 50% como el mejor disolvente de extracción. La discusión anterior se refleja del estudio de Nayak et al., (2018), en que observaron que el solvente con la mezcla de agua:etanol (1:1) tiene un efecto sinérgico, al promover el hinchamiento del material celulósico y la ruptura de los enlaces entre polifenoles y la matriz celular, lo que les permitió un rendimiento más alto en la obtención de fenoles.

#### **4.3. Determinación de intensidad de color (420 + 520 + 620 nm) en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

Una alternativa para estimar el color del vino, derivado de la presencia de fenoles es a través de la medición de absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm, correspondientes a las tonalidades amarilla, rojo y azul respectivamente. A través de un equipo de espectrofotómetro, donde la suma de ellas otorga los valores de la intensidad de color. En el cuadro 4.5. y 4.6., el primero refleja los resultados de los controles sometidos al efecto del tipo de solvente y la segunda entrega los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, y a su vez el efecto de los factores por separado, el tipo de solvente y tiempo de PFA aplicado en las muestras.

**Cuadro 4.5. Intensidad de color (promedios y desviación estándar) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos tipos de solvente**

<b>Intensidad de color (420 + 520 + 620 nm) <sup>(z)</sup></b>	
<b>Tipo de solvente</b>	
<b>C1= H<sub>2</sub>O</b>	1,100 ± 0,151 <b>a</b>
<b>C2= H<sub>2</sub>O: EtOH</b>	2,667 ± 0,606 <b>b</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0001</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05). C1: Orujo de uva con agua; C2: Orujo de uva con agua.

(x): p > 0.05= no significativo; p ≤ 0.05= significativo

**Cuadro 4.6. Intensidad de color (promedios y desviación estándar) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frío atmosférico y tipo de solvente escogidos.**

<b>Intensidad de color (420 + 520 + 620 nm) <sup>(z)</sup></b>	
<b>Tipo de solvente</b>	
H <sub>2</sub> O	1,512 <b>a</b>
H <sub>2</sub> O: EtOH	2,990 <b>b</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0002</b>
<b>Tiempo PFA</b>	
PFA-1	1,922
PFA-5	2,580
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	0,0793
<b>Tratamientos:</b>	
<b>Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>	
<b>T1= H<sub>2</sub>O + PFA -1</b>	1,382 ± 0,251
<b>T2= H<sub>2</sub>O + PFA-5</b>	1,643 ± 0,387
<b>T3= H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1</b>	2,463 ± 0,451
<b>T4= H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5</b>	3,517 ± 2,453
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	0,284

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p= 0,05$ ).

**T1:** Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, **T2:** Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, **T3:** Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, **T4:** Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos.

(x):  $p > 0.05=$  no significativo;  $p \leq 0.05=$  significativo.

Los resultados obtenidos a partir del ANDEVA, junto con la prueba de Tukey (Cuadro 4.6.), indican que el efecto sinérgico del PFA junto con el solvente no presentaron diferencias significativas, como a su vez, el efecto por sí solo del tiempo de exposición del PFA a 1 y 5 pulsos de 1 min cada uno, demostrando que la tecnología PFA no influyó significativamente en la intensidad de color en las muestras de orujo de uva en este estudio. Lukic et al., (2019) también evaluó el efecto del tratamiento con plasma sobre la coloración en el vino tinto, donde comprobó un cambio leve en comparación con los resultados del vino blanco, los que no mostraron diferencias significativas entre las muestras tratadas y las sin tratar con el efecto del plasma.

Sin embargo, se puede observar que en este estudio la intensidad del color en los tratamientos que contenían solvente mixto de agua con etanol ( $H_2O$ : EtOH) arrojaron un valor promedio de 2,990, el que fue superior a los tratamientos con solvente solo agua ( $H_2O$ ), con un promedio de 1,512 (Cuadro 4.6.). Estas diferencias significativas se vuelven a comprobar a través del análisis estadístico de los controles sin efecto de PFA (Cuadro 4.5.). Se debe tener presente que la uva contiene pigmentos de diversos compuestos y una de ellas corresponde a antocianinas concentradas en las vacuolas de las pieles (y en las pulpas en variedades tintoreras) (Peña, 2006) y flavonoles que se encuentra en la fruta de la uva, y por ende también en el orujo. Estos compuestos son moléculas polares y por consiguiente son más solubles en solventes polares que en no polares, es por esto por lo que los resultados analizados con respecto a los tipos de solventes usado en el experimento reflejan una mayor extracción de color en el solvente de la combinación agua con etanol, donde ambos son polares próticos lo que permite extraer moléculas catequinas, flavonoides y antocianinas (Fontana et al., 2013).

#### **4.4. Determinación del color en el extracto del orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

Además, para evaluar la influencia de los tratamientos con plasma sobre la intensidad de color de orujos de uva, se realizó el análisis de color a diferentes longitudes de onda (316, 375, 420,



520 y 620 nm). Los resultados se representan en el cuadro 4.7. y cuadro 4.8. correspondientes a los controles y tratamientos respectivamente.

**Cuadro 4.7. Análisis de color a diferentes longitudes de ondas (316, 375, 420, 520 y 620 nm) en los controles aplicados para el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon**

	316 nm <sup>(z)</sup>	375 nm <sup>(z)</sup>	420 nm <sup>(z)</sup>	520 nm <sup>(z)</sup>	620 nm <sup>(z)</sup>
<b>Tipo de solvente</b>					
<b>C1= H<sub>2</sub>O</b>	1,289 ± 0,153 <b>a</b>	0,655 ± 0,077 <b>a</b>	0,463 ± 0,058 <b>a</b>	0,353 ± 0,050 <b>b</b>	0,282 ± 0,051 <b>a</b>
<b>C2= H<sub>2</sub>O: EtOH</b>	3,863 ± 0,470 <b>b</b>	1,816 ± 0,288 <b>b</b>	1,120 ± 0,246 <b>b</b>	0,973 ± 0,201 <b>a</b>	0,574 ± 0,163 <b>b</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0018</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05). C1: Orujo de uva con agua; C2: Orujo de uva con agua.

(x): p > 0.05= no significativo; p ≤ 0.05= significativo.

**Cuadro 4.8. Análisis de color a diferentes longitudes de ondas (316, 375, 420, 520 y 620 nm) en los tratamientos aplicados para el orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.**

	316 nm <sup>(z)</sup>	375 nm <sup>(z)(y)</sup>	420 nm <sup>(z)</sup>	520 nm <sup>(z)</sup>	620 nm <sup>(z)</sup>
<b>Tipo de solvente</b>					
H <sub>2</sub> O	1,790 <b>a</b>	0,952 <b>a</b>	0,659 <b>a</b>	0,474 <b>a</b>	0,379 <b>a</b>
H <sub>2</sub> O: EtOH	4,647 <b>b</b>	2,122 <b>b</b>	1,283 <b>b</b>	1,078 <b>b</b>	0,628 <b>b</b>
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0087</b>
<b>Tiempo PFA</b>					
PFA-1	2,870 <b>a</b>	1,335 <b>a</b>	0,821	0,676	0,426
PFA-5	3,567 <b>b</b>	1,739 <b>b</b>	1,122	0,877	0,582
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	<b>0,0048</b>	<b>0,0496</b>	0,0623	0,1007	0,0923

<b>Tratamientos: Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>					
<b>T1=</b> H <sub>2</sub> O + PFA -1	1,628 ± 0,246	0,848 ± 0,156	0,594 ± 0,113	0,438 ± 0,0823	0,350 ± 0,069
<b>T2=</b> H <sub>2</sub> O + PFA-5	1,952 ± 0,313	1,055 ± 0,230	0,725 ± 0,176	0,510 ± 0,124	0,407 ± 0,093
<b>T3=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1	4,113 ± 0,542	1,821 ± 0,277	1,049 ± 0,207	0,913 ± 0,156	0,501 ± 0,121
<b>T4=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5	5,182 ± 2,021	2,423 ± 1,330	1,518 ± 1,047	1,243 ± 0,804	0,756 ± 0,606
Significancia (valor -p) <sup>(x)</sup>	0,9913	0,3296	0,2869	0,2898	0,2809

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05).

**T1:** Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, **T2:** Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, **T3:** Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, **T4:** Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos.

(y): Análisis en base a datos transformados a la función ( $\log(375 \text{ nm})$ ).

(x): p > 0.05= no significativo; p ≤ 0.05= significativo.

En el caso del parámetro de color, el ANDEVA no presentó diferencias significativas (valor – p >0,05) para ninguno de los tratamientos en los que se evaluó el efecto sinérgico de ambos factores (tipo solvente x tiempo de PFA) (Cuadro 4.8.). Este resultado fue similar al obtenido en la evaluación de intensidad de color antes realizada, pero en cuanto al análisis factorial realizado se obtuvo una significancia en los factores por separado siendo considerable el tiempo empleado del PFA para las longitudes de onda de 316 y 375 nm, la primera refleja el contenido de ácidos fenólicos, y la segunda el contenido de flavonoides extraídos del orujo de uva siendo mayores valor en las muestras de orujo de uva que fueron expuestas 5 pulsos de 1 min cada una con PFA (Cuadro 4.8.). Por otro lado, el estudio Garofulić et al., (2015) demostró que en el jugo de cereza ácida Mascara, la mayor concentración de ácidos fenólicos se obtuvo de muestras sometidas 3 min al plasma, mientras que la con menor contenido fueron sobre un tratamiento de 5 min.

Con relación al tipo de solvente, este mostró diferencias significativas (valor p > 0,05) en todas las longitudes de ondas. Los tratamientos con solventes de mezcla de agua con etanol (H<sub>2</sub>O: EtOH) indican un aumento superior en los valores de 316 nm (ácidos fenólicos), 375 nm (flavonoles), 420 nm (color café o amarilla), 520 nm (colores rojos) y 620 nm (color azul o violáceo) en comparación con los tratamientos en que se utilizó solo el solvente de agua (H<sub>2</sub>O); esta diferencia se puede observar en el cuadro 4.8. Este resultado es similar en las muestras sin tratar con PFA, es decir, los controles (Cuadro 4.7.) que a su vez coinciden con los resultados de

intensidad de color. Demostrando que la composición del solvente utilizado influye en la extracción del color, que representa diferentes clases de compuestos fenólicos (Hernández Castillo, 2016) localizados en la baya de la uva.

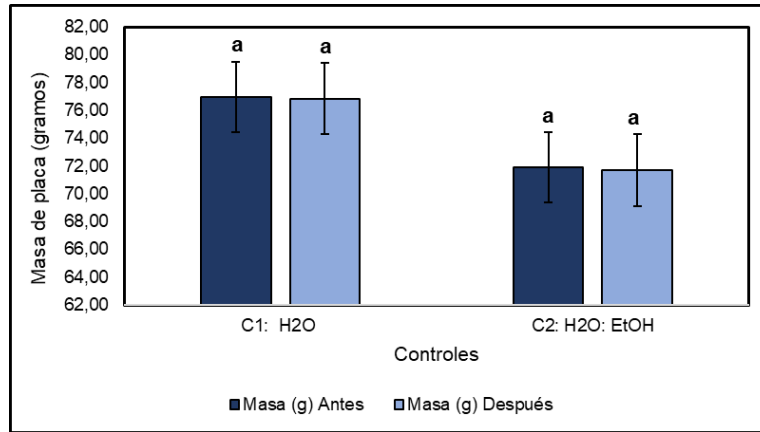
#### **4.5. Análisis de la masa de las placas**

La pérdida de volumen de las placas, por efecto del PFA, se cuantificó de forma indirecta a través de la masa (g) de las muestras antes y después de la aplicación del plasma. También de forma paralela se realizó la misma medición en las muestras control las que no recibieron tratamientos con PFA.

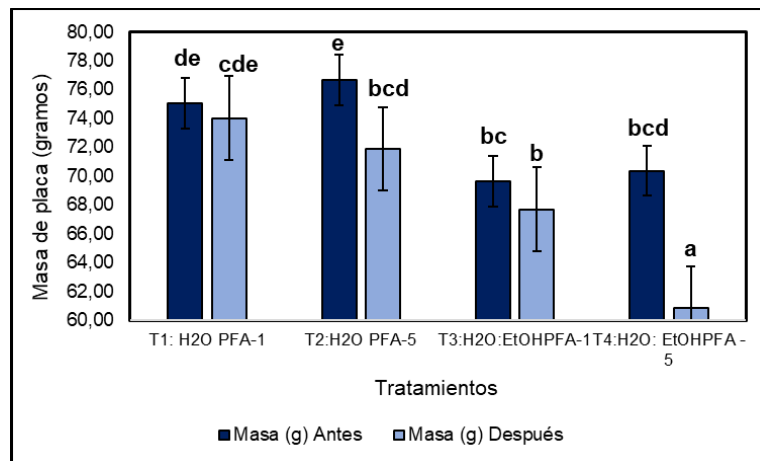
Los resultados de los tratamientos control (Figura 4.1.), no muestran diferencia estadísticamente significativa entre las medias de masas (g) de la placa, resultado que se comprobó con la prueba de múltiples (Tukey ( $p < 0,05$ )), entre los niveles de los controles (Anexo 7.1.). Esto indica que las muestras que no fueron expuestas al efecto del plasma no presentan una pérdida de volumen considerable, independiente del tipo de solvente utilizado en el estudio.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos aplicados al equipo PFA reflejan que existe una diferencia significativa sobre el peso de la placa de las muestras, es decir, el efecto del PFA influye en la pérdida de volumen (Figura 4.2.). En la figura 4.2. se observa que a medida que aumenta el tiempo empleado del PFA mayor es la pérdida de volumen, quedando en evidencia en los tratamientos de 5 pulsos, donde el peso promedio T2= 76,66 g disminuyó a 71,88 g, y el peso T4= 70,37 g a un valor de 60,85 g (Anexo 7.2.). Paralelamente, se observa que los tratamientos con solvente agua:etanol (1:1) son los que se obtuvieron una mayor pérdida de masa.

Basados en los resultados anteriores, se puede inferir que la disminución de volumen en los tratamientos puede ser producido por el funcionamiento del PFA, y a medida que aumenta el tiempo empleado del equipo este afecta con mayor magnitud en las muestras que contienen solventes volátiles, como el etanol. Sin embargo, se requieren hacer estudios que demuestre las razones específicas de la pérdida de volumen, que se cree pueden ser producto de las reacciones químicas que se generan del flujo de aire o gas ionizado, y el cambio de temperatura que produce el plasma. Por lo tanto, es difícil obtener conclusiones específicas del impacto de PFA sobre la pérdida de volumen de las muestras.



**Figura 4.1.** Peso de placa Petri con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después en muestras de controles, sin aplicación del PFA. Donde: C1: Orujo de uva con agua, C2: Orujo de uva con agua:etanol. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.2.** Masa de placa Petri con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después del efecto del plasma frío atmosférico. Donde: T1: Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, T2: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, T3: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, T4: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6. Análisis de temperatura**

Como se observó en el análisis anterior, se verificó que las muestras presentaban una disminución volumétrica, por lo que se buscó una posible explicación para este fenómeno a partir de la evaluación de temperatura. Para esto, se realizó un registro de dicha variable a partir del uso de un termómetro infrarrojo antes y después de ser expuesta a PFA, y a su vez también se realizó la medición para los controles (sin exposición a PFA).

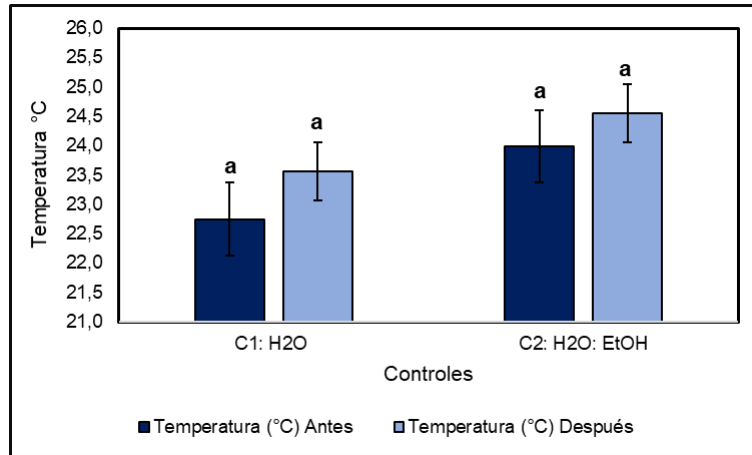
La Figura 4.3. refleja que en las muestras sin aplicación a PFA, la variación de temperatura es muy leve, por lo cual no existe una diferencia estadísticamente significativa con un valor-  $p = 0,2630$  verificado con la varianza (Test Levene) (Anexo 7.3 y 7.4.) (Figura 4.3.). Esto indica que la temperatura ambiente no es el factor de la disminución de volumen en las muestras, corroborado con la medición de análisis de las masas en los controles.

Para el caso de las muestras expuesta al plasma, correspondientes a los tratamientos (T1, T2, T3 y T4), existe una diferencia estadística significativa sobre su valor de temperatura (Figura 4.4.), comprobado en el análisis multifactorial (Anexo 7.5.). Lo anterior sugiere que el plasma influye en la variación de la temperatura en las muestras, donde los tratamientos con 5 pulsos de 1 min cada uno al PFA tiene una diferencia mayor en comparación a los tratamientos de 1 pulso, pero a su vez se observa que los tratamientos que contienen solvente agua, antes de exponerse al plasma presentan una temperatura  $T1 = 22,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T2 = 22,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las que después de la exposición a PFA cambian a  $T1 = 25,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T2 = 25,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es decir, ocurrió un aumento de temperatura; en cambio, los tratamientos constituidos por agua con etanol, antes de la exposición al plasma poseían una media de temperaturas  $T3 = 24,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T4 = 24,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y después de la aplicación del efecto del PFA  $T3 = 24,0\text{ }^{\circ}\text{C}$   $T4 = 23,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , notándose una leve disminución en sus temperaturas.

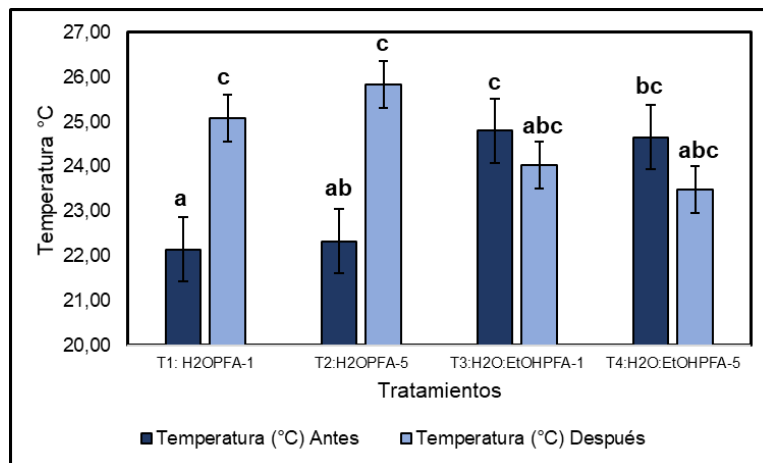
En el estudio Lukic et al., (2019) menciona que en las muestras de vino antes y después del tratamiento con plasma presentaron variación de temperatura, en la cual describe todas las muestras estaban a la temperatura ambiente de  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mientras que después de la exposición al plasma la temperatura se elevó hasta  $6^{\circ}\text{C}$ .

Según Pankaj et al., (2018) también observaron un aumento de en la temperatura de los jugos de frutas en las exposiciones de plasma más prolongados y con frecuencia más altas, mientras que el tratamiento más corto la temperatura se mantuvo estable.

Con base a los resultados y las discusiones anteriores, se puede concluir que un factor provoca disminución de volumen en las muestras podría ser debido al mecanismo de funcionamiento del plasma producto que implica variación en la temperatura en las muestras.



**Figura 4.3.** Temperatura (°C) promedio de muestras con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después, sin aplicación del PFA. Donde: C1: Orujo de uva con agua, C2: Orujo de uva con agua: etanol. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.4.** Temperatura (°C) promedio de muestras con orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon antes y después del efecto del plasma frío atmosférico. Donde: T1: Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso, T2: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos, T3: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso, T4: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSIÓN

Los tratamientos con plasma frío atmosférico no produjeron cambios significativos sobre el contenido de fenoles totales en la medición de absorbancia a 280 nm, intensidad de color, acidez titulable y color en absorbancias a 420, 520 y 620 nm, pero sí provocó cambios en las absorbancias a 316 y 375 nm, en muestras de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon.

El efecto sinérgico del tratamiento con plasma frío atmosférico, y el tipo de solvente, causaron una variación del contenido de sólidos solubles (°Brix) relevante en las muestras de solvente agua:etanol (1:1). Además, se evidenció una influencia significativa en pH, variación de temperatura y disminución volumétrica en las muestras. Sin embargo, se considera que son necesarios más estudios para analizar correctamente el comportamiento de los dos últimos.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, J. 2019. Evaluación de la tecnología de plasma frío atmosférico sobre la calidad de manzanas cv. Cripps Pink. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 39 p.

Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. 2020, a. Innovative cold plasma-assisted extraction for bioactive compounds from agricultural byproducts. Recuperado 17 de junio de 2020, de [https://hammer.figshare.com/articles/innovative\\_cold\\_plasmaassisted\\_extraction\\_for\\_bioactive\\_compounds\\_from\\_agricultural\\_byproducts/12250031/1](https://hammer.figshare.com/articles/innovative_cold_plasmaassisted_extraction_for_bioactive_compounds_from_agricultural_byproducts/12250031/1)

Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. 2020 b. Development of cold plasma pretreatment for improving phenolics extractability from tomato pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol 65, 102445.

Bao, Y., Reddivari, L., & Huang, J. Y. 2020 c. Enhancement of phenolic compounds extraction from grape pomace by high voltage atmospheric cold plasma. *LWT*, vol 133, 109970.

Bulnes del Valle, P. M. 2012. Extracción subcrítica de orujo de uva Cabernet Sauvignon pre y post fermentación vínica: identificación de flavonoides y capacidad antioxidante. Memoria para optar al título de Magíster en Ciencias de la Ingeniería. Santiago, Chile, Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile. 206 p.

Calderón, J. F. 2010. Caracterización de la composición fenólica de vinos chilenos por método espectrofotométricos. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Talca. 59 p.

Casares Faulín, A. B. 2010. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Memoria para optar al título de Ingeniería Técnica Industrial especialidad química. Universidad Politécnica de Catalunya (UPC) Barcelona, España. 276 p.

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50-55.

Cheng, X., Zhang, M., Xu, B., Adhikari, B., y Sun, J. 2015. Los principios del ultrasonido y su aplicación en procesos de congelación de materiales alimenticios: una revisión. *Ultrasonido sonoquímica*, 27, 576-585.

Concha Ricci, D. (2010). Efecto del pH y el hierro en la oxidación del vino tinto. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile, Facultad de Ciencia Agrarias, Universidad de Talca. 45p.

Davidov-Pardo, G., Navarro, M., Arozarena, I., & Marin-Arroyo, M. 2014. Obtaining polyphenolic extracts from wine by-products. *Grapes. Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects*, 225–244.

De Feria Cardet F. J. 2011. Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (*Camellia sinensis*) en productos de diferentes marcas comercializadas en



Chile. Memoria de título para optar título profesional Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 36 p.

Dueñas Zurita, J. A. 2017. Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cáscara de uva variedad quebranta (Ica, Perú) empleando técnicas convencionales y extracción asistida por ultrasonido. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Católica del Perú – Centrum Católica. San Miguel. Perú. 123p.

Famuyiwa, O., & Ough, C. S. 1982. Grape Pomace: Possibilities as Animal Feed. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 44–46.

Fanzone, M. L. 2012. Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial. Tesis Doctoral. Departamento de bioquímica i biotecnología. Universidad de Rovira i Virgili. España. 369 p.

Filgueira Garro I. 2017. Caracterización del potencial antioxidante de extractos acuosos de orujos de uva. Memoria para optar el título de Máster Universitario en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. Escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. España. 21 p.

Flamini, R., F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas and L. Bavaresco. 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10): 19651-19669.

Fontana, A; Antonioli, A; Bottini, R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(38), 8987-9003.

Frago Ramos, S. 2016. Extracción y determinación de aromas en orujos de uva. Escuela técnica superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. España. 59p.

García Ossandón, J. A. 2016. Efecto del pretratamiento de orujo de uva en la evolución de la composición fenólica y actividad antioxidante del vino durante la fermentación alcohólica. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico. Valparaíso, Chile, Departamento de ingeniería química y ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María. 91 p.

Garofulić, I. E., Jambrak, A. R., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., & Herceg, Z. 2015. The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 894-900.

Garrido, J., Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* 54 (2), 1844–1858.

Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., and Schluter, O. 2010. Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chemistry*. 122 (4): 1145-1152.

Gutiérrez, I. H., Lorenzo, E. S. P., & Espinosa, A. V. 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269-283.

Hernández Castillo, D. A. 2016. El color de los vinos tintos y la revisión de dos metodologías espectrofotométricas para su determinación. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencia Agrarias, Universidad de Talca. Talca, Chile, 45p.

Jofré Gutiérrez, C. 2004. Estudio de dos métodos de determinación de madurez fenólica en bayas de var. Cabernet Sauvignon. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 66p.

Kallithraka, S., Salacha, M.I., Tzourou, I., 2009. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food chemistry* 113 (2), 500–505.

Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, A. R., & Herceg, Z. 2016. Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190, 317-323.

Loureiro, G.A., Araujo, Q. R., Sodr e, G. A., Valle, R. R., Souza Jr, J. O., Ramos, E. M., et al. 2017. Cacao quality: Highlighting selected attributes. *Food Reviews International* 33 (4): 382-405.

Lujan Urrutia, A. 2017. Influencia de la concentración de bentonita sobre las propiedades fisicoquímicas en la elaboración de hidromiel. Facultad de Ingeniería. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional José María Arguedas. Perú. 98p.

Lukić, K., Vukušić, T., Tomašević, M., Ćurko, N., Gracin, L., & Ganić, K. K. 2019. The impact of high voltage electrical discharge plasma on the chromatic characteristics and phenolic composition of red and white wines. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 53, 70-77.

Martinez, G. A., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J. M. B., Natolino, A., Del Rio, D., Fava, F. 2015. Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chemistry*, 18(1), 261–270.

Masschelein-Kleiner, L. 2004. Les solventes. Edición en español. Dirección de Bibliotecas Archivos y Museos, Santiago de Chile: Centro Nacional de Conservación y Restauración. Santiago. Chile. 142 p.

Muñoz, E.C. 2019. Utilización de un pretratamiento enzimático en la extracción de antocianinas a partir de orujos de Uvina. Memoria para optar al título de Ingeniero en Industria Alimentarias. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 82 p.

Navajas A, C. 2019. Estudio de metodologías limpias para la extracción de polifenoles en orujos de uva. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. 37 p.

Nayak, A., Bhushan, B., Rosales, A., Turienzo, L. R., & Cortina, J. L. 2018. Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.004>

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 2020. Vinos. Recuperado en: < <https://www.odepa.gob.cl/rubros/vinos-y-alcoholes> >. Consultado el 27 de mayo del 2020.

Organización Internacional de la Viña y el Vino. 2019. Balance de la OIV sobre la situación vitivinícola mundial. Recuperado en: < <http://www.oiv.int/public/medias/6775/es-oiv-nota-de-prensa-balance-de-la-oiv-2019.pdf> >. Consultado 26 de mayo 2020.

Osterloh, A., G. Ebert, W.H. Held, H. Schulz, and E. Urban. 1996. Lagerung von obst und südfrüchten. Verlag Ulmer, Stuttgart, Baden-Württemberg. 253 p.

Pankaj, S. K., & Keener, K. M. 2018. Cold plasma processing of fruit juices. In *Fruit juices Academic Press*. 26. 529-537 p.

Peña, A. 2006. El color de los vinos. *Revista Vendimia*. Enero-Febrero, 24-26.

Peña, Á., & Grupo de Investigación Enológica (GIE). 2005. En uvas tintas factores que regulan el color. *Revista Vendimia*. Diciembre. Recuperado en: < <http://www.gie.uchile.cl/pdf/Alvaro%20Pe%F1a/Color%20de%20las%20bayas.pdf> >. Consultado 8 de julio del 2020.

Proantocianidinas, E. E. D. U. E., & VINHO, D. 2005. Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência Téc. Vitiv*, 20(2), 59-89.

Puig i Vayreda, E. 2016. El vino. Editorial UOC. p. 1-140.

Pussa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., Raal, A., 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 54 (20), 7488–7494.

Ramazzina, I., Tappi, S., Rocculi, P., Sacchetti, G., Berardinelli, A., Marseglia, A., and Rizzi, F. 2016. Effect of cold plasma treatment on the functional properties of fresh-cut apples. *J. Agric. Food Chem.* 64: 8010–8018.

Ribéreau P., Y. Glorie, A. Maujean and D. Dubourdieu. 2000. *Handbook of Enology*. Vol. 2. The chemistry of wine stabilisation and treatments. Chichester: John Wiley & Sons. McCarter, JD and Withers, SG (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 885-892.

Rodríguez, Ó., Gomes, W. F., Rodrigues, S., & Fernandes, F. A. 2017. Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). *LWT*, 84, 457-463.

Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., & Szekeres, T. 2008. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?. *Mutation research/reviews in mutation research*, 658(1-2), 68-94.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition* 45 (4), 287–306.

Soler Fernández, L. (2017). Valorización de los residuos procedentes de una producción vitivinícola. Memoria para optar al título de Ingeniería química. Universidad Politécnica de Valencia. España. 108 p.

Soria, A. C. and M. Villamiel. 2010. "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review." *Trends in Food Science and Technology* 21(7): 323-331.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D., & Garcia Viguera, C. 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.

Thirumdas R., Sarangapani Ch., and Annapure U. 2015. Cold plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophysics*. 10: 1-11.

Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. 2015. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406.

Ullari, Patricia. 2010. Transporte de masas en extracción fase sólido – líquido. *ReCiTeIA – v.10n.2*. Ecuador. 13p.

Van Balen, J. 1984. Recovery of anthocyanins and other phenols from converting grapes into wine. M.S. Thesis. Davis: University of California phenolic composition of grape stems. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 48:1076-1080.

Won, M. Y., Lee, S.J., and Min, S. C. 2017. Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 25-32.

Yu, J., & Ahmedna, M. 2013. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221–23

## 7. ANEXOS

**Anexo 7.1.** Cuadro de comparación múltiple para determinar las medias significativas de las variables masa de placas (g), Test Tukey (HSD).

<b>Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD</b>			
<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Media<sup>(z)</sup></b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
C1= H <sub>2</sub> O: EtOH -d	4	71, 61a	X
C1= H <sub>2</sub> O: EtOH -a	4	71, 90a	X
C2= H <sub>2</sub> O -d	4	76, 95a	X
C2= H <sub>2</sub> O -a	4	76, 85a	X

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p= 0,05$ ). Donde, C1: H<sub>2</sub>O: EtOH -a: Orujo de uva con agua:etanol (antes); C1: H<sub>2</sub>O: EtOH -d: Orujo de uva con agua:etanol (después); C2: H<sub>2</sub>O -a: Orujo de uva con agua (antes); C2: H<sub>2</sub>O -d : Orujo con agua (después).

**Anexo 7.2.** Cuadro masas de placas (promedios) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frio atmosférico y tipo de solvente escogidos.

	<b>Peso de placas (g) <sup>(z)</sup></b>
<b>Tipo de solvente</b>	
H <sub>2</sub> O	74,40 <b>b</b>
H <sub>2</sub> O: EtOH	67,14 <b>a</b>
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>
<b>Tiempo PFA</b>	
PFA-1-a	72,35 <b>b</b>
PFA-1-d	70,86 <b>b</b>
PFA-5-a	73,51 <b>b</b>
PFA-5-d	66,37 <b>a</b>
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>

<b>Tratamientos:</b>	
<b>Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>	
<b>T1=</b> H <sub>2</sub> O + PFA -1-a	75,05 <b>de</b>
<b>T1=</b> H <sub>2</sub> O + PFA -1-d	74,02 <b>cde</b>
<b>T2=</b> H <sub>2</sub> O + PFA-5-a	76,66 <b>e</b>
<b>T2=</b> H <sub>2</sub> O + PFA-5-d	71,88 <b>bcd</b>
<b>T3=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1-a	69,64 <b>bc</b>
<b>T3=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1-d	67,69 <b>b</b>
<b>T4=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5-a	70,37 <b>bcd</b>
<b>T4=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5-d	60,85 <b>a</b>
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	<b>0,0458</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) (p= 0,05). Donde, **T1:** H<sub>2</sub>O + PFA -1-a : Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso (antes), **T1:** H<sub>2</sub>O + PFA -1-d : Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso (después), **T2:** H<sub>2</sub>O + PFA-5-a: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos (antes), **T2:** H<sub>2</sub>O + PFA-5-d: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos (después), **T3:** H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1-a: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso (antes), **T3:** H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1-d: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso (después), **T4:** H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5-a: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos (antes), **T4:** H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5-d: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos (después).

(x): p > 0.05= no significativo; p ≤ 0.05= significativo.

**Anexo 7.3.** Cuadro temperatura (promedios y desviación estándar) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos solventes.

<b>Controles</b>	<b>Temperatura (°C) <sup>(z)</sup></b>
<b>Tipo de solvente</b>	
<b>C1=</b> H <sub>2</sub> O-a	22,8 ± 1,8 <b>a</b>
<b>C1=</b> H <sub>2</sub> O-d	23,6 ± 0,6 <b>a</b>
<b>C2=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH-a	24,0 ± 2,2 <b>a</b>
<b>C2=</b> H <sub>2</sub> O: EtOH-d	24,6 ± 1,1 <b>a</b>
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	<b>0,2630</b>

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p=0,05$ ). **C1**: H<sub>2</sub>O-a: Orujo de uva con agua (antes); **C1**: H<sub>2</sub>O-d: Orujo de uva con agua (después); **C2**: H<sub>2</sub>O: EtOH-a: Orujo de uva con agua (antes); **C2**: H<sub>2</sub>O: EtOH-d: Orujo de uva con agua (después).

(x):  $p > 0.05$ = no significativo;  $p \leq 0.05$ = significativo

**Anexo 7.4.** Cuadro Test de Levene's de análisis estadístico de la variable temperatura (°C) de controles de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a distintos tipos de solvente.

Verificación de Varianza		
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,589151	0,62921

**Anexo 7.5.** Cuadro temperatura (promedios) de orujo de uva cv. Cabernet Sauvignon sometidos a tratamientos de diferente tiempos plasma frío atmosférico y tipo de solvente escogidos.

	Temperatura (°C) <sup>(z)</sup>
<b>Tipo de solvente</b>	
H <sub>2</sub> O	23,9 a
H <sub>2</sub> O: EtOH	24,2 a
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	0,3216
<b>Tiempo PFA</b>	
PFA-1-a	23,5 a
PFA-1-d	24,6 a
PFA-5-a	23,5 a
PFA-5-d	24,7 a
Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	0,0488
<b>Tratamientos:</b>	
<b>Tipo de solvente x Tiempo PFA</b>	
T1= H <sub>2</sub> O + PFA -1-a	22,2 a
T1= H <sub>2</sub> O + PFA -1-d	25,1 c
T2= H <sub>2</sub> O + PFA-5-a	22,3 ab
T2= H <sub>2</sub> O + PFA-5-d	25,8 c
T3= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1-a	24,8 c
T3= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-1-d	24,0 abc
T4= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5-a	24,7 bc
T4= H <sub>2</sub> O: EtOH + PFA-5-d	23,5 abc

Significancia (p-valor) <sup>(x)</sup>	<b>0,0000</b>
---	---------------

Datos presentados como valor promedio de las repeticiones analíticas con desviación estándar. ANDEVA para comparar los datos.

(z): Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente, según Test Tukey (HSD) ( $p= 0,05$ ). Donde, **T1**: H<sub>2</sub>O + PFA -1-a : Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso (antes), **T1**: H<sub>2</sub>O + PFA -1-d : Orujo de uva con agua y efecto PFA de 1 pulso (después), **T2**: H<sub>2</sub>O + PFA-5-a: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos (antes), **T2**: H<sub>2</sub>O + PFA-5-d: Orujo de uva con agua y efecto de 5 pulsos (después), **T3**: H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1-a: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulso (antes), **T3**: H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-1-d: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 1 pulsos (después), **T4**: H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5-a: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos (antes), **T4**: H<sub>2</sub>O: EtOH + PFA-5-d: Orujo de uva con agua: etanol y efecto PFA 5 pulsos (después).

(x):  $p > 0.05$ = no significativo;  $p \leq 0.05$ = significativo.