

**PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

---

Estudio del impacto del uso de orujo deshidratado, obtenido a partir de  
residuos de la industria vitivinícola, en las características  
organolépticas y nutricionales del chocolate

---

**Sebastián Andrusiw - LU: 1114179**

**María Valentina D'Ambra - LU: 1124708**

Ingeniería en alimentos

Tutor:

**Lic. Mariana Barceló, UADE**

**2025**

## AGRADECIMIENTOS

---

*Queremos agradecer especialmente a nuestra tutora, Lic. Mariana Barceló, por todo su apoyo, dedicación y por acompañarnos durante cada paso de este proyecto. Su guía fue clave para que esto fuera posible.*

*También queremos dar las gracias a nuestras familias, docentes y amigos, quienes siempre estuvieron ahí para apoyarnos. Un agradecimiento especial al profesor Carlos Stutman por su ayuda con la aplicación en chocolate y a la bodega "Cabrito Wines" por brindarnos la materia prima.*

*Este logro no sería posible sin todos ustedes, que nos acompañaron en este camino.*

---

*Quiero agradecerle a mi familia, a mi novia Sofía, por todo el apoyo incondicional que me dieron a lo largo de todos estos años, me dieron la confianza, motivación e inspiración para seguir adelante y lograr este objetivo tan grande para mí, sin ellos todo esto no hubiera sido posible.*

*Por otra parte, quiero agradecerle a mi amiga y compañera de tesis, Valen, por todos los años juntos recorridos en la carrera, por todo ese apoyo mutuo que siempre hubo, fue un placer enorme compartir el proyecto final junto a vos, te deseo muchísimo éxito para tu vida personal y profesional, vas a lograr todo lo que te propongas porque sos una persona muy capaz y con un corazón enorme.*

*Sebastián*

---

*Quiero comenzar agradeciendo a mis papás, Néstor y Daniela, por ser mi sostén en cada paso de este camino. Gracias por confiar siempre en mí, por creer que podía lograrlo y por darme el apoyo necesario para enfrentar cada desafío.*

*A mis hermanos, Francisco y Agustina, gracias por ser un ejemplo para mí, por ser mis compañeros de vida, y por acompañarme siempre, sin importar las circunstancias. A Matías, mi novio, gracias por ser mi compañero incondicional, por tu apoyo constante y por llenarme de fuerza y motivación para seguir creciendo. A mis*

*amigas, las incondicionales de mi vida, gracias por su apoyo y por estar ahí en todo momento, llenándome de energía y alegría.*

*Y por supuesto, a mi compañero y amigo Sebi: gracias por compartir este viaje desde el primer día. Tu ayuda, tu amistad y tu compromiso hicieron de este proyecto una experiencia inolvidable. Estoy profundamente agradecida por todo lo que hemos construido juntos, y te deseo el mayor éxito en todo lo que emprendas en el futuro.*

*Valentina*

## GLOSARIO

---

- Ácidos fenólicos: son compuestos orgánicos derivados del fenol que tienen propiedades antioxidantes.
- Actividad acuosa ( $A_w$ ): relación que existe entre la presión de vapor de un alimento dado, en relación con la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura.
- Anillo anomérico: átomo de carbono en la estructura cíclica de los carbohidratos (como en los azúcares) que originalmente formaba parte del grupo carbonilo en forma lineal.
- Bagazo de uva: residuo sólido resultante del prensado durante la producción de vino. Está compuesto por pieles, semillas y partes del racimo.
- Biomasa: materia orgánica de origen vegetal o animal que puede ser utilizada como fuente de energía o para la producción de fertilizantes.
- Cambios organolépticos: modificaciones en las propiedades sensoriales de un producto, tales como el color, aroma, sabor, textura y apariencia.
- Citocompatibles: materiales o sustancias que son compatibles con las células vivas, es decir que no son tóxicas ni causan daño celular.
- Compost: abono orgánico rico en nutrientes obtenido a partir de la descomposición controlada de residuos vegetales, restos de comida y otros materiales biodegradables.
- Despalillado: proceso en la vinificación que consiste en separar los racimos de uva de sus escobajos o palillos, con el fin de evitar sabores amargos y astringentes en el vino.
- Economía circular: modelo económico que busca reducir el desperdicio al máximo, promoviendo la reutilización, reciclaje y renovación de productos y materiales en vez de desecharlos.

- Enólogo: especialista en la ciencia y técnica de la producción de vinos.
- Estrujado: proceso que consiste en triturar las uvas para romper sus pieles y liberar el jugo, siendo un paso esencial en la vinificación.
- Fenol: compuesto orgánico que contiene un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo bencénico. Tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas.
- Fenólicos simples: compuestos fenólicos básicos que contienen un solo grupo fenol en su estructura.
- Fertilizantes: sustancias aplicadas al suelo o a las plantas para proporcionar nutrientes esenciales y mejorar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas.
- Flavonoides: compuestos fenólicos presentes en frutas, verduras, té y otros alimentos vegetales, con propiedades antioxidantes, y antiinflamatorios.
- Gases de efecto invernadero: gases presentes en la atmósfera que capturan y retienen el calor contribuyendo al calentamiento global.
- Grupos hidroxilos: grupos funcionales en química orgánica que están compuestos por un átomo de oxígeno y un átomo de hidrógeno (-OH) unidos a un átomo de carbono.
- Hectolitros anuales: es una medida de volumen utilizada para cuantificar la producción de líquidos. Equivale a 100 litros.
- Hollejos: pieles o cáscaras de las uvas.
- Mosto: líquido obtenido al estrujar las uvas que contiene jugo, pulpa, semilla y a veces hollejos.
- Orujo deshidratado: residuo sólido de la vinificación que ha sido sometido a un proceso de secado para eliminar la humedad. Incluye pieles, semillas y otros restos de uva.
- Polifenoles: compuestos orgánicos que contienen más de un grupo fenol por molécula y están presentes en plantas que tienen propiedades antioxidantes.

- Proantocianidinas: grupo de compuestos flavonoides que se encuentran en diversas frutas, verduras, nueces y granos.
- Pulpa residual: material sólido que queda después de extraer el jugo o líquido de frutas, verduras u otro producto vegetal.
- Taninos: compuestos fenólicos presentes en plantas, con propiedades astringentes y antioxidantes, y contribuyen al sabor y color de alimentos y bebidas.
- Vinificación: es el proceso de producción de vino, que incluye varias etapas. Se transforman los azúcares de las uvas en alcohol y se desarrollan las características de sabor, aroma y color del vino.
- Nota: bagazo de uva equivale a orujo de uva, que a su vez equivale a residuo de vino.

## RESUMEN

---

La creciente tendencia hacia procesos de manufactura sostenibles y modelos de economía circular ha llevado a explorar el potencial del orujo de uva, un residuo mayoritario de la industria vitivinícola que representa aproximadamente el 30% de la masa total del fruto. Este subproducto, compuesto por pericarpio, semillas y mesocarpio, ofrece una oportunidad estratégica para reducir el impacto ambiental, al tiempo que puede ser valorizado como ingrediente funcional por su elevado contenido de fibra dietética y compuestos fenólicos bioactivos. El presente estudio exploró el impacto del orujo de uva deshidratado, rico en polifenoles, en las características nutricionales y organolépticas del chocolate semiamargo al 54%. Se evaluaron variables como aroma, textura, perfil de sabor y contenido de polifenoles, además de llevar a cabo análisis microbiológicos para garantizar la inocuidad del producto. Los resultados indicaron que la incorporación de un 15% de orujo mejoró la biodisponibilidad de polifenoles, y redujo el contenido de azúcar sin comprometer el sabor ni el color del chocolate. Estos hallazgos destacan el potencial del orujo de uva como una materia prima sostenible dentro de la economía circular, promoviendo su aprovechamiento en la industria alimentaria para desarrollar productos más responsables y ecológicos. Este trabajo establece una base sólida para futuras investigaciones sobre el uso del orujo en diversas matrices alimentarias y su sinergismo con otros componentes funcionales.

ÍNDICE

---

<b>1</b>	<b>ESTADO DEL ARTE DE INVESTIGACIONES PREVIAS .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
4.1	La industria del vino .....	11
4.1.1	Estudio del uso de los residuos generados en la producción de vino.....	13
4.1.2	Estado de situación de la Bodega “Cabrito Wines”.....	17
4.1.3	Características del residuo de la industria vitivinícola .....	18
4.2	Beneficios en la salud humana de los polifenoles.....	26
4.3	Posibles usos del orujo de uva en la industria .....	30
4.4	Estado de situación de la industria chocolatera en nuestro país .....	33
4.4.1	Pérdida de polifenoles en los tipos de chocolates .....	39
4.4.2	Tendencias de alimentación saludable.....	42
<b>5</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>43</b>
5.1	GENERAL.....	44
5.2	ESPECIFICOS .....	44
<b>6</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CAPITULO 1: ESTUDIO TÉCNICO.....</b>	<b>45</b>
7.1	Estudios fisicoquímicos y transformación de la materia prima .....	45
7.2	Deshidratación de la materia prima .....	45
7.3	Cuantificación de polifenoles en la muestra .....	47
7.3.1	Metodología .....	47
7.3.2	Resultados.....	50
7.3.3	Conclusión.....	53
7.4	Determinación de fibra dietaria en la muestra.....	55
7.4.1	Metodología .....	55
7.4.2	Resultados.....	57
7.4.3	Conclusión.....	57
<b>8</b>	<b>CAPITULO 2: Aplicación de materia prima en chocolate .....</b>	<b>58</b>
8.1	Incorporación del orujo de uva deshidratado en chocolate semiamargo al 54%.....	58
8.2	Análisis microbiológicos de la aplicación .....	62
8.2.1	Metodología.....	63

8.2.2 Resultados.....	65
8.2.3 Conclusión.....	66
8.3 Análisis sensorial de los cambios organolépticos .....	66
8.4 Análisis del contenido de compuestos fenólicos en el chocolate aplicado.....	74
8.4.1 Metodología.....	74
8.4.2 Resultados.....	76
8.4.3 Conclusión.....	78
8.5 Determinación de fibra dietaria en el chocolate semiamargo con el agregado de orujo de uva 79	
8.5.1 Metodología.....	80
8.5.2 Resultados.....	80
8.5.3 Conclusión.....	81
<b>9 CAPITULO 3: Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>10 Bibliografía .....</b>	<b>83</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>89</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>90</b>
<b>11 Anexos .....</b>	<b>91</b>
11.1 Anexo 1: elaboración chocolate amargo .....	91
11.2 Anexo 2: elaboración chocolate con leche .....	91
11.3 Anexo 3: elaboración chocolate blanco.....	93
11.5 Anexo 5: resultados de concentración de polifenoles en los diferentes bagazos.....	94
11.6 Anexo 6: materiales necesarios para la determinación de fibra dietaria:.....	98
11.7 Anexo 7: preparación de los reactivos par determinación de fibra dietaria:.....	98
11.8 Anexo 8: Procedimiento y resultados de los análisis microbiológicos: .....	101
11.9 Anexo 9: resultados y cálculos obtenidos de la medición de polifenoles en los diferentes chocolates con distintos porcentajes de bagazo .....	109
Con los resultados obtenidos, utilizando la curva de calibración del patrón previamente calculada, se determinaron los mg de polifenoles presentes en 1 g de muestra, siendo “y” absorbancia, y “x” concentración de ác gálico.....	109

## 1 ESTADO DEL ARTE DE INVESTIGACIONES PREVIAS

---

En los últimos años el interés por el aprovechamiento de subproductos agrícolas en la industria alimentaria ha aumentado significativamente. Este enfoque no solo responde a la necesidad de reducir el impacto ambiental de los residuos agroindustriales, sino también a la búsqueda de ingredientes funcionales que mejoren el perfil nutricional y organoléptico de los alimentos.

Entre los subproductos generados por la industria vitivinícola, el orujo de uva ha sido ampliamente estudiado debido a su alto contenido en polifenoles, fibra y por otros compuestos bioactivos. Estas características hacen que el orujo se considere un ingrediente funcional con un gran potencial para su incorporación en diversos alimentos.

Diversos estudios detallan el efecto benéfico de los polifenoles provenientes del orujo de uva agregado a alimentos. Por ejemplo, Bolenz y Glöde (2021) evaluaron la incorporación de orujo de uva en productos chocolateros dando como resultado un mejor rendimiento tanto su estabilidad frente a la oxidación como su contenido nutricional. A su vez, Silva *et al.*, (2022) evidencia que los compuestos bioactivos del orujo, incluidos los polifenoles y flavonoides, no solo tienen un efecto antioxidante, sino que también pueden modular procesos inflamatorios en el organismo humano. Estas propiedades funcionales refuerzan el potencial del orujo como ingrediente en alimentos saludables. Por otra parte, Bustamante., (2018) evaluó la incorporación de fibra derivada del orujo de uva en la elaboración de galletas, lo que resultó en un aumento del contenido de fibra soluble y una mejora en las propiedades texturales del producto, sin comprometer su aceptabilidad sensorial. En aplicaciones más innovadoras se evaluó el uso de orujo de uva en chocolates amargos, Tavernini *et al.*, (2020) los resultados destacaron que la incorporación de orujo en polvo mejoró el contenido de polifenoles del chocolate, aumentando sus beneficios antioxidantes y manteniendo características organolépticas aceptables.

En este contexto, el presente estudio busca profundizar en la aplicación del orujo de uva en la formulación de chocolate semiamargo, evaluando tanto sus beneficios nutricionales como sus efectos sobre las propiedades sensoriales del producto final.

## 2 INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años, la producción mundial de vino ha crecido significativamente, posicionando a Argentina como el quinto productor global y el principal exportador de mosto. Este crecimiento genera grandes cantidades de residuos, como el orujo de uva, compuesto por hollejos y semillas, especialmente en vinos tintos tras la maceración. El impacto ambiental de estos residuos ha impulsado investigaciones recientes que buscan promover su reutilización y reciclaje en la cadena de valor.

La parte fundamental de este proyecto implicó el estudio del bagazo de uva deshidratado obtenido a partir de los residuos vitivinícolas, al cual se le analizaron las características de sus componentes, entre ellos los polifenoles, sus beneficios en la salud del consumidor, y las posibilidades de uso como materia prima dentro de la industria chocolatera.

Para poder llevar a cabo la práctica en el laboratorio, se utilizó el bagazo de uva proveniente de la bodega “Cabrito Negro Wines”. Una vez obtenida la muestra, se realizó la deshidratación de ésta a escala laboratorio y luego se realizaron los análisis fisicoquímicos (incluyendo la cuantificación de polifenoles) y microbiológicos.

A continuación, se llevaron a cabo las diferentes pruebas aplicando esta materia prima en diferentes formulaciones de chocolates semiamargo, reemplazando el contenido de azúcar por orujo de uva, para luego observar los cambios organolépticos y nutricionales.

Como etapa final de este trabajo, se analizaron los resultados obtenidos y se establecieron conclusiones sobre el impacto positivo del orujo de uva en la elaboración de productos chocolateros, destacando su potencial para mejorar la calidad nutricional y organoléptica del chocolate semiamargo al 54%.

### 3 HIPÓTESIS

---

La utilización del bagazo de uva deshidratado en la industria chocolatera aportaría beneficios organolépticos y nutricionales.

### 4 MARCO TEÓRICO

---

#### 4.1 La industria del vino

El Código Alimentario Argentino define al vino como el producto obtenido por fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de uva fresca, con un contenido de alcohol mínimo del 7% (v/v a 20°C).

El proceso de elaboración del vino comienza con la vendimia (cosecha), cuya fecha debe ajustarse al momento de maduración óptima de la uva, definido por el enólogo. Esta puede llevarse a cabo de forma manual o mediante el uso de maquinaria especializada, procurando en todo momento minimizar los daños sobre el fruto. Durante el transporte hasta la bodega, se debe preservar la integridad de las uvas para evitar su deterioro por oxidaciones o golpes mecánicos. Una vez en la planta de elaboración, se realiza la recepción de la materia prima, etapa en la cual se efectúa la selección y clasificación de las uvas. Se analizan diversos parámetros como el pH, la acidez total, el color y el grado alcohólico probable, lo cual permite obtener un diagnóstico preciso de la calidad de la cosecha. Además, se descartan aquellas uvas que presenten golpes, presencia de plagas o signos de descomposición.

A continuación, las uvas seleccionadas son sometidas a la molienda, proceso que libera el mosto mediante un estrujado cuidadoso que evita romper las semillas para prevenir la liberación de sabores amargos. Este mosto es tratado con dióxido de azufre en la etapa de sulfitado, con el fin de inhibir el crecimiento microbiano indeseado y evitar procesos oxidativos que afecten la calidad del producto. Posteriormente, el mosto sulfitado se lleva a depósitos donde tiene lugar la maceración, proceso fundamental en la vinificación del vino tinto, ya que durante esta etapa se extraen compuestos fenólicos de las pieles, como taninos, antocianinas y sustancias aromáticas. En esta fase también se

puede aplicar refrigeración controlada para modular la extracción de compuestos. En paralelo o de forma consecutiva, se lleva a cabo la fermentación alcohólica, donde las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono. La temperatura y la duración de este proceso deben controlarse cuidadosamente, ya que influyen directamente en el perfil sensorial del vino. Una vez finalizada la fermentación, en muchos casos se lleva a cabo la fermentación malo-láctica, proceso en el cual el ácido málico es convertido en ácido láctico por acción de bacterias lácticas, reduciendo así la acidez total y mejorando la estabilidad microbiológica del vino.

Luego de las fermentaciones, se realiza el descube, que consiste en separar el vino líquido del bagazo o partes sólidas (pieles, semillas y restos de pulpa), seguido del trasiego, técnica mediante la cual se transfiere el vino a un nuevo recipiente para eliminar las lías gruesas y favorecer su limpidez. Posteriormente, el vino se somete a clarificación y filtrado. La clarificación implica la adición de agentes clarificantes que aglutinan las partículas coloidales, facilitando su sedimentación. El filtrado complementa este proceso, eliminando los sólidos residuales que puedan quedar en suspensión. Ambas operaciones son esenciales para garantizar la estabilidad físico-química y la limpidez del vino, además de evitar la aparición de sedimentos en la botella. Finalmente, el vino es embotellado bajo condiciones controladas de higiene, en envases que pueden ser de vidrio u otros materiales, según la estrategia comercial y las exigencias del mercado. El embotellado constituye una etapa crítica para preservar la calidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial del producto final, asegurando así su integridad hasta el momento del consumo.



Figura 1: diagrama de flujo de la elaboración del vino tinto.

#### 4.1.1 Estudio del uso de los residuos generados en la producción de vino

En los últimos años, la producción mundial de vino se ha mantenido relativamente estable con un promedio de 26 millones de hectolitros anuales (Organización Internacional de la Viña y el Olivo, 2023). Europa es una región dominante en la producción de vino, con países como Italia, Francia y España liderando las cifras; sin embargo, países como Argentina, Chile, Australia y Estados Unidos también han experimentado un crecimiento sostenido en sus volúmenes de producción.

Argentina es el quinto productor mundial de vino y el principal exportador de mosto a nivel mundial. La vitivinicultura constituye una de las actividades agroindustriales más importantes del país, está concentrada en las provincias del oeste, abarcando más de 230.000 ha cultivadas, predominando las uvas aptas para la elaboración de vino y mosto (92,2 %), con un bajo porcentaje de uvas para consumo en fresco (5,7 %) y para pasas (1,9 %). La cantidad de bodegas es de 884, de las cuales 634 están en Mendoza, 121 en San Juan y 129 en las otras provincias vitivinícolas (INV, 2023).

Argentina fue el quinto mayor productor mundial de vino, destacándose entre las potencias globales de este sector (INV, 2019). Este posicionamiento no solo se debe a los volúmenes de producción, sino también a la calidad y variedad de sus vinos, destacándose la emblemática cepa Malbec.

Unidad: Mill. hl	2014	2015	2016	2017	Prov. 2018	Prel. 2019	Var. 19/18 en volumen	Var. 19/18 en %
Italia	44.2	50.0	50.9	42.5	54.8	46.6	-8.2	-15%
Francia	46.5	47.0	45.4	36.4	49.0	41.9	-7.2	-15%
España	39.5	37.7	39.7	32.5	44.9	34.3	-10.6	-24%
Estados Unidos**	23.1	21.7	23.7	23.3	23.9	23.6	-0.3	-1%
<b>Argentina</b>	<b>15.2</b>	<b>13.4</b>	<b>9.4</b>	<b>11.8</b>	<b>14.5</b>	<b>13.0</b>	<b>-1.5</b>	<b>-10%</b>
Australia	11.9	11.9	13.1	13.7	12.9	12.5	-0.4	-3%
Chile	9.9	12.9	10.1	9.5	12.9	11.9	-1.0	-7%
Sudáfrica	11.5	11.2	10.5	10.8	9.5	9.7	0.2	3%
China***	13.5	13.3	13.2	11.6	9.1	ND	ND	ND
Alemania	9.2	8.8	9.0	7.5	10.3	9.0	-1.2	-12%
Portugal	6.2	7.0	6.0	6.7	6.1	6.7	0.6	10%
Rusia	5.1	5.6	6.6	5.8	5.5	6.0	0.5	8%
Rumanía	3.7	3.6	3.3	4.3	5.1	4.9	-0.2	-4%
Hungría	2.4	2.6	2.5	2.5	3.4	3.2	-0.2	-6%
Nueva Zelanda	3.2	2.3	3.1	2.9	3.0	3.0	0.0	-1%
Brasil	2.6	2.7	1.3	3.6	3.1	2.9	-0.1	-5%
Austria	2.0	2.3	2.0	2.5	2.8	2.6	-0.1	-4%
Grecia	2.8	2.5	2.5	2.6	2.2	2.0	-0.2	-8%
Georgia	0.9	1.2	0.9	1.0	1.7	1.8	0.0	1%
Suiza	0.9	0.9	1.1	0.8	1.1	1.1	-0.1	-6%
<b>MUNDO</b>	<b>270</b>	<b>275</b>	<b>270</b>	<b>249</b>	<b>294</b>	<b>263</b>	<b>-30.6</b>	<b>-10%</b>

Figura 2: porcentaje de producción de vino a nivel mundial expresado en millones de hectolitros. Extraído de Organización Internacional de la Viña y el Vino (2021)

Argentina también se ha consolidado como el principal exportador mundial de mosto, utilizado en diversas aplicaciones como en la elaboración de jugos, en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, entre otros.

En el país solo siete provincias concentran el 99,5% de la superficie cultivada de vid. La cosecha de uvas alcanzó los 1.455.311.700 kilogramos, siendo la provincia de Mendoza la que mayor cantidad de cosecha de uvas tiene. Parte de esta fue destinada a la producción de vino, alcanzando los 10.730.412 hectolitros de vino, siendo mayor la cantidad de vino tinto, seguido por blancos y por últimos rosados (INV, 2023).

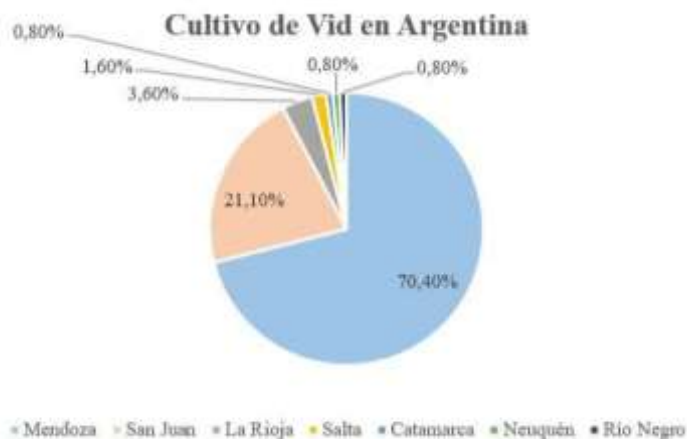


Figura 3: porcentaje de las diferentes provincias en el cultivo de vid en Argentina (INV, 2023).

La actividad vitivinícola en Argentina representa una parte significativa de la producción agroindustrial nacional, aportando aproximadamente entre el 10% y 12% en comparación con otros productos del sector.

Se generaron 229.000 litros de desechos durante el proceso de vinificación, de los cuales el 80%, que incluyen principalmente orujo (piel, semillas y tallos de uva), fueron destinados al compostaje a gran escala. Parte de los desechos también se utiliza para alimentación animal, y otra fracción se destila para la producción de etanol (INV, 2023).

Según diferentes fuentes que se detallan al pie de cada párrafo, las cinco principales consecuencias ambientales de los residuos generados en la producción de vino son:

### 1. Gases de efecto invernadero

La generación de gases de efecto invernadero, como el metano, ocurre durante la descomposición de los residuos orgánicos y contribuye al cambio climático cuando estos residuos no se gestionan adecuadamente. La mala descomposición de los residuos vitivinícolas en bodegas puede acelerar la emisión de gases de efecto invernadero, aumentando la huella de carbono del sector (Destilando el Mundo, 2025).

### 2. Impacto en suelos

El uso inapropiado de los residuos de la vinificación como abono puede alterar la estructura del suelo, afectando su capacidad para retener agua y nutrientes y, como consecuencia, disminuir su fertilidad. Esto repercute negativamente en la estructura física

del suelo afectando directamente la producción vitícola futura. Además, puede alterar la diversidad de microorganismos esenciales para la calidad de los suelos, y también a la vegetación y la biodiversidad (Campo Galego, 2019).

### 3. Degradación biológica

La alta carga orgánica presente en el orujo de uva, tales como polifenoles y taninos, dificulta su degradación biológica. En regiones como Mendoza, donde se realiza la cosecha de uvas de forma estacional, se acumulan grandes cantidades de residuos en cortos periodos de tiempo (Indiveri, 2022).

### 4. Contaminación de aguas

El orujo de vino también tiene el potencial de contaminar el agua subterránea y superficial debido a la presencia de compuestos orgánicos como azúcares y etanol, además nutrientes como nitrógeno y fósforo. La falta de tratamiento adecuado podría aumentar la concentración de contaminantes en cuerpos de agua cercanos a las áreas productivas impactando en la calidad del agua (Condorchem Enviro Solutions, 2023).

### 5. Impacto en la biodiversidad

Por último, la acumulación de orujo de vino en el suelo y el agua puede afectar la biodiversidad local, alterando los ecosistemas. El impacto en áreas naturales cercanas a los viñedos debido a los residuos sin un procesamiento previo adecuado puede reducir la población de especies vegetales autóctonas y afectar también a la fauna (Duarte *et al.*, 2021).

De acuerdo con los efectos adversos mencionados anteriormente, la gestión de residuos es crucial. Iniciativas como la investigación en la reutilización del orujo de uva muestran un camino hacia la sostenibilidad. Reducir la generación de residuos y fomentar su transformación en nuevas materias primas puede no solo mitigar los impactos ambientales, sino también promover una economía circular dentro del sector vitivinícola, clave para contribuir al desarrollo sostenible del país. Los posibles usos y aplicaciones dentro de la industria se encuentran detallados en el punto 6.3 del presente trabajo de investigación.

#### 4.1.2 Estado de situación de la Bodega “Cabrito Wines”

En Argentina, las bodegas se clasifican de acuerdo con su capacidad de producción en base a la cantidad de litros de vino producidos al año. De acuerdo con el Instituto Nacional de Vitivinicultura Argentino (INVA), entidad que regula y supervisa la actividad vitivinícola en el país, las bodegas se pueden clasificar en:

- Bodegas artesanales o pequeñas:
  - Tienen una producción menor a 500.000 de litros anuales.
  - Son caracterizados por producir vinos de autor o de alta calidad
- Bodegas medianas:
  - Producción entre 500.000 y 5.000.000 de litros anuales
  - Incluye bodegas que combinan distintos procesos industriales, con producción orientada tanto al mercado interno para exportar.
- Bodegas grandes:
  - Producción superior a 5.000.000 de litros anuales.

Para el presente trabajo se seleccionó una bodega artesanal llamada “Cabrito Negro Wines”, la cual se fundó en el año 1968 como una cooperativa vitivinícola, situada en San Rafael de Mendoza.

Con más de 80 años de antigüedad como bodega, la misma está formada por alrededor de 250 socios y abarca alrededor de 1000 hectáreas, en las cuales se cultivan las siguientes uvas:

- Uvas tintas: Malbec; Cabernet S., Syrah, Bonarda, Tempranillo, Criollas, Cerezas
- Uvas Blancas: Chenin, Torrontés Riojano, Pedro Giménez, Moscatel Rosado

Particularmente esta bodega, de acuerdo con los datos proporcionados por Fabio Zamora, enólogo responsable, se procesan alrededor de 13 millones de kilogramos de uvas, y tiene una capacidad de 12 millones de litros de vino, de los cuales un 12% aproximadamente son residuos, los cuales están compuestos por el orujo y por los

escobajos, es decir, que aproximadamente hay 1.560.000 kg de residuos anuales producidos únicamente por esta bodega.

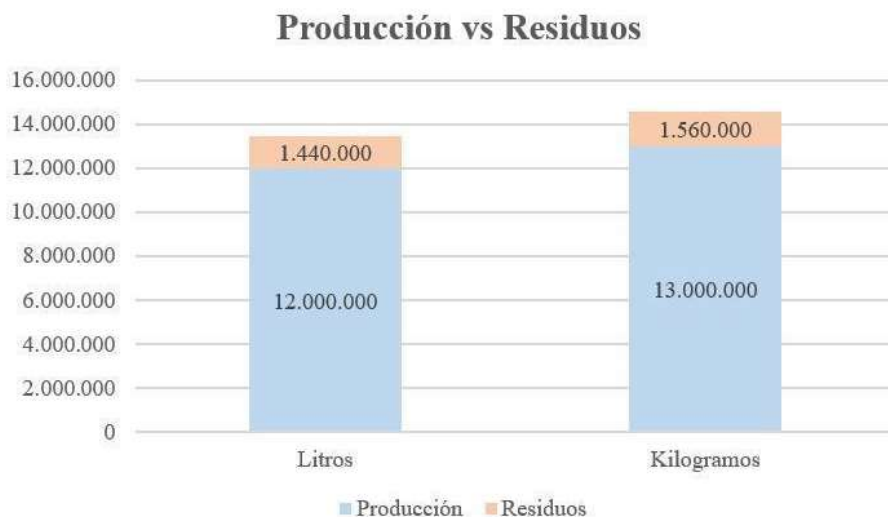


Figura 4: cantidad de residuos generados vs cantidad producida.

Esta bodega utiliza los residuos de la producción de vino para obtener alcohol destilado o para compostar, contribuyendo al ciclo de cultivo. Como posible solución al manejo de residuos, se planteó la hipótesis de que el orujo de uva, subproducto de la vinificación, podría reutilizarse eficientemente. Los posibles usos y aplicaciones dentro de la industria se encuentran detallados en el punto 6.3 del presente trabajo de investigación.

#### 4.1.3 Características del residuo de la industria vitivinícola

Durante la producción de vino tinto, se generan diversos residuos a lo largo de las distintas etapas del proceso. Entre estos residuos se encuentran los tallos de las uvas, que son eliminados durante el despallado y estrujado, así como el orujo de uva fermentado que queda después del primer prensado. Además, las lías, un subproducto que se forma tras la maduración del vino, y las aguas de desecho resultantes del filtrado antes del embotellado, también representan una parte significativa de los residuos generados.

Si estos subproductos no se gestionan adecuadamente, pueden tener un impacto considerable en el medio ambiente.

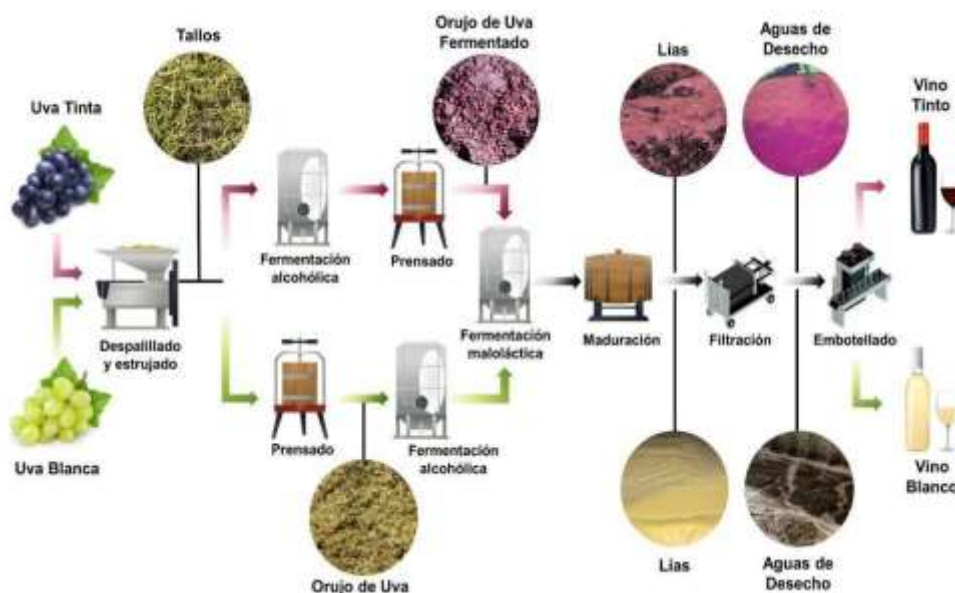


Figura 5: diagrama de flujo de la producción de vino tinto y vino blanco con el detalle de los residuos generados. Extraído de López-Astorga et al. (2023).

Estos residuos representan un 30% del peso total de las uvas producidas en los viñedos, de acuerdo con Moro y colaboradores (2021) están compuestos principalmente por la piel, la pulpa residual, semillas y tallos de las uvas utilizadas para la producción de vino; este alto porcentaje de desechos no solo refleja la magnitud del material orgánico generado durante la elaboración del vino.

Tal como se mencionó anteriormente, los productores suelen emplear estos residuos como abono orgánico para los cultivos o como alimento para el ganado, aprovechando su contenido nutricional básico. Sin embargo, estos residuos representan una valiosa fuente de compuestos bioactivos, como los polifenoles y antioxidantes que ofrecen importantes beneficios que aportan dichos compuestos, así como su potencial para ser aprovechados en diversas industrias, desde la alimentaria hasta la farmacéutica.

#### 4.1.3.1 Compuestos fenólicos del orujo de uva: polifenoles

Los polifenoles son un grupo amplio y diverso de compuestos bioactivos presentes en plantas, caracterizados por tener múltiples unidades fenólicas en su estructura química. Estos compuestos desempeñan un papel fundamental en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo y los patógenos. Son responsables de muchas de las propiedades organolépticas, como el color y el sabor, en alimentos y bebidas derivados de plantas.

En las uvas, los polifenoles se dividen principalmente en dos grandes categorías:

- flavonoides
- no flavonoides

Estos compuestos varían en su estructura química y función, pero comparten algunas propiedades comunes, como su capacidad antioxidante.

Categoría de polifenoles	Flavonoides		
<b>Tipos</b>	Antocianinas	Flavonoles	Flavanoles (Catequinas y Epicatequinas)
<b>Descripción</b>	Son las responsables del color rojo, azul, y púrpura de las uvas, especialmente en las variedades tintas y abundan principalmente en la piel de la uva.	Se encuentran en la piel y en menor medida en las semillas.	Se encuentran en las semillas de uva, son monómeros que pueden formar polímeros conocidos como taninos condensados o procianidinas
<b>Funciones</b>	Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, prevención de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.	Protectores de UV en las plantas y potentes efectos antioxidantes.  Contribuyen a la estabilidad del color en el vino.	Propiedades astringentes que contribuyen a la estructura y sabor del vino, además de ser antioxidantes efectivos.

<b>Similitudes</b>	Fuertes capacidades antioxidantes.		
<b>Diferencias</b>	Sensibles a cambios de pH, lo que influye en su coloración.	Menos sensibles al pH y generalmente no afectan el color de la uva o el vino.	No contribuyen al color, pero sí a la astringencia y la sensación en boca.

Tabla 1 cuadro comparativo de principales categorías de flavonoides presentes en el orujo de uva.  
Extraído de Fuente Marín, L. (2014).

<b>Categoría de polifenoles</b>	<b>No Flavonoides</b>	
<b>Tipos</b>	Ácidos Fenólicos	Estilbenos (como el resveratrol)
<b>Descripción</b>	Presentes en la pulpa, piel, y semillas de la uva, siendo el ácido gálico uno de los más abundantes.	Es el más estudiado debido a sus beneficios potenciales para la salud, y se encuentra principalmente en la piel de la uva.
<b>Funciones</b>	Actúan como antioxidantes y tienen propiedades antimicrobianas. También son precursores de taninos hidrolizables.	Propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y de prolongación de la vida útil en algunos modelos biológicos.
<b>Similitudes</b>	Capacidad antioxidante	
<b>Diferencias</b>	Su estructura química es más simple que la de los flavonoides, y no contribuyen al color o astringencia de la misma manera, pero su contribución a la preservación, sabor y propiedades antioxidantes es crucial.	Tiene una estructura única que le confiere propiedades especiales, como la activación de ciertas vías celulares asociadas con la longevidad.

Tabla 2 cuadro comparativo de principales categorías de flavonoides presentes en el orujo de uva. Extraído de Fuente Marín, L. (2014).

A continuación, se detalla una figura con la clasificación de los compuestos fenólicos y sus respectivas moléculas:

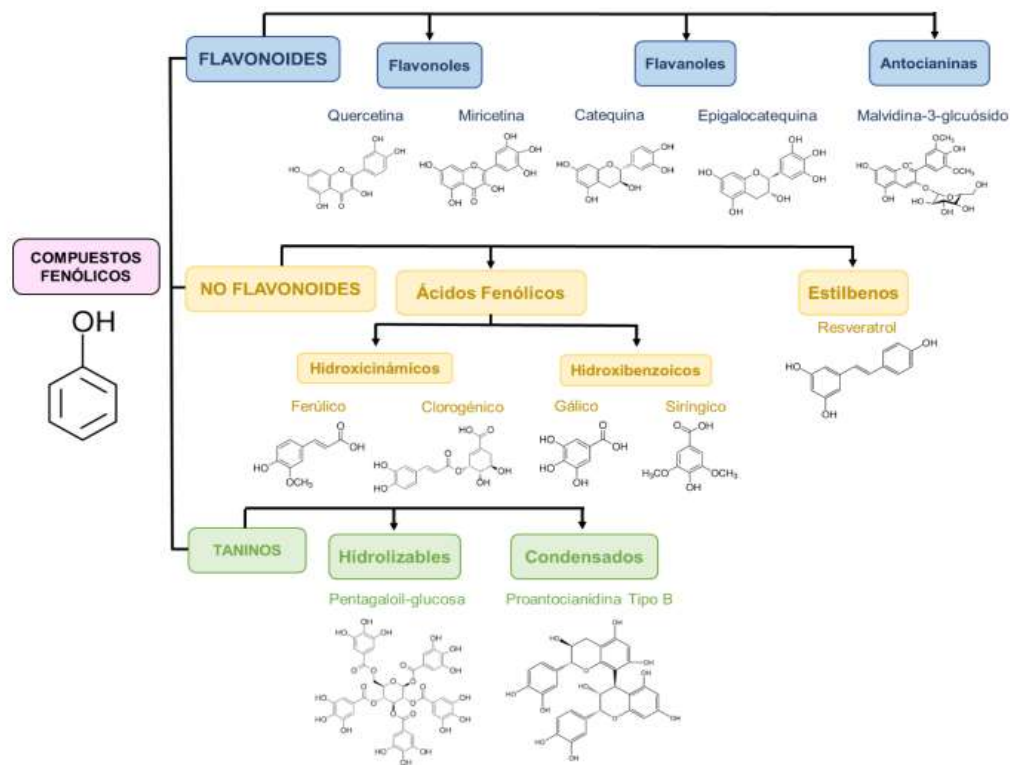


Figura 6: cuadro detallado de los diferentes compuestos fenólicos. Extraído de López-Astorga et al., (2023).

En lo que respecta al orujo de uva como fuente de compuestos fenólicos, contiene alrededor de un 70% del contenido de compuestos fenólicos presentes en la uva, los cuales permanecen en el orujo luego de transcurrir el proceso de elaboración del vino. Esta retención importante de compuestos fenólicos se debe a factores relacionados con la estructura misma de la uva y con el proceso de elaboración del vino, entre los cuales encontramos tres factores principales:

1. Composición en la uva: los compuestos fenólicos se encuentran en mayor concentración en la piel, las semillas y los tallos de la uva, por lo tanto, gran parte de estos compuestos queda en el orujo (los residuos sólidos).



Figura 7: detalle de compuestos fenólicos de la uva. Extraído de López-Astorga et al., (2023).

2. Proceso de maduración: Durante la maceración, los compuestos polifenólicos son extraídos de las pieles y las semillas al mosto, sin embargo, este proceso no es 100% eficiente, por diferentes aspectos:
  - Estructura de la piel y semillas: las pieles y semillas de las uvas, tienen una estructura celular compleja y rígida, lo que dificulta la liberación total de polifenoles, encontrándose algunos de estos compuestos protegidos dentro de las células o en la pared celular, limitando su disponibilidad para ser extraídos al mosto.
  - Solubilidad limitada: la solubilidad de ciertos polifenoles en el mosto se ve limitada por factores como la temperatura, el tiempo de maceración, el pH y el contenido de alcohol, influyen en cómo se disuelven estos compuestos.
  - Tiempo de contacto limitado: a pesar de que el mosto se encuentra en contacto con las pieles y las semillas durante un tiempo prolongado para maximizar la extracción, no es suficiente para extraer todos los compuestos polifenólicos.
3. Naturaleza de los polifenoles: algunos polifenoles tienen una baja solubilidad en el mosto acuoso, lo que hace que permanezcan en los componentes sólidos, que luego formarán parte del orujo.

#### 4.1.3.2 Fibra dietaria

La fibra dietaria se define como la parte de los carbohidratos que el cuerpo humano no puede digerir ni absorber durante el proceso digestivo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) esta fracción de compuestos, que incluye tanto fibra soluble como insoluble, es fundamental para la salud digestiva, ya que ayuda a regular el tránsito intestinal y previene el estreñimiento (OMS, 2018).

La fibra se categoriza en dos tipos:

- Fibra soluble:

Es un tipo de fibra dietética que se disuelve en agua debido a su estructura química, compuesta por polisacáridos y otros compuestos que tienen la capacidad de interactuar con las moléculas del agua, formando un gel viscoso en el sistema digestivo.

- Fibra insoluble:

Esta clasificación de fibra no interacciona con las moléculas de agua por su estructura química que, a diferencia de las solubles, estas fibras están compuestas por polímeros como la celulosa, hemicelulosa y lignina, que tienen una estructura más rígida y menos capacidad de formar enlaces con las moléculas de agua, por lo que pasa a través del tracto digestivo prácticamente intacta.



Figura 8: detalle de fibra dietaria de la uva. Extraído de López-Astorga et al., (2023).

El orujo de uva se considera fuente de fibra dietaria soluble e insoluble, pudiendo contener entre el 20-80%. En el orujo de uva se encuentran principalmente la pectina, celulosa, lignina y otros polisacáridos.

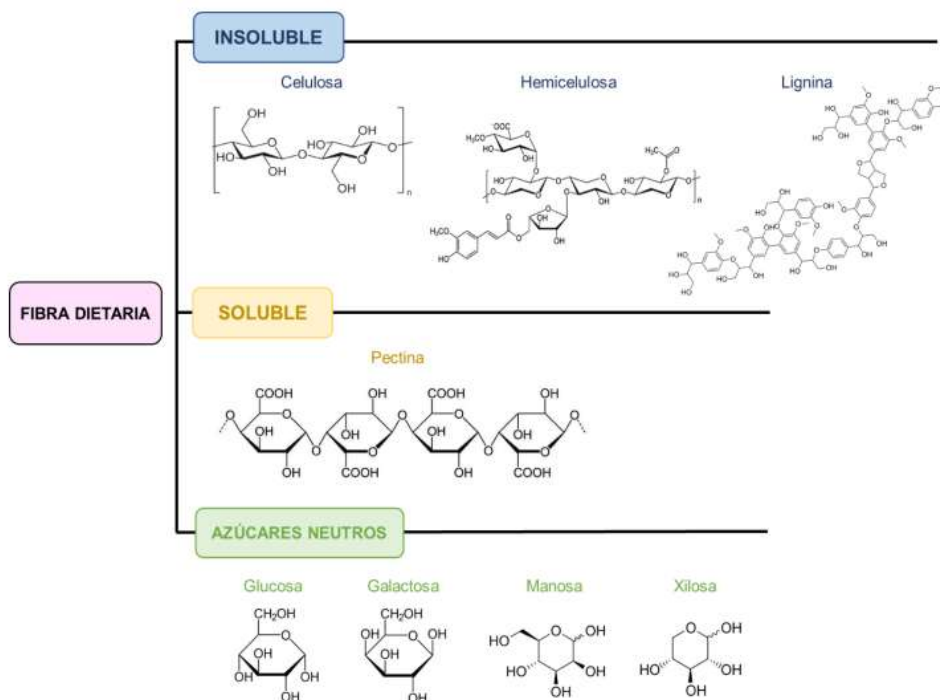


Figura 9: cuadro detallado de la clasificación de fibra dietaria. Extraído de López-Astorga et al., (2023).

Dependiendo del tipo de fibra, sea soluble o insoluble, se puede clasificar de acuerdo con su grado de fermentación:

- La fibra fermentable se refiere a la parte de la fibra que puede ser descompuesta por las bacterias intestinales en el colon. Esta fermentación produce productos como ácidos grasos de cadena corta y gases, que pueden tener efectos beneficiosos en la salud intestinal, como mejorar la función del colon y apoyar la salud metabólica, en donde las fibras fermentables son mayormente las fibras solubles, debido a que se disuelve en agua y forma una sustancia tipo gel (*gel-like*) en el intestino, es decir una sustancia con textura viscosa, semisólida. Esta propiedad de gel permite que las fibras fermentables desempeñen sus funciones beneficiosas, como ralentización de la digestión, mejorar la absorción de nutrientes y actuar como alimentos para las bacterias intestinales beneficiosas.
- La fibra no fermentable, presente en mayor medida en las fibras no solubles, no es descompuesta por las bacterias intestinales y atraviesa el tracto digestivo sin

ser alterada. Esta característica contribuye principalmente al aumento del volumen de las heces y a la regularidad intestinal.

#### 4.2 Beneficios en la salud humana de los polifenoles

Los compuestos polifenólicos recuperados en el residuo del vino (orujo de uva) luego del proceso de vinificación cuentan con grandes valores añadidos, ya que los polifenoles son compuestos bioactivos con diferentes impactos positivos en la salud humana

Con base en investigaciones científicas, se han identificado diversos beneficios respaldados por evidencia

- Poder antioxidante:

El poder antioxidante proviene de su capacidad de neutralizar los radicales libres, definidos como moléculas inestables altamente reactivas, que se generan de manera natural y dañan las células y los tejidos del cuerpo. Los polifenoles por su estructura química permiten donar electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres, neutralizándolos y evitando que dañen las células. Algunos polifenoles tienen la capacidad de estimular la actividad de enzimas antioxidantes presentes en el cuerpo, como la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión, peroxidasa (Quiñones *et al.*, 2012).

- Capacidad antiinflamatoria

Mediante investigaciones científicas, se ha mostrado la capacidad de los polifenoles en la posible intervención de problemas inflamatorios. Podrían promover la secreción de factores antiinflamatorios, al mejorar la barrera mucosa intestinal y la función del sistema inmunológico (Mancuso *et al.*, 2019).

Esto se da, por varios factores:

- a. Inhibición de mediadores inflamatorios:

Los polifenoles inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, la interleucina-6

y la interleucina-1 beta. Estas citocinas son muy importantes en lo que respecta a la activación de la respuesta inflamatoria.

b. Modulación de las vías de señalización inflamatorias:

Mediante la composición polifenólica, se genera un impacto que puede influir en las diferentes vías de señalización:

- i. Vía NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): factor importante de transcripción que promueve la expresión de genes proinflamatorios, su inhibición ayuda a reducir la producción de citocinas proinflamatorias.
- ii. Vía MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase): esta vía, incluye varias quinasas que regulan la respuesta celular a factores externos, como el estrés.
- iii. Vía PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase / Protein kinase B): los polifenoles pueden activar esta vía, que se encuentra asociada a la supervivencia celular y la regulación del crecimiento. La activación de esta vía podría tener efectos antiinflamatorios al inhibir la apoptosis y mejorar la función celular.
- iv. Vía Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2): esta vía puede activarse por la presencia de polifenoles, al ser un factor de transcripción reguladora de la expresión de enzimas detoxificadoras, lo que ayuda a reducir la inflamación,
- v. Vía AMPK (AMP-activated protein kinase): la activación de esta vía, puede contribuir a la regulación del metabolismo energético y la inflamación.

c. Reducción de estrés oxidativo:

Genera un alivio en el estrés oxidativo, asociado a la capacidad antioxidante de los polifenoles, reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), los polifenoles disminuyen la activación de

rutas inflamatorias inducidas por el estrés oxidativo, evitando la probabilidad al riesgo de inflamación.

- Protección cardiovascular

Es una de las cualidades más conocidas en el vino, por lo que tiene suma importancia en el bagazo, estos efectos se generan gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y vasodilatadoras, actuando en varios mecanismos en el sistema cardiovascular.

Parámetros importantes en la protección cardiovascular:

- a. Reducción del estrés oxidativo, una de las principales causas del daño cardiovascular. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden oxidar el colesterol LDL promoviendo la formación de placas ateroscleróticas en las arterias.
- b. Mejora en la función endotelial:

El endotelio (capa interna de vasos sanguíneos) es fundamental en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial. La presencia de los polifenoles generaría un aumento en la producción del óxido nítrico, fomentando los efectos beneficiosos de la molécula promotora de la vasodilatación, de esta manera se reduce la presión arterial y mejora el flujo sanguíneo.

- Capacidad neuroprotectora

El efecto neuroprotector de los polifenoles, está relacionado a la capacidad de proteger las neuronas y mejorar la salud del sistema nervioso central.

La posible protección neurológica se asocia a un conjunto de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y moduladoras de rutas celulares involucradas en la supervivencia neuronal, con posibles beneficios en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson.

Entre las principales propiedades destacan:

- Reducción de estrés oxidativo en el cerebro:

Los polifenoles, podrían tener un efecto significativo en la reducción del estrés oxidativo (ROS) en el cerebro, siendo este altamente susceptible al daño por estrés oxidativo debido a su alta tasa metabólica y su consumo de oxígeno.

- Efecto antiinflamatorio en el cerebro:

La propiedad de los polifenoles podría generar una inhibición de las células gliales activadas, responsables de la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF), reduciendo la inflamación y previniendo el daño neuronal asociado a la neuro inflamación crónica.

- Modulación de la señalización neuronal:

La presencia de los polifenoles podría permitir modular rutas de señalización celular involucradas en la supervivencia y la plasticidad de las neuronas, rutas que regulan la neuroprotección.

Los polifenoles se encuentran en distintas variedades de alimentos, dentro de los cuales encontramos visibles en la siguiente tabla:

Grupo de alimento	Alimentos con alto contenido de polifenoles	
	100-200 mg/Equivalente	>200 mg/Equivalente
Frutas	Pera ( <i>Pyrus communis</i> )	Mandarina ( <i>Citrus reticulata</i> )
	Melón ( <i>Cucumis melo</i> L.)	Manzana ( <i>Malus domestica</i> )
	Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> )	Naranja ( <i>Citrus sinensis</i> )
	Piña ( <i>Ananas Comosus</i> L.)	Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )
	Uva verde ( <i>Vitis vinifera</i> )	Arándano ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )
		Ciruela pasa ( <i>Prunus domestica</i> )
	Durazno ( <i>Prunus persica</i> )	
	Fresa ( <i>Fragaria</i> )	
Verduras	Calabaza local ( <i>Cucurbita moschata</i> )	
	Brócoli ( <i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> )	
	Coliflor ( <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> )	Espinaca ( <i>Spinacia oleracea</i> )
	Pimiento rojo, verde y amarillo ( <i>Capsicum annuum</i> )	
	Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	
Cereales	Repollo ( <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> )	
	Elote ( <i>Zea mays</i> )	
Leguminosas		Frijol negro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
		Lenteja ( <i>Lens culinaris</i> )
Aceites	Nuez ( <i>Juglans regia</i> )	
Azúcar		Cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> )
Alimentos libres de energía		Alcaparra ( <i>Capparis spinosa</i> )
Bebidas alcohólicas		Vino tinto

Figura 10: alimentos clasificados según su grupo y contenido aproximado de polifenoles. Extraído de López-Cervantes et al., (2023).

El consumo promedio de polifenoles en Argentina no se encuentra documentado por ninguna investigación, sin embargo, el rango de consumo depende de la dieta individual, teniendo una gran variación de consumo promedio, debido a la situación actual del país. Existen estudios internacionales publicados (Kawada, 2021) que indican como resultado, que una ingesta promedio de polifenoles en una dieta típica, oscila entre 500 y 1000 mg /día, dependiendo de la cantidad de frutas, verduras, té, vino tinto, café y productos integrales consumidos por cada individuo.

#### 4.3 Posibles usos del orujo de uva en la industria

En los últimos 10 años, las empresas comenzaron a investigar y desarrollar, la utilización de residuos generados a lo largo de los procesos productivos, impulsado por varios factores, como normativas ambientales, expectativas de los consumidores, innovaciones tecnológicas, iniciativas globales, entre otras cosas.

En la industria vitivinícola se generan grandes cantidades de residuos de bagazo de uva, por lo cual se están estudiando los posibles usos de estos residuos.

Actualmente varias empresas productoras de vino pagan por la eliminación de estos residuos, dirigidos a su reutilización en forma de compostaje. Pero, se están investigando distintas alternativas de uso para estos residuos:

- Aplicaciones en la industria alimentaria

El enriquecimiento de los alimentos con subproductos de la vinificación permitirá crear alimentos funcionales, permitiendo la introducción de ingredientes naturales, obtenidos a partir de residuos.

A continuación, se presenta una pirámide alimenticia como herramienta visual donde se observa la posible aplicación del orujo de uva deshidratado en los productos pertenecientes a los cinco grupos de alimentos y bebidas, con el fin de enriquecerlos.



Figura 11: pirámide alimenticia para aplicación del orujo de uva. Extraído de Ferrer-Gallego et al. (2022).

Desglosando cada sección de la pirámide alimenticia tenemos:

- Aguas e infusiones aromatizadas

Las infusiones se encuentran en creciente demanda por parte de los consumidores. Actualmente hay un gran movimiento mundial, por el uso de colorantes naturales, en donde el bagazo de uva podría llegar a tener gran significancia. En el caso de las uvas rojas, son una gran fuente de pigmento natural. Contiene pigmentos solubles en agua tales como antocianinas, principalmente 3-glucósidos, 3-acetilglucosidos, y 3-p-cumaroilglucosidos.

Por otro lado, al igual que el color, los volátiles presentes en el bagazo de vino, tienen sabores diferenciales, que pueden usarse para mejorar el perfil aromático de algunas infusiones, por su gran variedad de compuestos aromáticos. Como parámetro de seguridad y vida útil, la bioactividad del bagazo de uva, también podría ser evaluada en aguas fortificadas e infusiones, por su gran disminución en la tasa de crecimiento microbiano, en lo que se destacan los patógenos, con su posible uso como conservante (Alibade *et al.*, 2021).

- Pan y pastas

Los productos panificados y las pastas son muy predominantes en el mercado, por lo que la producción de trigo/maíz por día se encuentran en grandes escalas.

Se busca obtener una harina con una granulación similar a la harina de trigo, a partir del orujo de uva seco, con el fin de obtener un nuevo producto, u obteniendo una fortificación del pan de trigo con el agregado de orujo de uva, mejorando el potencial bioactivo. Esta materia prima se ha evaluado en barras de cereales y de panadería con diferente contenido de harina, mejorando las propiedades reológicas y microestructurales de la masa de trigo (Tolve *et al.*, 2021).

- Productos lácteos

El yogurt es de gran importancia global, por la gran demanda de los consumidores como producto lácteo funcional, con ingredientes que promueven la salud.

Utilizando el bagazo de uva, como fuente de antioxidantes, aplicado en el yogurt, daría un gran agregado a su funcionalidad, así como también influye en sus atributos sensoriales como textura, color y aroma. Se realizaron pruebas, para evaluar el prolongamiento de la vida útil de estos productos, obtenido por el aumento de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidantes, ausentes en los productos lácteos (Chouchouli *et al.*, 2013).

- Muffins y pasteles

En la parte superior, se encuentran alimentos de consumo habitual, como muffins, galletas y productos azucarados, donde podría influir el uso de bagazo de uva (Aksoylu *et al.*, 2015).

Se demostró que, con la adición del bagazo de uva deshidratado y molido, a las galletitas, hay una disminución en los ácidos grasos libres, aumentando un ligero contenido proteico. En este estudio de galletas, se observó que el uso del bagazo de uva como materia prima, puede ser fuente importante de fibra y polifenoles, aumentando considerablemente las propiedades funcionales de las galletas y galletas dulces. Siendo esta materia prima, una alternativa a los productos sin gluten, mejorando sus propiedades nutritivas y saludables (Mildner-Szkudlarz *et al.*, 2013).

- Bebidas alcohólicas / no alcohólicas y alimentos procesados

En la parte superior de la pirámide se encuentran estos productos, en los cuales se ha investigado en los últimos años el impacto de los extractos de bagazo de uva en la estabilidad oxidativa, así como en los compuestos orgánicos volátiles y el perfil aromático de bebidas alcohólicas como el vino tinto y bebidas no alcohólicas funcionales (Nunes *et al.*, 2024), así como en productos procesados como embutidos, snacks y productos cárnicos cocidos (Asensio-Grau *et al.*, 2022; López de Dicastillo *et al.*, 2024).

- Aplicaciones en ganadería y alimentación animal

En general, el uso de orujo de uva es aplicable a la alimentación de rumiantes, está especialmente indicado de acuerdo con el artículo publicado Sitio Argentino de Producción Animal, para animales en mantenimiento/crecimiento. Las posibilidades de uso durante la fase productiva, se relaciona principalmente con los efectos de los compuestos bioactivos que contienen, de los nutrientes que proporciona (Baumgärtel *et al.*, 2007; INRA,2007).

Una de las estrategias más comunes para prevenir la oxidación lipídica en la carne es la inclusión de antioxidantes en la dieta animal. Sin embargo, muchos de estos compuestos son costosos de sintetizar y están restringidos en algunos países debido a sus posibles efectos tóxicos o carcinogénicos. Esto ha generado un creciente interés en desarrollar antioxidantes naturales a partir del bagazo de uva para su uso en la alimentación animal. (Makris *et al.*, 2007; Molina-Alcalde *et al.*, 2008; Spanghero *et al.*, 2009).

#### 4.4 Estado de situación de la industria chocolatera en nuestro país

La industria chocolatera en Argentina ha experimentado un crecimiento sostenido en las últimas décadas, consolidándose como uno de los sectores más dinámicos y creativos del país. Con una producción anual de alrededor de 45.000 toneladas al año, Argentina se posiciona entre los países latinoamericanos con mayor consumo de chocolate, con un consumo per cápita anual entre 2 y 3 kilos, y una frecuencia de compra de al menos 2 veces por semana (Canosa, 2023).

El crecimiento de la industria chocolatera en Argentina ha sido impulsado por una combinación de tradición y capacidad de innovación. Con una rica herencia que fusiona

influencias europeas con sabores autóctonos, el chocolate argentino se destaca no solo en el mercado local, sino también a nivel internacional. Argentina exporta sus productos a diversos países de América Latina, Europa y otras regiones, lo que fortalece su presencia global y contribuye de manera significativa a la economía nacional, posicionando al chocolate argentino en el mapa global de la excelencia culinaria. Según el informe de Nosis (2023), Argentina tiene una gran producción de chocolates a través de más de 150 empresas chocolateras y de producción de golosinas, ubicadas principalmente en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (22%), Río Negro (13,9%), Córdoba (9,3%) y Mendoza (6,9%).

Para la producción de chocolate, se necesita una serie de ingredientes fundamentales, donde cada uno cumple una función característica:

#### Ingredientes Básicos

- Cacao en grano: la materia prima esencial que se procesa para obtener la pasta de cacao, la manteca de cacao y el polvo de cacao.
- Pasta de cacao (licor de cacao): obtenida al moler los granos de cacao, contiene tanto sólidos de cacao como manteca de cacao.
- Manteca de cacao: es la grasa natural del cacao, que se separa de los sólidos de cacao durante el proceso de producción.
- Azúcar: utilizado para endulzar el chocolate.
- Leche en polvo: usado en la producción de chocolate con leche y chocolate blanco.

Dependiendo el tipo de chocolate, va a variar el porcentaje de cada ingrediente:

Materia prima	Chocolate amargo	Chocolate con leche	Chocolate blanco
Pasta de Cacao	42 %	15 %	0%
Azúcar	41 %	42 %	55 %

Manteca de cacao	8,4 %	20 %	20 %
Lectina	0,4 %	0,4 %	0,4 %
Leche en polvo	0 %	23 (8% descremada + 15% entera)	14 %
Otros (Vainilla, etc.)	0,2 %	0,6 %	0,6%

*Tabla 3 cuadro comparativo de las diferentes proporciones de ingredientes en los diferentes chocolates. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina (2025) y Directo al Paladar (2020).*

### Ingredientes adicionales

- Lecitina de soja: un emulsionante que ayuda a mejorar la textura del chocolate y facilita su procesamiento.
- Vainilla o extracto de vainilla: utilizado para mejorar el sabor del chocolate.
- Sólidos de leche: además de la leche en polvo, se pueden usar otros derivados de la leche para ciertos tipos de chocolate.
- Frutos secos: almendras, avellanas, nueces, etc., para agregar sabor y textura.
- Frutas deshidratadas: como pasas, arándanos, y otras frutas para chocolates especiales.
- Saborizantes naturales o artificiales: para agregar diferentes perfiles de sabor.
- Edulcorantes alternativos: para chocolates bajos en azúcar o sin azúcar (por ejemplo, stevia o maltitol).
- Sal: en pequeñas cantidades, para resaltar los sabores.

El estudio se enfocará en la siguiente variedad de chocolate producido en Argentina:

- Chocolate semiamargo 54% de cacao

El chocolate semiamargo, también conocido como chocolate negro o chocolate puro, cuenta con el siguiente diagrama de flujo para su producción:

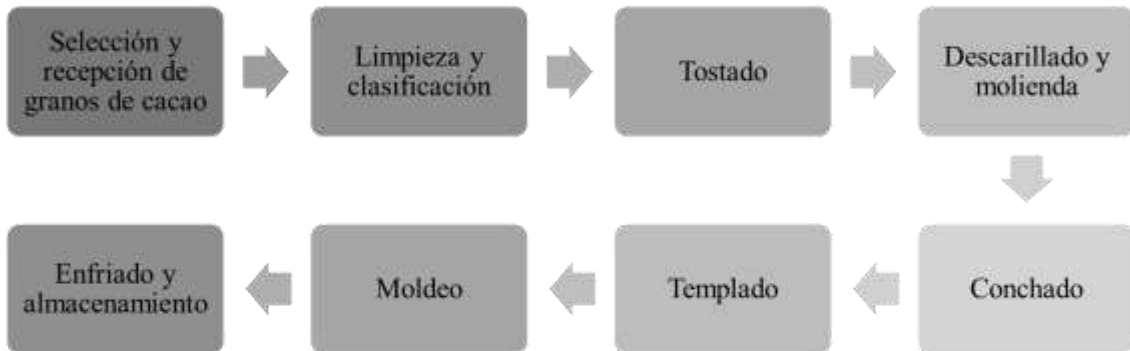


Figura 12: diagrama del proceso industrial de elaboración de chocolate. Extraído de Afoakwa et al., 2008).

En la elaboración del chocolate semiamargo a nivel industrial en Argentina, cuenta con una variedad de máquinas especializadas para garantizar la calidad y consistencia del producto.

Las principales máquinas incluyen:

1. Tostadoras de cacao: Se utilizan para tostar los granos de cacao, con el fin de realzar el sabor y eliminar la humedad.



*Figura 13: tostadora de cacao*

2. Molinos de bolas o rodillos: Estos equipos trituran las habas tostadas, formando una masa de cacao (licor de cacao). En esta fase, se obtienen partículas finas que contribuyen a la textura final del chocolate.



*Figura 14: molino de bolas o rodillos*

3. Conchas: Son máquinas que mezclan y airean el chocolate durante varias horas para mejorar su sabor y suavizar la textura. En este proceso se reduce la acidez y la astringencia del cacao.



*Figura 15: máquina de conchado*

4. Templadoras: Estas máquinas controlan el enfriamiento del chocolate, siendo crucial para obtener la cristalización adecuada de la manteca de cacao, dándole al chocolate su brillo y textura correcta.



*Figura 16: templadora*

5. Moldes y líneas de enfriamiento más envasado: Se utilizan para darle forma al chocolate y empaquetarlo en sus formatos comerciales. Las líneas de envasado pueden ser automáticas o semiautomáticas, dependiendo del volumen de producción.

El túnel de enfriamiento consiste en transportar el chocolate moldeado a través de bandas transportadoras, a medida que va circulando la temperatura del chocolate dentro del túnel disminuye gradualmente. Las condiciones deben ser exactas en cuanto a su temperatura y humedad, para asegurar la calidad del chocolate, evitando que pierda su brillo o se formen defectos como manchas blancas (*bloom* de grasa)



*Figura 17: línea de enfriamiento y envasado*

La descripción detallada de cada etapa correspondiente a la producción de cada tipo de chocolate se encuentra en los Anexos 1, 2 y 3.

#### 4.4.1 Pérdida de polifenoles en los tipos de chocolates

Los polifenoles presentes en el chocolate provienen principalmente de los granos de cacao, especialmente de la testa y el cotiledón. La testa, conocida también como cáscara, es la capa externa que recubre los granos de cacao y contiene la mayor concentración de polifenoles, mientras que el cotiledón corresponde a la parte interna del grano.

La cantidad y composición de polifenoles pueden variar significativamente durante el procesamiento y almacenamiento del chocolate. Un factor determinante es el tipo de chocolate y los procesos específicos empleados en su elaboración, los cuales influyen directamente en el contenido final de estos compuestos bioactivos.

El procesamiento del cacao al chocolate afecta los flavonoles y metilxantinas y sus mecanismos de acción (Goya, Kongor, & de Pascual-Teresa, 2022). A continuación, se detallan las principales operaciones donde se produce la pérdida de polifenoles:

1. Oxidación: los polifenoles son sensibles al oxígeno, debido a su estructura química. Están compuestos de enlaces dobles y grupos hidroxilos (Figura 6) que pueden reaccionar con el oxígeno del aire, provocando su oxidación. Durante la oxidación, los polifenoles pierden su capacidad antioxidante, lo que puede afectar negativamente a la calidad del chocolate. Esto puede ocurrir durante el

procesamiento del cacao, especialmente al utilizar altas temperaturas o si se almacena el chocolate en condiciones de alta humedad.

2. Calentamiento: el calentamiento provoca la liberación y degradación de los polifenoles, al realizarse el tostado se genera una pérdida importante de su contenido inicial, especialmente si se superan los 60°C. Esta etapa es una de las más importantes ya que permite el desarrollo del sabor y el aroma del chocolate producido. Por lo tanto, es importante controlar la temperatura durante el procesamiento del chocolate para minimizar las pérdidas de polifenoles.
3. Luz: la luz ultravioleta (UV), puede causar la degradación de los polifenoles, por la capacidad que tiene para romper los enlaces químicos de la estructura de los polifenoles. En el momento que los polifenoles absorben la luz UV, se activan y comienzan a descomponerse, pierden sus propiedades antioxidantes y alteran su estructura química. Esto puede modificar tanto el sabor, como la calidad nutricional del chocolate. Por eso, es crucial almacenar el chocolate en lugares oscuros o en empaques que lo protejan de la exposición directa a la luz.
4. Envejecimiento: los polifenoles pueden degradarse con el tiempo, especialmente si se almacena el chocolate durante períodos prolongados. Esto se debe a la oxidación y la hidrólisis de los polifenoles, que pueden conducir a la formación de compuestos menos activos.

Las diferencias en las pérdidas de polifenoles entre los distintos tipos de chocolate se deben a la variación en la concentración de cada componente. El chocolate amargo, por ejemplo, presenta la mayor cantidad de polifenoles debido a su bajo contenido de azúcar y a la ausencia de leche en su composición. En contraste, el chocolate de leche y el chocolate blanco contienen más azúcar y lácteos, lo que reduce la cantidad de compuestos polifenólicos que se conservan. Además, el chocolate blanco, al no incluir sólidos de cacao, pierde muchos de estos valiosos compuestos, lo que lo convierte en la opción con menor concentración de polifenoles.

Por otra parte, la pérdida de polifenoles va a variar dependiendo del tipo de proceso por el cual se obtiene el chocolate:

- En el caso del chocolate amargo al sufrir un procesamiento térmico más leve y menos extenso en términos de temperaturas, esto ayuda a preservar mucho mejor los compuestos polifenólicos por su sensibilidad al calor.
- En el caso del chocolate de leche en su periodo de producción, principalmente en etapas de molienda, conchado y templado, se somete al cacao a temperaturas muy elevadas, degradando en gran escala los compuestos fenólicos; esto se da porque al contar con agregados lácteos y un mayor contenido de azúcar, afecta tanto a la estabilidad del producto como a su sabor y textura, lo que exige un control más riguroso durante su elaboración.

La selección de las variedades de cacao desempeña un papel crucial en la conservación de polifenoles, ya que algunas presentan niveles más altos debido a factores genéticos, condiciones ambientales y métodos de procesamiento. Además, la elección de la variedad de cacao está influenciada por las preferencias del productor de chocolate, quien toma en cuenta el perfil de sabor deseado, los procesos de elaboración, el tipo de producto final y las particularidades culturales y regionales. Estos aspectos combinados determinan tanto la calidad funcional como las características organolépticas del chocolate producido

Existen tres diferentes variedades de cacao:

- Cacao Forastero
- Cacao Criollo
- Cacao Trinitario



*Figura 18: variedades de granos de cacao. Extraído de Carvalho, J. A., et al. (2020).*

El Cacao Forastero o Amazonia es el más común, tiene un sabor fuerte y amargo, es algo ácido y representa el 70% del consumo de cacao del mundo. Esta variedad, produce la mayor cantidad de frutos, pero la desventaja se encuentra en su aroma sin fineza y escaso sabor frutal. Se cultiva principalmente en Venezuela, Perú, Ecuador, Colombia, Brasil, Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Costa Rica, Santo Tomé y algunas plantaciones en el sudeste asiático. Tiene un contenido de polifenoles alto, representando un 8-10% del peso seco de la semilla cruda.

El Cacao Criollo es el fruto con mejor calidad entre los tres tipos de cacao, caracterizándose por ser el menos fructífero, es decir produce menos cantidad de frutos en comparación a las otras variedades, representando una menor proporción en la elaboración mundial. Este tipo de cacao se caracteriza por tener aromas frutados con notas de frutos secos y ligeramente amargo, pero refinado. Se utiliza en chocolates de mayor calidad. Son cultivados principalmente en México, Guatemala y Nicaragua en pequeñas cantidades. Además, en otros países como Venezuela, Colombia, islas del Caribe, Trinidad, Jamaica, Isla de Granada, Madagascar, Java e islas Comores. Presentan un contenido de polifenoles bajo en comparación con el Forastero, representando alrededor del 6-8% del peso seco de la semilla cruda.

El Cacao Trinitario es un tipo de cacao híbrido obtenido a partir del criollo y del forastero. La producción de este cacao es superior en comparación al criollo, y al combinar las características gustativas de ambos, lo hace de mejor calidad frente al forastero. Contiene un amplio rango de sabores y aromas, siendo persistentes en el paladar. Esta variedad se cultiva en Trinidad, Java, Sri Lanka, Papúa - Nueva Guinea, Camerún y en Venezuela con el nombre de Carenero Superior. Tiene un contenido de polifenoles intermedio, aproximadamente entre el 7-9% del peso seco de la semilla.

#### 4.4.2 Tendencias de alimentación saludable

Aunque el chocolate no es considerado un alimento esencial para una dieta balanceada, su popularidad lo posiciona como un producto destacado en la mesa del consumidor argentino. En los últimos años, las tendencias hacia una alimentación saludable han cobrado fuerza en Argentina, reflejadas en una mayor demanda de productos con menos azúcar y más beneficios nutricionales. Estas preferencias también

se alinean con la Ley N° 27.642, conocida como la Ley de Promoción de la Alimentación Saludable, vigente desde el 20 de noviembre de 2021. Esta normativa basada en la Resolución GMC N° 26/03 del Reglamento Técnico Mercosur, exige la implementación de sellos de advertencia en la cara principal de los envases para identificar productos con exceso de nutrientes críticos, como azúcar, sodio, grasas saturadas, grasas totales y calorías.

Por cada nutriente crítico en exceso, los productos deben llevar sellos específicos como “EXCESO EN AZÚCARES”, “EXCESO EN SODIO”, “EXCESO EN GRASAS SATURADAS”, “EXCESO EN GRASAS TOTALES” o “EXCESO EN CALORÍAS”, según lo establece el *Manual de Rotulado Nutricional* de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT, 2022). Estas regulaciones buscan promover elecciones alimentarias más conscientes.

En este contexto, esta investigación busca contribuir a la reformulación del chocolate, un alimento con alto contenido de azúcar, proponiendo el uso de orujo de uva como sustituto parcial. Este cambio no solo permitiría reducir el contenido de azúcares en el producto, facilitando su adecuación a la normativa, sino que también añadiría un valor nutricional significativo al incorporar polifenoles, compuestos bioactivos conocidos por sus propiedades antioxidantes y beneficios para la salud.

Estas propiedades, sumadas al creciente interés de los consumidores por alimentos funcionales, podrían posicionar esta formulación de chocolate como una opción innovadora y saludable en el mercado local. En definitiva, este enfoque busca alinear la innovación alimentaria con las tendencias actuales y las normativas vigentes, contribuyendo al desarrollo de productos que no solo satisfagan los gustos del consumidor argentino, sino que también promuevan hábitos alimentarios más saludables.

## 5 OBJETIVO

---

## 5.1 GENERAL

Estudiar el impacto del uso de orujo deshidratado rico en polifenoles, obtenido a partir de residuos de la industria vitivinícola, en las características organolépticas y nutricionales del chocolate.

## 5.2 ESPECIFICOS

1. Elaborar un estado de situación detallando el contexto internacional y nacional acerca de los residuos generados en la industria vitivinícola, su uso para otras industrias y el beneficio de la economía circular.
2. Estudiar la situación actual de la industria chocolatera, sus procesos, materias primas y aditivos, y desafíos tecnológicos.
3. Caracterizar los compuestos presentes en el bagazo de vino, incluyendo los polifenoles; describir sus beneficios para la salud del consumidor y explorar las posibilidades de su uso como materia prima en la industria chocolatera.
4. Deshidratar el orujo de uva a escala de laboratorio para analizar sus características fisicoquímicas (incluyendo la cuantificación de polifenoles) y microbiológicas.
5. Evaluar su utilización en la producción de chocolate, y los cambios organolépticos y nutricionales que otorga

## 6 METODOLOGÍA

---

Para el presente trabajo se eligió la metodología de investigación exploratoria, ya que el tema de estudio, relacionado con el uso de los residuos de la industria vitivinícola (específicamente el orujo de uva deshidratado) en la producción de chocolate, es un área emergente con escasa investigación previa.

Esta metodología permitirá comprender de manera preliminar y profunda un fenómeno poco estudiado, identificando las principales variables y entendiendo las posibles aplicaciones de estos residuos en la industria alimentaria. Además, ayudará a

detectar problemas y oportunidades en el proceso de aprovechamiento de estos residuos, sentando las bases para formular nuevas preguntas e hipótesis en investigaciones futuras.

La elección de este enfoque se justifica por la posibilidad de generar conocimiento nuevo que contribuya tanto a la industria vitivinícola como a la industria alimentaria, abriendo el camino para innovaciones que promuevan la sostenibilidad y el aprovechamiento de subproductos en estos sectores.

## 7 CAPITULO 1: ESTUDIO TÉCNICO

---

### 7.1 Estudios fisicoquímicos y transformación de la materia prima

La muestra proporcionada por el enólogo Fabio Zamora proviene de los residuos generados durante la producción de un vino tinto multivarietal de la bodega Cabrito Wines. En su composición se encuentran uvas de las variedades Bonarda, Syrah y Criolla, cultivadas en San Rafael, Mendoza. Antes de ser manipulada, la muestra fue congelada durante aproximadamente un mes. Para su posterior procesamiento, el bagazo se descongeló a temperatura ambiente durante 12 horas.

### 7.2 Deshidratación de la materia prima

El agua es el componente mayoritario en los alimentos y su presencia determina muchos procesos químicos. La actividad del agua ( $A_w$ ) se define como la presión parcial de vapor de agua en equilibrio con el alimento, dividido por la presión parcial de vapor de agua en condiciones estándares. Este parámetro relaciona el contenido de agua de un alimento, con el agua disponible o no ligada al soluto.

El objetivo de la deshidratación del bagazo es disminuir su actividad acuosa, lo que reduce el porcentaje de agua disponible y, de este modo, evita que se convierta en un medio propicio para el crecimiento microbiano. Esto también facilita la manipulación futura en la aplicación en la elaboración de chocolate.

Tras descongelar el orujo de uva a temperatura ambiente, se tomaron 90 gramos y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente. Luego, las muestras se colocaron en placas para su posterior deshidratación.



*Figura 19: orujo de uva antes del proceso deshidratación*

Se utilizaron dos equipos con mecanismos diferentes para deshidratar el orujo. Para la Muestra 1, se empleó un horno a 90°C durante 2 horas y 10 minutos (Figura 20). En el caso de la Muestra 2 (Figura 21), se utilizó un deshidratador configurado a 40°C durante 10 horas y 13 minutos.



*Figura 20: orujo de uva deshidratado en horno*



*Figura 21: orujo de uva deshidratado en deshidratador*

El orujo deshidratado a 40°C con el deshidratador (Muestra 2) conservó un aspecto similar al original debido al proceso prolongado a baja temperatura. En cambio,

la muestra secada en horno a 90°C (Muestra 1) presentó un color más oscuro, ya que el secado rápido a alta temperatura provocó una mayor degradación de estos compuestos.

### 7.3 Cuantificación de polifenoles en la muestra

La cuantificación de compuestos polifenólicos en el bagazo de uva representa una etapa clave en la valorización de este subproducto vitivinícola, especialmente debido a su potencial funcional y antioxidante. En este apartado se describe el procedimiento utilizado para determinar el contenido total de polifenoles en la muestra de bagazo de uva, junto con los resultados obtenidos.

#### 7.3.1 Metodología

Para la cuantificación de polifenoles presentes en la muestra de bagazo de uva, se seleccionó el método de Folin-Ciocalteu. Este es un método colorimétrico que se basa en la reacción de los polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu, provocando un cambio de coloración de amarillo a azul.

Los materiales y reactivos se utilizados se alistan detalladamente en el Anexo 4.

Función de reactivos aplicados:

- Ácido gálico:

El ácido gálico es un compuesto fenólico, se utiliza como patrón estándar debido a que su estructura es representativa de los polifenoles. Esto permite su uso en la cuantificación de los polifenoles presentes en la muestra mediante un Espectrofotómetro UV-Visible.

- Metanol:

Es utilizado como disolvente orgánico (alcohol) para la extracción de los polifenoles presentes en la muestra de bagazo, debido a la solubilidad de estos compuestos en dicho solvente. Esto permite que los polifenoles queden en solución para su posterior análisis.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu:

Esta solución se obtiene a partir de la mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, y se utiliza como reactivo principal para la cuantificación de polifenoles. En presencia de compuestos fenólicos, el reactivo vira a una coloración azul debido a la reducción de sus ácidos. La reacción redox generada es proporcional a la cantidad de polifenoles presentes en la muestra, lo que permite medirlos en el espectrofotómetro UV-Visible gracias a este cambio de color

- Carbonato sódico 7,5%

Esta sal alcalina disuelta en agua forma una solución básica ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) que se agrega para crear un medio alcalino. Este ambiente es esencial para que la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu con los polifenoles se lleve a cabo de manera eficiente; sin un entorno básico, la reacción no ocurriría adecuadamente.

#### 1. Preparación de Reactivo de Folin Ciocalteu

Se preparó una solución diluida en una proporción 1:10 utilizando agua destilada como disolvente. La mezcla fue homogeneizada adecuadamente para asegurar una distribución uniforme del soluto. Posteriormente, la solución fue envasada en un frasco de vidrio color caramelo, el cual proporciona protección frente a la exposición lumínica, minimizando así posibles procesos de degradación fotoquímica. El frasco fue almacenado en un lugar resguardado de la luz directa, en condiciones controladas, con el fin de preservar la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de la solución.

#### 2. Preparación de la solución de carbonato sódico al 7,5%.

Se preparó una solución de carbonato de sodio anhidro a una concentración de 75 g/L utilizando agua destilada como medio de disolución. La sustancia fue incorporada gradualmente al agua bajo agitación constante, asegurando su completa disolución y homogeneización. Una vez obtenida la solución, se transfirió a un frasco limpio con tapa, adecuado para su almacenamiento, con el fin de preservar sus propiedades fisicoquímicas y evitar la contaminación externa.

#### 3. Curva de calibración – estándar de ácido gálico

Se realizó la disolución de ácido gálico mediante la incorporación de 50 mg de la sustancia en 25 mL de metanol al 80% v/v, obteniéndose así una disolución madre concentrada. A partir de esta solución, se prepararon disoluciones de concentración creciente, según se detalla en la tabla 4.

Los tubos de ensayo fueron debidamente rotulados para garantizar la correcta identificación de cada muestra. A continuación, se añadió a cada tubo la cantidad correspondiente de metanol, conforme a lo indicado en la Tabla 4 posteriormente, se incorporó la cantidad adecuada de ácido gálico en cada caso, también especificada en la Tabla 2. Las mezclas fueron homogeneizadas mediante agitación en vórtex y se mantuvieron en condiciones de oscuridad para preservar la estabilidad del compuesto.

Puntos de la curva	Concentración de ácido gálico (ug/ml)	Volumen de ácido gálico (ul)	Volumen de metanol 80% (ul)
1 (Vf = 5ml)	6,00	15,00	4985,00
2 (Vf = 5ml)	7,44	18,60	4981,40
3 (Vf = 5ml)	14,40	36,00	4964,00
4 (Vf = 5ml)	24,00	60,00	4940,00
5 (Vf = 5ml)	35,00	87,50	4912,50
6 (Vf = 5ml)	50,00	125,00	4875,00
7 (Vf = 5ml)	77,00	192,50	4807,50

*Tabla 4 preparación de puntos de la curva*

#### 4. Preparación de la muestra de bagazo de vino:

Se pesaron 10 g de orujo de uva seco y molido. A continuación, se añadieron 20 mL de una solución de metanol al 80% (80:20 en agua destilada) y se mezcló cuidadosamente para favorecer la extracción de los compuestos de interés.

La mezcla fue sometida a agitación durante 30 minutos y posteriormente centrifugada a 4°C a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado con jeringa de 10 ml con un filtro de Nylon con 0,45 µm, y el filtrado se recolectó en tubos limpios para su posterior análisis. La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

Se realizó un ensayo piloto previo para evaluar la concentración de polifenoles que resultaron estar concentradas, por lo que se las diluyó 1:250, dilución que

permitió que la absorbancia entre en el rango de la curva patrón. Para ello, se tomaron 4  $\mu\text{L}$  de cada tubo y se agregaron 996  $\mu\text{L}$  (1:250) de la solución de metanol al 80%, obteniendo así disoluciones adecuadas para su evaluación.

#### 5. Determinación curva de calibración y polifenoles en la muestra

Se pipetearon 300  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de ácido gálico en cada uno de los tubos de ensayo, por duplicado. Del mismo modo, se pipetearon 300  $\mu\text{L}$  de los extractos diluidos en cada tubo, por triplicado. Para la preparación del blanco, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de una solución de metanol/agua al 80% v/v, también por duplicado.

A continuación, se incorporaron 1,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido en una proporción 1:10 con agua destilada. Las mezclas fueron agitadas en vórtex durante 15 segundos para asegurar una adecuada homogeneización. Posteriormente, se añadieron 1,2 mL de una solución de carbonato de sodio a una concentración de 75 g/L.

Se registró la hora de inicio de la reacción y se procedió a agitar nuevamente en vórtex durante 15 segundos. Las muestras fueron mantenidas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente (24 °C) durante un período de 2 horas.

Finalizado el tiempo de incubación, se midieron las absorbancias de cada muestra a una longitud de onda de 765 nm, utilizando como referencia el blanco de reactivos. Los valores obtenidos fueron registrados y utilizados para la construcción de la curva de calibración.

Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g) o por mililitro de muestra (mg GAE/mL), según correspondiera.

#### 7.3.2 Resultados

La absorbancia medida a partir del espectrofotómetro UV correspondiente al patrón son:

Concentración de ácido gálico (ug/ml)		Absorbancia bruta		Absorbancia - Blanco		Media
		A	B	A	B	
C1	6,00	0,102	0,101	0,018	0,017	0,018
C2	7,44	0,127	0,122	0,043	0,038	0,041
C3	14,40	0,167	0,178	0,083	0,094	0,089
C4	24,00	0,254	0,254	0,170	0,170	0,170
C5	35,00	0,382	0,391	0,298	0,307	0,303
C6	50,00	0,551	0,555	0,467	0,471	0,469
C7	77,00	0,904	0,905	0,820	0,821	0,821
Blanco	-	0,083	0,085	-	-	0,084

*Tabla 5 absorbancia medida en espectrofotometría UV*

- C (Concentración de ácido gálico): Representa las diferentes concentraciones de ácido gálico (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que fueron preparadas para construir la curva de calibración en el análisis espectrofotométrico UV.
- Blanco: Corresponde a una muestra preparada con todos los reactivos del ensayo, pero sin ácido gálico. Se utiliza para corregir la absorbancia de fondo.
- A y B: Corresponden a las réplicas del experimento, ya que cada medición de absorbancia se realizó por duplicado.

Luego, a partir de estos datos, se construyó un gráfico de dispersión que representa la relación entre la absorbancia y la concentración de ácido gálico. Este gráfico incluye la ecuación de la recta, la cual simboliza la tendencia lineal entre ambos parámetros. El objetivo de obtener esta ecuación es calcular la concentración de polifenoles en una muestra incógnita, usando la relación establecida entre la absorbancia y la concentración de un antioxidante conocido.

### Curva de Ácido Gálico

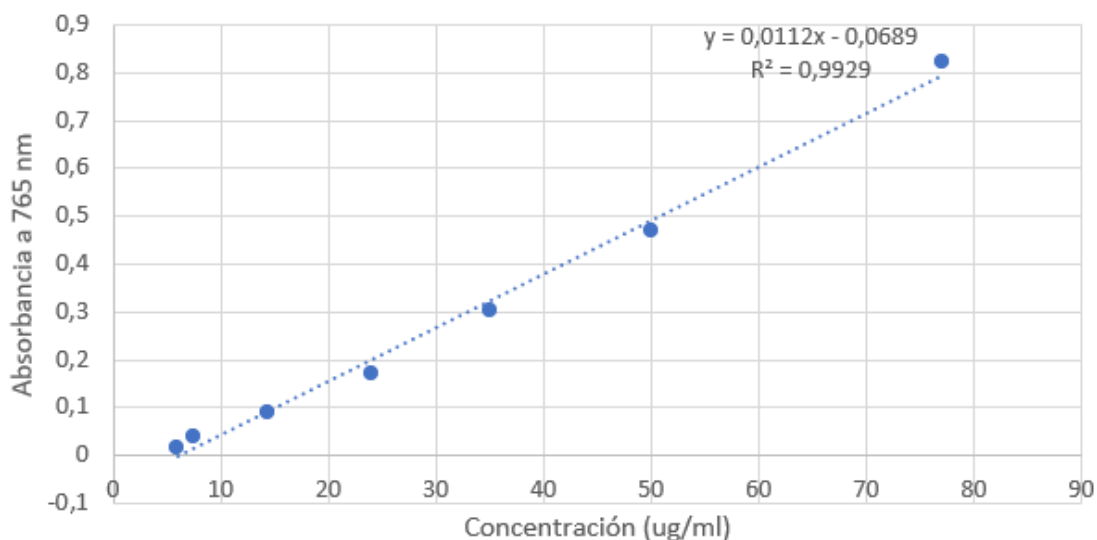


Figura 22: curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico

Finalmente, se procedió a medir las absorbancias de las muestras obtenidas tanto del horno como del deshidratador. En primer lugar, se analizaron las muestras provenientes del horno, registrando sus valores de absorbancia en dos ocasiones consecutivas. Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento con las muestras del deshidratador.

Como resultado de este proceso, se obtuvieron valores específicos que permitieron establecer una comparación entre ambas condiciones de tratamiento:

Muestra	Absorbancia
Orujo secado en deshidratador 1	0,52
Orujo secado en deshidratador 2	0,545
Orujo secado en deshidratador 3	0,551
Orujo secado en horno 1	0,134
Orujo secado en horno 2	0,142
Orujo secado en horno 3	0,136

*Tabla 6 resultados espectrofotómetro*

A partir de los resultados obtenidos, se determinó la concentración de polifenoles totales, expresada en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g). Para ello, se utilizó la curva de calibración construida previamente con el patrón de ácido gálico. En dicha curva, la absorbancia (variable y) se relaciona directamente con la concentración de ácido gálico (variable x), lo que permitió calcular los valores correspondientes a las muestras analizadas mediante la ecuación de la recta. El procedimiento detallado, junto con los datos obtenidos, se presenta en el Anexo 5.

El promedio de los resultados obtenidos se detalla a continuación:

- Polifenoles en muestra de deshidratador:  $271,24 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Bagazo H.}}$
- Polifenoles en muestra de horno:  $92,07 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Bagazo H.}}$

### 7.3.3 Conclusión

Los resultados obtenidos evidencian una clara influencia de las condiciones de secado sobre la concentración de compuestos fenólicos presentes en el bagazo de uva. Tal como se puede observar en la Figura 23, las muestras tratadas con deshidratador mostraron concentraciones significativamente más altas de polifenoles totales, con valores promedio de **271,24 mg GAE/g de bagazo seco**, en comparación con las muestras secadas en horno, que presentaron un promedio de **92,07 mg GAE/g**.

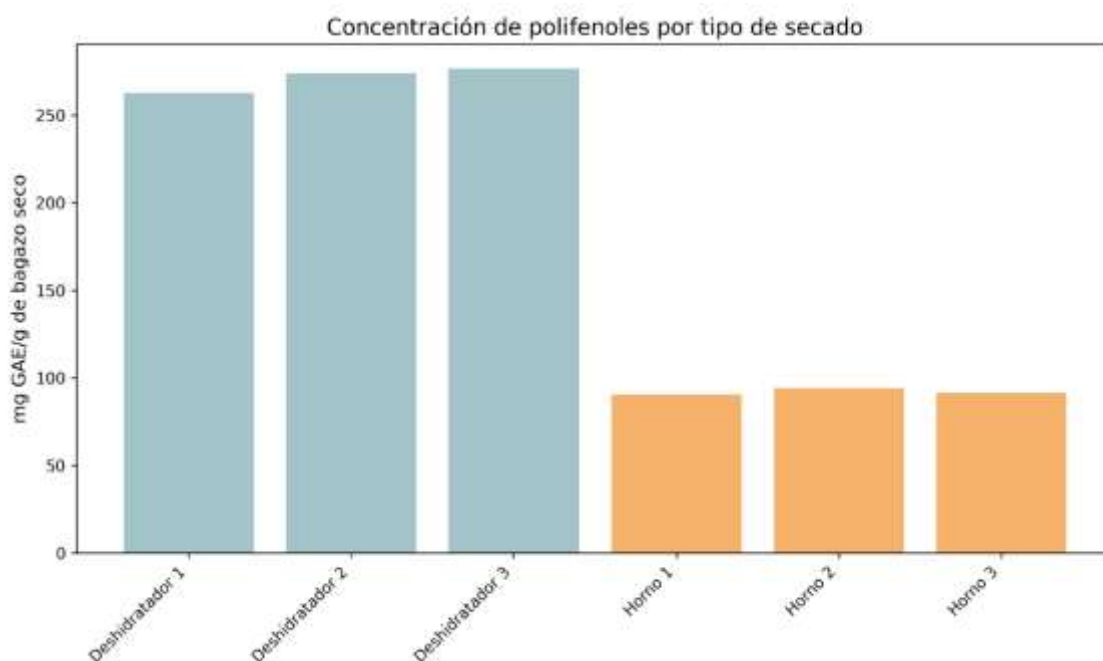


Figura 23: concentración de polifenoles por tipo de secado

Esta diferencia puede atribuirse al efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos, los cuales son sensibles al calor. El secado en horno, al implicar temperaturas más elevadas, probablemente favoreció la degradación térmica de estos compuestos, mientras que el uso de un deshidratador a bajas temperaturas permitió conservar una mayor proporción de polifenoles. Por lo tanto, este método representa una alternativa eficiente y económica para preservar el valor funcional del bagazo de uva, un subproducto con alto potencial de aprovechamiento.

Los valores obtenidos en este estudio indican que, a pesar de las pérdidas sufridas durante la vinificación, una fracción considerable de estos compuestos permanece en el residuo sólido. Esto refuerza la importancia de valorizar el bagazo como fuente de antioxidantes naturales.

Sin embargo, es importante señalar que las mediciones se realizaron por triplicado y con un número limitado de réplicas, lo cual restringe la robustez estadística de los resultados. Por ello, se recomienda realizar estudios complementarios con mayor número de repeticiones y análisis estadísticos adecuados para validar estas observaciones preliminares.

#### 7.4 Determinación de fibra dietaria en la muestra

La determinación de fibra dietaria en el bagazo de uva es fundamental para evaluar su aporte nutricional y su viabilidad como ingrediente funcional en productos alimenticios. En este apartado se describe el procedimiento utilizado para determinar el contenido de fibra dietaria en la muestra de bagazo de uva, junto con los resultados obtenidos.

##### 7.4.1 Metodología

El método utilizado para la determinación de fibra dietaria en el bagazo de uva fue el método de "Prosky", o el "Método de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales" (AOAC), conocido como AOAC 985.29. Este procedimiento, desarrollado por Prosky en 1985, es un estándar global para la determinación de fibra dietaria total, soluble e insoluble en alimentos. Su precisión y capacidad para simular el proceso digestivo lo convierten en una herramienta fundamental para analizar productos como el bagazo de uva, rico en fibra insoluble.

Los materiales necesarios para la determinación de fibra dietaria se detallan en el anexo 6.

Función de reactivos utilizados:

- Solución de HCl 0.257M

Esta solución de ácido clorhídrico (HCl) simula las condiciones ácidas del estómago humano durante la digestión. El HCl descompone los componentes solubles no fibrosos, como azúcares y almidones, liberando las fracciones de fibra. En este paso se realiza una hidrólisis ácida controlada que facilita la separación de los carbohidratos digeribles y permite aislar la fibra de la muestra.

- Solución de NaOH 0.319M

Posterior a la hidrólisis ácida, se utiliza una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para neutralizar el medio ácido creado por el HCl. Esta base fuerte crea un ambiente alcalino que simula las condiciones del intestino delgado, promoviendo la liberación completa de las fracciones de fibra dietaria presentes

en la muestra. Este paso es crucial para asegurar que se recojan tanto las fibras solubles como las insolubles, y que el análisis sea representativo de la digestión natural.

- Etanol 95%

Alcohol utilizado como solvente, para precipitar la fibra soluble una vez que ha sido separada de la muestra. Éste precipita las fracciones solubles de fibra, como las gomas y mucílagos, lo que permite su efectivo aislamiento y posterior cuantificación. Este reactivo es esencial para medir tanto la fibra soluble como la insoluble en la muestra.

Este método implica la digestión enzimática de la muestra para eliminar proteínas y almidones, seguida de tratamientos ácidos y alcalinos simulando las condiciones del tracto digestivo. La muestra pasa por filtrado para separar las fracciones insolubles, mientras que las solubles se precipitan con etanol. El bagazo de uva es una fuente rica en fibra insoluble, como celulosa, hemicelulosa y lignina, pero también contiene fracciones solubles que deben aislarse mediante este procedimiento.

El análisis se completa midiendo los residuos de fibra mediante tamizado y centrifugación, lo que permite cuantificar tanto la fibra soluble como la insoluble. Este proceso es especialmente adecuado para el bagazo de uva debido a su alto contenido de fibra estructural, lo que le confiere propiedades funcionales importantes para la industria alimentaria, como su uso en productos ricos en fibra.

- Procedimiento del método:

La preparación de los reactivos se encuentra detallada en el Anexo 7.

Para comenzar con la preparación de la muestra, se trituraron 2 gramos de orujo de uva previamente deshidratado. El siguiente paso fue la extracción de la fibra cruda. La muestra seca se trató con una solución de HCl 0,257M previamente valorada, para simular las condiciones ácidas del estómago (digestión gástrica), agitando durante 30 minutos. Tras la agitación, se centrifugó la mezcla a 3000 rpm a temperatura ambiente (25° C), y luego se descartó el líquido para eliminar los componentes solubles en ácido.

Posteriormente, se repitió el tratamiento utilizando NaOH 0,319M previamente valorado, con el objetivo de simular las condiciones alcalinas del intestino delgado (digestión intestinal). Este paso neutralizó el medio ácido y permitió continuar con la liberación de los componentes no digeribles. Después del tratamiento con la base, se realizaron lavados repetidos con agua destilada, para asegurar la eliminación de cualquier residuo de los reactivos ácidos y básicos que pudieran haber quedado adheridos a la muestra.

A continuación, se utilizó etanol al 95% para precipitar los componentes insolubles. La muestra se dejó reposar durante 30 minutos para garantizar la completa precipitación. Tras este tiempo, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante, permitiendo obtener el sólido que contenía la fibra dietaria. Este residuo sólido fue pasado a través de un tamiz de 100  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier material que no fuese considerado fibra.

El residuo retenido en el tamiz fue transferido a una placa y colocado en una estufa a 90°C durante 30 minutos, permitiendo secar la fibra por completo. Una vez finalizado el proceso de secado, el residuo seco se pesó cuidadosamente en una balanza analítica, obteniendo un resultado final de 0,8236 gramos de fibra dietaria.

#### 7.4.2 Resultados

A partir del análisis realizado se procedió a calcular el porcentaje de fibra presente en el bagazo de uva.

Cálculo de la fibra dietaria:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{\text{Peso del residuo seco}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \right) * 100$$

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,2836 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = \mathbf{41,18 \%}$$

El resultado obtenido, que muestra un contenido de fibra dietaria del 41,18%.

#### 7.4.3 Conclusión

Los estudios realizados por Villanueva, E., Bustamante, A., & Hirsch, S. (2015), mencionan que el bagazo de uva tinta presenta un contenido de fibra dietética de aproximadamente 46,8%, compuesto por un 39,5% de fibra insoluble y un 7,2% de fibra

soluble. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en este trabajo y refuerzan la idea de que el bagazo de uva es podría ser una fuente alta en fibra dietaria. Sin embargo, dado que las mediciones se realizaron por duplicado y sin un número suficiente de réplicas, las conclusiones deben considerarse preliminares y sujetas a verificación mediante análisis estadísticos.

Asimismo, el hecho de que estos estudios coincidan con los resultados obtenidos reafirma el potencial del bagazo de uva para su aprovechamiento dentro de la industria alimentaria. Por ejemplo, en la formulación de chocolates, su incorporación puede no solo enriquecer el contenido nutricional del producto final, sino también aportar beneficios adicionales al consumidor, fomentando el desarrollo de alimentos funcionales más sostenibles y nutritivos.

## 8 CAPITULO 2: Aplicación de materia prima en chocolate

---

En base a los análisis previos sobre la composición y propiedades del orujo de uva deshidratado, se realizaron pruebas de aplicación de la materia prima en distintas proporciones en chocolate semiamargo, con el objetivo de evaluar su viabilidad como ingrediente funcional. Para ello, se utilizó la maquinaria y materias primas de la empresa Tikal, ubicada en Saavedra, Ciudad de Buenos Aires.

Tikal, liderada por Carlos Stutman, ofrece una amplia variedad de chocolates, desde chocolate con leche hasta tabletas veganas con 70 y 80% de cacao. Su enfoque se centra en la elaboración de productos con mayor contenido de cacao y menor proporción de azúcares agregados.

### 8.1 Incorporación del orujo de uva deshidratado en chocolate semiamargo al 54%

Para evaluar la incorporación de orujo de uva deshidratado en una matriz de chocolate semiamargo, se seleccionó el chocolate con un contenido de 54 % de cacao, ya que ofrece un equilibrio más adecuado entre el sabor del cacao y la suavidad, lo que lo hace más accesible para un público más amplio, y a su vez es más sencillo incorporar el orujo de uva reemplazando el azúcar.

Para garantizar una integración adecuada del orujo de uva deshidratado en la matriz de chocolate, se utilizó un molino de bolas (ver Figura 14) a baja temperatura, acorde con las prácticas estándar en la elaboración de chocolate. Esta temperatura se mantuvo dentro del rango típico para preservar las propiedades organolépticas y nutricionales tanto del chocolate como del orujo de uva.

El proceso de refinado se llevó a cabo durante un periodo de dos días, asegurando una distribución homogénea de los sólidos y reduciendo el tamaño de las partículas hasta obtener una textura fina y uniforme. Este paso fue esencial para evitar diferencias notables en la textura del producto final, logrando que los sólidos del orujo de uva y los demás ingredientes, como el licor de cacao y el azúcar, alcanzaran tamaños similares de partícula.

Este procedimiento no solo favoreció la integración de los ingredientes, sino que también ayudó a mejorar las características sensoriales del chocolate, proporcionando una textura suave y un sabor equilibrado, donde el orujo de uva aporta su perfil distintivo sin afectar la calidad final del producto.

La formulación original del chocolate 54 % para producir 1 kg de producto es:

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Azúcar	475,000	47,500
Manteca de cacao	142,000	14,200
Licor de cacao	380,200	38,002
Lecitina	2,800	0,280
Total	1000	100

*Tabla 7 formulación 1 kg de chocolate semiamargo*

Se realizaron modificaciones en la formulación original del chocolate semiamargo reemplazando gradualmente el azúcar por orujo de uva deshidratado en proporciones del

5%, 10%, 15% y 20%. Cada formulación se diseñó con el objetivo de evaluar el impacto del orujo en las características sensoriales, nutricionales y funcionales del producto final.

1. Formulación con 5% de orujo de uva:

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Azúcar	425,000	42,500
Orujo de uva	50	5
Manteca de cacao	142,000	14,200
Licor de cacao	380,200	38,002
Lecitina	2,800	0,280
Total	1000	100

*Tabla 8 formulación con 5% de orujo de uva*

Esta formulación buscó un equilibrio inicial en el que el aporte del orujo fuera perceptible, pero sin generar cambios drásticos en la textura, dulzura o el sabor tradicional del chocolate. La intención fue determinar si esta cantidad podía enriquecer el producto con polifenoles y fibra sin alterar significativamente sus propiedades organolépticas.

2. Formulación con 10% del orujo de uva:

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Azúcar	375,000	37,500
Orujo de uva	100	10

Manteca de cacao	142,000	14,200
Licor de cacao	380,200	38,002
Lecitina	2,800	0,280
Total	1000	100

*Tabla 9 formulación con 10% del orujo de uva*

En este nivel, se comenzó a explorar una mayor reducción del contenido de azúcar, destacando el sabor del cacao y aportando un mayor contenido de compuestos bioactivos provenientes del orujo. Se evaluaron posibles cambios en la textura y la aceptabilidad del producto.

3. Formulación con 15% del orujo de uva:

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Azúcar	325,000	32,500
Orujo de uva	150	15
Manteca de cacao	142,000	14,200
Licor de cacao	380,200	38,002
Lecitina	2,800	0,280
Total	1000	100

*Tabla 10 formulación con 15% del orujo de uva*

En esta variante, se priorizó un balance entre dulzura y amargor, manteniendo la textura adecuada del chocolate. El aumento en la proporción de orujo se enfocó en

maximizar los beneficios nutricionales sin comprometer las propiedades organolépticas, especialmente la textura y el sabor.

4. Formulación con 20% del orujo de uva:

Ingrediente	Cantidad (g)	%
Azúcar	275,000	27,500
Orujo de uva	200	20
Manteca de cacao	142,000	14,200
Licor de cacao	380,200	38,002
Lecitina	2,800	0,280
Total	1000	100

*Tabla 11 formulación con 20% del orujo de uva*

Esta formulación representó el límite superior de reemplazo de azúcar. Aunque se esperaba un impacto mayor en la textura y el sabor debido al perfil del orujo, también se buscó optimizar el aporte de fibra y polifenoles, posicionando este producto como una alternativa más funcional y saludable.

## 8.2 Análisis microbiológicos de la aplicación

Dentro del capítulo 3 del Código Alimentario Argentino, el artículo 156 tris – (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017), detalla cuatro categorías que describen el tratamiento y la manipulación de las comidas preparadas. Estas categorías son las siguientes:

I. Comidas preparadas sin tratamiento térmico.

II. Comidas preparadas con tratamiento térmico que incluyan posteriormente ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.

III. Comidas preparadas con tratamiento térmico que reciban un proceso de manipulación post tratamiento térmico, como cortado, mezclado, feteado, envasado, entre otros.

IV. Comidas preparadas que al final de su elaboración hayan sido sometidas en su conjunto a un proceso térmico.

### 8.2.1 Metodología

El chocolate se encuentra dentro de la categoría IV, ya que al final de su elaboración ha sido sometido en su totalidad a un proceso térmico. Este incluye etapas como el tostado de los granos de cacao, el conchado y el templado. Todo el producto, en su estado final, pasa por un tratamiento térmico completo, lo cual garantiza su textura y sabor, además de reducir la carga microbiana.

Por lo tanto, el chocolate al encontrarse en la categoría IV, está sujeto a los análisis microbiológicos correspondientes descritos en la “Tabla 12” a continuación. Estos análisis son esenciales para verificar la inocuidad del producto, asegurando que cumpla con los límites establecidos por el Código Alimentario Argentino para garantizar la seguridad del consumidor. Estos análisis permiten confirmar que el tratamiento térmico ha sido efectivo en la reducción de riesgos microbiológicos.

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	$n=5, c=2, m=10^4, M=10^5$	ISO 4833:2003
Recuento de Enterobacterias (UFC/g)	$n=5, c=2, m=10^4, M=10^5$	ISO 21528-2:2004

Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	n=5, c=1, m=10, M=10 <sup>2</sup>	ISO 6888-3: 1999
<i>Salmonella</i>	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002,
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 11290-1:1996,

Tabla 12 análisis microbiológicos correspondientes al CAA

- n = Número de unidades de muestra que se analizan. Es la cantidad de muestras individuales tomadas para evaluar un lote de producto.
- c = Número máximo permitido de unidades de muestra que pueden presentar un recuento entre m y M sin que el lote sea rechazado.
- m = Límite microbiológico aceptable. Es el valor umbral por debajo del cual los resultados son satisfactorios.
- M = Límite microbiológico inaceptable. Si alguna muestra supera este valor, el lote es rechazado automáticamente.

De acuerdo con las especificaciones indicadas en el Artículo 156 tris del CAA, se llevaron a cabo los análisis microbiológicos correspondientes. La preparación de la muestra comenzó con la elaboración del homogenato, que consistió en colocar, bajo campana y en una bolsa estéril, 10 gramos de muestra mezclados con 90 ml de agua peptonada al 0,1%. Esta mezcla correspondió a la dilución 10<sup>-1</sup>, que fue homogeneizada adecuadamente.

A partir de este homogenato 10<sup>-1</sup>, se realizaron diluciones en serie. Inicialmente, se tomó 1 ml del homogenato y se añadió a un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0,1%,

obteniendo la dilución  $10^{-2}$ . Luego, se repitió el procedimiento utilizando 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  para obtener la dilución  $10^{-3}$  en un nuevo tubo de agua peptonada al 0,1%. Finalmente, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-3}$  y se transfirió a un tubo con 9 ml de agua peptonada al 0,1%, dando lugar a la dilución  $10^{-4}$ .

Por otro lado, se preparó un segundo homogenato con el objetivo de investigar la presencia de *Salmonella*. En este caso, se utilizaron 25 gramos de muestra mezclados con 250 ml de agua peptonada bufferada (APB). Posteriormente, la mezcla fue homogeneizada y se incubó durante 24 horas a 37°C

### 8.2.2 Resultados

Se obtuvieron los resultados de los análisis microbiológicos a continuación:

1. Recuento de aerobios mesófilos en UFC/g (ISO 4833:2003): 11.600 UFC/g, por lo que **cumple** con los requisitos del código.
2. Recuento de enterobacterias en UFC/g (ISO 21528-2: 2004): 0 UFC/g, por lo que **cumple** con los requisitos del código.
3. Recuento de *E. coli* por NMP/g (ISO 16649-3: 2005): <3 NMP/g, por lo que **cumple** con los requisitos del código.

En la tabla se registraron los resultados obtenidos de los tubos (0-0-0), evidenciando ausencia de crecimiento bacteriano. A partir de los datos expresados en la Tabla 32, se concluye que no se detectó *E. coli* en ninguna de las diluciones analizadas. Dado que no se observó desarrollo microbiano, la muestra cumple con lo establecido en el artículo correspondiente del CAA, siendo este valor aceptable.

4. Recuento de *estafilococos coagulasa positiva* (NMP/g): <1 NMP/g. **Cumple** con los requisitos del código.

A Partir resultados obtenidos expresados en tabla 17, se puede concluir que no se detectaron Estafilococos coagulasa positivos en ninguna de las diluciones. Ya que no se observó crecimiento, cumple con los descrito por el artículo del CAA, siendo este valor

5. Investigación de *Salmonella* (ISO 6579:2002): ausencia de *Salmonella*, por lo que **cumple** con los requisitos del código.

Luego de la incubación, se observa que no hubo crecimiento en el medio de cultivo XLD selectivo de *Salmonella spp*, siendo evidencia suficiente para confirmar la ausencia de *Salmonella spp*, cumpliendo con lo solicitado en el artículo del CAA.

### 8.2.3 Conclusión

Los análisis microbiológicos realizados de acuerdo con lo indicado por el artículo 156 tris – (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017) del Código Alimentario Argentino, dieron como resultado el cumplimiento de los requerimientos descriptos por el artículo.

Concluyendo así, que el chocolate elaborado se encuentra apto para el consumo humano, asegurando su inocuidad higiénica.

### 8.3 Análisis sensorial de los cambios organolépticos

Según el IFT (1975), la evaluación sensorial es “la disciplina científica utilizada para evocar, medir analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído”.

La calidad sensorial es captada por los cinco sentidos, los cuales hacen que un producto sea aceptado o no por los consumidores siendo esto de gran importancia para la selección de un alimento.

La percepción sensorial se lleva a cabo por impulsos eléctricos, que son transmitidos desde el punto de recepción del estímulo hasta un área central nerviosa. El impulso es enviado al cerebro donde la sensación es correlacionada y definida.

- La vista comprueba la apariencia, la densidad, el color.

- El olfato se estimula ante las sustancias volátiles aromáticas que se perciben cuando se transmiten por el aire, siendo este un punto fuerte en la evaluación.
- El gusto se percibe por la boca, específicamente en las papilas gustativas que se encuentran distribuidas por toda la lengua.
- El tacto indica la textura del alimento a evaluar, se clasifica en atributos mecánicos del alimento frente a la masticación y por otra parte en atributos geométricos que son aquellos que están relacionados con la forma física del alimento.
- El oído percibe también como es la textura del alimento, si es crujiente, si es hueco.



Figura 24: cuadro descriptivo de los 5 sentidos.

El sabor de un alimento, de acuerdo con *British Standards Institution*. (2014) se define como: “la combinación del sabor y el olor, que puede estar influenciada por las sensaciones de dolor, calor, frío y sensaciones táctiles”.

A continuación, se detalla la cadena de percepción de un alimento o bebida:



Figura 25: cadena de percepción de un alimento o bebida.

Existen diversos tipos de jueces o panelistas a la hora de evaluar sensorialmente un alimento, que se clasifican en diferentes tipos según sus habilidades y entrenamientos:

- Jueces entrenados: son panelistas con formación específica en evaluación sensorial. Pueden identificar y distribuir atributos sensoriales específicos del alimento, como el sabor, olor, aroma, textura y apariencia. Estos panelistas son esenciales para obtener resultados precisos y consistentes.
- Panelistas expertos: además de tener entrenamiento, tienen experiencia en ciertos productos en específico, siendo capaces de detectar detalles muy específicos.
- Panelistas consumidores o no entrenados: representan al público general y evalúan los alimentos basándose en gustos/preferencias personales. Son utilizados en pruebas de aceptación y preferencia para comprender mejor las reacciones del mercado hacia un producto.
- Panel mixto: resulta de la combinación panelistas entrenados y consumidores, para obtener una visión tanto técnica como general, muy útil en los estudios que buscan mejorar la formulación del producto.

En esta investigación, la evaluación sensorial se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, se realizó un análisis con un panel de jueces entrenados (saboristas), mientras que en la segunda se incorporó a un grupo de consumidores de chocolate semiamargo.

Un saborista es un profesional especializado en identificar, diseñar y ajustar perfiles sensoriales en productos alimenticios. Su formación les permite percibir y describir con precisión las características organolépticas de un alimento en comparación con una referencia.

En esta primera fase, un grupo de seis saboristas evaluó las cuatro formulaciones de chocolate semiamargo descritas en el punto 8.1. Las muestras se analizaron en comparación con una referencia: un chocolate semiamargo sin agregado de orujo de uva. El objetivo fue identificar y describir las diferencias sensoriales entre las formulaciones, considerando la intensidad y el impacto del orujo en el perfil del producto.

Como resultado de esta evaluación, se descartó la muestra con un 20% de orujo de uva, ya que fue percibida como desbalanceada y con una intensidad excesiva. En contraste, las formulaciones con 10% y 15% de orujo mostraron diferencias sensoriales más equilibradas: la primera destacó por notas sutiles a pasa de uva, mientras que la segunda presentó un perfil más intenso y característico del orujo.

En la segunda etapa, un panel de consumidores de chocolate semiamargo evaluó las tres formulaciones seleccionadas (5%, 10% y 15% de orujo de uva). En este caso, no se utilizó la muestra de referencia, sino que se realizó un análisis de preferencia entre las opciones, con el objetivo de determinar cuál era la más aceptada por los consumidores.

Para esta parte de la evaluación, se seleccionaron tres códigos para las muestras de chocolate con diferentes concentraciones de bagazo:

- Bagazo 5%: muestra 205
- Bagazo 10%: muestra 310
- Bagazo 15%: muestra 415

A los participantes se les proporcionó un cuestionario con diversas preguntas relacionadas con la percepción general del producto, incluyendo el agrado por la intensidad del aroma, del sabor, de la textura, del dulzor, y del sabor residual. Además, se incluyó un ranking de preferencia entre las tres muestras, permitiendo que el consumidor especificara qué fue lo que más le gustó y lo que menos le agradó de cada muestra.

A los consumidores se les preguntó inicialmente sobre la frecuencia de consumo de chocolate, y los resultados fueron los siguientes: un 50% indicó que consume chocolate al menos una vez por semana, un 41,67% mencionó que lo consume de dos a tres veces por semana, y un 8,33% afirmó que lo consume al menos una vez por día. Los resultados generales se pueden visualizar en el siguiente gráfico de barras:

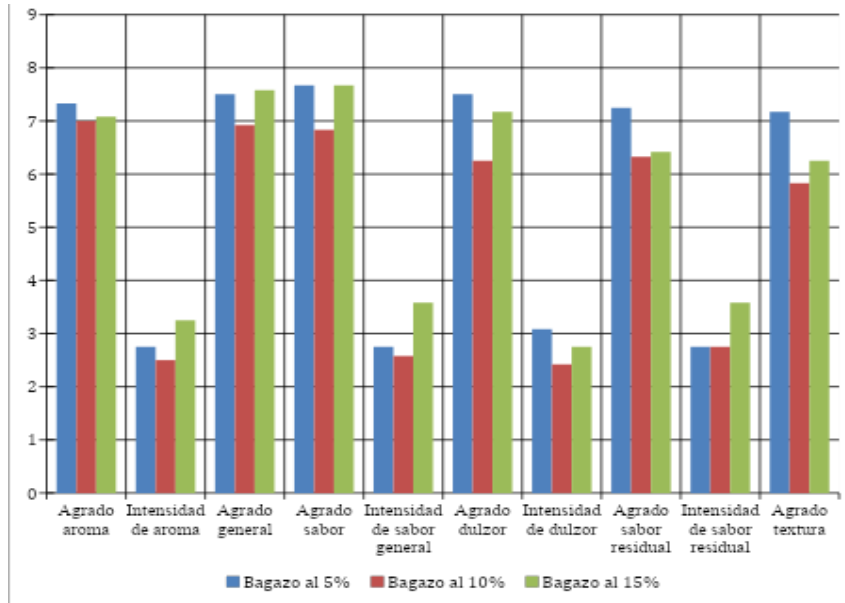


Figura 26: análisis de atributos de las muestras de chocolate con distintos porcentajes de bagazo. Los valores corresponden a la media aritmética e las evaluaciones.

Como primera observación de los resultados obtenidos en la Figura (26), se puede apreciar que las muestras con 5% y 15% de bagazo presentaron valores similares en la mayoría de los atributos evaluados. La muestra con 10% de bagazo, en cambio, muestra una leve tendencia a valores más bajos en algunos atributos. No obstante, estas diferencias deben interpretarse con cautela, ya que no se ha realizado un análisis estadístico que permita confirmar si son significativas. Cabe destacar que las tres muestras lograron buenos resultados generales en la evaluación.

Para comparar los resultados de manera más detallada, también se presenta el siguiente gráfico araña, el cual ofrece una visión alternativa de los datos y permite una mejor percepción de las diferencias entre las muestras:

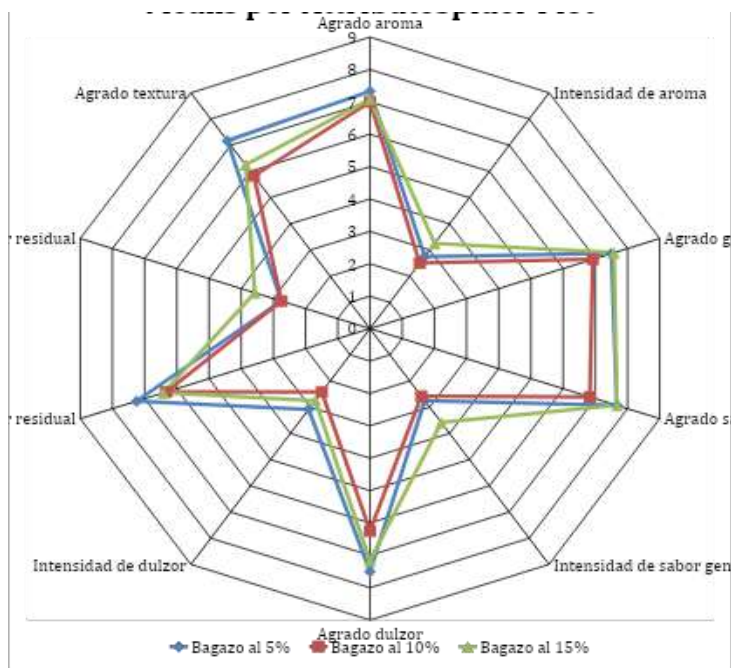


Figura 27: análisis de atributos de las muestras de chocolate con distintos porcentajes de bagazo.

En este gráfico araña se puede observar que el chocolate con 5% de bagazo destaca por tener el mayor agrado en cuanto a textura y sabor residual entre las opciones. Sin embargo, presenta una menor intensidad de aroma en comparación con las otras muestras.

Por otro lado, el chocolate con 10% de bagazo fue el que mostró menor aceptación general, ya que obtuvo puntajes más bajos en comparación con las dos muestras en atributos como agrado de dulzor, agrado de sabor, agrado general, textura y sabor residual.

Finalmente, el chocolate con 15% de bagazo sorprendió positivamente, obteniendo buenos puntajes en varios atributos, como el agrado de sabor, la intensidad del sabor general, el agrado del dulzor y el agrado de aroma.

En los comentarios proporcionados por los consumidores, se pueden identificar las principales preferencias y aspectos destacados de las muestras de chocolate con orujo de uva en tres concentraciones diferentes: 5%, 10% y 15%.

**Lo que más gustó:**

- **Sabor:** El sabor fue la característica más mencionada positivamente en todas las concentraciones. Los consumidores destacaron su intensidad y el sabor residual, que fue apreciado por su agradabilidad y su diferencia con otros chocolates. En el

caso del chocolate con 10% de orujo, muchos mencionaron que tiene un sabor único, suave, sin ser empalagoso, con una nota distintiva de pasa de uva que le da un carácter especial. También se valoró positivamente el balance entre el aroma y el sabor, encontrando la intensidad justa de ambos. Para el chocolate con 15%, se destacó especialmente su **sabor intenso**, exótico y distintivo, con un claro toque a uva que lo hace diferente y único.

- **Equilibrio:** Algunos consumidores señalaron que el chocolate tiene un buen equilibrio entre sus características, lo que sugiere que tanto el sabor como la textura están bien balanceados, especialmente en las concentraciones de 5% y 10%.
- **Textura:** En cuanto a la textura, se mencionó que en general es agradable, con un toque positivo en la mayoría de las concentraciones. Sin embargo, algunos consumidores señalaron que la textura del chocolate con 15% de orujo podría ser más suave, ya que la sequedad fue un aspecto que algunos no apreciaron tanto.

#### **Lo que menos gustó:**

- **Textura:** A pesar de que muchos disfrutaron de la textura, algunos consumidores destacaron que en las concentraciones de 5% y 10%, la textura era algo fuerte o menos invasiva, sugiriendo diferencias en la percepción. En el caso del chocolate con 15%, la sequedad fue un punto negativo para algunos, ya que resultó poco agradable para ciertos consumidores.
- **Dulzor y sabor residual:** El **dulzor** también fue una característica mencionada negativamente por algunos, particularmente en el chocolate con 5% y 10% de orujo, donde se percibió como demasiado intenso o desequilibrado en relación con el sabor general. El **sabor residual** fue otro punto crítico, especialmente en el chocolate con 10% y 15% de orujo, ya que dejó un sabor fuerte en la boca, y algunos lo describieron como algo "picante" o "ácido", lo cual afectó la experiencia general del producto.

#### **Preferencias generales de los consumidores**

El análisis sensorial permitió identificar diferencias perceptibles entre las muestras de chocolate elaboradas con distintas concentraciones de orujo de uva. Tal como se observa

en las figuras 25 y 26, correspondientes a las medias por atributo y a la representación gráfica tipo araña respectivamente, la muestra con un 15 % de orujo presentó las puntuaciones más elevadas en atributos como intensidad de aroma, intensidad de dulzor, agrado general, agrado de la textura y sabor residual. Estos resultados sugieren una buena aceptación por parte de los consumidores, quienes destacaron especialmente el perfil sensorial intenso y distintivo de esta formulación.

La muestra con un 5% de orujo, por su parte, obtuvo resultados favorables en atributos como textura y sabor residual, y presentó una percepción sensorial equilibrada en la mayoría de los atributos evaluados. En comparación con la muestra al 15%, mostró valores similares en varias dimensiones, lo que indica que también fue bien recibida por el panel de consumidores.

En cambio, la muestra con un 10% de orujo fue la que registró las puntuaciones más bajas en múltiples atributos sensoriales, como dulzor, agrado general y sabor residual. Esta tendencia sugiere una menor aceptación relativa, posiblemente asociada a un perfil sensorial percibido como menos armónico o más intenso en notas no deseadas, como la acidez o el amargor residual.

En conjunto, los resultados indican que las formulaciones con 5% y 15% de orujo de uva fueron las que presentaron una mayor aceptación sensorial dentro del grupo evaluado, destacándose por atributos diferenciales que podrían resultar atractivos para determinados segmentos de consumidores. Estos hallazgos respaldan el potencial del orujo de uva como ingrediente funcional en el desarrollo de productos chocolateros, especialmente en concentraciones que no comprometan el equilibrio sensorial general del producto.

No obstante, es importante señalar que las conclusiones obtenidas en esta evaluación sensorial están basadas en un grupo específico de consumidores y en un contexto experimental controlado. Por ello, se recomienda ampliar el estudio a una muestra más diversa y representativa, así como complementar los resultados con análisis estadísticos inferenciales que permitan confirmar la significancia de las diferencias observadas. Además, sería pertinente profundizar en la caracterización sensorial mediante técnicas más estructuradas, como análisis descriptivo cuantitativo (QDA), para validar los atributos identificados y orientar futuras formulaciones

#### 8.4 Análisis del contenido de compuestos fenólicos en el chocolate aplicado

La evaluación del contenido de compuestos fenólicos en el chocolate formulado con adición de bagazo de uva constituye un paso clave para determinar el impacto funcional del ingrediente incorporado. En este apartado se realiza el procedimiento utilizado para la determinación de polifenoles en el chocolate formulado, junto con los resultados obtenidos.

##### 8.4.1 Metodología

Para la cuantificación de polifenoles presentes en la muestra de chocolate semiamargo, se seleccionó el método más adecuado para este tipo de muestra, el método de Folin-Ciocalteu. Es un método colorimétrico que se basa en la reacción de los polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu, provocando un cambio de coloración de amarillo a azul.

Para el método Folin-Ciocalteu, se utilizan los mismos materiales de laboratorio, junto con las mismas proporciones de reactivos mencionados en la cuantificación de polifenoles del bagazo de vino.

Siguiendo el mismo procedimiento previamente establecido para la preparación de muestras, se procedió a la determinación de polifenoles en las muestras de chocolates. Para ello, se utilizó la misma curva de calibración correspondiente al patrón de ácido gálico, ya que el ensayo se realizó en la misma fecha en la que se cuantificaron los polifenoles en el bagazo.

Debido a la elevada concentración de los extractos obtenidos mediante filtración con jeringa de 10 mL equipada con un filtro de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , fue necesario realizar una dilución previa al análisis. Para ello, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto de chocolate y se completó con 990  $\mu\text{L}$  de una solución de metanol al 80 %, obteniendo una dilución 1:100. Las mezclas fueron recogidas en tubos adecuados para su posterior evaluación. Es importante destacar que esta preparación se realizó el mismo día en que se llevó a cabo la cuantificación de polifenoles, asegurando así la coherencia y comparabilidad de los resultados obtenidos.

A continuación, se llevó a cabo la determinación de polifenoles utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se pipetearon 300  $\mu\text{l}$  de cada extracto diluido en tubos por triplicado. Luego, se añadieron 1,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido en una proporción 1:10. La mezcla se agitó en un vortex durante 15 segundos, tras lo cual se incorporaron 1,2 ml de una solución de carbonato de sodio a una concentración de 75 g/l. Se registró la hora de inicio de la reacción y se agitó nuevamente en vortex durante 15 segundos. Posteriormente, las muestras se dejaron reposar durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente (24 °C).

Finalizado el tiempo de incubación, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 765 nm utilizando como referencia un blanco de reactivos. Los datos obtenidos fueron registrados y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g) o por mililitro de muestra (mg GAE/ml), según correspondiera.

Concentración de ácido gálico (ug/ml)		Absorbancia bruta		Absorbancia - Blanco		Media
		A	B	A	B	
C1	6,00	0,102	0,101	0,018	0,017	0,018
C2	7,44	0,127	0,122	0,043	0,038	0,041
C3	14,40	0,167	0,178	0,083	0,094	0,089
C4	24,00	0,254	0,254	0,170	0,170	0,170
C5	35,00	0,382	0,391	0,298	0,307	0,303
C6	50,00	0,551	0,555	0,467	0,471	0,469
C7	77,00	0,904	0,905	0,820	0,821	0,821
Blanco	-	0,083	0,085	-	-	0,084

*Tabla 13 absorbancia medida en espectrofotometría UV*

- C (Concentración de ácido gálico): Representa las diferentes concentraciones de ácido gálico (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que fueron preparadas para construir la curva de calibración en el análisis espectrofotométrico UV.
- Blanco: Corresponde a una muestra preparada con todos los reactivos del ensayo, pero sin ácido gálico. Se utiliza para corregir la absorbancia de fondo.
- A y B: Corresponden a las réplicas del experimento, ya que cada medición de absorbancia se realizó por duplicado.

Luego, a partir de estos datos, se construyó un gráfico de dispersión que representa la relación entre la absorbancia y la concentración de ácido gálico. Este gráfico incluye la ecuación de la recta, la cual simboliza la tendencia lineal entre ambos parámetros. El

objetivo de obtener esta ecuación es calcular la concentración de polifenoles en una muestra incógnita, usando la relación establecida entre la absorbancia y la concentración de un antioxidante conocido.

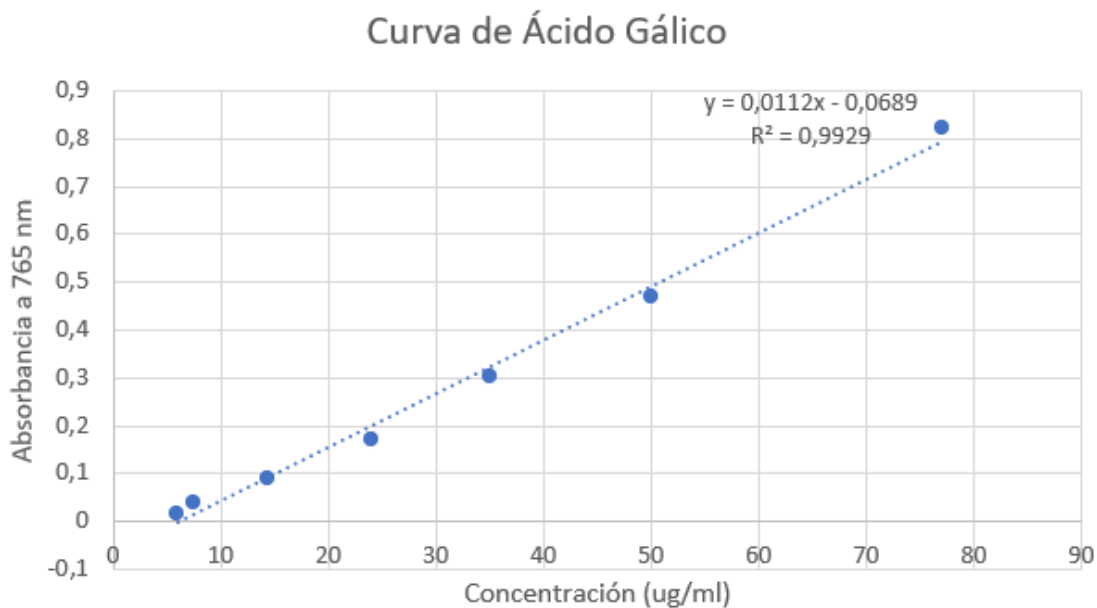


Figura 28: curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico

Finalmente, se procedió a medir las absorbancias de los chocolates con diferente porcentaje de bagazo de uva.

#### 8.4.2 Resultados

Como resultado de este proceso, se obtuvieron valores específicos que permitieron establecer una comparación entre ambas condiciones de tratamiento:

Muestra	Absorbancia
Chocolate 5%	0,483
Chocolate 5%	0,463
Chocolate 5%	0,438
Chocolate 10%	0,456

Chocolate 10%	0,465
Chocolate 10%	0,471
Chocolate 15%	0,456
Chocolate 15%	0,439
Chocolate 15%	0,695
Chocolate 20%	0,515
Chocolate 20%	0,513
Chocolate 20%	0,523
Chocolate base	0,526
Chocolate base	0,445
Chocolate base	0,492

*Tabla 14 resultados espectrofotómetro del chocolate*

A partir de los resultados obtenidos, se determinó la concentración de polifenoles totales, expresada en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g). Para ello, se utilizó la curva de calibración construida previamente con el patrón de ácido gálico. En dicha curva, la absorbancia (variable y) se relaciona directamente con la concentración de ácido gálico (variable x), lo que permitió calcular los valores correspondientes a las muestras analizadas mediante la ecuación de la recta. El desarrollo del procedimiento y los resultados específicos se encuentran detallados en el Anexo 9.

Luego de comparar los resultados de la cuantificación de polifenoles en el chocolate semiamargo 54% con las diferentes proporciones agregadas de bagazo durante su elaboración, se observa tienen un promedio de:

- Chocolate sin bagazo:  $99,38 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate base}}$
- Chocolate 5%:  $96,01 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate 5\%}}$

- Chocolate 10%:  $92,66 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 10\%}$
- Chocolate 15%:  $114,86 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 15\%}$
- Chocolate 20%:  $110,38 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 20\%}$

#### 8.4.3 Conclusión

La cuantificación de polifenoles totales en las muestras de chocolate con agregado de bagazo de uva presentó resultados variables y sin una tendencia lineal clara. El chocolate base (sin agregado de bagazo) mostró un contenido de 99,38 mg GAE/100 g. Las formulaciones con 5% y 10% de bagazo arrojaron valores ligeramente inferiores (96,01 y 92,66 mg GAE/100 g, respectivamente), mientras que las muestras con 15% y 20% evidenciaron un aumento, alcanzando 114,86 y 110,38 mg GAE/100 g.

Aunque estos datos podrían sugerir una tendencia creciente a partir de un determinado porcentaje de bagazo, no deben considerarse concluyentes, ya que no se realizó un análisis estadístico ni replicaciones suficientes. Para una evaluación confiable, cada formulación debería analizarse a partir de al menos tres muestras independientes y cada una ser medida por triplicado.

Una observación destacada es que las muestras con 5% y 10% de bagazo presentaron valores inferiores al chocolate base, lo cual no concuerda con lo esperado teóricamente, considerando que el bagazo deshidratado utilizado mostró una concentración muy elevada de polifenoles: 271,24 mg GAE/g de bagazo seco, es decir, 27.124 mg GAE/100 g, una cantidad que lo posiciona como una fuente altamente concentrada de estos compuestos.

En comparación, el cacao en polvo siendo el componente mayoritario en la elaboración del chocolate, presenta valores de polifenoles considerablemente menores, con un rango entre 1.500 y 3.000 mg GAE/100 g en base seca, es decir, entre 15 y 30 mg GAE/g, según lo informado por Wollgast & Anklam (2000). De forma más específica, un estudio reciente de De la Rosa-Millán *et al.* (2023) reporta valores de entre 9,2 y 57,4 mg GAE/g en cacaos no alcalinizados, dependiendo del tratamiento y origen de la muestra, lo que confirma que el contenido fenólico del bagazo supera ampliamente al del cacao y,

más aún, al del azúcar siendo un ingrediente que fue parcialmente reemplazado por el bagazo y que no aporta polifenoles.

Bajo esta lógica, incluso una inclusión mínima de bagazo debería haber generado un incremento, aunque sea leve en el contenido total de polifenoles. No obstante, los resultados sugieren lo contrario en los porcentajes más bajos, lo que podría explicarse por la complejidad de la matriz del chocolate, rica en compuestos polares y no polares (como lípidos, proteínas y azúcares), con los que los polifenoles pueden interactuar durante la elaboración. Estas interacciones pueden formar complejos no extraíbles fácilmente, disminuyendo la fracción de polifenoles libres detectables mediante los métodos convencionales de análisis.

Este fenómeno se menciona en Sánchez-Rangel *et al.* (2013) donde señalan que el método de Folin–Ciocalteu puede subestimar el contenido de polifenoles en matrices complejas debido a interferencias con otras sustancias reductoras. Asimismo, Naczk & Shahidi (2004) destacan que una fracción significativa de los polifenoles puede permanecer ligada a la matriz alimentaria, en forma de complejos con proteínas o lípidos, lo que limita su extracción y posterior cuantificación.

En conclusión, aunque los datos preliminares sugieren un posible aumento del contenido fenólico a mayores niveles de incorporación de bagazo, se requiere un diseño experimental más robusto, con replicación adecuada y análisis estadístico, para confirmar estos resultados. Además, sería recomendable profundizar en el estudio de las interacciones entre los polifenoles y los componentes del chocolate, que podrían estar afectando su disponibilidad y recuperación durante el análisis.

#### 8.5 Determinación de fibra dietaria en el chocolate semiamargo con el agregado de orujo de uva

La determinación de fibra dietaria en el chocolate formulados con adición de bagazo de uva constituye un paso clave para determinar el impacto funcional del ingrediente incorporado. En este apartado se realiza el procedimiento utilizado para la determinación de fibra dietaria en el chocolate formulado, junto con los resultados obtenidos.

### 8.5.1 Metodología

Para la determinación de fibra dietaria en la muestra de chocolate semiamargo, se seleccionó el método más adecuado para este tipo de análisis: el método de Prosky, también conocido como el "Método de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales" (AOAC 985.29). Este procedimiento, que también fue utilizado en el punto 7.4 del presente trabajo, es un estándar internacional para la cuantificación de fibra dietaria total, así como de las fracciones soluble e insoluble en alimentos. Su precisión y su capacidad para simular el proceso digestivo lo convierten en una herramienta esencial para el análisis de productos con alto contenido de fibra insoluble.

En la aplicación del método de Prosky, se emplearon los mismos materiales de laboratorio y las proporciones de reactivos previamente utilizadas en la determinación de fibra dietaria del bagazo de vino (mencionado en el punto 7.4).

El procedimiento seguido incluyó la preparación de la muestra de chocolate semiamargo y su posterior análisis, considerando las diferentes proporciones de bagazo de vino incorporadas en su formulación (5%, 10%, 15% y 20%).

### 8.5.2 Resultados

Se realizaron los siguientes cálculos para determinar el porcentaje de fibra dietaria presente en los chocolates con diferentes porcentajes de bagazo de uva adicionado.

Cálculo de la fibra dietaria:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{\text{Peso del residuo seco}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \right) * 100$$

- Chocolate semiamargo sin orujo de uva:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,0445 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = 2,26 \%$$

- Chocolate semiamargo con 5 % de bagazo de vino:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,1025 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = 5,13 \%$$

- Chocolate semiamargo con 10 % de bagazo de vino:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,1832 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = 9,16 \%$$

- Chocolate semiamargo con 15 % de bagazo de vino:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,2554 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = 12,77 \%$$

- Chocolate semiamargo con 20 % de bagazo de vino:

$$\% \text{ Fibra dietaria} = \left( \frac{0,3011 \text{ g}}{2 \text{ g}} \right) * 100 = 15,06 \%$$

### 8.5.3 Conclusión

Los resultados obtenidos muestran una variación lógica acorde con la cantidad de orujo de uva incorporada durante el procesamiento del chocolate. Al comparar estas muestras con el chocolate elaborado sin la adición de bagazo de uva, se observa una diferencia porcentual en el contenido de fibra dietaria. Esto permite concluir que, a medida que se incrementa la proporción de bagazo de vino en la formulación del chocolate, aumenta también la cantidad de fibra dietaria presente en el producto final.

El aumento en el porcentaje de fibra dietaria observado en los chocolates enriquecidos con bagazo de vino no solo confirma que este subproducto es una fuente rica en fibra, sino que también evidencia su capacidad para transferir compuestos funcionales al alimento final sin comprometer su elaboración. Esto sugiere que el bagazo de uva puede ser estratégicamente utilizado como ingrediente funcional en la industria alimentaria, no solo para mejorar el perfil nutricional de productos como el chocolate, sino también para responder a una creciente demanda de alimentos con beneficios digestivos y valor agregado. En este sentido, su incorporación representa una oportunidad para el desarrollo de alimentos funcionales sustentables, promoviendo a la vez el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

## 9 CAPITULO 3: Conclusiones

---

Esta investigación exploratoria analizó la posibilidad de aprovechar un residuo vitivinícola como materia prima en la elaboración de chocolate, aportando beneficios tanto nutricionales como sensoriales. En un país como Argentina, con gran relevancia en la producción de vino, valorizar este tipo de subproducto representa una oportunidad interesante tanto a nivel industrial como ambiental, en línea con los principios de la economía circular.

El secado del bagazo de vino en deshidratador permitió conservar mejor el contenido de polifenoles que el secado en horno. Durante la etapa experimental se observó una diferencia en el contenido fenólico total entre chocolates con y sin bagazo; sin embargo, al no haberse aplicado un análisis estadístico, no es posible confirmar la significancia de esa variación. Por este motivo, sería recomendable ampliar el número de muestras, trabajar con bagazos de diferentes orígenes y aplicar pruebas estadísticas adecuadas para validar las tendencias observadas.

Se destacó que la incorporación de hasta un 15% de bagazo mejora atributos como sabor y aroma, dando como resultado un chocolate con una identidad particular y bien aceptado por los consumidores. Además, los resultados sugieren que, en ciertas proporciones, su inclusión permitiría reducir el contenido de azúcares sin afectar negativamente las características sensoriales.

Parte de las variaciones registradas en el contenido de polifenoles podría explicarse por las interacciones que estos compuestos establecen con macronutrientes de la matriz del chocolate (proteínas, lípidos y carbohidratos). Debido a su estructura química, rica en grupos hidroxilo y anillos aromáticos, los polifenoles tienden a formar enlaces con estas macromoléculas, lo que puede modificar tanto su estabilidad como su actividad biológica. Estudios previos Goya *et al.* (2022) han demostrado que estas interacciones influyen en la cantidad de compuestos detectables, lo que justifica la necesidad de profundizar en esta línea. Sería interesante, además, identificar de manera cualitativa los polifenoles presentes en el bagazo y en el producto final, así como medir la capacidad antioxidante que aportan al chocolate. Esto abre la puerta a futuras aplicaciones en otros tipos de chocolate, como el blanco o el de leche, siempre considerando las diferencias en su composición.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el proceso de elaboración del chocolate — que involucra varias horas de agitación y temperaturas relativamente altas— podría reducir en parte la concentración final de polifenoles. Optimizar estas condiciones de procesamiento será clave en investigaciones futuras para maximizar el aporte bioactivo del bagazo.

Más allá del chocolate, la alta concentración de fibra dietaria y compuestos bioactivos del bagazo de uva sugiere que también podría incorporarse en otras matrices alimentarias (galletas, barras de cereal, bebidas), lo cual requeriría ajustes de formulación y evaluaciones sensoriales específicas.

En definitiva, aunque se trata de un estudio exploratorio, los resultados abren el camino a nuevas investigaciones que permitan profundizar en los efectos del bagazo y ampliar sus aplicaciones. Este trabajo sienta las bases para transformar un residuo agroindustrial en un ingrediente funcional, con potencial para enriquecer el perfil nutricional de los alimentos y, al mismo tiempo, impulsar una producción más sostenible.

## 10 Bibliografía

- 
- Alibade, A., Lakka, A., Bozinou, E., Lalas, S. I., Chatzilazarou, A., & Makris, D. P. (2021). Development of a green methodology for simultaneous extraction of polyphenols and pigments from red winemaking solid wastes (pomace) using a novel glycerol-sodium benzoate deep eutectic solvent and ultrasonication pretreatment. *Environments*, 8(9), 90. <https://doi.org/10.3390/environments8090090>
  - Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>
  - Aksoylu, Z., Çağindi, O., & Köse, E. (2015). Efectos de la incorporación de arándanos, polvo de semilla de uva y semilla de amapola en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de las galletas. *Journal of Food Quality*, 38(2), 164–174. <https://doi.org/10.1111/jfq.12145>
  - Alimento procesado hamburguesa: Asensio-Grau, A., Calvo, L., Martín-Diana, A. B., Rico, D., & Villamiel, M. (2022). Use of grape pomace to improve the nutritional value of bakery products: A review. *Current Research in Food Science*, 5, 1127–1135. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.004>

- Alimentos procesados salchichon: Carrapiso, A. I., Tejeda, J. F., Morales, J., & Ventanas, S. (2024). High-hydrostatic-pressure-stabilized white grape pomace to improve the oxidative stability of dry-cured sausages ("salchichón"). *Foods*, 13(5), 687. <https://doi.org/10.3390/foods13050687>
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules*, 14(10), 3729–3741. <https://doi.org/10.3390/molecules14103729>
- Antioxidants y Journal of Food Science realizados por Hinojosa-Dávalos, Joel & Cardona López; Marco & Gutiérrez-Lomelí; Melesio & Barrera, Arturo & Robles, Miguel. (2019).
- Bolenz, S., & Glöde, L. (2021). Technological and nutritional aspects of milk chocolate enriched with grape pomace products. *European Food Research and Technology*, 247(3), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03651-4>
- Bustamante, L., Saavedra, J., & Trombert, A. (2004). Caracterización de galletas elaboradas con cascarilla de orujo de uva. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 43–48. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0004-06222004000100014&lng=es](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06222004000100014&lng=es)
- "Biodiversity and wine production: A review" (Biodiversidad y producción de vino: Una revisión) de la revista "Agriculture, Ecosystems & Environment" (2019).
- Benítez Cruz, G., González de Llano, D., & Moreno Arribas, M. V. (2014, junio). Antioxidant properties of wine polyphenols and their biologic/preventive usage. Villaviciosa de Odón, España.
- Baumgärtel, T., Kluth, H., Epperlein, K., & Rodehutschord, M. (2007). Evaluación nutricional del orujo de uva en la alimentación de rumiantes: una revisión. *Ciencia y Tecnología de la Alimentación Animal*, 137(1-2), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.005>
- British Standards Institution. (2014). *BS EN ISO 8586:2014 – Análisis sensorial: Directrices generales para la selección, formación y supervisión de evaluadores sensoriales seleccionados y evaluadores sensoriales expertos*. Recuperado de <https://www.iso.org/standard/45352.html>
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P., & Karathanos, V. T. (2013). Fortificación de yogures con extractos de semillas de uva (*Vitis vinifera*). *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.003>
- Cala, O., Dufourc, E. J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., & Pianet, I. (2012). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Langmuir*, 28(50), 17410–17418. <https://doi.org/10.1021/la303964m>

- "Changes in polyphenol content during storage of dark chocolate" (Food Res. Int., 2018)
- Carvallo, J. A. (2020, noviembre 27). Tipos de cacao: Criollo, trinitario y forastero ¿Conoces la diferencia? Le Vice Chocolat. <https://levicechocolat.com/blogs/articulos/tipos-de-cacao-criollo-trinitario-y-forastero-conoces-la-diferencia>
- Delgado-Adámez, J., Fernández-León, M. F., Velardo-Micharet, B., & González-González, C. (2021). Technological and antioxidant properties of grape seed flour intended for functional foods. *Applied Sciences*, 11(10), 4664. <https://doi.org/10.3390/app11104664>
- Denev, S. R. L., Popova, Y. S. L., Martynova, M. M., *et al.* (2019). Interactions between polyphenols and carbohydrates in food matrices: Impact on the bioavailability of polyphenols. *Food Research International*, 126, 108979. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108979>
- Directo al Paladar. (2020, 24 de enero). Chocolate blanco: la leche que quería ser chocolate.
- <https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/chocolate-blanco-la-leche-que-queria-ser-chocolate>
- Environmental impacts of wine production: A review" (Impactos ambientales de la producción de vino: Una revisión) de la revista "Journal of Cleaner Production" (2019).
- "Effect of oxygen on the stability of polyphenols in cocoa powder" (J. Agric. Food Chem., 2015)
- "Effect of light on the stability of polyphenols in chocolate" (J. Food Sci., 2012)
- Ferrer-Gallego, R., & Silva, P. (2022). The wine industry by-products: Applications for food industry and health benefits. *Antioxidants*, 11(10), 2025. <https://doi.org/10.3390/antiox11102025>
- Forbes Argentina. (2023). Industria del chocolate: cuántas toneladas venden en Argentina y el consumo per cápita. Recuperado de <https://www.forbesargentina.com/negocios/industria-chocolate-cuantas-toneladas-venden-argentina-consumo-per-capita-n37664>
- Food Research International por Lisbet Argüelles Martínez; Iván Hernández Ramírez; Daniel Méndez Iturbide; Pablo Méndez Hernández (2010).
- Food Research International y Plos One por Zavaleta, Juana; Muñoz, Ana María; Blanco, Teresa; Alvarado-Ortiz, Carlos; Loja, Bertha en diciembre de 2005.
- Greenhouse gas emissions from wine production: A review" (Emisiones de gases de efecto invernadero de la producción de vino: Una revisión) de la revista "Journal of Cleaner Production" (2018).

- González, C. M., Moreno, A. J., & Villalobos, M. (2023). Polifenoles como compuestos bioactivos en alimentos: fuentes, clasificación y beneficios en la salud. *Acta Universitaria*, 33, e3863. <https://doi.org/10.15174/au.2023.3863>
- Goya, L., Kongor, J. E., & de Pascual-Teresa, S. (2022). Del cacao al chocolate: efecto del procesamiento sobre flavonoles y metilxantinas y sus mecanismos de acción. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14365).
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). (2019). Informe técnico anual 2019. <https://www.argentina.gob.ar/inv>
- Interempresas. (2019, mayo 21). Aplicaciones y nuevos usos de subproductos de la vinificación. Interempresas. <https://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/245686-Aplicaciones-y-nuevos-usos-de-subproductos-de-la-vinificacion.html>
- Institute of Food Technologists. (1975). *Sensory evaluation guide for the food industry*. *Food Technology*, 29(11), 16–26
- INRA (2007). Alimentación de rumiantes: Requerimientos de alimento e ingesta. París: INRA Éditions.
- Journal of Food Biochemistry y Molecules, hecho por González-Díaz, A., & García-Nuñez, J. A. (2023).
- K. I. B. Moro, A. B. B. Bender, L. P. da Silva, and N. G. Penna, “Green Extraction Methods and Microencapsulation Technologies of Phenolic Compounds From Grape Pomace: A Review,” *Food Bioprocess Technol.* 2021 148, vol. 14, no. 8, pp. 1407–1431, May 2021, doi: 10.1007/S11947-021-02665-4.
- López-Astorga, M., Molina-Quijada, C. C., Ovando-Martínez, M., & Leon-Bejarano, M. (2022). Orujo de uva: Más que un residuo, una fuente de compuestos bioactivos. *Epistemus (Sonora)*, 16(33), 115–122.
- Miranda, A. M., Steluti, J., Fisberg, R. M., Marchioni, D. M. L., & Martini, L. A. (2021). Dietary intake and food contributors of polyphenols in adults and elderly adults of São Paulo: A population-based study. *British Journal of Nutrition*, 126(3), 404–414. <https://doi.org/10.1017/S0007114520004294>
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., & Górecka, D. (2013). Orujo de uva blanca como fuente de fibra dietética y polifenoles y su efecto sobre las características físicas y nutraceuticas de las galletas de trigo. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 389–395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5840>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina. (s.f.). Composición del chocolate. *Alimentos Argentinos*. Recuperado el 16 de abril de 2025, de

[https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Golosinas/productos/Chocolate/composicion\\_choco.htm](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/Golosinas/productos/Chocolate/composicion_choco.htm)

- Neuroprotective Effects of Polyphenols in Neurodegenerative Diseases  
Rahman, M. M., Islam, M. R., Islam, M. T., *et al.* (2020). Neuroprotective effects of polyphenols in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2020/3567341>
- Nunes, M. A., Ramos, F., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2024). Grape pomace extracts as sustainable antioxidants to improve oxidative stability of grape seed oil. *Applied Sciences*, 14(22), 10184. <https://doi.org/10.3390/app142210184>
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2023). Informe estadístico de la OIV 2023 sobre la vitivinicultura mundial. <https://www.oiv.int/>
- Polyphenol Anti-Inflammatory Effects and Their Clinical Relevance  
Liu, Y., & Wang, J. (2018). Polyphenol anti-inflammatory effects and their clinical relevance. *Journal of Medicinal Food*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.4005>
- Polyphenol Anticancer Properties and Their Mechanisms of Action  
Farzaei, M. H., Bahramsoltani, R., Rahimi, R., & Abbasabadi, Z. (2018). Polyphenol anticancer properties and their mechanisms of action. *Phytotherapy Research*, 32(4), 651–665. <https://doi.org/10.1002/ptr.6024>
- Polyphenol content and antioxidant activity of different types of chocolate" (*J. Food Sci.*, 2015)
- Rodríguez Durán, L. V., Balagurusamy, N., Aguilar, C. N., & Rodríguez, R. (2014). Química y biotecnología de la tanasa. ResearchGate. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/266372327>
- Razola-Díaz, M. d. C., Aznar-Ramos, M. J., Verardo, V., Melgar-Locatelli, S., Castilla-Ortega, E., & Rodríguez-Pérez, C. (2023). Exploring the nutritional composition and bioactive compounds in different cocoa powders. *Antioxidants*, 12(3), 716. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10045957/>
- Silva, M. P., Pimentel, T. C., Cruz, A. G., Deliza, R., Marques, M. B., Freitas, M. Q., ... & Ranadheera, C. S. (2022). Grape pomace as a functional ingredient in dairy products: Consumer insights and health benefits. *Nutrients*, 14(9), 1875. <https://doi.org/10.3390/nu14091875>
- Sánchez Díaz, R., & Hernández, A. (2013). Impacto del uso de taninos y compuestos fenólicos en residuos agroindustriales para productos funcionales. Biblioteca Digital Zamorano. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu>

- Soil degradation and wine production: A review" (Degradación del suelo y producción de vino: Una revisión) de la revista "Agriculture, Ecosystems & Environment" (2020).
- Tolve, R., Simonato, B., Rainero, G., Bianchi, F., Rizzi, C., Cervini, M., & Giuberti, G. (2021). Wheat bread fortification by grape pomace powder: Nutritional, technological, antioxidant, and sensory properties. *Foods*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.3390/foods10010075>
- Thermal degradation of polyphenols in cocoa" (Food Chem., 2013)
- Tavernini, S., De Leo, R., Serafini, M., & Pellegrini, N. (2020). Grape pomace as a functional ingredient in dark chocolate: Impact on taste and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(12), 3668–3675. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07044>
- Villanueva, E., Bustamante, A., & Hirsch, S. (2015). CO121. Caracterización de la fibra dietética asociada a harina de bagazo de uva tinta. Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. En *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 65(Supl. 2). Recuperado de <https://www.alanrevista.org/ediciones/2015/suplemento-2/art-103/>
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423–447. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996900000685>

INDICE DE TABLAS

---

Tabla 1 cuadro comparativo de principales categorías de flavonoides presentes en el orujo de uva. Extraído de Fuente Marín, L. (2014). .....	21
Tabla 2 cuadro comparativo de principales categorías de flavonoides presentes en el orujo de uva. Extraído de Fuente Marín, L. (2014). .....	22
Tabla 3 cuadro comparativo de las diferentes proporciones de ingredientes en los diferentes chocolates. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina (2025) y Directo al Paladar (2020). .....	35
Tabla 4 preparación de puntos de la curva .....	49
Tabla 5 absorbancia medida en espectrofotometría UV .....	51
Tabla 6 resultados espectrofotómetro .....	53
Tabla 7 formulación 1 kg de chocolate semiamargo.....	59
Tabla 8 formulación con 5% de orujo de uva.....	60
Tabla 9 formulación con 10% del orujo de uva.....	61
Tabla 10 formulación con 15% del orujo de uva.....	61
Tabla 11 formulación con 20% del orujo de uva.....	62
Tabla 12 análisis microbiológicos correspondientes al CAA.....	64
Tabla 13 absorbancia medida en espectrofotometría UV .....	75
Tabla 14 resultados espectrofotómetro del chocolate.....	77
Tabla 15 resultados obtenidos agar PCA.....	102
Tabla 16 resultados obtenidos para recuento de enterobacterias .....	104
Tabla 17 resultados colonias típicas .....	108

INDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1: diagrama de flujo de la elaboración del vino tinto</i>	12
<i>Figura 2: porcentaje de producción de vino a nivel mundial expresado en millones de hectolitros, Extraído de Organización Internacional de la Viña y el Vino (2021)</i>	14
<i>Figura 3: porcentaje de las diferentes provincias en el cultivo de vid en Argentina (INV,2023)</i>	15
<i>Figura 4: cantidad de residuos generados vs cantidad producida.</i>	18
<i>Figura 5: diagrama de flujo de la producción de vino tinto y vino blanco con el detalle de los residuos generados. Extraído de López-Astorga et al., (2023).</i>	19
<i>Figura 6: cuadro detallado de los diferentes compuestos fenólicos. Extraído de López-Astorga et al., (2023).</i>	22
<i>Figura 7: detalle de compuestos fenólicos de la uva. Extraído de López-Astorga et al., (2023).</i>	23
<i>Figura 8: detalle de fibra dietaria de la uva. Extraído de López-Astorga et al., (2023).</i>	24
<i>Figura 9: cuadro detallado de la clasificación de fibra dietaria. Extraído de López-Astorga et al., (2023).</i>	25
<i>Figura 10: alimentos clasificados según su grupo y contenido aproximado de polifenoles. Extraído de López-Cervantes et al., (2023).</i>	30
<i>Figura 11: pirámide alimenticia para aplicación del orujo de uva. Extraído de Ferrer-Gallego et al., (2022).</i>	31
<i>Figura 12: Diagrama del proceso industrial de elaboración de chocolate. Afoakwa y colaboradores (2008).</i>	36
<i>Figura 13: tostadora de cacao</i>	37
<i>Figura 14: molino de bolas o rodillos</i>	37
<i>Figura 15: máquina de conchado</i>	38
<i>Figura 16: templadora</i>	38
<i>Figura 17: línea de enfriamiento y envasado</i>	39
<i>Figura 18: variedades de granos de cacao Levice Chocolat (2024).</i>	42
<i>Figura 19: orujo de uva antes del proceso de tabla ón</i>	46
<i>Figura 20: orujo de uva deshidratado en horno</i>	46
<i>Figura 21: orujo de uva deshidratado en deshidratador</i>	47
<i>Figura 22: curva de absorbancia vs concentración de ácido gálico</i>	52
<i>Figura 23: concentración de polifenoles por tipo de secado</i>	54
<i>Figura 24: cuadro descriptivo de los 5 sentidos.</i>	67
<i>Figura 25: cadena de percepción de un alimento o bebida.</i>	68
<i>Figura 26: análisis de atributos de las muestras de chocolate con distintos porcentajes de bagazo. Los valores corresponden a la media aritmética e las evaluaciones.</i>	70
<i>Figura 27: análisis de atributos de las muestras de chocolate con distintos porcentajes de bagazo.</i>	71
<i>Figura 28: curva de concentración absorbancia vs concentración ácido gálico</i>	76
<i>Figura 29: placas de PCA para el recuento de aerobios mesófilos</i>	105
<i>Figura 30: placa de VRBG para el recuento de enterobacterias</i>	106
<i>Figura 31: tubos de caldo LST para el recuento de E coli por NMP</i>	108
<i>Figura 32: tabla de NMP/g</i>	108
<i>Figura 33: tubos de caldo GC (Giolliti Cantoni) para el recuento de Estafilococos coagulasa positiva</i>	109
<i>Figura 34: placas de Baird Parker para la confirmación</i>	109
<i>Figura 35: placas de Baird Parker con colonias atípicas.</i>	110
<i>Figura 36: placas de XLD para investigación de Salmonella spp</i>	111

## 11 Anexos

---

### 11.1 Anexo 1: elaboración chocolate amargo

1. Selección y recepción de granos de cacao: se seleccionan y reciben granos de cacao de alta calidad.
  2. Limpieza y clasificación: los granos de cacao se limpian para eliminar impurezas y se clasifican según su tamaño y calidad.
  3. Tostado: los granos de cacao se tuestan para desarrollar su sabor característico y eliminar la humedad.
  4. Descascarillado y molienda: se separan las cáscaras de los granos de cacao tostados y se muelen para obtener una pasta llamada licor de cacao.
  5. Conchado: el licor de cacao se concha, es decir, se mezcla y agita a una temperatura controlada para mejorar la textura, aroma y sabor del chocolate. Este proceso puede durar varias horas.
  6. Templado: la masa de chocolate se enfría y se agita para que los cristales de manteca de cacao se formen de manera uniforme, lo que dará al chocolate su textura crujiente y brillante.
1. Moldeo: la masa de chocolate se vierte en moldes y se enfría para solidificarla en barras o formas deseadas.
  2. Enfriado y almacenamiento: las barras de chocolate se enfrían completamente y se almacenan en condiciones adecuadas de temperatura y humedad para su posterior distribución y venta.

### 11.2 Anexo 2: elaboración chocolate con leche

1. Selección y Recepción de Cacao
  - a. Recepción y selección de granos de cacao.
  - b. Limpieza de impurezas (piedras, polvo, etc.).

2. Tostado:
  - a. Tostado de los granos de cacao a temperaturas controladas para desarrollar el sabor.
3. Triturado y Descascarillado:
  - a. Triturado de los granos para separar la cáscara del grano (nibs de cacao).
  - b. Descascarillado: Separación de la cáscara y los nibs.
4. Molienda de Nibs:
  - a. Molienda de nibs para obtener licor de cacao (masa de cacao).
5. Prensado:
  - a. Prensado del licor de cacao para separar manteca de cacao y torta de cacao.
6. Elaboración del Chocolate con Leche:
  - a. Mezcla del licor de cacao, manteca de cacao, azúcar, leche en polvo, y otros ingredientes (emulsionantes, saborizantes).
  - b. Refinado de la mezcla para reducir el tamaño de las partículas.
7. Conchado:
  - a. Conchado para suavizar la textura y desarrollar el sabor. Este proceso puede durar varias horas.
8. Templado:
  - a. Enfriamiento controlado del chocolate para estabilizar los cristales de manteca de cacao, obteniendo un chocolate brillante y con buena textura.
9. Moldeado:
  - a. Vertido del chocolate templado en moldes.
  - b. Enfriamiento para solidificar el chocolate.

10. Desmoldado y Empaque:

- a. Desmoldado del chocolate solidificado.
- b. Empaque final para su distribución.

11.3 Anexo 3: elaboración chocolate blanco

1. Recepción y Selección de Materias Primas:

- a. Recepción de la manteca de cacao, leche en polvo, azúcar y otros ingredientes (emulsionantes, saborizantes).
- b. Selección y almacenamiento adecuado de las materias primas.

2. Mezcla de Ingredientes:

- a. Manteca de cacao se funde y se mezcla con leche en polvo y azúcar.
- b. Se añaden emulsionantes (como la lecitina) y saborizantes (como la vainilla).

3. Refinado:

- a. La mezcla se pasa por rodillos o refinadores para reducir el tamaño de las partículas y obtener una textura fina y homogénea.

4. Conchado:

- a. La mezcla refinada se somete a un proceso de conchado, donde se agita y se calienta para mejorar la textura, reducir la acidez y desarrollar el sabor.

5. Temperado:

- a. La mezcla conchada se enfría y se calienta en un proceso controlado para formar cristales estables de manteca de cacao, lo que asegura un buen brillo, textura y un "snap" al romper el chocolate.

6. Moldeado:

- a. El chocolate temperado se vierte en moldes y se deja enfriar para solidificar.

7. Desmoldado y Empaque:

- a. Una vez que el chocolate se ha enfriado y solidificado, se desmolda y se empaqueta para su distribución y venta.

11.4 Anexo 4: listado de materiales y reactivos utilizados en la cuantificación de polifenoles.

- Pipetas de 1,5 y 10ml
- Tubos de centrífuga
- Metanol
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Centrifuga
- Tubos de ensayo con tapón
- Acido gálico
- Agita tubos (vórtex)
- Matraces aforados de 25 mL y 10 mL
- Reactivo de Folin-Ciocalteau
- Carbonato sódico 7,5%
- Cubetas de plástico de 3 mL para espectrofotometría visible
- Espectrofotómetro UV-Visible

11.5 Anexo 5: resultados de concentración de polifenoles en los diferentes bagazos

Como resultado de este proceso, se obtuvieron valores específicos que permitieron establecer una comparación entre ambas condiciones de tratamiento:

Muestra	Absorbancia
Orujo secado en deshidratador 1	0,52
Orujo secado en deshidratador 2	0,545
Orujo secado en deshidratador 3	0,551

Orujo secado en horno 1	0,134
Orujo secado en horno 2	0,142
Orujo secado en horno 3	0,136

Tabla 6: resultados espectrofotómetro

Con los resultados obtenidos, utilizando la curva de calibración del patrón previamente calculada, se determinaron los mg de polifenoles presentes en 1 g de muestra, siendo “y” absorbancia, y “x” concentración de ác gálico.

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

I. Polifenoles en muestra de deshidratador 1:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$52,58 \frac{\mu g}{ml} x 250 \mu l \text{ (factor de dilución)} = 13145,089 \mu g/ml$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 13.145,089 \frac{\mu g}{ml} x 3 ml = 39.435,268 \mu g$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3ml x 10 g \text{ Bagazo D.})}{20 ml} = 0,15 g \text{ de Bagazo Deshidratado}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Deshidratado:

$$\frac{39.435,268 \mu g}{0,15 g \text{ Bagazo D.}} = 262.901,79 \frac{\mu g}{g}$$

$$\frac{262.901,79 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 262,902 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Bagazo D.}}$$

II. Polifenoles en muestra de deshidratador 2:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$54,8125 \frac{\mu g}{ml} x 250 \mu l \text{ (factor de dilucion)} = 13.703,125 \mu g/ml$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 13.703,125 \frac{\mu g}{ml} x 3 ml = 41.109,375 \mu g$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g Bagazo D.})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Bagazo Deshidratado}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Deshidratado:

$$\frac{41,109,375 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Bagazo D.}} = 247.062,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{247.062,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 274,0625 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Bagazo D.}}$$

III. Polifenoles en muestra de deshidratador 3:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$55,348214 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 250 \mu\text{l (factor de dilucion)} = 13.837,054 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 13.837,054 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 41.511,161 \mu\text{g}$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g Bagazo D.})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Bagazo Deshidratado}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Deshidratado:

$$\frac{41.511,161 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Bagazo D.}} = 276.741,07 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{276.741,07 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 276,74107 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Bagazo D.}}$$

IV. Polifenoles en muestra de horno 1:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$18,116071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 250 \mu\text{l (factor de dilucion)} = 4529,0179 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4529,0179 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 13.587,054 \mu\text{g}$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g Bagazo H.})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Bagazo Horno}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Horno:

$$\frac{13.587,054 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Bagazo H.}} = 90.580,357 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{90.580,357 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 90,580357 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Bagazo H.}}$$

V. Polifenoles en muestra de horno 2:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$18,830357 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 250 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4707,5893 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4707,5893 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.122,768 \mu\text{g}$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g Bagazo H.})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Bagazo Horno}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Horno:

$$\frac{14.122,768 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Bagazo H.}} = 94.151,786 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{94.151,786 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 94,151786 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Bagazo H.}}$$

VI. Polifenoles en muestra de horno 3:

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$18,294643 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 250 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4573,6607 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4573,6607 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 13.720,982 \mu\text{g}$$

De 10g de bagazo en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g Bagazo H.})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Bagazo Horno}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Bagazo Horno:

$$\frac{13.720,982 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Bagazo H.}} = 91.473,214 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{91.473,214 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 91,473214 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Bagazo H.}}$$

11.6 Anexo 6: materiales necesarios para la determinación de fibra dietaria:

- Muestra de orujo de uva deshidratado
- Balanza analítica
- Agua destilada
- Etanol 95%
- Matraz de 250 ml
- Solución HCl 0.257M
- Solución NaOH 0.319M
- Centrífuga
- Estufa
- Tamices de 100  $\mu\text{m}$

11.7 Anexo 7: preparación de los reactivos par determinación de fibra dietaria:

Para la preparación de la solución HCl 0,257 M se partió de la solución HCl 0,9939 N disponible en el laboratorio de UADE.

Para la preparación de la solución de HCl 0,257 M, se partió de la solución de HCl 0,9939 N disponible en el laboratorio de UADE. Esta solución tenía la particularidad de que la molaridad era igual a la normalidad, dado que en los ácidos monopróticos como el HCl, la molaridad y la normalidad son equivalentes. Por lo tanto, cada molécula de HCl liberaba un protón en solución, es decir, se partió de una solución 0,9939 M = 0,9939 N.

Para preparar 250 ml de esta solución, se calculó el volumen que se debía tomar de HCl 0,9939 M para obtener una concentración teórica de 0,257:

$$\begin{aligned} \text{Masa HCL ( 0,9939M) } \times \text{Volumen HCl ( 0,9939M) } &= \\ &= \text{Masa HCL (0,257M)} \times \text{Volumen HCl (0,257M)} \end{aligned}$$

Siendo el Volumen de HCl 0,9939 M la incógnita de esta fórmula.

Despejando esta incógnita, se obtuvo como resultado que 64,644 ml de HCl 0,9939 M eran necesarios para obtener la concentración experimental de la solución de

HCl. Estos 64,644 ml se llevaron a un matraz de 250 ml y se completó con agua destilada hasta alcanzar el volumen total. Luego, se titularon para verificar la concentración.

Posteriormente, se tomaron 25 ml de la solución de HCl 0,257 M.

Para preparar la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se pesaron 1,0599 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, obtenidos de la siguiente manera:

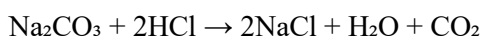
$$\text{Masa (Na}_2\text{CO}_3) = M \times V \times P_m$$

$$\text{Masa} = 0,1\text{mol} \times 0,1\text{L} \times 105,99\text{g/mol} = 1,0599\text{g}$$

Luego, se colocaron los 1,0599 gramos de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en un Erlenmeyer y se completó con agua destilada hasta alcanzar 1 litro. Se tomaron 25 ml de esta solución y se agregaron 3 gotas de azul de bromotimol como indicador de la titulación.

Una vez que se comenzó a titular, se observó que la coloración inicial era azul. Después de añadir un cierto volumen de HCl, la solución comenzó a virar levemente a una coloración amarilla, hasta alcanzar un amarillo constante, indicando el volumen de HCl gastado en la titulación.

Reacción redox:



El volumen de titulante gastado fue de 19,7ml. Con este dato, se obtuvo la concentración experimental:

$$\text{mol HCL} = C_{\text{HCL}} \times V_{\text{HCL}}$$

$$\text{mol HCL} = 0,257\text{M} \times 0,0197\text{L}$$

$$\text{mol HCL} = 0,00506 \text{ mol}$$

$$\text{mol de Na}_2\text{CO}_3 = 0,00506\text{mol} / 2 = 0,00253 \text{ mol}$$

$$C_{\text{experimental}} = C(\text{Na}_2\text{CO}_3) / V(\text{Na}_2\text{CO}_3)$$

$$C_{\text{experimental}} = 0,00253 / 0,025 = 0,1012 \text{ M}$$

Como la concentración experimental no es 0,257M, se calculó y aplicó el factor “F” de corrección:

F (factor de corrección) = Concentración de ácido a obtener / Concentración experimental

$$F (\text{factor de corrección}) = 0,257M / 0,1012M = 2,54$$

Aplicando el factor de corrección encontrado, se calculó el volumen de HCl 0,9939M para obtener una concentración de 0,257M:

$$V = V (\text{HCL } 0,9939) \times F$$

$$V = 64,644 \text{ ml} \times 3,54 = \mathbf{264,95 \text{ ml}}$$

El volumen de HCl 0,9939 M, que se utilizó para obtener una concentración de HCL 0,319 M, fue de 264,95ml.

#### NaOH:

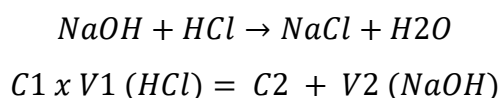
Para la preparación de la solución de NaOH 0,319 M, se partió de la solución de NaOH 0,97 M disponible en el laboratorio de UADE. Para preparar 250 ml de esta solución, se calcularon los gramos de NaOH que debían pesarse para obtener una concentración teórica de 0,319 M:

$$M (\text{Masa de NaOH } 0,97M) =$$

$$= \text{Molaridad NaOH } (0,319M) \times \text{Volumen } (0,250\text{ml}) \times Mr \left( \frac{40g}{\text{mol}} \right) =$$

$$= M(\text{Masa de NaOH } 0,97M) = 3,19\text{gramos}$$

Se procedió a valorizar la solución de NaOH 0,319 M con HCl 0,257 M. Este es un procedimiento ácido-base típico, donde el NaOH actúa como base y el HCL como ácido titulante. La reacción entre ellos es:



Se procedió a agregar lentamente el HCl a la solución de NaOH mientras se agitaba el matraz. Se observó el cambio de color del indicador, donde la fenolftaleína cambió de rosa a incolora, para identificar el punto de equivalencia.

$$\text{Mol HCL} = 0,257\text{M} \times 0,0116\text{ L} = 0,00299\text{ mol HCL} \rightarrow 0,00299\text{ mol NaOH}$$

La concentración obtenida de NaOH teórica calculada fue:

$$C(\text{NaOH}) = 0,00299\text{ mol NaOH} / 0,1\text{ L} = 0,0299\text{ M}$$

Como la concentración experimental no era 0,319 M, se calculó y aplicó el factor “F” de corrección:

$$F(\text{factor de corrección}) = \text{Concentración de base a obtener} / \text{Concentración experimental}$$

$$F(\text{factor de corrección}) = 0,319\text{ M} / 0,0299\text{ M} = 10,67$$

$$V(\text{NaOH}) = 0,319\text{ M} \times 0,1\text{ L} \div 0,97\text{ M} = 0,0329\text{ L} = 32,9\text{ ml}$$

Es decir, los gramos que se debieron pesar para obtener NaOH 0,319 M fueron calculados aplicando el factor de corrección:

$$32,9\text{ ml} \rightarrow 1,272\text{ gramos}$$

#### 11.8 Anexo 8: Procedimiento y resultados de los análisis microbiológicos:

- Recuento de aerobios mesófilos en UFC/g (ISO 4833:2003):

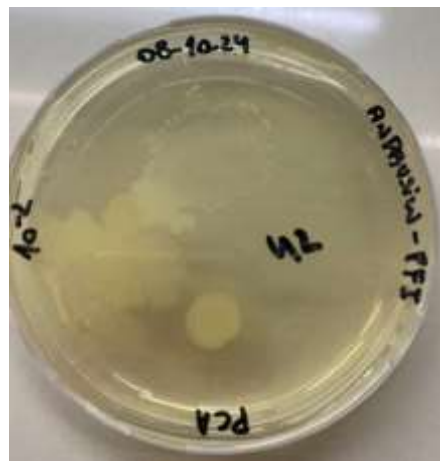
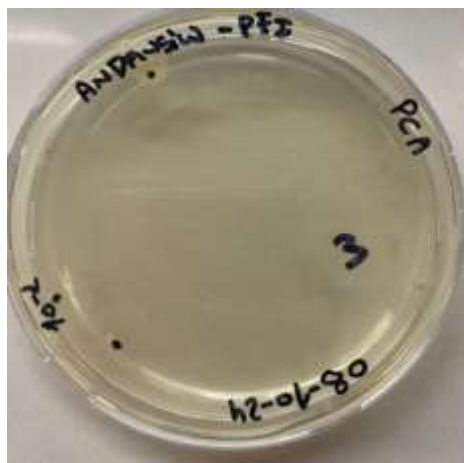
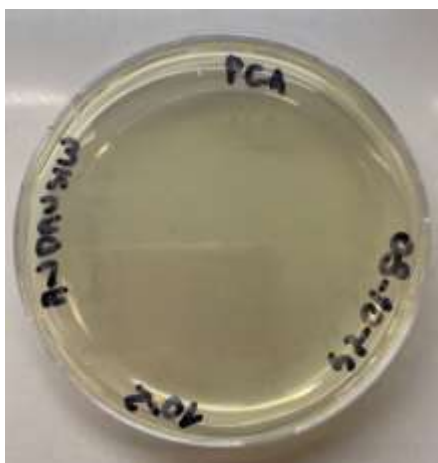
Para el recuento de aerobios mesófilos en UFC/g (ISO 4833:2003), se seleccionó la dilución  $10^{-2}$ , basada en experiencias previas, donde se estimaba que la concentración de aerobios mesófilos en la muestra sería lo suficientemente alta como para que el recuento de colonias en esta dilución fuera representativo y cayera dentro del rango óptimo de 25 a 250 colonias por placa.

Luego de colocar 0,1 ml en la placa de PCA, se utilizó una espátula estéril para distribuir de manera eficiente la muestra en la placa, repitiendo este procedimiento 5 veces, según lo requerido en el artículo. Posteriormente, las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 72 horas.

Resultados obtenidos:

Dilución	Volumen de siembra	Recuento (UFC/g)	Factor de dilución	Resultado obtenido en UFC/g
10 <sup>-2</sup>	0,1 ml	0 UFC/G	100	11,600 UFC/g

*Tabla 15 resultados obtenidos agar PCA*



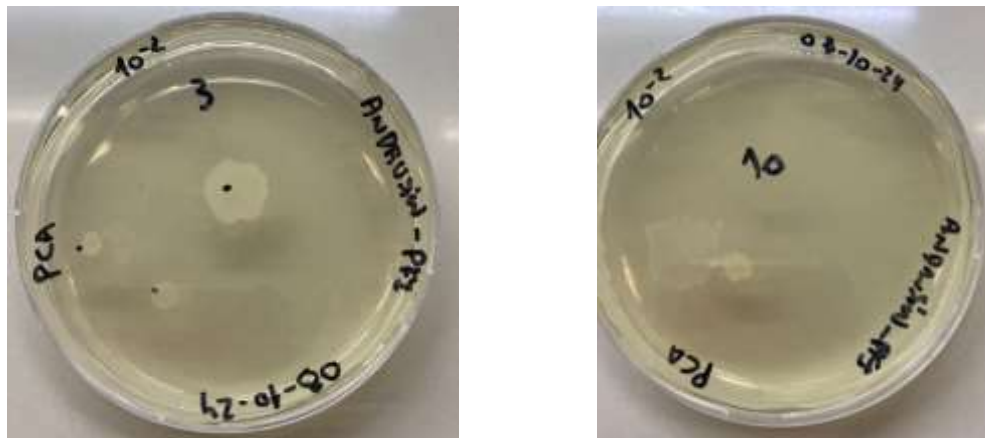


Figura 29: placas de PCA para el recuento de aerobios mesófilos

Para el cálculo de UFC/g se utiliza la siguiente forma:

$$UFC/g = \frac{\text{promedio de colonias} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen inoculado}}$$

$$UFC/g = \frac{11,6 * 100}{0,1} = 11,600 UFC/g$$

- Recuento de Enterobacterias en UFC/g (ISO 21528-2: 2004):

Para la siembra, se seleccionó la dilución  $10^{-2}$ , basada en experiencias previas, donde se estimaba que la concentración de Enterobacterias en la muestra sería lo suficientemente alta como para que el recuento de colonias en esta dilución fuera representativo y cayera dentro del rango óptimo de 30 a 300 colonias por placa.

Luego de colocar 0,1 ml en la placa de VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar), se utilizó una espátula estéril para distribuir de manera eficiente la muestra en la placa, repitiendo este procedimiento 5 veces, según lo requerido en el artículo. Posteriormente, las placas se incubaron en estufa a  $37^{\circ}C$  durante 24 horas.

Analizando los resultados:

Dilución	Volumen de siembra	Recuento (UFC/g)	Factor de dilución	Resultado obtenido en UFC/g

10 <sup>-2</sup>	1 ml	0 UFC/g	100	< 100 UFC/g
------------------	------	---------	-----	-------------

Tabla 16 resultados obtenidos para recuento de enterobacterias

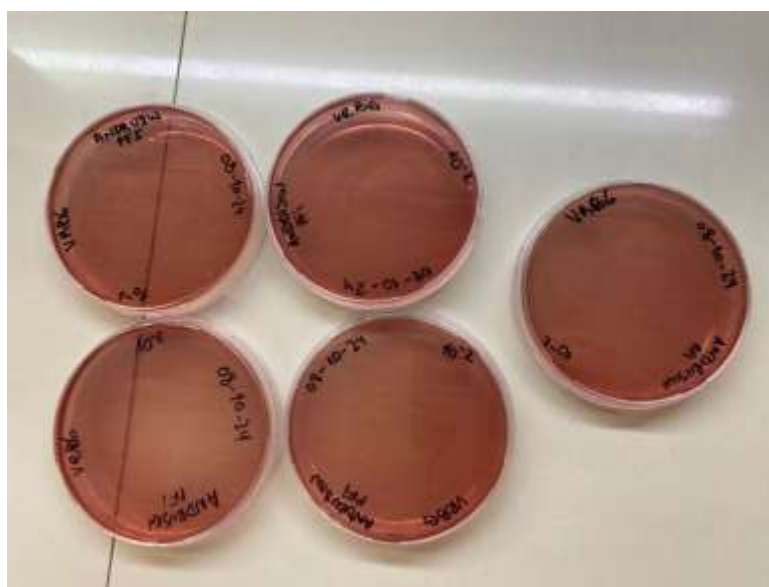


Figura 30: placa de VRBG para el recuento de enterobacterias

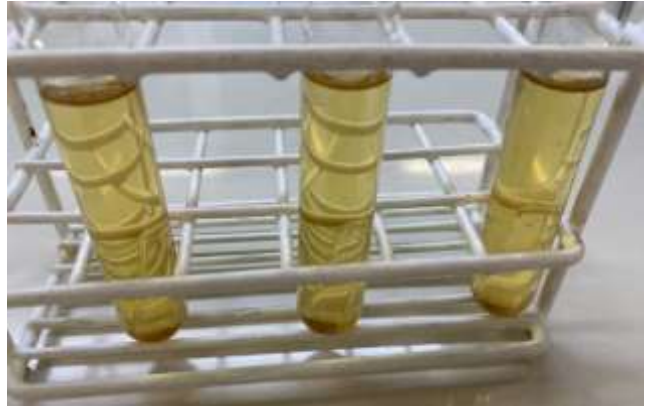
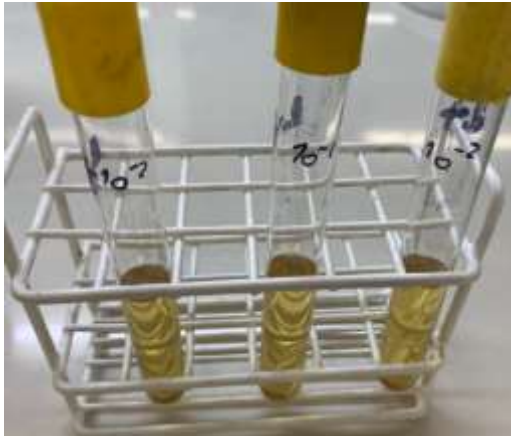
$$UFC/g = \frac{\text{promedio de colonias} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen inoculado}}$$

$$UFC/g = \frac{0 * 100}{1} = 0 UFC/g$$

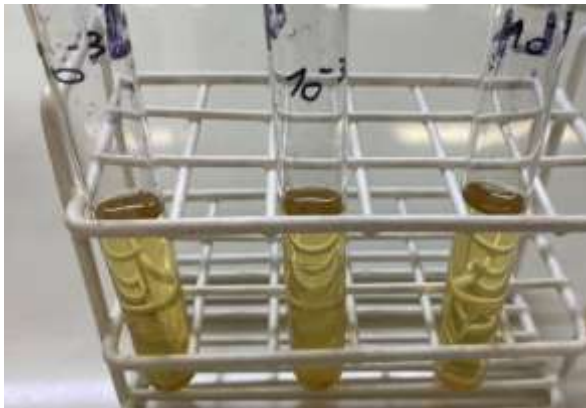
- Recuento de *E. coli* por NMP/g (ISO 16649-3 : 2005):

Para la siembra, se utilizaron las diluciones seriadas de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup>. Se inoculó 1 ml de cada dilución en tubos con 10 ml de caldo LST (Lauril Sulfato de Triptosa) por triplicado, con el fin de asegurar la precisión estadística del NMP/g. Luego, se incubaron los 9 tubos, correctamente rotulados, en una estufa a 37°C durante 48 horas.

- Dilución  $10^{-2}$



- Dilución  $10^{-3}$



- Dilución  $10^{-4}$

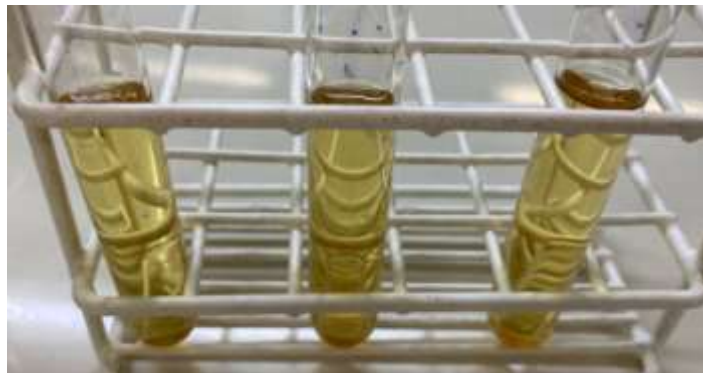


Figura 31: tubos de caldo LST para el recuento de *E coli* por NMP

Luego de la incubación, en ninguno de los 9 tubos se observó turbidez (crecimiento bacteriano) ni producción de gas en la campana de Durham. Por lo tanto, se consideró que no había presencia de *coliformes* (incluyendo *E. coli*) en la muestra. Al ingresar los resultados en la tabla de NMP/g después de la incubación, se obtuvo el valor de NMP/g correspondiente.

Table 966.24A Most probable numbers (MPN) per 1 g test portion, using 3 tubes with each of 0.1, 0.01, and 0.001 g portions

Positive tubes				Positive tubes				Positive tubes				Positive tubes			
0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN	0.1	0.01	0.001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2 <sup>a</sup>	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3 <sup>a</sup>	9	1	0	3 <sup>a</sup>	15	2	0	3 <sup>a</sup>	26	3	0	3 <sup>a</sup>	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2 <sup>a</sup>	9.2	1	1	2 <sup>a</sup>	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3 <sup>a</sup>	12	1	1	3 <sup>a</sup>	19	2	1	3 <sup>a</sup>	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1 <sup>a</sup>	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2 <sup>a</sup>	12	1	2	2 <sup>a</sup>	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3 <sup>a</sup>	16	1	2	3 <sup>a</sup>	24	2	2	3 <sup>a</sup>	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1 <sup>a</sup>	13	1	3	1 <sup>a</sup>	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2 <sup>a</sup>	16	1	3	2 <sup>a</sup>	24	2	3	2 <sup>a</sup>	44	3	3	2	1100
0	3	3 <sup>a</sup>	19	1	3	3 <sup>a</sup>	29	2	3	3 <sup>a</sup>	53	3	3	3	>1100

Figura 32: tabla de NMP/g

- Recuento de *Estafilococos coagulasa positiva* (NMP/g)

Para la siembra, se utilizaron las diluciones seriadas de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Se inoculó 1 ml de cada dilución en tubos con 10 ml de caldo GC (Giolliti Cantoni) con tapón de Vaspar, por triplicado, teniendo finalmente 9 tubos, con el fin de asegurar la precisión estadística del NMP/g. Luego, se incubaron los 9 tubos, correctamente rotulados, en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Posteriormente, se observaron tubos con turbidez, indicativos de crecimiento bacteriano.

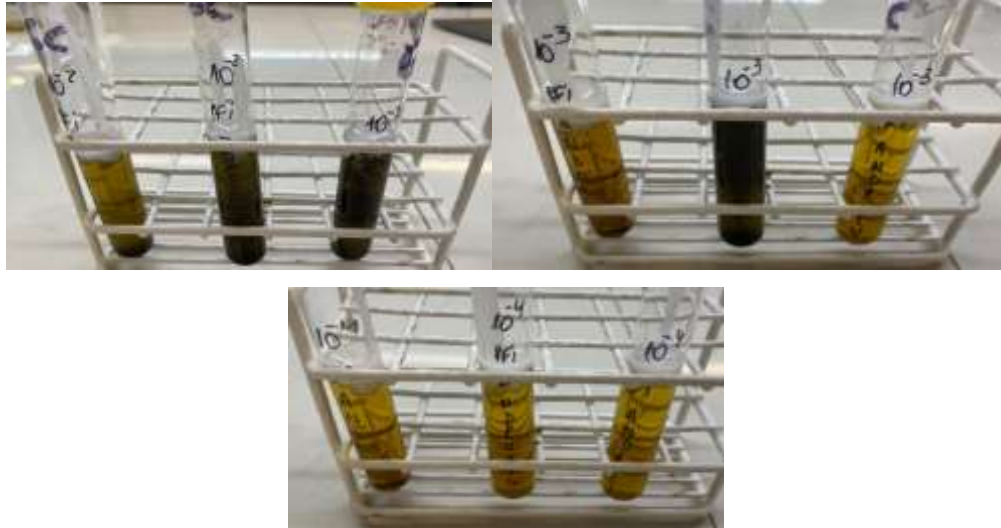


Figura 33: tubos de caldo GC (Giolliti Cantoni) para el recuento de *Estafilococos coagulasa positiva*

Se procedió a inocular 0,1 ml de cada tubo positivo/oscurcido (con crecimiento bacteriano) en placas de Baird Parker, un medio selectivo para la confirmación de coagulasa. Luego de la siembra, las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 48 horas.

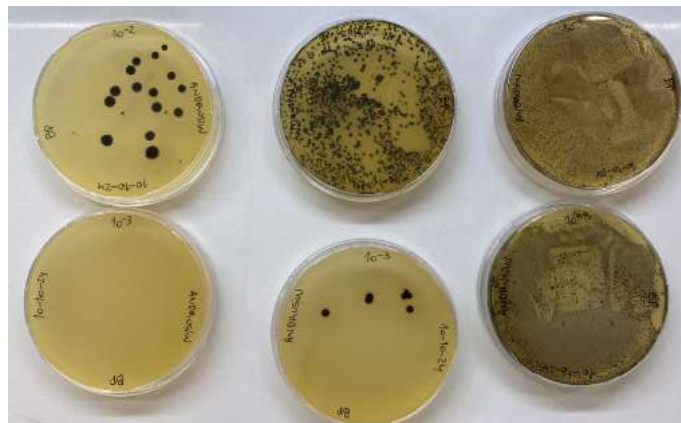


Figura 34: placas de Baird Parker para la confirmación

Luego de incubar las placas de Baird Parker, se observó el evidente crecimiento de colonias microbianas. Sin embargo, las colonias desarrolladas en el agar no correspondían a las características típicas de *Staphylococcus aureus*. Estas colonias deberían ser negras con un halo claro, resultado de la hidrólisis de la yema de huevo presente en el agar Baird Parker.

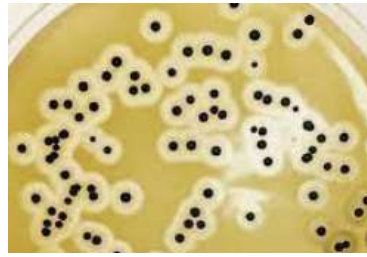


Figura 35: placas de Baird Parker con colonias atípicas.

Colonias típicas:

Dilución	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Número de placas positivas
$10^{-2}$	0	0	0	0
$10^{-3}$	0	0	0	0
$10^{-4}$	-	-	-	-

Tabla 17 resultados colonias típicas

- Investigación de *Salmonella* spp (ISO 6579:2002):

Para la investigación de *Salmonella* spp., se partió del homogenato incubado durante 24 horas a 37°C. Se tomaron 0,1 ml y se colocaron en tubos con el medio RV (Rappaport-Vassiliadis), repitiendo este procedimiento cinco veces para obtener el n = 5 solicitado por el artículo del CAA. Posteriormente, se incubaron a 42°C durante 24 horas.

Luego de la incubación, se procedió a repicar a partir de los tubos RV incubados en placas de XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

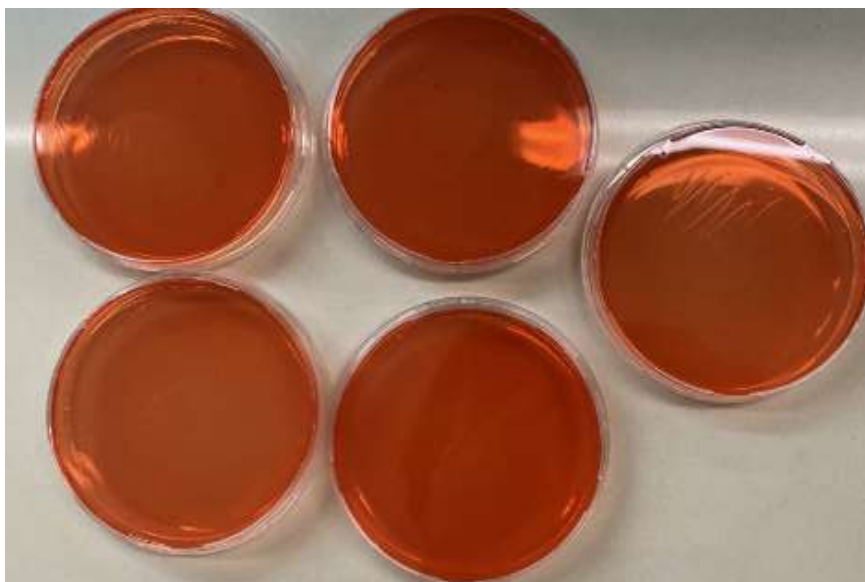


Figura 36: placas de XLD para investigación de *Salmonella spp*

11.9 Anexo 9: resultados y cálculos obtenidos de la medición de polifenoles en los diferentes chocolates con distintos porcentajes de bagazo

Con los resultados obtenidos, utilizando la curva de calibración del patrón previamente calculada, se determinaron los mg de polifenoles presentes en 1 g de muestra, siendo “y” absorbancia, y “x” concentración de ác gálico.

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

I. Polifenoles en muestra de chocolate 5% (1):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$49,276786 \frac{ug}{ml} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.927,6786 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.927,6786 \frac{ug}{ml} \times 3 \text{ ml} = 14.783,036 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 5% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3ml \times 10 \text{ g chocolate } 5\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 5\%$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 5%:

$$\frac{14.783,036 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate } 5\%} = 98.553,571 \frac{ug}{g}$$

$$\frac{98.553,571 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 98,553571 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate 5\%}}$$

II. Polifenoles en muestra de chocolate 5% (2):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$47,491071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.749,1071 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.749,1071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.247,321 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 5% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate 5\%})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate 5\%}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 5%:

$$\frac{14.247,321 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate 5\%}} = 98.982,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{98.982,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 98,982143 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate 5\%}}$$

III. Polifenoles en muestra de chocolate 5% (3):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$45,258929 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.525,8929 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.525,8929 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 13.577,679 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 5% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate 5\%})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate 5\%}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 5%:

$$\frac{13.577,679 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate 5\%}} = 90.517,857 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{90.517,857 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 90,517857 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate 5\%}}$$

IV. Polifenoles en muestra de chocolate 10% (1):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$46,866071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.686,6071 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.686,6071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.059,821 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 10% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate } 10\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 10\%$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 10%:

$$\frac{14.059,821 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate } 10\%} = 93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 93,732143 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate } 10\%}$$

V. Polifenoles en muestra de chocolate 10% (2):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$46,669643 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.766,9643 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.766,9643 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.300,893 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 10% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate } 10\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 10\%$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 10%:

$$\frac{14.300,893 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate } 10\%} = 95.339,286 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{95.339,286 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 95,339286 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate } 10\%}$$

VI. Polifenoles en muestra de chocolate 10% (3):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$48,205357 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.820,5357 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.820,5357 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.461,607 \mu\text{g}$$

De 10g de chocolate 10% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:  

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate } 10\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 10\%$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 10%:

$$\frac{14.461,607 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Chocolate } 10\%} = 93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 93,732143 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate } 10\%}$$

VII. Polifenoles en muestra de chocolate 15% (1):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$46,866071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.686,6071 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.686,6071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 14.059,821 \mu\text{g}$$

De 10g de chocolate 15% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:  

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate } 15\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 15\%$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 15%:

$$\frac{14.059,821 \mu\text{g}}{0,15 \text{ g Chocolate } 15\%} = 93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{93.732,143 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 93,732143 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate } 15\%}$$

VIII. Polifenoles en muestra de chocolate 15% (2):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$45,348214 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.534,8214 \mu\text{g/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.534,8214 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 13.604,464 \mu\text{g}$$

De 10g de chocolate 15% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:  

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate } 15\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 15\%$$

Por lo que la concentración en los 0,15g Chocolate 15%:

$$\frac{13.604,464 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate 15\%}} = 90.696,429 \frac{\text{ug}}{\text{g}}$$

$$\frac{90.696,429 \frac{\text{ug}}{\text{g}}}{1000 \frac{\text{ug}}{\text{mg}}} = 90,696429 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate 15\%}}$$

IX. Polifenoles en muestra de chocolate 15% (3):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$68,205357 \frac{\text{ug}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 6.820,5357 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 6.820,5357 \frac{\text{ug}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 20.461,607 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 15% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate 15\%})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate 15\%}$$

Por lo que la concentración en los 0,15g Chocolate 15%:

$$\frac{20.461,607 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate 15\%}} = 136.410,71 \frac{\text{ug}}{\text{g}}$$

$$\frac{136.410,71 \frac{\text{ug}}{\text{g}}}{1000 \frac{\text{ug}}{\text{mg}}} = 136,41071 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate 15\%}}$$

X. Polifenoles en muestra de chocolate 20% (1):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$52,133929 \frac{\text{ug}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 5.213,3929 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 5.213,3929 \frac{\text{ug}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 15.640,179 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate 20% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate 20\%})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate 20\%}$$

Por lo que la concentración en los 0,15g Chocolate 20%:

$$\frac{15.640,179 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate 20\%}} = 104.267,86 \frac{\text{ug}}{\text{g}}$$

$$\frac{136.410,71 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 104,26786 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 20\%}$$

XI. Polifenoles en muestra de chocolate 20% (2):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$51,955357 \frac{\mu g}{ml} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 5.195,5357 \text{ ug/ml}$$

*Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final*

$$= 5.195,5357 \frac{\mu g}{ml} \times 3 \text{ ml} = 15.586,607 \text{ ug}$$

*De 10g de chocolate 20% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:*

$$= \frac{(0,3ml \times 10 \text{ g chocolate } 20\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 20\%$$

*Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 20%:*

$$\frac{15.586,607 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate } 20\%} = 103.910,71 \frac{\mu g}{g}$$

$$\frac{103.910,71 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 103,91071 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 20\%}$$

XII. Polifenoles en muestra de chocolate 20% (3):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$52,848214 \frac{\mu g}{ml} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 5.284,8214 \text{ ug/ml}$$

*Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final*

$$= 5.284,8214 \frac{\mu g}{ml} \times 3 \text{ ml} = 15.854,464 \text{ ug}$$

*De 10g de chocolate 20% en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:*

$$= \frac{(0,3ml \times 10 \text{ g chocolate } 20\%)}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate } 20\%$$

*Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate 20%:*

$$\frac{15.854,464 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate } 20\%} = 105.696,43 \frac{\mu g}{g}$$

$$\frac{105.696,43 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 105,69643 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate } 20\%}$$

XIII. Polifenoles en muestra de chocolate base (1):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$53,116071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 5.311,6071 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 5.311,6071 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 15.934,821 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate base en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate base})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate base}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate base:

$$\frac{15.934,821 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate base}} = 106.232,14 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{106.232,14 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 106,23214 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate base}}$$

XIV. Polifenoles en muestra de chocolate base (2):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$45,883929 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 4.588,3929 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 4.588,3929 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 3 \text{ ml} = 13.765,179 \text{ ug}$$

De 10g de chocolate base en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3\text{ml} \times 10 \text{ g chocolate base})}{20 \text{ ml}} = 0,15 \text{ g de Chocolate base}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate base:

$$\frac{13.765,179 \text{ ug}}{0,15 \text{ g Chocolate base}} = 91.767,857 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\frac{91.767,857 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}} = 91,767857 \frac{\text{mg GAE}}{\text{g Chocolate base}}$$

XV. Polifenoles en muestra de chocolate base (3):

$$y = 0,0112x - 0,0689$$

$$50,080357 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ul (factor de dilucion)} = 5.008,0357 \text{ ug/ml}$$

Determinamos cuantos ug hay en 3ml del volumen final

$$= 5.008,0357 \frac{\mu g}{ml} \times 3 ml = 15.024,107 \mu g$$

De 10g de chocolate base en 20ml de metanol, la cantidad en el volumen final de 0,3 ml fue:

$$= \frac{(0,3ml \times 10 g \text{ chocolate base})}{20 ml} = 0,15 g \text{ de Chocolate base}$$

Por lo que la concentracion en los 0,15g Chocolate base:

$$\frac{15.024,107 \mu g}{0,15 g \text{ Chocolate base}} = 100.160,71 \frac{\mu g}{g}$$

$$\frac{100.160,71 \frac{\mu g}{g}}{1000 \frac{\mu g}{mg}} = 100,16071 \frac{mg \text{ GAE}}{g \text{ Chocolate base}}$$