

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO Y LA IDENTIFICACIÓN  
MOLECULAR DE LA VID *Vitis sp.* DENOMINADA “ISABELITA”, DEL  
DISTRITO DE SAN ANTONIO DE CUMBAZA, SAN MARTÍN, PERÚ.”**

Tesis presentada por los Bachilleres:

**Aguilar Morón, Brigitte Guizela**

**Vargas Yana, Diego Alejandro**

Para obtener el título profesional de:

**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesor:

Ph.D Cárdenas García, Jaime Dante

Co-Asesora:

Mgter. Natalia López Álvarez

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000018689  
N° Trámite en Fac. 335-2017  
Fecha Recep. Fac. 18-04-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: AGUILAR MORON, Brigitte Guizela  
VARGAS YANA, Diego Alejandro

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"VALORACION DE LA UVA "ISABELITA" NATIVA DEL DISTRITO DE SAN ANTONIO DE CUMBAZA, SAN MARTIN PERU; MEDIANTE LA ELABORACION DE SU PERFIL MOLECULAR Y EVALUACION DEL CONTENIDO FENOLICO"

DICTAMINADORES: 1) Dr. José Villanueva Salas 2) Mgter. Roxana Bardales Álvarez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente  
FIRMAS:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA 12/04/17

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "DETERMINACION DEL PEFIL FENOLICO Y LA IDENTIFICACION MOLECULAR DE LA UVA "ISABELITA", NATIVA DEL DISTRITO DE SAN ANTONIO DE CUMBAZA. SAN MARTIN, PERU", después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

FECHA 23/04/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
  - 2) Mgter. Roxana Bardales Álvarez
- Mgter. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "DETERMINACION DEL CONTENIDO FENOLICO Y LA IDENTIFICACION MOLECULAR DE LA VID *Vitis sp.* "ISABELITA", DEL DISTRITO DE SAN ANTONIO DE CUMBAZA, SAN MARTIN, PERU" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente  
FIRMA

(Devolver antes de 15 días hábiles)

FECHA 03/05/2019

JURADOS: PRESIDENTE ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS  
VOCAL MAG. ROXANA BARDALES ALVAREZ  
SECRETARIO MAG. JAIME BARREDA DEL CARPIO

FECHA 17/5/19 HORA 19.00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO

FECHA

## DEDICATORIA

A mis padres por haberme apoyado en todo aspecto durante la realización de esta investigación.

A mis familiares y amigos por haberme impulsado y motivado a cumplir mis metas.

A Dios por darme la fortaleza para no rendirme en este camino.

Brigitte Guizela Aguilar Morón

A mi abuela, a quien le hubiese gustado verme profesional y quien me impulsó a seguir mis sueños.

Diego Alejandro Vargas Yana

## AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jaime Cárdenas García por su apoyo y confianza a lo largo de esta investigación y a la maestra Natalia López Álvarez por su constante dedicación y guía.

A nuestros familiares por impulsarnos a seguir adelante y sortear los inconvenientes que se presentan en el camino.

A la doctora Lena Gálvez Ranilla por haber compartido sus conocimientos con nosotros y guiarnos para la realización de un mejor trabajo.

A los señores Carlos Callo y Marcos Vargas, y a la señora Luisa del Carpio por su amabilidad y disposición para facilitar nuestra investigación.

Al maestro César Arévalo-Hernández del Instituto de Cultivos Tropicales y a la ingeniera agrónoma Raquel Ríos Carrasco por facilitarnos la materia prima para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
HIPÓTESIS.....	xiii
OBJETIVOS .....	xiv
CAPÍTULO I .....	1
1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1La vid .....	1
1.1.1Taxonomía.....	1
1.1.2Historia .....	2
1.2La uva .....	3
1.2.1Contenido nutricional .....	3
1.2.2Variedad local.....	4
1.2.3Condiciones de crecimiento y desarrollo de la uva .....	5
1.3 San Antonio de Cumbaza .....	6
1.4Ácido Desoxirribonucleico (ADN).....	9
1.4.1Historia .....	9
1.4.2Importancia .....	11
1.4.3Extracción de ADN.....	11
1.5Secuenciamiento .....	12
1.5.1Método de Maxam-Gilbert .....	12
1.5.2Método Sanger.....	15
1.5.3Métodos modernos.....	15
1.6Contenido Fenólico .....	17

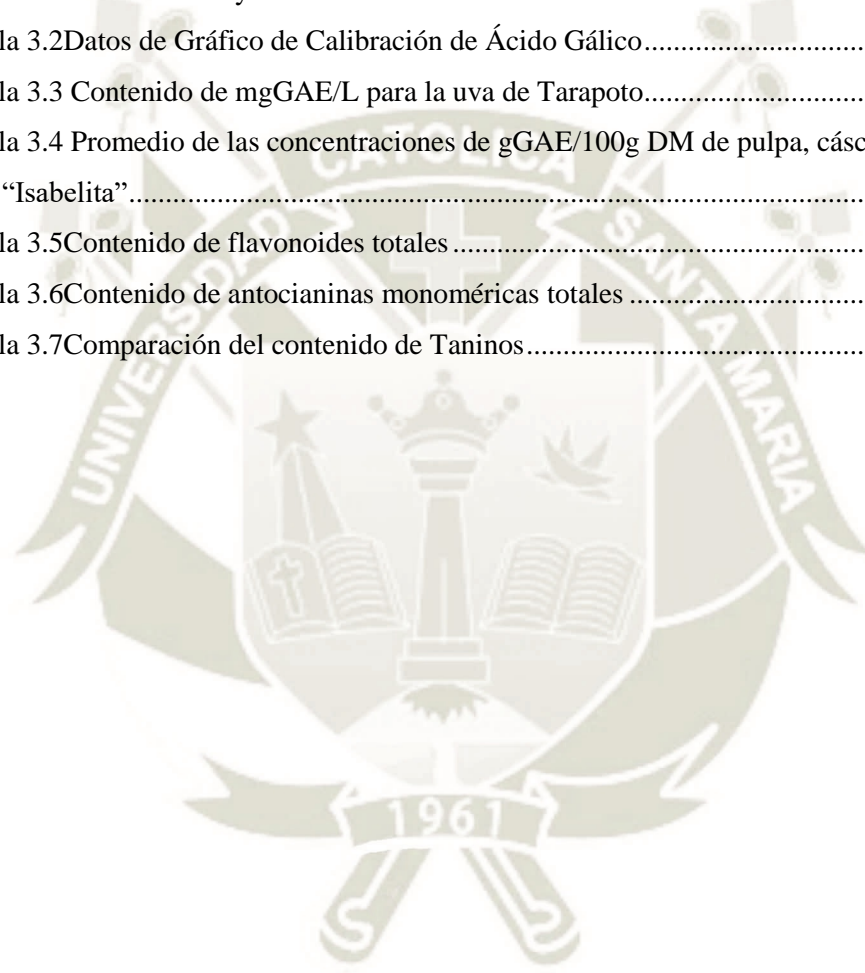
1.6.1Flavonoides .....	18
1.6.2Antocianinas.....	19
1.6.3Taninos .....	20
1.6.4Importancia .....	22
CAPÍTULO II .....	23
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Materiales .....	23
2.1.1Materia prima .....	23
2.1.2Equipos y materiales .....	23
2.1.3Reactivos .....	23
2.1.4Materiales de vidrio y otros .....	24
2.2Métodos .....	25
2.2.1 Determinación del contenido fenólico de la uva denominada “Isabelita” .....	26
2.2.2 Secuenciamiento genético .....	32
CAPÍTULO III .....	33
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1 Determinación del contenido fenólico.....	33
3.1.1 Características de la materia prima.....	33
3.1.2Determinación de compuestos fenólicos totales.....	34
3.1.3 Determinación del contenido de flavonoides .....	38
3.1.4Determinación de antocianinas monoméricas totales (TMA) .....	39
3.1.5Determinación de taninos totales.....	40
3.2Identificación molecular de la uva “Isabelita” .....	41
3.2.1 Identificación usando el marcador matK .....	42
3.2.2 Identificación usando marcador rcbL.....	48
CAPÍTULO IV .....	53
CONCLUSIONES .....	53
SUGERENCIAS .....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Variedad de uva llamada “Isabelita” en el distrito de San Antonio de Cumbaza y toda la región de San Martín.....	5
Figura 1.2 Localización geográfica del distrito de San Antonio de Cumbaza.....	7
Figura 1.3 Distrito de San Antonio de Cumbaza, lugar donde se cultiva la uva “Isabelita”.....	8
Figura 1.4 Parrales de uva “Isabelita” en el distrito de San Antonio de Cumbaza. ....	8
Figura 1.5 Proceso de Extracción de ADN.....	13
Figura 1.6Gel de poliacrilamida junto con las bandas de ADN distribuidas según el peso molecular de cada una (21). ....	14
Figura 1.7Estructura básica de un flavonoide y sus tipos. ....	19
Figura 1.8Estructura química de las principales antocianinas en <i>Vitis vinífera</i> L. A) 3-glucósido B) 3-p-cumaroil glucósido (37).....	20
Figura 1.9 Estructuras básicas de los diferentes tipos de taninos.....	21
Figura 2.1 Flujograma experimental para la determinación del contenido fenólico de la uva “Isabelita” .....	25
Figura 2.2Preparación de la uva Isabelita para el proceso de Liofilización.....	28
Figura 2.3A) Equipo Soxhlet para hacer la extracción de compuestos fenólicos de la uva, B) Extracción de la cascara de uva C) Extracción de la semilla de uva. ....	29
Figura 2.4A) Tubos de ensayo conteniendo HCl al 25% y formaldehído al 37%, y muestra para la determinación de flavonoides. B) Filtración de cada tubo de ensayo.....	31
Figura 2.5 A) Tubos eppendorff con PVP, agua destilada y extracto de cáscara de uva B) Los tubos se sometieron a vortex C) En esta imagen se muestra la separación del PVP del extracto de cascara de uva después del proceso de vortex. ....	32
Figura 3.1 Caracterización de la uva “Isabelita” se muestra la cascara, el fruto entero y la pulpa junto con la semilla. ....	33
Figura 3.2 Gráfico de calibración de Ácido Gálico. ....	35
Figura 3.3 Resultados gráficos de nBLAST para el marcador matK.....	43
Figura 3.4 Resultados de alineamiento para el marcador matK.....	45
Figura 3.5.Comparación de secuencias con la herramienta nBLAST.....	45
Figura 3.6 Diferencia de nucleótidos en la herramienta nBLAST.....	46
Figura 3.7Resultados de alineamiento de la herramienta BLASTx para el marcador matK .....	46
Figura 3.8 Resultados de expresión en la herramienta ExPASy para el marcador matK .....	47
Figura 3.9 Resultados gráficos de nBLAST para el marcador rbcL.....	49
Figura 3.10 Resultados de alineamiento para el marcador rbcL.....	50
Figura 3.11 Resultados de alineamiento de la herramienta BLASTx para el marcador rbcL.....	51
Figura 3.12 Resultados de expresión en la herramienta ExPASy para el marcador rbcL .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Información nutricional de la uva (10) .....	4
Tabla 1.2 Contenido Nutricional básico de uva. (11) .....	4
Tabla 3.1 Muestra los pesos en g de la cáscara, pulpa y semilla de la uva “Isabelita” después del proceso de liofilización y trituración .....	34
Tabla 3.2 Datos de Gráfico de Calibración de Ácido Gálico.....	35
Tabla 3.3 Contenido de mgGAE/L para la uva de Tarapoto.....	35
Tabla 3.4 Promedio de las concentraciones de gGAE/100g DM de pulpa, cáscara y semilla de uva “Isabelita”.....	36
Tabla 3.5 Contenido de flavonoides totales .....	38
Tabla 3.6 Contenido de antocianinas monoméricas totales .....	39
Tabla 3.7 Comparación del contenido de Taninos.....	41





## RESUMEN

En la actualidad la preservación de la biodiversidad es una de los temas con mayor importancia a nivel mundial, y siendo el Perú uno de los países con mayor variedad de ecosistemas y especies, la búsqueda de estudiar y conservar las especies criollas es una de las tareas principales a desarrollar como científicos. El departamento de San Martín se ubica en la ceja de selva peruana y goza de una gran variedad de especies animales y vegetales. Una de las especies vegetales más curiosas y representativas de la región es la uva “*Isabelita*”, cultivada casi exclusivamente en el distrito de San Antonio de Cumbaza, por lo que se desarrolla en condiciones geográficas y climáticas muy distintas al resto de uvas del Perú.

El objetivo de esta investigación fue en primera parte identificar molecularmente la variedad de uva “*Isabelita*”, representativa del distrito de San Antonio de Cumbaza dado que sólo ha sido clasificada morfológicamente. Se buscó evaluar el perfil fenólico de este fruto mediante la determinación de la cantidad de compuestos fenólicos totales (TPC), flavonoides totales (FC), antocianinas monoméricas totales (TMA), y taninos totales (TC).

El contenido de polifenoles totales del fruto estudiado fue de 0.4618 gGAE/100gDM, 1.9288 gGAE/100gDM y 3.1311 gGAE/100gDM para las porciones de pulpa, cáscara y semilla respectivamente. El contenido de flavonoides totales fue de 0.2278 gGAE/100gDM, 1.1232 gGAE/100gDM y 2.8962 gGAE/100gDM para las porciones de pulpa, cáscara y semilla respectivamente. El contenido de antocianinas monoméricas totales (TMA) fue de 11.8980 mg/100gDM, 219.3816 mg/100gDM y 3.4094 mg/100gDM para las porciones de pulpa, cáscara y semilla respectivamente. El contenido de taninos totales fue de 0.4115 gGAE/100gDM, 1.8390 gGAE/100gDM y 3.0946 gGAE/100gDM para las porciones de pulpa, cáscara y semilla respectivamente. La variedad de uva de San Antonio de Cumbaza presenta mayor similitud en la expresión genética mediante el uso de marcadores matK y rCBL con la especie *Vitis rotundifolia*.

Palabras Clave: Perfil fenólico, Uva, Flavonoides, Antocianinas, Taninos, Identificación molecular



## ABSTRACT

In the latest years the preservation of biodiversity has become one of the most important subjects worldwide and since Peru is one of the countries with the greatest ecosystem and species biodiversity, one of the paramount tasks as scientists is to study and preserve the native species in our country. The San Martin region is located on the rim of the Peruvian jungle and is home to a great variety of animal and vegetal species. One of most curious and representative species is the “*Isabelita*” grape, grown almost exclusively in the San Antonio de Cumbaza district, so that it develops in very different geographic and climatic conditions than the other grapevines grown in Peru.

The aim of this research was in firstly to identify the grape variety “*Isabelita*”, representative of the San Antonio de Cumbaza district by molecular methods given that it has only been classified according to its morphologic characteristics. Moreover, we sought to evaluate the grape’s phenolic profile by the determination of its total phenolic content (TPC), flavonoid content (FC), total monomeric anthocyanin content (TMA), and its tannin content (TC).

The studied grape’s total phenolic content was 0.4618 gGAE/100gDM, 1.9288 gGAE/100gDM and 3.1311 gGAE/100gDM for the pulp, skin and seed portions respectively. The flavonoid content was 0.2278 gGAE/100gDM, 1.1232 gGAE/100gDM and 2.8962 gGAE/100gDM for the pulp, skin and seed portions respectively. The total monomeric anthocyanin content was 11.8980 mg/100gDM, 219.3816 mg/100gDM and 3.4094 mg/100gDM for the pulp, skin and seed portions respectively. The tannin content was 0.4115 gGAE/100gDM, 1.8390 gGAE/100gDM y 3.0946 gGAE/100gDM for the pulp, skin and seed portions respectively. This grape variety native to San Antonio de Cumbaza has more similarity regarding its genetic expression with the *Vitis roduntifolia*, which was determined by the alignment with the matK and rcbL markers.

Keywords: Phenolic profile, Grape, Flavonoids, Anthocyanins, Tannins, Molecular identification

## INTRODUCCIÓN

El Perú es un país que cuenta con una gran biodiversidad puesta de manifiesto en todas las regiones que lo comprenden, tanto costa, sierra o selva. La selva peruana en particular cuenta con un sinnúmero de especies animales y vegetales que en la actualidad no han sido estudiadas a fondo, a pesar de ser utilizadas de manera tradicional y de forma extensiva por los pobladores de la región selvática.

Una de estas especies vegetales es la vid cultivada en el distrito de San Antonio de Cumbaza, en el departamento de San Martín. Esta variedad es de especial interés debido a las condiciones geográficas y climáticas en las que se desarrolla las que son muy diferentes a las condiciones tradicionales de cultivo de la vid en el Perú. El fruto de esta vid se encuentra disponible la mayor parte del año y es uno de los alimentos más consumidos en la región, ya sea en la forma del fruto mismo o preparado como helado, jugos, postres, bebidas alcohólicas u otros.

Es bien sabido que los compuestos fenólicos tienen importantes propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Además, intervienen en características sensoriales como el sabor, color y aroma, generando variaciones debido a su concentración incluso entre cultivares de la misma especie. A pesar de la enorme presencia que tiene esta uva en la dieta de la región, son escasos los estudios físico-químicos de este fruto, enfocándose más las investigaciones a la producción de derivados de la uva, especialmente la bebida fermentada representativa de la región llamada “*uvachado*”.

Es por esta razón que en la presente investigación se evalúan propiedades físico-químicas como el contenido fenólico, flavonoides, antocianinas y taninos; compuestos importantes en la dieta diaria de San Martín.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales

BLASTx: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales, para el análisis de aminoácidos traducidos de una cadena de ADN.

DM: Materia Seca

ExPASy: Sistema Experto de Análisis de Proteínas

FC: Contenido de Flavonoides

FW: Materia Fresca

GAE: Equivalentes de Ácido Gálico

nBLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos locales, para el análisis de nucleótidos.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico

SDS: Dodecilsulfato sódico

SSR: Repetición de secuencias simples

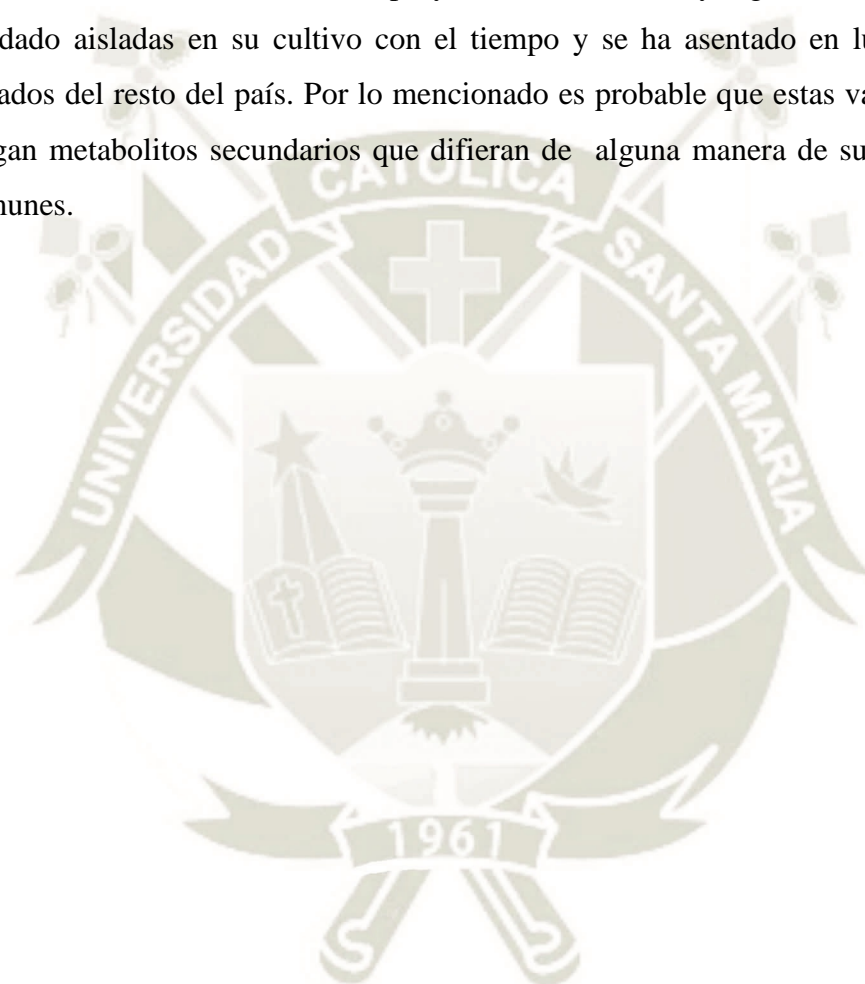
TC: Contenido de Taninos

TMA: Antocianinas Monoméricas Totales

TPC: Contenido Fenólico Total

## HIPÓTESIS

Dado de que al momento existen alrededor de 460 especies asociadas a la Vid y todas ellas han sido traídas desde Europa y medio Oriente, hay algunas de ellas que se han quedado aisladas en su cultivo con el tiempo y se ha asentado en lugares alejados o aislados del resto del país. Por lo mencionado es probable que estas variedades aisladas tengan metabolitos secundarios que difieran de alguna manera de sus variedades más comunes.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido fenólico e identificar molecularmente la uva denominada “Isabelita”, del distrito de San Antonio de Cumbaza, San Martín, Perú.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la cantidad de fenoles totales en porciones de cáscara, pulpa y semilla de la uva.
- Determinar el contenido de flavonoides totales en porciones de cáscara, pulpa y semilla de la uva.
- Determinar el contenido de antocianinas monoméricas totales en porciones de cáscara, pulpa y semilla de la uva.
- Determinar el contenido de taninos totales en porciones de cáscara, pulpa y semilla de la uva.
- Identificar molecularmente la uva denominada “Isabelita”.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 LA VID

El término vid se refiere a un conjunto de plantas que engloban alrededor de 460 especies asociadas, de las cuales 79 son aceptadas (1). La vid es una planta considerada un arbusto que se caracteriza por ser frondoso, capaz de soportar grandes rangos de temperatura: bajas temperaturas en invierno, y altas temperaturas en verano, siendo su ambiente óptimo un clima templado (2).

Es uno de los árboles frutales más cultivados a nivel mundial y ha sido aprovechada de numerosas formas. El producto más elaborado a partir de ella es el vino, que es un fermentado del fruto de la vid también llamado uva. El genoma de la vid es muy diverso debido a la influencia de factores como el clima, tipos de suelos, variación de temperaturas, precipitaciones, etc (3).

La vid requiere para su crecimiento ser cultivada en suelos sueltos debido a que estas condiciones le permiten a sus raíces, las cuales penetran profundamente, crecer libremente y desarrollarse sin dificultad. La variedad de lugares y por ende de suelos en los que se cultiva la vid ha dado lugar a un gran número de variedades de esta planta, cada una con características particulares las cuales se evidencian mayormente en el fruto de la misma, por ejemplo en el color, sabor y tamaño del fruto (4).

##### 1.1.1 TAXONOMÍA

Según el Sistema Integrado de Información Taxonómica, ITIS por sus siglas en inglés, la *vitis* se sitúa taxonómicamente de la siguiente manera (5):

**Reino:** *Plantae*

**Subreino:** *Viridiplantae*

**Infrareina:** *Streptophyta*

**Superdivisión:** *Embryophyta*

**División:** *Tracheophyta*

**Subdivisión:** *Spermatophytina*

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Superorden:** *Rosanae*

**Orden:** *Vitales*

**Familia:** *Vitaceae* (uvas)

**Género:** *Vitis L.* (uva)

**Especie:** *Vitis vinífera L.* (uva de vino)

**Subespecie:** *Vitis vinífera ssp. Sylvestris* (uva silvestre)

### 1.1.2 HISTORIA

La vid es una planta de origen europeo que fue introducida al Perú con la llegada de los conquistadores españoles. Algunos de los primeros registros históricos del Perú en tiempo de la conquista mencionan el cultivo de los llamados “frutos de Castilla” alrededor del año de 1540, luego de la fundación de las primeras villas y solares en tierras peruanas. Algunos de los primeros emplazamientos fundados fueron Jauja, Lima, Trujillo, Chincha, Arequipa, entre otros; destacándose que la gran mayoría de estos centros poblados se encontraban en la costa o en la sierra baja (6).

A finales de los años 40 del siglo XVI, el historiador Pedro Cieza de León menciona ya la presencia de viñedos durante su recorrido del Perú en lugares tales como Piura y Trujillo (7). No hay sin embargo una mención que evidencie la presencia del cultivo de la vid en ceja de selva hasta el año de 1939, fecha en la que se narra la historia de Doña Miguelina García de Reátegui, natural del distrito de San Antonio de Cumbaza. Según relata la historia, Doña Miguelina recibió la visita de unos extranjeros a los cuales extendió un refresco a base de la uva que ella cultivaba. Ellos, al notar que la bebida estaba fermentada,

le mencionan que se trataba de vino y le recomiendan agregarle azúcar y dejarlo fermentar unos días más. Así nacería la tradición vinícola y de producción de uvachado en la región (8).

No existe una crónica confiable que detalle la introducción de la vid en la región San Martín, pero se puede especular que, debido a la cercanía a otras regiones vinícolas en la época del virreinato como Chachapoyas, Trujillo y Huánuco; se introdujo de regiones cercanas en algún momento luego de la fundación española.

## **1.2 LA UVA**

La uva es el fruto de la vid y se caracteriza por ser una baya de pequeño tamaño, color variado entre tonos oscuros violáceos a colores verdes amarillentos, y que crecen en racimos de 30 uvas aproximadamente. Se suelen clasificar en base al uso que se le dan en uvas de mesa y uvas viníferas, siendo estas últimas las más estudiadas. A partir de la uva se elaboran diversos productos como vinos, vinagres, mermeladas, piscos, frutos secos, y otros (9).

### **1.2.1 CONTENIDO NUTRICIONAL**

Existe cierta diferencia en las sustancias presentes en las variedades oscuras y claras de la uva, debido sobre todo a la presencia de pigmentos como antocianinas y flavonoides que a su vez influirán en la capacidad antioxidante de las mismas. Sin embargo, se puede establecer que ciertos compuestos existen en diferente medida en ambos tipos de uva, tales como: calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, yodo, zinc, vitaminas varias, y compuestos fenólicos (10).

Tienen un muy bajo contenido de grasas y proteína; por el contrario, tienen un alto contenido de carbohidratos y agua, aunque estos también varían dependiendo de la especie de uva como se muestra en las tablas 1.1 y 1.2:

*Tabla 1.1 Información nutricional de la uva (10).*

<b>COMPOSICIÓN POR 100 GRAMOS DE PORCIÓN COMESTIBLE</b>	<b>UVA BLANCA</b>	<b>UVA NEGRA</b>
Calorías	63	67
Hidratos de carbono (g)	16.1	15.5
Fibra (g)	0.9	0.4
Potasio (mg)	250	320
Magnesio (mg)	10	4
Calcio (mg)	17	4
Vitamina B6 (mg)	0.1	0.1
Provitamina A (µg)	3	3
Ácido fólico (µg)	16	26

*Tabla 1.2 Contenido Nutricional básico de uva (11).*

<b>COMPOSICIÓN POR 100 GRAMOS DE PORCIÓN COMESTIBLE</b>	<b>UVA BLANCA</b>	<b>UVA NEGRA</b>
Calorías	63	61
Hidratos de carbono (g)	16.1	15.5
Fibra (g)	0.9	0.4
Proteína	0.6	0.6
Grasas	0	0

### **1.2.2 VARIEDAD LOCAL**

La uva cultivada localmente en el departamento de San Martín, y más específicamente en el distrito de San Antonio de Cumbaza, es llamada comúnmente uva “Isabella” o Borgoña negra. Es de color morado intenso oscuro, de forma redondeada y de pequeño tamaño, como se muestra en la Figura 1.1. En los mercados se le puede encontrar como “uva para jugo” o simplemente uva “Isabelita”; sin embargo, a pesar de encontrarse en cualquier mercado local, su cultivo es exclusivo del distrito de San Antonio de Cumbaza (2).

Con esta uva se elaboran jugos y helados artesanales, fermentados como vino y la bebida característica de la región: el uvachado. Este último producto resulta de una fermentación modificada por la adición de azúcar en el proceso. No existen sin embargo industrias dedicadas a la exportación o transformación no artesanal de esta uva, por lo que tampoco existen estudios detallados de la misma.



*Figura 1.1 Variedad de uva llamada “Isabelita” en el distrito de San Antonio de Cumbaza y toda la región de San Martín.*

### **1.2.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA UVA**

Las zonas productoras de vid más importantes en el Perú se encuentran en la costa donde destacan Ica, Lima, La Libertad y Piura con 43.10%, 19.87%, 15.47%, y 12.47% de la producción nacional respectivamente al año 2010. (11) Se desarrolla eficientemente en estas localidades debido a las condiciones agroclimáticas que poseen y que se adecúan positivamente a las condiciones óptimas de crecimiento del cultivo (12). La temperatura recomendada para el cultivo y crecimiento de la vid varía entre 7°C y 24 °C, siendo la vid muy susceptible a las heladas y a temperaturas por debajo de los 2°C.

Requiere también una humedad relativa de entre 70% a 80%; una humedad mayor presenta el peligro de infecciones criptogámicas producidas por hongos. Por otro lado, poca humedad produce que las temperaturas regulares a altas afecten a las hojas y racimos causando quemaduras.

Los suelos destinados para el cultivo de la vid deben ser franco-arcillosos y tener un pH casi neutro o ligeramente alcalino; entre 5.6 a 7.7. Deben también tener una buena capacidad de retención de agua ya que si bien la vid tiene cierta resistencia a las sequías, esta característica y su supervivencia dependerán del suministro de agua adecuado (11).

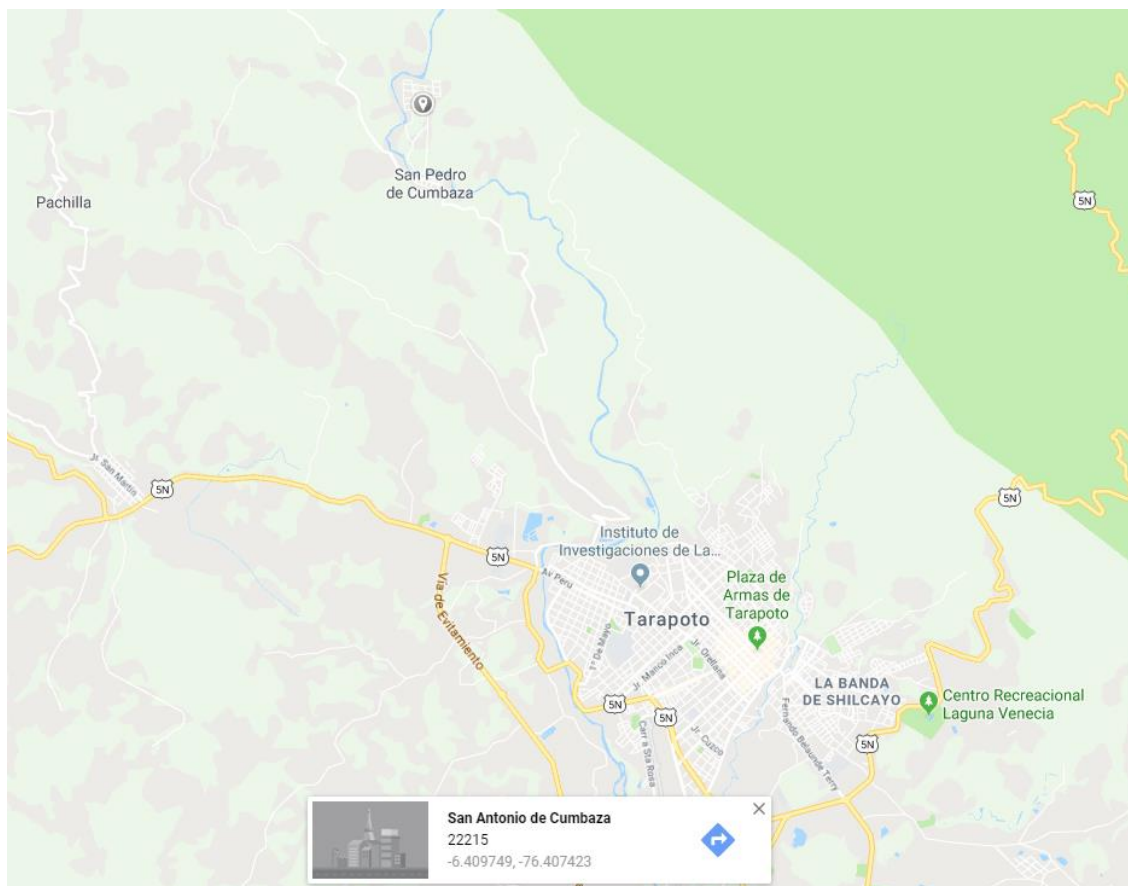
### **1.3 SAN ANTONIO DE CUMBAZA**

El distrito de San Antonio se localiza a 12km de la ciudad de Tarapoto en dirección NO, con coordenadas latitud sur 06°25'12", longitud oeste 76°24'16"; y a una altitud de 402 msnm. (13). Con una población estimada de 1340 habitantes al 2015, la capital San Antonio de Cumbaza es un pueblo pequeño pero sumamente importante por la producción exclusiva a este lugar de la uva “Isabelita”. La ubicación geográfica se muestra en la Figura 1.2.

Las condiciones climáticas y geográficas son bastante diferentes de la costa, con una humedad relativa anual de 82% y una temperatura anual promedio de 23.1 °C (con temperaturas mínimas de 20°C y temperaturas máximas de 32°C) se sitúa al extremo superior de los parámetros de siembra y cosecha de la vid. Una precipitación anual promedio de 1298.6mm le permite a estos viñedos crecer sin necesidad de un sistema de riego, beneficiándose de las lluvias continuas y abundantes lo que los hace también distintos de los viñedos tradicionales costeros (13).

El pueblo se encuentra en la cuenca media del río Cumbaza, lo que hace que sus suelos sean clasificados como ultisoles, suelos arcillosos y con pHs bajos; y alfisoles, suelos arcillosos pero altamente fértiles capaces de suministrar agua de manera eficiente.

En la localidad de San Antonio de Cumbaza predominan los suelos franco-arcillosos que poseen una cantidad elevada de arcilla en su composición lo que hace que puedan retener mejor la humedad, y en conjunto con los limos y arena los convierte en suelos de alta productividad agrícola (14) (15).



*Figura 1.2 Localización geográfica del distrito de San Antonio de Cumbaza.*

El rango de pH de la zona es de 4 a 6.5, siendo éste muy distinto del pH de los suelos utilizados para el cultivo de la vid en la costa. Esta acidez por lo general generaría suelos que son de regular calidad para la agricultura, sin embargo en la zona existe un gran cultivo de vid y otros árboles frutales. Entre los otros productos que se cultivan en la zona se encuentran el arroz seco, frijol, maíz, plátano, yuca, maní, hortaliza, piña, café y algodón (14). Frente a la plaza principal que se muestra en la Figura 1.3 existe incluso un establecimiento de bebidas fermentadas de esta uva, el cual pertenece a una familia local y es un ejemplo claro de la producción artesanal de vinos y uvachados representativos de la zona. Es de esta zona que camiones de carga llevan las uvas a los mercados de Tarapoto aunque es importante también precisar que los vinos y uvachados elaborados en San Antonio de Cumbaza tienen especial acogida en el público tarapotino.



*Figura 1.3 Distrito de San Antonio de Cumbaza, lugar donde se cultiva la uva “Isabelita”*

Existen en el distrito de San Antonio de Cumbaza terrenos extensos destinados al cultivo de la vid pero su mantenimiento no es controlado sino más bien es dejado a las condiciones climáticas propias de la región, donde las lluvias frecuentes y la alta humedad favorecen el crecimiento de los cultivos. Estos terrenos sin embargo no son los únicos dedicados a la producción de la uva “Isabelita”, sino que en el pueblo de San Antonio de Cumbaza existen numerosas viviendas que poseen huertos con ramales de vid mostrados en la Figura 1.4; más aún, cada vivienda cultiva la vid y elabora a partir de ella el producto característico de la zona: el uvachado.



*Figura 1.4. Parrales de uva “Isabelita” en el distrito de San Antonio de Cumbaza.*

## 1.4 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula orgánica compleja que es la base de la organización informacional de la célula, teniendo codificada en ella las instrucciones para la construcción de proteínas y por ende de macroestructuras celulares. Una molécula de ADN está constituida por dos cadenas largas de polinucleótidos, los que a su vez presentan 4 variaciones. La estructura de estos nucleótidos se caracteriza por tener un anillo heterocíclico de Carbono y Nitrógeno, un azúcar de 5 carbonos llamada desoxirribosa, y un grupo fosfato en la posición 5' del azúcar. Las 4 variaciones de nucleótidos tienen los nombres de Adenina, Guanina, Timina y Citosina; dándoseles las abreviaciones A, G, T, y C respectivamente. Es esta codificación del posicionamiento y orden de los nucleótidos la que constituye la carga informativa de la molécula. Adicionalmente, las bases nitrogenadas en cuestión pueden ser purinas, bases con un anillo de 5 y otro de 6 lados fusionados; o pirimidinas, bases con un solo anillo de 6 lados (16) (17).

El ADN presenta una estructura tridimensional en la forma de una doble hélice unida por enlaces puente de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de las cadenas. Para mantener una estructura estable, siempre una pirimidina se une con una purina estableciéndose así las uniones Adenina-Timina (A-T), y Guanina-Citosina (G-C) (17).

### 1.4.1 HISTORIA

El primer indicio de la presencia de una molécula contenedora de información en el núcleo celular fue descubierto en 1869 por el químico alemán Friederich Miescher, quien encontró una molécula a la que denominó “nucleína”. Pasarían muchos años para que se revelase la identidad de esta nucleína como el ácido desoxirribonucleico (ADN).

En la década de 1950 se publicaron los resultados de la investigación llevada a cabo por los científicos Francis Compton Crick y James Watson acerca de la estructura molecular de los ácidos nucleicos. Utilizando la tecnología de rayos X lograron identificar la estructura tridimensional helicoidal del ADN, descubrimiento que los llevaría a ganar el premio Nobel en Medicina en 1962. Cabe mencionar que este descubrimiento no habría

podido llevarse a cabo sin el aporte científico de la química Rosalind Franklin, cuyo trabajo en cristalografía y rayos X facilitó el descubrimiento del ADN (18).

Este descubrimiento cambiaría de manera radical el entendimiento de la transferencia de información en la célula y la herencia genética, revolucionando muchos campos de la biología y creando enteramente otros como la biología molecular y la genética. Así mismo, se desarrollaron nuevas tecnologías en base al conocimiento del ADN enfocadas a la decodificación de la información contenida en esta molécula. Una de estas tecnologías que surgieron en los años posteriores a la tesis de Crick y Watson sería la de la secuenciación molecular del ADN. Esta tecnología fue desarrollada por Frederick Sanger en 1977 cuando se introdujo el concepto de complementariedad de cadenas entre las dos hélices del ADN. Sanger estableció que existía afinidad entre moléculas de Adenina (A) y Timina (T); y entre Guanina (G) y Citosina (C). Estas relaciones seguían también un orden que serviría como instrucciones para la producción de proteínas. El determinar este orden se convirtió en la base de la secuenciación genética y forma parte hoy en día de una serie de importantes herramientas en el ámbito clínico y forense (19) (17).

En las últimas décadas se han logrado grandes avances en el entendimiento y aplicación de las técnicas moleculares para diversas áreas, al mismo tiempo de abaratar los costos de la investigación aplicada en este campo. Un producto importante de esta nueva era de innovación en investigación genética es la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual permite clonar rápida y eficientemente segmentos altamente específicos de ADN para su posterior uso. Es esta innovación la que permitió el desarrollo de uno de los proyectos más ambiciosos en la historia de la ciencia moderna: el proyecto Genoma Humano. El proyecto Genoma Humano buscaba conocer en detalle toda la información genética contenida en el ADN humano para poder entender sus variaciones y plantear soluciones a enfermedades genéticas, y tener un mayor entendimiento de la historia evolutiva del ser humano (19).

En los últimos años, nuevas tecnologías han aparecido y están conduciendo a un nuevo horizonte de posibilidades en el campo de la genética y la biología molecular. Técnicas

como el CRISPR y NGS prometen ser la clave para la resolución de grandes problemas a nivel mundial como la salud y la hambruna, aunque sus verdaderos alcances recién podrán ser apreciados en la siguiente década (20).

### **1.4.2 IMPORTANCIA**

La información que posee el ADN está codificada en base al orden en el que aparecen en una cadena dada los diferentes nucleótidos que conforman la molécula. De esta forma, el código ordenado de secuencias A, T, G o C puede ser leído y usado por organelos de la célula para la producción de proteínas. El ribosoma en particular se encarga de producir aminoácidos y proteínas en base a un ácido nucléico (ácido ribonucleico mensajero o ARNm) transformado en el núcleo y exportado al citoplasma. Las proteínas producidas sirven para una miríada de funciones como intermediarios en rutas metabólicas, funciones estructurales, regulación enzimática, entre otros. Sin embargo, no todo el código genético es útil; aproximadamente sólo el 5% de éste codifica proteínas y el otro 95% aunque no codifica proteínas está encargado entre otras cosas de regular la lectura del ADN e interactuar con proteínas asociadas (21) (17).

Esta porción del ADN no codificante ha sido aprovechada para establecer diferencias en el código genético que han llevado a la identificación de especies tanto eucariotas como procariotas. Existen secciones del ADN que mantienen un grado de similitud entre especies y es justamente la diferencia en el código genético de diversas muestras la que establece un orden taxonómico más específico que con las técnicas biológicas clásicas. (21). Existen además otras causas para la existencia de diferencias en el código genético; desde mutaciones hasta la influencia del ámbito geográfico en el que se desarrolla el individuo que obliga al ADN a adaptarse y a producir nuevas proteínas para su supervivencia. De esta forma, se establecen las diferencias de especies y subespecies en base a la cantidad porcentual de nucleótidos distintos en zonas específicas del ADN (22).

### **1.4.3 EXTRACCIÓN DE ADN**

Para cualquier tecnología que haga uso de la molécula de ADN es preciso primero extraer y purificar el material genético. Éste está contaminado por lo general con trozos pequeños de ADN no incluidos en la cadena, proteínas, ARN, trazas del buffer de extracción, entre

otros; por lo que es importante obtener ADN de la mayor calidad posible. Se tienen que tener en cuenta ciertos factores al momento de iniciar una extracción de ADN ya que aunque la molécula es estable, el tamaño de la misma influye en su fragilidad: mientras más grande sea la cadena menor es la dificultad necesaria para degradarla. Otros criterios que deben considerarse son el tipo de ácido nucleico, el organismo de origen, la fuente de obtención, y la técnica en la que se utilizará el ácido nucleico (23).

Independientemente del método de extracción utilizado para una muestra en específico, todos los protocolos pueden dividirse en partes similares en la que se cumple una función específica en el proceso de extracción-purificación. De esta forma se muestra en la Figura 1.5 (23) (24).

## **1.5 SECUENCIAMIENTO**

Con el descubrimiento del ADN se propusieron también las primeras tecnologías capaces de aprovechar la información contenida para ampliar el entendimiento de la creación de proteínas, y determinar qué es lo que hace una especie distinta a otra. Sabiendo que la información contenida en el ADN codifica las características de un organismo vivo, científicos en los años 70 se propusieron extraer esa información y transformarla de manera que pudiese ser leída y manipulada eventualmente.

### **1.5.1 MÉTODO DE MAXAM-GILBERT**

El primer método que satisfactoriamente consiguió secuenciar cadenas de ADN fue el desarrollado por los científicos Allan Maxam y Walter Gilbert en 1977 el cual se basa en numerosas reacciones químicas entre los componentes de la cadena con sustancias químicas para obtener fragmentos de ADN marcados radioactivamente (25). El método para diferenciar las bases nitrogenadas está fundamentado en las características estructurales de las mismas: se usa dimetilsulfato para atacar las purinas e hidracina para

atacar

las

pirimidinas.

## LISIS CELULAR

- Se busca liberar el contenido genético de la célula a través de la utilización de agentes mecánicos, químicos o enzimáticos; siendo los más comunes el Tritón y el SDS
- Es importante lograr la fragmentación del tejido sin dañar el ADN para que pueda ser purificado en las siguientes etapas.

## PURIFICACIÓN

- Se pretende separar del ADN contaminantes como proteínas, ARN, iones metálicos, metabolitos varios. Para lograr esto se hace uso de compuestos tales como cloroformo, fenol, alcohol isoamílico, etc.
- En esta etapa se forman fases que contienen diversos contaminantes afines a las sustancias usadas, pero generalmente el material genético se quedará en la fase superior.

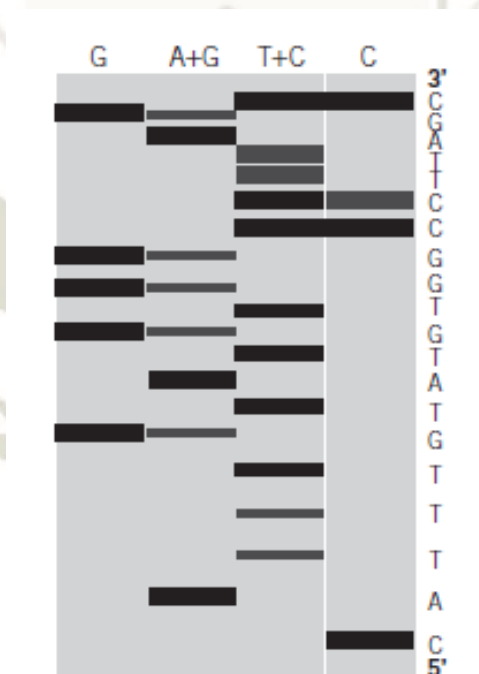
## PRECIPTACIÓN Y LAVADO

- Se necesita, luego de la etapa anterior, precipitar el ADN disuelto en la fase orgánica superior para que esté disponible de forma soluble en los procedimientos posteriores de electroforesis o cualquier otro que se desee llevar a cabo. Para esto se usa etanol absoluto frío o isopropanol, en los cuales el ADN es insoluble.
- Finalmente, se deben realizar varios lavados con etanol a diferentes concentraciones con el propósito de eliminar trazas de cualquier contaminante y aprovechando la facilidad de evaporación de estos alcoholes.

*Figura 1.5 Proceso de Extracción de ADN*

Luego de un tratamiento con NaOH 1.0M a 90°C se liberan los residuos los fragmentos de ADN que contendrán purinas dejando únicamente bases A y G. Para purificar los fragmentos de pirimidinas se utiliza un tratamiento a 0°C en condiciones ligeramente ácidas con HCl 0.1M. Estos tratamientos otorgan fragmentos con la presencia fuerte de Guanina para las purinas, y Citosina para las pirimidinas; sin embargo, es preciso repetir los tratamientos evitando la degradación de las otras bases (Adenina y Timina respectivamente) para poder obtener un patrón del que se pueda evidenciar la composición de bases nitrogenadas (23) (26).

Una vez realizados los tratamientos cada uno de los mismos es colocado en un tubo de ensayo y corrido en un gel de poliacrilamida y las bandas resultantes permiten el análisis del código genético como se muestra en la Figura 1.6.



*Figura 1.6. Gel de poliacrilamida junto con las bandas de ADN distribuidas según el peso molecular de cada una (21).*

### 1.5.2 MÉTODO SANGER

Frederick Sanger desarrolló en 1977 otro método para el secuenciamiento de cadenas de ADN pero basándose en otro principio de las mismas. A diferencia de Maxam y Gilbert quienes se basaron en reacciones de sustancias químicas con las bases nitrogenadas, Sanger fundamentó su método en la utilización de un azúcar distinto al que posee naturalmente el ADN. El ADN está compuesto por una estructura del azúcar desoxirribosa, el cual a su vez es una forma de ribosa (el azúcar componente del ARN); mientras la ribosa tiene grupos hidroxilos en sus carbonos 2 y 3, la desoxirribosa posee únicamente un grupo hidroxilo en el carbono 3. Sanger propuso la utilización de un azúcar llamado didesoxirribosa, el cual no tiene grupos hidroxilo ni en el carbono 2 ni en el carbono 3. Esta didesoxirribosa unida a los nucleótidos forma los llamados ddNTP (didesoxinucleótidostrifosfatados) los cuales tienen la característica de terminar inmediatamente la formación de la cadena de ADN. Es esta característica la que fue utilizada por Sanger para generar fragmentos de longitud variable que inevitablemente terminasen en un ddNTP. Los diferentes fragmentos luego eran corridos en un gel de poliacrilamida donde se observaba la variación en tamaño uno de otro, siendo ese tamaño variable exactamente 1 nucleótido y a partir de esto se elaboraba la cadena principal (25) (27).

Este método es más preciso que el método químico empleado por Maxam y Gilbert y es el más usado actualmente con ciertas modificaciones, pudiendo aplicarse a un gran número de muestras de manera relativamente sencilla (26).

### 1.5.3 MÉTODOS MODERNOS

Con los años se han desarrollado nuevas tecnologías que aprovechan de manera más efectiva características de la cadena de ADN, o que incorporan elementos para un mejor reconocimiento de las bases implicadas. Sin embargo, actualmente es de suma importancia el tipo de muestra que se desea analizar pues existen numerosos y muy diversos tipos de secuenciamiento específicos para plantas, animales, bacterias; e incluso específicos para una familia de organismos.

Además de la variación en los protocolos acorde al tipo de muestra existen también diferencias al momento de visualizar o detectar los cambios que se hayan efectuado en la molécula (como la inclusión de moléculas radioactivas o fluorescentes). Entre algunos de los métodos más usados usualmente se encuentran la pirosecuenciación, un método que utiliza una reacción enzimática para generar luminiscencia y detectar nucleótidos basados en ella; secuenciamiento “*shotgun*”, método que se basa en fragmentar el ADN para secuenciar pequeños segmentos de manera más fácil; secuenciamiento “*Illumina*”, que utiliza fluorescencia en la adición de un nucleótido a la vez y la detección de la señal del mismo; entre otros (28).

La importancia del secuenciamiento del ADN es tan grande que los métodos moleculares se han extendido a campos antes impensados, desde la criminología hasta la nutrición. Cada área a la que apoya la biotecnología requiere una porción de ADN distinta. Por ejemplo, si se desea determinar si un paciente tiene una enfermedad se requiere ADN extraído de un tejido afectado por la misma. En el caso de la determinación de especies nuevas, la porción ideal de ADN a analizar depende mucho del organismo cuyo origen se desee conocer. Generalmente la distinción se hace entre organismos procariontas y eucariotas debido en parte a la forma en la que se encuentra el ADN en cada uno de ellos, y en parte al empaquetamiento de la molécula dentro del organismo. Para identificar especies procariontas se suele utilizar marcadores genéticos 16S que corresponden a la subunidad pequeña de los ribosomas procariontas. Por otro lado, en el caso de eucariotas el secuenciamiento es más complicado pero muchas veces utiliza marcadores genéticos 18S el cual homólogo a la unidad 16S procarionta. Cada una de las porciones ribosomales contiene a su vez regiones específicas para la tarea que se quiera realizar u organismo que se desee secuenciar; he de ahí la existencia de un sinfín de marcadores o “*primers*” (25) (23) (28).

En el caso de la vid existen ya protocolos y servicios estandarizados que utilizan marcadores para RAPD, amplificación aleatoria de ADN polimórfico por sus siglas en inglés, o marcadores SSR, repeticiones de secuencia simple por sus siglas en inglés. Ambos métodos implican la utilización de no sólo un primer o marcador sino una serie de

varios marcadores cortos; así como la posición, orden y la frecuencia de aparición de estos fragmentos en la cadena para compararlos con bases de datos de genomas completos. Sin embargo, la necesidad de utilizar varios marcadores y una tecnología avanzada hacen de este método uno relativamente caro y más utilizado en Europa. Una alternativa al método específico para *vid* es el secuenciamiento y comparación de secuencias 18S de muestras no contaminadas debido a que la *vid* es también un organismo eucariota (29) (30).

## 1.6 CONTENIDO FENÓLICO

Todo alimento tiene como constituyentes estructurales a los carbohidratos, lípidos y proteínas, pero contienen también cantidades menores de otros compuestos como ácidos, vitaminas y minerales, pero muy a menudo hay componentes en cantidades tan pequeñas que pueden pasar desapercibidos en una apreciación cotidiana; un grupo importante de estas sustancias son los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas como producto de diferentes rutas metabólicas y son producidos básicamente por dos razones: o bien son indispensable para el funcionamiento de la planta, o bien la planta utiliza estos compuestos como mecanismo de defensa bajo situaciones de tensión o peligro (31).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos tienen como molécula principal al fenol. El fenol está compuesto de un anillo aromático llamado fenil el cual está unido a un grupo hidroxilo (OH). A partir de esta molécula base y junto a la estructura que forman se clasifican en: fenoles simples, ácidos fenólicos, entre los que están el ácido benzoico y los ácidos cinámicos; flavonoides dentro de este grupo se encuentra a los antocianos destacando las antocianinas y antocianidinas; taninos, que está conformados por catequinas y leucocatequinas; y por último los flavonoles destacan las quercetinas y miricetinas (32).

Debido a su estructura estos compuestos son considerados antioxidantes importantes para la dieta del ser humano y se encuentran presentes en diferentes productos como frutas, hortalizas, raíces y cereales. Miles de estos compuestos juegan un papel importante en el desarrollo de la planta; por ejemplo, si una planta está expuesta directamente al estrés de

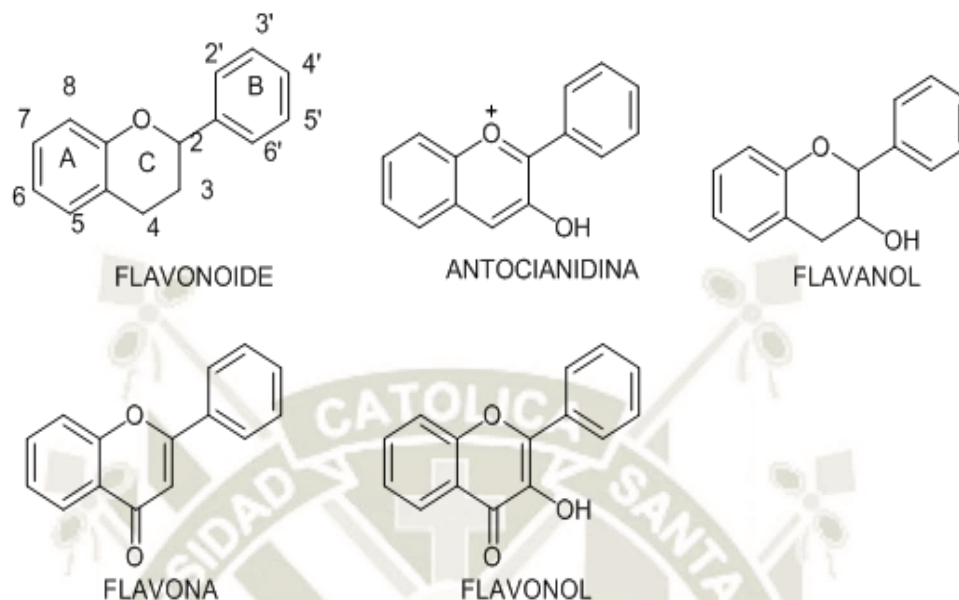
la radiación ultravioleta, ésta generará más polifenoles para protegerse de la exposición. Otro caso se da cuando la planta necesita protegerse contra patógenos. Muchos de estos compuestos son responsables del color y sabor de la planta como por ejemplo la astringencia de algunas frutas y hortalizas.

### 1.6.1 FLAVONOIDES

La palabra flavonoide deriva del latín “*flavus*” que significa amarillo, y son compuestos parcialmente responsables del color de las flores y el fruto de una planta. En 1930 el científico Premio Nobel Szent-György aisló la citrina de la cascara de limón, una sustancia que tenía como característica la permeabilidad de los capilares y gracias a su aislamiento se descubrió a los flavonoides que fueron en principio considerados vitaminas, sin embargo 20 años más tarde se descartó esta idea (33).

La estructura química de los flavonoides, mostrada en la Figura 1.7 consta principalmente de tres anillos: un anillo benzopirano 2-fenil junto a un anillo dihidroxilados fenólicos en las posiciones 5 y 7, un segundo anillo fenólico que puede contener O-CH<sub>3</sub> y que es generalmente mono-hidroxilado, orto-dihidroxilados o vic- trihidroxilados, y el tercer anillo que puede ser un anillo heterocíclico. Por las características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en cuatro grupos: primeramente los flavanos que se caracterizan por tener como principal compuesto a la catequina; en segundo lugar, los flavoles cuyo compuesto representativo es la quercitina; luego las flavonas; y por último a las antocianidinas (32) (34).

Gracias a numerosos estudios se ha logrado identificar más de 5 000 mil tipos de flavonoides (35), los cuales se pueden encontrar en diferentes tipos de alimentos habitualmente consumidos por el ser humano tales como: frutas, verduras, cerveza, vino, té verde o negro, soja, entre otros. Otra forma de encontrar flavonoides es en los extractos de plantas como arándanos, ginkgobiloba, cardo, mariano o crataegus.



*Figura 1.7 Estructura básica de un flavonoide y sus tipos.*

Gran parte de estas plantas contienen este tipo de compuesto porque necesitan tener control de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación de las plantas. También cumple la función antifúngica y bactericida como defensa a diferentes patógenos, además de tener una importante capacidad para fijar metales; sin embargo su principal característica es otorgar coloración a la planta.

### 1.6.2 ANTOCIANINAS

Las antocianinas pertenecen a la familia de los flavonoides y están compuestos por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de 3 carbonos. Los anillos de las antocianinas, mostrados en la Figura 1.8, son denominados A y B respectivamente y variaciones en sus estructuras dan origen a diferentes antocianinas como por ejemplo: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delphinidina (Df). A su vez, cada nuevo compuesto produce un color diferente; por ejemplo si hay un incremento en la hidroxilación produce la tonalidad azul, mientras que un incremento en la metoxilación produce coloraciones rojas (36).

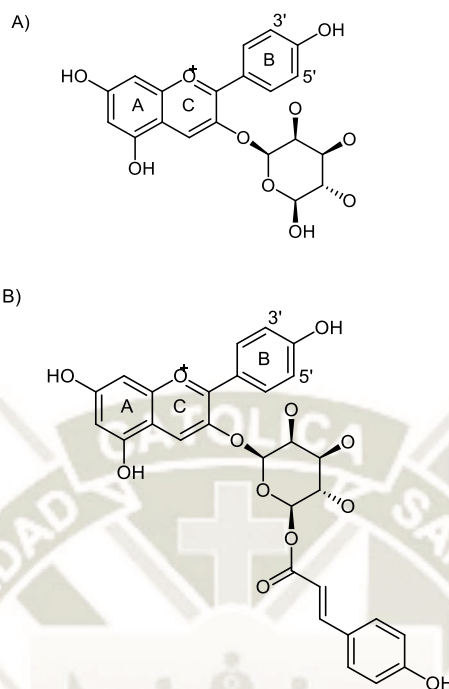


Figura 1.8 Estructura química de las principales antocianinas en *Vitis vinífera* L. A) 3-glucósido B) 3-p-cumaroil glucósido (37)

Investigaciones han demostrado que antocianinas de la uva, específicamente de los vinos, presentan una capacidad antioxidante en contra de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y contra radicales peróxido, y superóxido ( $O_2$ ) (38) (39).

Finalmente, las antocianinas son pigmentos naturales que brindan color a la planta por sus diferentes funciones y es un pigmento potencial con alto interés económico porque puede reemplazar los colorantes sintéticos.

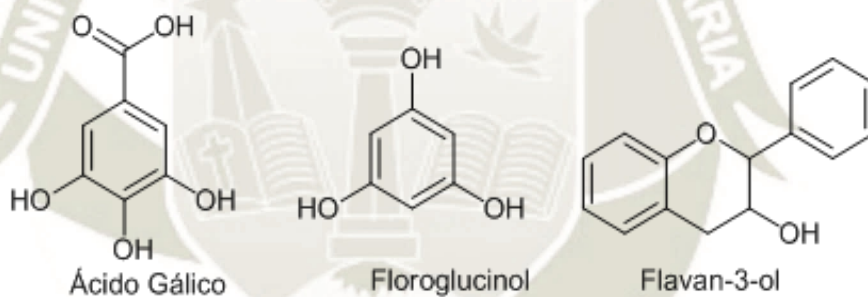
### 1.6.3 TANINOS

La investigación en temas de agricultura, la ecología, la alimentación y la medicina tomaron mayor auge desde 1950 después de la segunda guerra mundial. El estudio de los alimentos y la relación que tenían con la medicina o la salud eran de gran importancia lo que motivó el estudio de los compuestos fenólicos. Como parte de estos compuestos se

encuentra un subgrupo importante que tiene la característica de dar astringencia a ciertos alimentos y es conocido como el grupo de los taninos.

Al inicio, los taninos extraídos a partir de plantas eran utilizados en el proceso de curtido donde se convierte la piel animal de los animales en cuero, aprovechando la característica principal que tienen los taninos: unirse a proteínas y precipitarlas. Los taninos se encuentran principalmente en la corteza de una planta, en las hojas y frutos; además cumple la función de proteger a la planta contra alguna infección y de animales herbívoros (40).

Los taninos son compuestos relativamente complejos de origen vegetal los que clasificados en base a su estructura son: ácido gálico, ácido elágico, flavan-3-oles y floroglucinol como se muestra en la figura 1.9.



*Figura 1.9 Estructuras básicas de los diferentes tipos de taninos*

Sin embargo, también dependiendo a la capacidad que tienen de unirse a las proteínas u otras macromoléculas se pueden clasificar en: taninos condensados, hidrolizables y complejos. Los taninos condensados están formados por numerosas moléculas de flavan-3-ol, y también se les denomina como taninos no hidrolizables por la dificultad que tienen al ser hidrolizados. Este tipo de compuesto se encuentra en las plantas para cumplir la función natural de defenderse contra agentes extraños, pero al ser ingeridos dan la característica de astringencia a algunos tipos de frutos y plantas (41).

Los taninos hidrolizables en estos grupos: elagitaninos no conjugados, galotaninos y ácido elágico junto a sus formas conjugadas. Los elagitaninos se encuentran en frutos como el

mango y las bayas, mientras que los galotaninos se encuentran en uvas, fresas y frambuesas. Todos ellos se caracterizan por la capacidad antioxidante y antibacterial.

Los taninos complejos contienen principalmente como unidad a la catequina la cual se vincula con los galotánios o elagitaninos. Estos compuestos tienen la característica y la ventaja de precipitar más fácilmente proteínas que los taninos pequeños; esto gracias a su alto peso molecular. Estos taninos se pueden encontrar en los productos añejados como el vino tinto (42).

#### **1.6.4 IMPORTANCIA**

Los compuestos fenólicos tienen una gran importancia tanto para industria química y la industria alimentaria ya que ambas tienen un gran interés en los antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos que cumplen la función de evitar el estrés oxidativo de las células, es decir su envejecimiento y dentro de este grupo están los flavonoides, antocianinas y en especial importancia el resveratrol. Los compuestos fenólicos que sirven como colorantes son también de suma importancia pues pueden servir para reemplazar pigmentos sintéticos. Algunos de ellos son las antocianinas y los flavonoides.

Muchas industrias necesitan compuestos que puedan formar complejos con las proteínas, almidón o enzimas digestivas por lo que los taninos son una opción muy viable por sus características. En conclusión, los compuestos fenólicos, los que se encuentran en numerosas frutas, hortalizas y cereales, pueden cumplir un gran número de funciones beneficiosas a nivel biológico y la obtención de los mismos es un campo de estudio importante para el desarrollo de empresas modernas dedicadas al área alimentaria o de la salud; más aún, todos estos compuestos se pueden encontrar con facilidad en cualquier tipo de alimento como: frutas, hortalizas y cereales, lo importante es consumirlas adecuadamente.

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 MATERIALES

##### 2.1.1 MATERIA PRIMA

Uva “Isabelita” procedente del distrito de San Antonio de Cumbaza, departamento de San Martín; proporcionada gentilmente por el Ing. César Arévalo Hernández, Jefe del Departamento de Suelos del Instituto de Cultivos Tropicales – Tarapoto.

##### 2.1.2 EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza analítica (*Adventure™ OHAUS AR2140*)
- Liofilizador (*LabConco Triad*)
- Equipo Soxhlet, balón de muestra, condensador, mangueras.
- Cocinilla eléctrica.
- Termómetro (*Giardino*)
- Baño María (*HW Kessel SA*)
- Espectrofotómetro (*BOECO Germany S-200*)
- Potenciómetro (*Hannainstruments*)
- Vórtex (*Genie 2*)
- Centrífuga refrigerada (*Mikro 200R hettich*)
- Mortero
- Micropipetas (*BOECO Germany*), de volumen 100µL.-1000µL.; 20µ-200µL.; y 2µ-20µ.

##### 2.1.3 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o superior, provistos por la Universidad Católica de Santa María.

- Solución hidroalcohólica al 66%.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- Solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 25%.

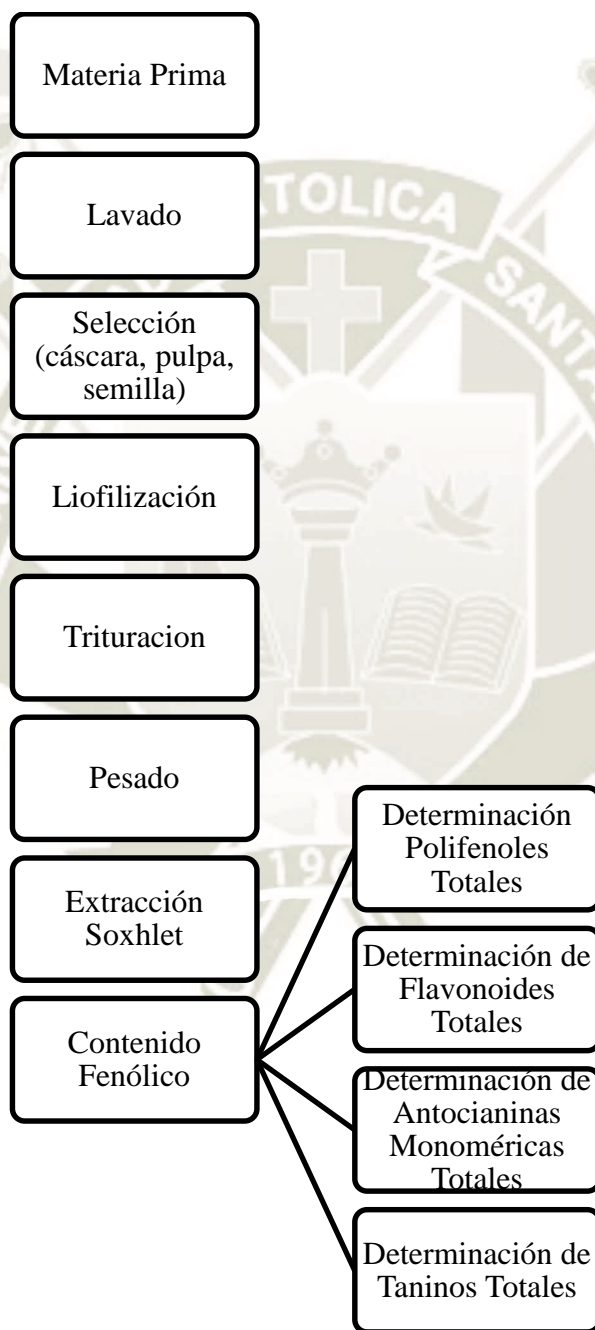
- Ácido Gálico.
- Solución de HCl al 25%.
- Solución de Formaldehído al 37%.
- Solución de KCl 0.025M, pH 1.0.
- Solución de Acetato de Sodio 0.4M, pH 4.5.
- Solución de HCl 1N.
- Solución de NaOH 1N.
- Solución de Polivinilpirrolidona (PVP), pH 3.0.
- Solución de etanol 70%.

#### **2.1.4 MATERIALES DE VIDRIO Y OTROS.**

- Tubos de ensayo.
- Pipetas de 1.0, 5.0, y 10mL.
- Fiolas de 25, 50, y 100mL.
- Baguetas.
- Vaso de precipitados de 50 y 100mL.
- Probetas de 50 y 100mL.
- Matraz de 25mL.
- Embudo de vidrio.
- Tubos eppendorf de 1.5mL.
- Propipeta.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Goteros de 50mL.
- Botellas de vidrio oscuras.
- Papel aluminio.
- Papel filtro Whatman.
- Espátula de laboratorio.
- Puntas para micropipeta.

## 2.2 MÉTODOS

Para el presente trabajo se procedió en primer lugar al tratamiento de la materia prima con el fin de separar los componentes de interés en ella, siendo estos las porciones de cáscara, pulpa y semilla. Luego se procedió a las pruebas acorde al flujograma experimental mostrado en la Figura 2.1.



*Figura 2.1 Flujograma experimental para la determinación del contenido fenólico de la uva "Isabelita"*

## **2.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO DE LA UVA DENOMINADA “ISABELITA”**

### **2.2.1.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se desarrolló durante los meses de Noviembre del año 2017 a Mayo del año 2018. El análisis del contenido fenólico de la uva denominada “Isabelita” se realizó en los laboratorios H-301 y H-203 de la Universidad Católica de Santa María. El secueamiento genético de la especie se realizó a través de la empresa de BioAL S.A.C, ubicado en Av. Santiago de Surco 3664, Santiago de Surco, Lima, Perú.

### **2.2.1.2 RECEPCIÓN DE MATERIA PRIMA**

La materia prima en forma de uva denominada “Isabelita” fue provista por el Ing. César Arévalo Hernández del Instituto de Cultivos Tropicales, y fue adquirida de los viñedos del distrito de San Antonio de Cumbaza, departamento de San Martín. Fue enviada en un contenedor para evitar su degradación durante el viaje. Las muestras se utilizaron inmediatamente a su llegada.

#### **A) LAVADO**

Todas las muestras fueron lavadas primeramente con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 30 segundos, y luego con una solución de etanol al 70% por 3 minutos.

#### **B) SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA**

Se separaron las uvas de los racimos y posteriormente se separó la muestra en 3 fracciones: cáscara, pulpa y semillas. Esto se realizó en condiciones estériles con ayuda de un bisturí y bolsas de cierre hermético para su almacenamiento. Cada porción se almacenó en una bolsa independiente.

#### **C) PESADO**

Las muestras separadas se pesaron inmediatamente en una balanza analítica *Adventure™ OHAUS AR2140*, habiéndose pesado anteriormente una bolsa hermética vacía. Una vez pesadas, las fracciones fueron almacenadas a -2°C hasta el momento de su utilización.

#### **D) LIOFILIZACIÓN**

Las muestras de Tarapoto fueron liofilizadas, proceso que se llevó a cabo en un liofilizador *LabConco Triad*. Se colocó la mitad del material fresco de cada porción distribuido adecuadamente en la bandeja del liofilizador. Se realizaron 2 liofilizaciones seguidas con condiciones diferentes; las condiciones de la primera liofilización fueron las siguientes:

- Presión: 0.1 mm Hg
- Tiempo: ciclo de 24 horas.
- Precongelamiento:  $-80^{\circ}\text{C}$  por 3 horas.
- Congelamiento:  $-40^{\circ}\text{C}$  por 8 horas.
- Secado primario:  $10^{\circ}\text{C}$  por 6 horas.
- Velocidad de calentamiento:  $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Las condiciones de la segunda liofilización, exclusiva para la porción de pulpa, fueron:

- Presión: 0.1 mm Hg
- Tiempo: ciclo de 24 horas.
- Precongelamiento:  $-80^{\circ}\text{C}$  por 3 horas.
- Congelamiento:  $-20^{\circ}\text{C}$  por 8 horas.
- Secado primario:  $20^{\circ}\text{C}$  por 6 horas.
- Velocidad de calentamiento:  $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Los productos resultantes se almacenaron en nuevas bolsas herméticas a  $-2^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. El proceso de preparación de las muestras se ilustra en la Figura 2.2.

#### **E) TRITURACIÓN**

La trituración de la porción de semilla se hizo en un mortero lavado cuidadosamente hasta obtener fragmentos pequeños. Este procedimiento aumenta considerablemente la superficie de acción para la extracción futura.

Las trituraciones de las porciones de pulpa y cáscara se realizaron con ayuda de un bisturí hasta obtener fragmentos pequeños. Estos fragmentos fueron utilizados inmediatamente para la extracción Soxhlet.

### 2.2.1.3 EXTRACCIÓN SOXHLET

Para la extracción Soxhlet se trabajó con una mezcla etanol-agua al 66% durante 93 minutos. Se utilizaron 10g de cada muestra (cáscara, pulpa, semilla) pesados en una balanza analítica *Adventure™ OHAUS AR2140*, con 250mL de solvente para cada proceso de extracción. El tiempo de extracción se determinó basándose en el protocolo descrito por Rajha y otros (43) siendo este de 93 minutos a 93°C.



Figura 2.2 Preparación de la uva Isabelita para el proceso de Liofilización

Las características geográficas del lugar de la investigación de Rajha son similares a las de Arequipa por lo que no se consideraron ajustes extras a los parámetros de extracción, sobre todo porque se sabe que temperaturas elevadas y tiempos largos de extracción pueden llegar a dañar los compuestos fenólicos (43) (44). La disposición del equipo se muestra en la Figura 2.3.

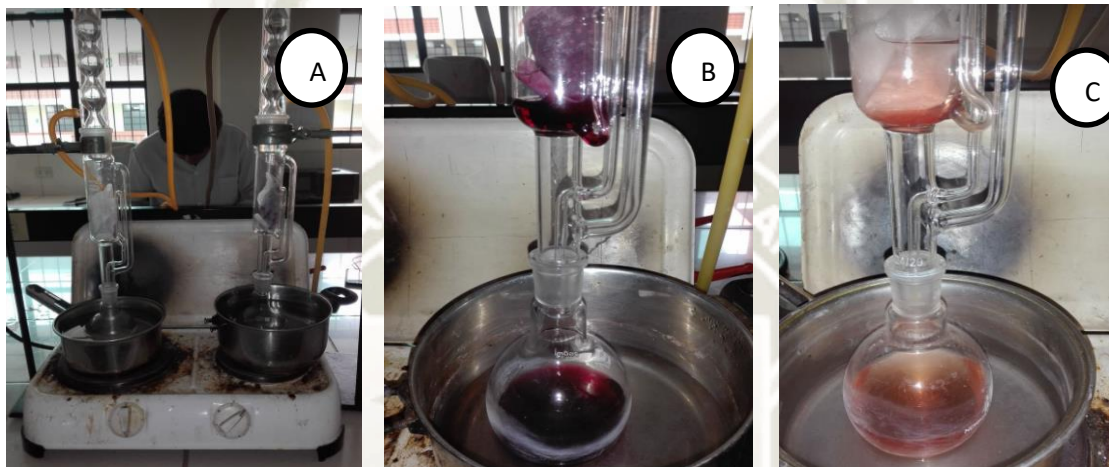


Figura 2.3A) Equipo Soxhlet para hacer la extracción de compuestos fenólicos de la uva, B) Extracción de la cascara de uva C) Extracción de la semilla de uva.

El volumen inicial para las extracciones fue de 200mL de solvente. Se priorizó el tiempo de extracción por la fragilidad de los compuestos fenólicos los que estaban siendo expuestos a altas temperaturas por lo que una vez cumplidos los 93 minutos de extracción se le agregó un volumen conocido de solvente a las muestras que no hubiesen finalizado un ciclo de extracción. Estos volúmenes extras fueron considerados para los cálculos y se denotan en los resultados de cada análisis. Los extractos se almacenaron en botellas de vidrio oscuras, forradas de papel aluminio, a 4°C para proteger los compuestos y evitar su degradación por la luz, calor, u otro factor que pudiese afectarlos

#### 2.2.1.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo según el protocolo descrito por Rajha y otros (43) con ciertas modificaciones. La elaboración del gráfico de calibración se hizo según el método sugerido por la Universidad de California Davis (45).

Para la elaboración del gráfico de calibración se prepararon primero soluciones madre de ácido gálico de concentración 5g/L, Carbonato de Sodio al 25%, y reactivo de Folin-

Ciocalteau al 1N. Se prepararon soluciones stock de ácido gálico con 0, 50, 100, 150, 250 y 500mg/L. Para la elaboración del gráfico de calibración se tomaron 30 $\mu$ L de ácido gálico de cada concentración en un tubo de ensayo y se les agregó a cada uno 2370 $\mu$ L de agua destilada, y 150 $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteau. Posteriormente se agitaron las muestras y se les dejó reposar por 5 minutos. Luego se les añadió 450 $\mu$ L de carbonato de sodio y se les dejó en baño maría a 37°C por 40 minutos.

Para la determinación de compuestos fenólicos totales de las muestras se siguió el mismo protocolo, reemplazando el ácido gálico por 30 $\mu$ L de cada porción de muestra. Cada análisis se hizo por triplicado y se leyó a 760nm.

#### **2.2.1.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES**

La determinación del contenido de flavonoides totales se realizó con el método diferencial descrito por Rajha y otros (43); Isla y otros (46), con ciertas modificaciones.

Para este ensayo se colocaron 1.8mL de HCl al 25% (preparado previamente), 1.8mL de formaldehído al 37%, y 3.6mL de muestra en un tubo de ensayo. La muestra en este ensayo estuvo constituida por el extracto de semilla, pulpa y cáscara respectivamente. Cada experimento se realizó por triplicado. Se dejó incubar a los tubos de ensayo a temperatura ambiente por 24 horas. Pasado este tiempo se filtró el contenido de los tubos eliminando el pellet y conservando el sobrenadante. El proceso se muestra en la Figura 2.5. Se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteau de la forma descrita anteriormente y la concentración obtenida se restó de la concentración de Compuestos Fenólicos Totales.

#### **2.2.1.6 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES**

La determinación del contenido de Antocianinas Monoméricas Totales (TMA) se realizó acorde al método descrito por Rajha y otros (43), y Barnes y otros (47) con ciertas modificaciones.

Se prepararon 50mL de buffer KCl 0.025M en una fiola y se reguló a pH 1.0. De igual forma se prepararon 50mL de buffer Acetato de Sodio 0.4M en una fiola y se reguló el pH a 4.5. Una vez preparados los buffers, se colocó 1mL de cada muestra en tubos de ensayo y se les agregó 4mL de buffer KCl; y para la otra preparación se mezcló 1mL de muestra con 4mL de buffer acetato de sodio. Cada experimento se realizó por triplicado.

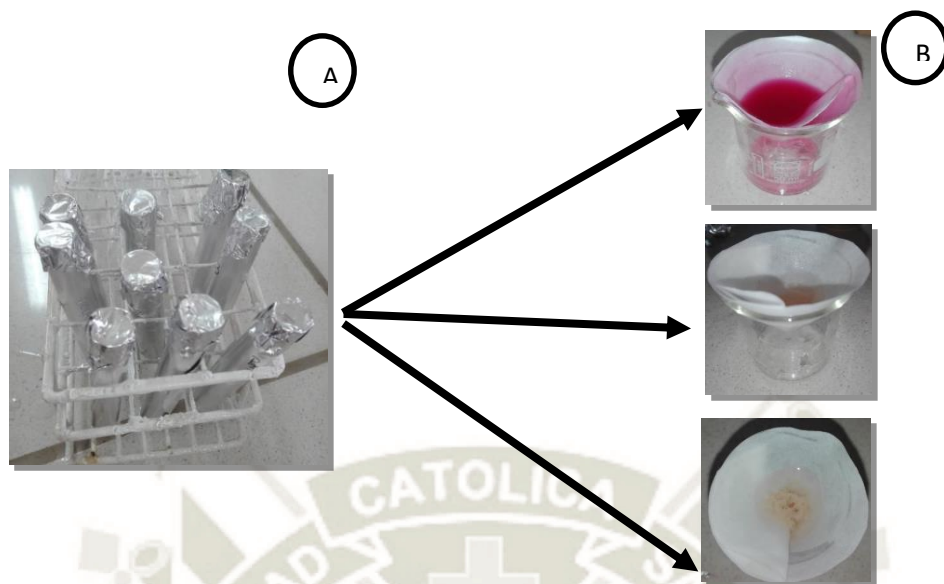


Figura 2.4A) Tubos de ensayo conteniendo HCl al 25% y formaldehído al 37%, y muestra para la determinación de flavonoides. B) Filtración de cada tubo de ensayo

Luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente se leyó la absorbancia de cada tubo a 520nm y a 700nm. El contenido de TMA se calculó con la siguiente fórmula:

Pigmento de Antocianina (cianindín-3-glucósido) =  $\frac{A * MW * DF * 10^3}{\epsilon * 1}$ , donde

- $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}$
- MW = Peso molecular del pigmento, 449.2 g/mol
- DF = Factor de dilución
- $10^3$  = Conversión de gramos a miligramos
- $\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar: 26900 L \* mol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>

### 2.2.1.7 DETERMINACIÓN DE TANINOS TOTALES

La determinación del contenido de Taninos Totales se realizó acorde al método descrito por Makkar (48) con ciertas modificaciones.

Se pesaron 0.075 g de Polivinilpirrolidona (PVP) y se colocaron en tubos eppendorff. Se agregaron 750 $\mu$ L de agua destilada y 750 $\mu$ L de muestra. Estos tubos fueron sometidos a vórtex fuerte por 3 minutos e incubados posteriormente a 4°C por 15 minutos. Se sometió a los tubos nuevamente a vórtex fuerte por 3 minutos y fueron llevados a la centrifuga refrigerada por 10 minutos a 3000g. Se recolectó el sobrenadante para realizar el ensayo de Folin-Ciocalteu. El proceso se muestra en la Figura 2.5. Los datos fueron calculados por método diferencial.



*Figura 2.5A) Tubos eppendorff con PVP, agua destilada y extracto de cáscara de uva B) Los tubos se sometieron a vortex C) En esta imagen se muestra la separación del PVP del extracto de cascara de uva después del proceso de vortex.*

### 2.2.2 SECUENCIAMIENTO GENÉTICO

Para el secuenciamiento genético muestras de hojas de vid de Tarapoto fueron provistas gentilmente por la Ingeniera Raquel Ríos Carrasco del Instituto de Cultivos Tropicales. Estas hojas fueron recolectadas de San Antonio de Cumbaza y enviadas a Arequipa en un sobre de manila. Para el secuenciamiento se utilizaron los servicios de la empresa BioAL S.A.C., empresa que realiza análisis moleculares para el sector biotecnológico y agroindustrial. Según indicaciones de la directora técnica de BioAL, Mónica Santa María, se enviaron las muestras en un envase de vidrio sumergidas en etanol al 95%. El secuenciamiento molecular se hizo utilizando los marcadores moleculares matK y RbCl con la técnica de “*barcoding*”. Los resultados fueron analizados utilizando la herramienta de BLAST disponible en el portal del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y la herramienta ExPASy.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO

##### 3.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA

Se trabajó con uva denominada “Isabelita” del distrito de San Antonio de Cumbaza, San Martín; la cual llegó en un contenedor previamente enfriado para mantener la temperatura baja y evitar la degradación del fruto. Debido a la larga distancia desde San Martín a Arequipa, que fue donde se realizaron los ensayos, se buscó que el transporte sea el más rápido y eficiente posible.

Esta uva está caracterizada por un fuerte color negruzco azulado en la cáscara y una pulpa incolora que se ve manchada por los pigmentos de la cáscara al momento de separarse. Estas características se muestran en la Figura 3.1. El fruto tiene semillas pequeñas de sabor amargo que no son consumidas mientras que la uva en sí presenta un sabor más dulce que las uvas costeñas.



*Figura 3.1 Caracterización de la uva “Isabelita” se muestra la cáscara, el fruto entero y la pulpa junto con la semilla.*

El tiempo de envío de la uva fue de dos días e inmediatamente se buscó liofilizarlo para su conservación.

El liofilizar un alimento extiende considerablemente el tiempo de vida de los compuestos del mismo (49). La eliminación de agua evita que agentes patógenos puedan desarrollarse fácilmente sobre la superficie de las muestras; y la ausencia de temperaturas elevadas asegura que los componentes termolábiles no se vean afectados por el proceso y mantengan su integridad estructural y funcional (50) (51).

Luego de liofilizar el material en las condiciones mencionadas anteriormente se almacenó cada porción (cáscara, semilla, y pulpa) en bolsas herméticas. Estas bolsas a su vez se colocaron dentro de otras bolsas con el fin de evitar el contacto de las muestras con el medio ambiente y permitir la subsiguiente trituración sin tener que exponer las muestras al exterior. El proceso de trituración eleva la superficie de acción de una sustancia, lo que le permite interactuar mejor con otros compuestos químicos; en el caso de esta investigación, mejorará la eficiencia de la extracción. La trituración se realizó con ayuda de un pilón de laboratorio y posteriormente se pesaron las muestras, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 3.1:

*Tabla 3.1 Peso en g de la cascara pulpa, semilla de la uva “Isabelita” después del proceso de liofilización y trituración.*

<b>MUESTRA</b>	<b>PESO (g)</b>
Cáscara (C)	24.4
Pulpa (P)	28
Semilla (S)	24.2

### **3.1.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

Para la determinación de Compuestos Fenólicos Totales (TPC) se elaboró primeramente un gráfico de calibración a fin de establecer la correlación entre la absorbancia y la concentración de Ácido Gálico. La curva de calibración estándar resultante tuvo un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0.996, y una ecuación de concentración que se muestra a continuación:

$y = 0.096 * x + 0.006$ , donde:

X = Concentración de la muestra en equivalentes de ácido gálico (GAE) en mg./L.

y = Absorbancia de la muestra.

Los resultados del gráfico de calibración se muestran en la Figura 3.2 y la Tabla 3.2.

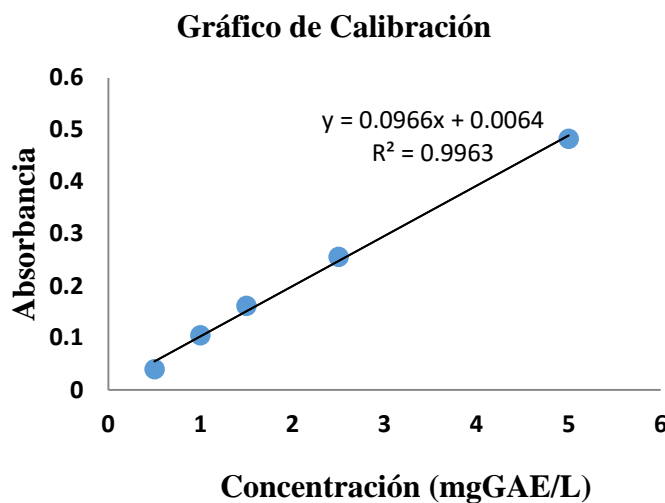


Figura 3.2 Gráfico de calibración de Ácido Gálico.

Tabla 3.2 Datos de Gráfico de Calibración de Ácido Gálico

ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/L)
0.04	0.5
0.105	1
0.162	1.5
0.256	2.5
0.483	5

A continuación se muestran en la Tabla 3.3 los valores promedios de las concentraciones de GAE halladas con la anterior fórmula en las distintas porciones de la muestra de Tarapoto:

Tabla 3.3 Contenido de mgGAE/L. para extractos de la uva de Tarapoto

CONCENTRACIÓN DE mgGAE/L.		
PULPA	CÁSCARA	SEMILLA
184.722	771.527	1252.430

Estos valores se expresaron como equivalentes de Ácido Gálico en gramos, por 100g de materia seca, para lo que se utilizó la siguiente fórmula:

$$TPC_{g/100gDM} = \frac{C*V*100}{10gDM*10^6}, \text{ donde:}$$

TPC<sub>g./100g.DM</sub> = Contenido de Polifenoles Totales expresado en g/100g de Materia Seca (DM)

C = Concentración en mg/L de GAE obtenidos de la comparación con la curva de calibración.

V = Volumen final de solvente utilizado para la extracción Soxhlet.

10gDM = Peso de materia seca utilizada para la extracción Soxhlet. En todos los casos se pesaron 10g exactamente.

10<sup>6</sup> = Valor para la conversión de mg a g; multiplicado por el valor para la conversión de L a mL

Los resultados finales de las concentraciones de equivalentes de gGAE/100gDM se muestran en la Tabla 3.4:

*Tabla 3.4 Promedio de las concentraciones de gGAE/100gDM de pulpa, cascara y semilla de uva “Isabelita”*

<b>CONCENTRACIÓN DE gGAE/100gDM</b>		
<b>PULPA</b>	<b>CÁSCARA</b>	<b>SEMILLA</b>
0.461	1.928	3.131

Se obtuvo el promedio de TPC para las 3 muestras a fin de poder comparar este valor. La mayoría de investigaciones examina el TPC a partir del orujo, que comprende los residuos fermentados de la uva, es decir; cáscaras, pulpa, y semillas desechadas de otros procesos que impliquen el uso de la uva.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Rajha y otros (43), quienes obtuvieron 5.5 g GAE/100g DM utilizando orujo como materia prima y una extracción hidroalcohólica.

Los resultados del ensayo de polifenoles totales para el orujo de uva según Rajha, comparado con los resultados de polifenoles totales de pulpa de Tarapoto obtenidos en esta investigación son ligeramente mayores debido a que sus resultados utilizaron como materia prima al orujo conteniendo semilla, cascara y pulpa, mientras que en este ensayo sólo se utiliza pulpa, cáscara o semilla por separado. La pulpa, por la estructura que la conforma, contiene mayor cantidad de agua y menor cantidad de compuestos fenólicos; es por ello que el resultado de TPC es menor, mientras que el orujo por ser la mezcla de todo el fruto contiene mayor cantidad de polifenoles totales por la presencia de la cascara y semilla. Así mismo las condiciones climáticas son muy diferentes entre Tarapoto y la zona costera donde se realizó la investigación de Rajha. La alta humedad de la ceja de selva peruana y las continuas precipitaciones en la zona de San Antonio de Cumbaza podría hacer que la uva madure más rápido y tenga mayor cantidad de compuestos fenólicos (4). Lo mismo aplica para cada una de las porciones independientes, sin embargo si se adicionan los valores de gGAE/100gDM de las tres porciones de Tarapoto suman 5.521g, los que son resultados mucho más similares a los reportados por Rajha.

Tourmour y otros (52) reportan un contenido de TPC de  $6.93 \pm 1.9$  g GAE/100 g DM para muestras de orujo de uva *Tinta Roriz* proveniente de España, de color oscuro y características fisiológicas similares a la uva de Tarapoto, sometidas a una extracción con solución hidroalcohólica 80%. Este valor es similar al obtenido en esta investigación probablemente al uso del solvente etanol-agua a una proporción similar a la de 66% usada por nosotros, el cual es mejor para la extracción de compuestos fenólicos debido a que disminuye el punto de ebullición y por ende disminuye la temperatura necesaria para extraer dichos compuestos (43). Es importante señalar que los valores de TPC son similares a pesar de utilizar un método de extracción distinto. Tourmour utiliza agitación orbital a 300rpm por 48h a temperatura ambiente mientras que el método utilizado por nosotros utiliza una extracción Soxhlet. La similitud de concentración de TPC parece indicar que ambos métodos son eficientes para la extracción de estos compuestos a pesar de la temperatura que podría dañarlos.

Por otro lado Coklar y Akbulut (53) reportan un contenido de 1.014gGAE/100gDM en muestras de fruta fresca *Mahonia aquifolium* con una solución etanol/agua 80% a temperatura ambiente. Los resultados de TPC son menores a los obtenidos en esta investigación probablemente debido al uso de material fresco como muestra. La presencia de agua y otros componentes puede hacer que los compuestos fenólicos sigan madurando dentro de la fruta y por ende, luego de los análisis, aparente una cantidad menor a la real (50) (51).

### 3.1.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES

El contenido de flavonoides se determinó en todos los casos precipitando los flavonoides con HCl y formaldehído para luego determinar la cantidad presente a través de la diferencia de TPC del sobrenadante con los resultados de TPC obtenidos originalmente de cada porción. Las fórmulas usadas fueron las mismas que las usadas para la determinación de TPC. Los datos de la uva de Tarapoto se muestran en la Tabla 3.5.

*Tabla 3.5 Contenido de flavonoides totales*

<b>CONCENTRACIÓN DE gGAE/100gDM</b>			
<b>MUESTRA</b>	<b>PULPA</b>	<b>CÁSCARA</b>	<b>SEMILLA</b>
Tarapoto	0.227	1.123	2.896

Katalinic´ y otros (54) reportan una concentración de 0.106 gGAE/100gFW de flavonoides en cáscara de uva Merlot. Si los resultados de esta investigación se expresan en materia seca teniendo en cuenta el volumen de trabajo, la cantidad de materia fresca, y la humedad de las cáscaras, el contenido de flavonoides sería de 0.139 gGAE/100gDM. Este valor es menor que el obtenido por nosotros para la uva de Tarapoto. Esta diferencia puede deberse al tipo de uva utilizada, aunque la uva Merlot es también una variedad de uva oscura, así como a las condiciones climáticas y geográficas de las zonas de cultivo. También puede deberse a que los investigadores secaron las muestras de cáscara antes de la extracción pero lo hicieron a temperatura ambiente y utilizando papel filtro. El tiempo de exposición a las condiciones ambientales puede haber afectado la concentración de compuestos fenólicos en general debido a una posible oxidación de los mismos.

Rajha y otros (43) reportan un contenido de flavonoides totales de 5.4gGAE/100gDM para orujo en uvas *Cabernet Sauvignon*. Hay que considerar que el orujo es la mezcla de todas las porciones de la uva (pulpa, cáscara y semilla) por lo que es lógico que los valores de su investigación sean mayores. Sin embargo, si se suman las concentraciones de las porciones obtenidas por nosotros se obtiene un valor de 4.247gGAE/100gDM, valor que es muy cercano a los obtenidos por Rajha. Estos valores son similares en parte a que la metodología utilizada fue la misma, tanto en la extracción como en el ensayo de contenido de flavonoides. Las diferencias pueden deberse a que son distintas variedades de uva y a los factores geográficos y climáticos de las zonas de cultivo, sin embargo no existe mucha diferencia entre los resultados reportados.

### 3.1.4 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES (TMA)

Para la determinación de TMA se utilizó el método de pH diferencial reportado por Rajha y otros (43), y Barnes y otros (47). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.6:

*Tabla 3.6 Contenido de antocianinas monoméricas totales*

CONCENTRACIÓN DE mg/100gDM			
MUESTRA	PULPA	CÁSCARA	SEMILLA
Tarapoto	11.898	219.381	3.409

Los resultados están expresados como equivalentes de cianidin-3-glucósido el cual es la molécula utilizada comúnmente para reportar antocianinas. La uva de Tarapoto presenta una alta concentración de antocianinas en todas las porciones analizadas. En la pulpa se evidencia un contenido de antocianinas que puede deberse a la pigmentación de la cáscara que se habría impregnado en la pulpa. Es en la cáscara donde se evidencia la mayor diferencia en el contenido de TMA, debiéndose esto probablemente a que la uva de Tarapoto es muy coloreada y su pigmento se impregna fácilmente en otras sustancias. De ahí su uso extendido para la preparación de refrescos, helados y otros. Por último se evidencia también mayor contenido de TMA en la semilla de Tarapoto pero no es muy relevante dado que las

antocianinas se encuentran mayormente en las cáscaras dando color azul-violeta en el fruto. Estas diferencias pueden deberse a la diferencia de cultivares, estado de madurez o condiciones estacionales las cuales son muy distintas en Tarapoto con precipitaciones continuas eliminando la necesidad de riego (37).

Márquez (55) reporta una concentración de 21.28mg/100gDM de antocianinas monoméricas totales para la uva *Vitis vinífera Red Globe* cultivada en Lima e Ica, Perú. Esta concentración es para la suma de todas las porciones ya que Márquez licuó todo el fruto previamente a la liofilización y análisis del mismo. En nuestra investigación el contenido de TMA de todas las porciones juntas es de 234.688mg/100gDM. Esta diferencia se debe probablemente a la variedad de uva utilizada en los análisis. La uva *Red Globe* tiene frutos más rojizos que violáceos, mientras que la uva de Tarapoto es oscura en su coloración, teniendo tonos más fuertes y azul-violetas que la uva usada por Márquez. Dado que los colores violáceos están asociados a la presencia de antocianinas es consecuente que el contenido de TMA de la uva de Tarapoto sea mayor a la uva cultivada en Ica o Lima.

Rajha y otros (43) reportan una concentración de 70.3mg/100gDM de TMA para una muestra de orujo en uvas *Cabernet Sauvignon*. La uva de Tarapoto presenta un contenido mayor de TMA debido probablemente a que presenta una cáscara más oscura que la de la variedad *Cabernet Sauvignon*. Esta característica está relacionada directamente con el contenido de TMA por lo que es lógico que sea mayor. Otros factores que podrían influir son las condiciones geográficas y climáticas que podrían favorecer enormemente a la uva de Tarapoto.

### **3.1.5 DETERMINACIÓN DE TANINOS TOTALES**

La determinación del contenido de Taninos Totales se realizó acorde al método descrito por Makkar (48). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.7. El método utilizado se basa en la capacidad de ciertos polímeros como el PVP, PVPP, y PEG de poder formar enlaces de hidrógeno con los grupos fenólicos de los taninos y precipitarlos para luego ser determinados por métodos diferenciales. Si bien todos estos polímeros pueden usarse para la conjugación de los taninos, es el PVPP el que es más utilizado por su alta especificidad (56) (57).

Tabla 3.7 Comparación del contenido de Taninos

CONCENTRACIÓN DE gGAE/100gDM			
MUESTRA	PULPA	CÁSCARA	SEMILLA
Tarapoto	0.411	1.839	3.094

Debido a la disponibilidad de reactivos del laboratorio donde se llevó a cabo esta investigación no se pudo trabajar con PVPP y se optó por utilizar PVP como agente para la precipitación de taninos. Este compuesto si bien se une a los taninos por el gran número de oxígenos disponibles en su cadena no se une de manera tan específica, lo que se evidencia en los resultados. El contenido de taninos es casi igual al contenido de polifenoles totales. El TPC debería ser bastante mayor tratándose de un método diferencial, sin embargo es posible que al ser inespecífica la unión del PVP con taninos, se haya unido también a otros compuestos diferentes, incrementando la densidad óptica de las muestras al momento de realizar el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Filgueira (58) reporta una concentración de 0.132g/100gDM de taninos totales para *Vitis vinífera* variedad *Cabernet Sauvignon*. Estos valores corresponden a un contenido de TPC para la misma muestra de 4.337gGAE/100gDM. Como se observa el contenido de polifenoles totales de Filgueira es similar al contenido de TPC obtenido por nosotros (5.521gGAE/100gDM), mientras que el contenido de taninos totales de Filgueira representa menos del 10% del contenido de TPC, en los resultados obtenidos en esta investigación utilizando PVP el contenido de taninos totales representa más del 90% del contenido de TPC. Se observa con estos resultados que el método de precipitación con PVP sobreestima la cantidad de taninos totales por la poca especificidad de la reacción que se lleva a cabo.

### 3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA UVA “ISABELITA”

El secuenciamiento de una muestra de hoja de la uva de Tarapoto fue realizado por la empresa BioAL S.A.C. utilizando 2 marcadores moleculares: el marcador matK, que secuencia la proteína maturasa K; y el marcador rbcL, que secuencia la subunidad grande de la proteína Rubisco.

### 3.2.1 IDENTIFICACIÓN USANDO EL MARCADOR MATK

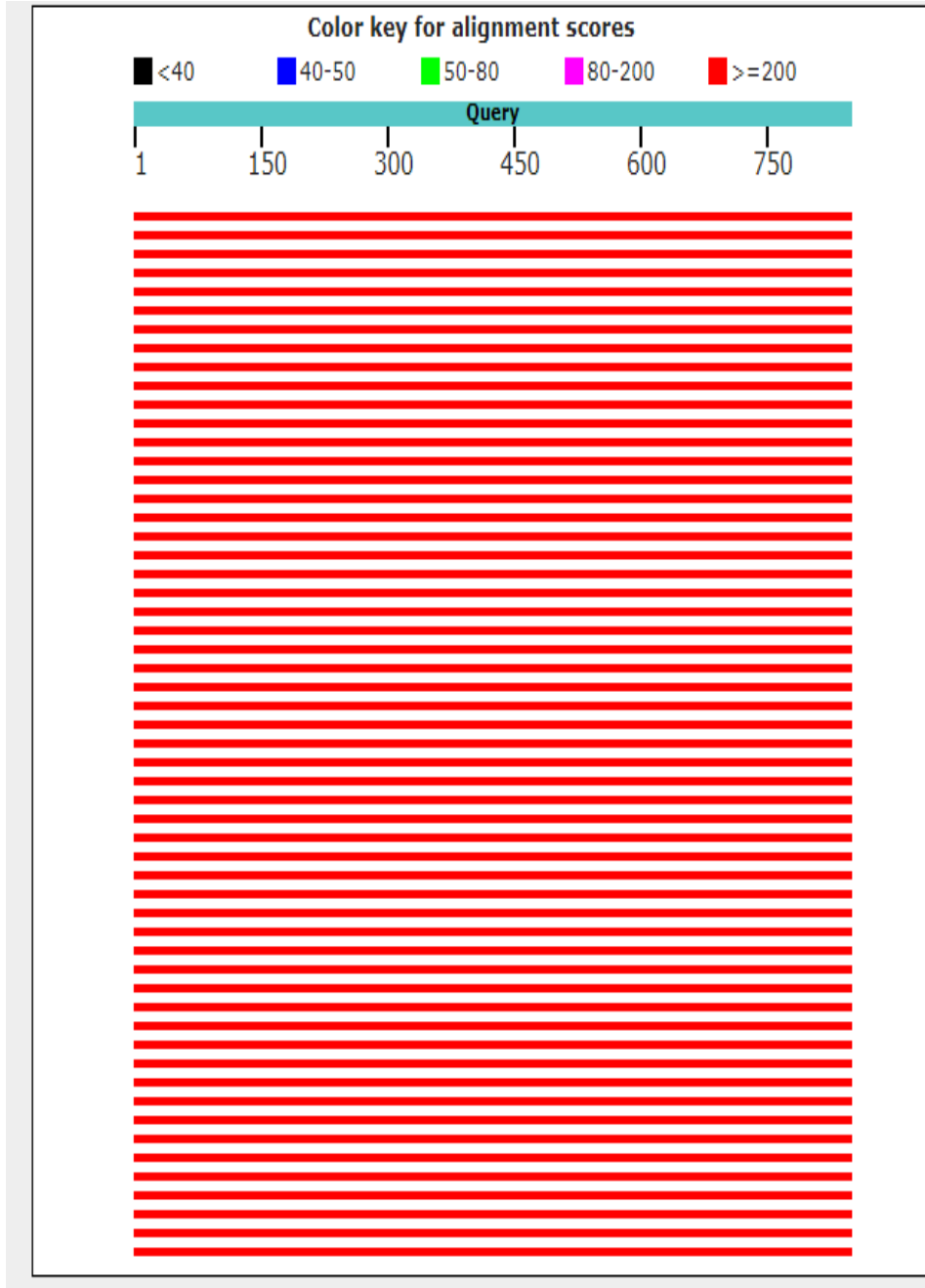
La secuencia de ADN obtenida con el marcador matK fue:

```
TTCCCACATTTAAAGTATGTGTCAGATATACTAATACCCCCACCCCATCCATC
TGGAAATCTTGGTTCAAGCCCTTCGTTACTGGGTGAAAGATGCCTCTTCTTTGC
ATTTATTACGATTCTTTCTACACGAGTATCATAATTGGAATAGTATGATTACTCC
AAAGAAATCAATTTCCATTTTTTCAAAAAGGAATCAAAGATTTTTCTTATTCTCCT
ATATAATTTTCATGTATGTGAATACGACTCTATCTTCATTTTTATCCGCAATCAA
TCTTATCATTACGATCAACATCTTATGGAGCCCTTCTTGGGCGAATATTTTTCT
ATGGAAAATAGAGCATTGTCGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCAGACAATCT
TATGGTTGTTCAAGAATCCTTTCATGCATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCCA
TTCTGGCTTCAAAGGGGCGCCTTCTGATGAATAAATGGAAATATTACCTTG
TCAATTTCTGGCAATGTCATTTTTACGTGTGGTCTCAACCAGTAAGGATCCATA
TAAACCAATTATCCAAGCATTCCCTCGACTTTCTGGGCTATCTTTCAAGTGTGC
GACTAAATCCTTCAGTGGTACGGAGTCAAATGCTAGAAAATGCATTTATAATA
GATAATGCTATTAAGAAGTTCGATACTATAGTTCCAATTATTCCTATGATTGGA
TCGTTGGCTAAAGCGAGATTTTGTAATGCCTTAGGGCATCCCATTAGTAAGCCG
TCCTGGGCCGATTCATCAGATTATGATATTATCGACCGATTTGTGCGTATATGC
AGAAATATTTCTCATTATCACAGTGGATCCTC
```

Esta secuencia tiene 844 nucleótidos y su lugar de inserción es entre los nucleótidos 3116 a 2275 del gen de la maturasa K.

Para el análisis de los datos se utilizó la herramienta BLAST disponible en el portal NCBI. Los parámetros utilizados fueron los predeterminados con excepción de que se comparó con los organismos pertenecientes al género *Vitis*. Se utilizó la variante de nucleótidos de la herramienta BLAST.

Los resultados del nBLAST se separan en resultados gráficos y resultados de alineamientos. Ambos se muestran a continuación en las Figuras 3.3 y 3.4:



*Figura 3.3 Resultados gráficos de nBLAST para el marcador matK*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis cinerea var. helleri voucher Wen 12653 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039684.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis bryoniifolia voucher Ickert Bond 1706A chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039683.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis girdiana voucher Wen 12713 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039682.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis tiliifolia voucher Wen 12733 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039681.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis riparia voucher Wen 12938 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039680.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis baileyana voucher Wen 12612 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039804.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis biformis voucher Wen 12745 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039802.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis bloodworthiana voucher Wen 12743 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039801.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis cinerea var. cinerea voucher Wen 12623 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039799.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis cinerea var. floridana voucher Wen 12777 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039798.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis doaniana voucher Wen 12647 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039797.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis heyneana voucher Wen 12826 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039796.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis Jacquemontii voucher Wen 12736 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039795.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis lanata voucher Wen 12738 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039794.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis labrusca voucher Wen 12563 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039793.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis monticola voucher Wen 12662 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039792.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Vitis palmata voucher Wen 12631 chloroplast, complete genome</a>	1546	1546	100%	0.0	99%	<a href="#">NC_039791.1</a>

Figura 3.4 Resultados de alineamiento de nBLAST para el marcador matK

Los resultados gráficos no muestran una diferencia apreciable entre las secuencias comparadas con la herramienta BLAST. Esto se debe a que los puntajes de alineamiento entre las secuencias comparadas son muy similares entre sí. Como se observa en los resultados de alineamiento el puntaje máximo de alineamiento es idéntico para varias secuencias, con un 100% de nucleótidos comparados (valor del “*query cover*”), sin embargo la identidad no es del 100%. Esto indica que si bien todos los nucleótidos han sido comparados y dados un puntaje, existe una diferencia entre las secuencias comparadas y la secuencia de la uva de Tarapoto. Un acercamiento se muestra en la Figura 3.5.

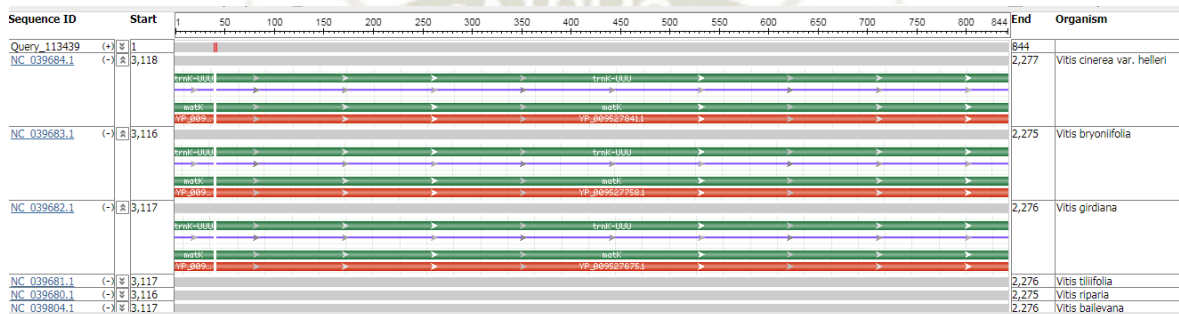


Figura 3.5 Comparación de secuencias con la herramienta nBLAST

En un acercamiento de las secuencias comparadas se nota un valor en rojo que corresponde a una diferencia en nucleótidos con la secuencia original de Tarapoto. Esta diferencia se presenta en todas las secuencias comparadas como se observa en la Figura 3.6.

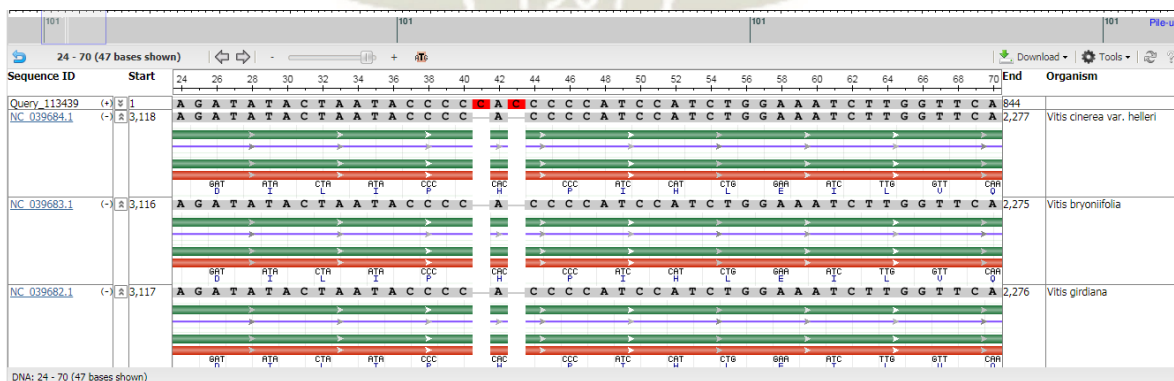


Figura 3.6 Diferencia de nucleótidos en la herramienta nBLAST

Se realizó el análisis en BLASTx posteriormente al nBLAST, como se muestra en la figura 3.7:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments <span>Download</span> <span>GenPept</span> <span>Graphics</span> <span>⚙</span>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis rotundifolia]</a>	556	556	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009019772.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis cinerea var. hellen]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">BBA46177.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis bryoniifolia]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009527758.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis coignetiae]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009444196.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis aestivalis]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009235324.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis arizonica]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009535230.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis piasezkii]</a>	555	555	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009533886.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase [Vitis vinifera]</a>	553	553	95%	0.0	99%	<a href="#">CAD22170.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis flexuosa]</a>	553	553	95%	0.0	99%	<a href="#">AQQ77805.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis flexuosa]</a>	553	553	95%	0.0	99%	<a href="#">ASY97641.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis vinifera]</a>	553	553	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_567057.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis betulifolia]</a>	552	552	95%	0.0	99%	<a href="#">YP_009535062.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis californica]</a>	550	550	95%	0.0	99%	<a href="#">AT110347.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Parthenocissus quinquefolia]</a>	549	549	95%	0.0	98%	<a href="#">AGC70807.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Parthenocissus chinensis]</a>	549	549	95%	0.0	99%	<a href="#">AQQ77801.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">maturase K [Vitis vinifera]</a>	548	548	95%	0.0	99%	<a href="#">AWM67440.1</a>

Figura 3.7 Resultados de alineamiento de la herramienta BLASTx para el marcador matK

Analizando las secuencias en mayor detalle se observan diferencias en los nucleótidos 41 y 43 de las secuencias comparadas. Mientras la secuencia de la uva de Tarapoto presenta 2 citocinas en esas posiciones, las secuencias comparadas no presentan ese nucleótido. Este blanco puede deberse a errores en el secuenciamiento de la muestra (con repetición de nucleótido) o al momento de realizarse el nBLAST. Estos errores son relativamente comunes al momento de comparar secuencias de ADN. Dado que la información de ADN no es suficiente para establecer un mejor candidato para la comparación de la uva de Tarapoto con otras especies se utilizó la herramienta BLASTx que permite comparar proteínas expresadas a partir de una secuencia de ADN. Estos resultados se muestran en la Figura 3.7.

En los resultados del BLASTx se observa mayor variación en los puntajes de alineamiento a pesar que el porcentaje de identidad se mantiene igual. Esto se debe a que si bien la secuencia genética de los resultados es la misma, la expresión proteica varía ligeramente. El “query cover” baja en valor a un 95% debido a que algunos nucleótidos funcionan como marcos abiertos de lectura, secciones que indican donde empezar a traducir la información genética, y probablemente a los codones “stop” de las muestras. Viendo que la diferencia podía encontrarse a nivel de expresión se utilizó la herramienta ExPASy para analizar la expresión genética como se muestra en la Figura 3.8.

5'3' Frame 1  
FPHLKVVSDILIPPPSIWKSWFKPFVGTG Stop K Met PLLCIYYDSFYTSIIIGIV Stop LLQRNQFPFFQKGIKDFSSYSYIIF Met YVNTLSS  
LSAINLIYDQHL Met EPFLGEYFS Met EK Stop SILSKSL Met IFRQSYGCSRLSC Met LGIKENPFWLQKGRLF Stop Stop INGNITLSISG  
NVIFTCGLNQ Stop GSI Stop TNYPSIPSTFWAIFQVCD Stop ILQWYGVCK Stop K Met HL Stop Stop Met LLRSSIL Stop FQLFL Stop LDRWLKR  
DFV Met P Stop GIPLVSRPGPIHQI Met ILSTDLCVYAEIFLIITVD

5'3' Frame 2  
SHI Stop S Met CQIY Stop YPHPHPSGNLGSPPSLLGERCLFFAFITILSTRVS Stop LE Stop YDYSKEINFHFFKESKIFLIP Stop FSC Met  
Stop IRLYLHFYQSI LSF TINILWSPSWANIFLWKNRAFRCRSLC Stop Stop FSDNL Met VVQESFHALC Stop VSRKIHSGFKRGASDSE Stop  
Met EILPCQFLA Met SFLRVVSTSKDPYKPIQAFPRLSGLSFKCATKSFSGTESNARKCIYNR Stop CY Stop EVRYSSNYSDYDWIVG Stop  
SEIL Stop CLRASH Stop Stop AVLGRFIRL Stop YRPIICAY Met QKYFSLSQWII

5'3' Frame 3  
PTFKVCVRYTNTPTPIHLEILVQALRYWVKDASSLHLLRFFLHEYHNWNS Met ITPKKSISIFSKRNQRFFFLFYNFHVCEYDSIFIFIRN  
QSYHLRSTSYGALLGRIFFFYKIEHFVEVFANDFQITLWLFKNPF Met HYVRYQGKSLASKGAPLL Met NKWKYYLVNFWQCHFVYWS  
QPVRIHINLSKHSLDLFLGYLSSVRLNPSVVRSQ Met LENAFIIDNAIKKFDITVPIIP Met IGLAKARFCNALGHPISKPSWADSSDYD  
IDRFVIRCRNISHYHSGS

3'5' Frame 1  
EDPL Stop Stop Stop EIFLHIRTNRISIIS Stop SDESAQDGLL Met GCPKALQNLALANDPIIGIIGTIVSNFLIALSIINAFSS Stop LRTTEGFSR  
TLER Stop PRKSRECLDNWFIWLTG Stop DHT Stop K Stop HCQKLTR Stop YHFLFIRRGAPFEAR Met DFP Stop YLT Stop C Met KGLNHHKIV  
Stop KSLAKTSTKCSIFP Stop KNIRPRRAP Stop DVDRK Stop D Stop LRIK Met KIESYSHI Stop KLYRNKKNL Stop FLFEK Met EIDFFGVI  
LFQL Stop YSCRKNRNKCKEEASFQ Stop RRA Stop TKISRW Met GVGVLVYLTHLTVNG

3'5' Frame 2  
RIHC DNEKYFCIYAQIGR Stop YHNL Met NRPTAY Stop WDALRHYKISL Stop PTIQS Stop E Stop LEL Stop YRTS Stop Stop HYLL Stop Met HFL  
AFDSVPLKDLVAHLKDSPE SRGNAWII GLYGSLLVETTRKNDIARN Stop QNISIIYSEEAPLLKPEWIFLDT Stop HNA Stop KDS Stop TT  
IRLSENH Stop QRLRQNALFFHRKIFAGEGLHK Met LIVNDKIDCG Stop K Stop R Stop SRIHENYIGIRKIFDSFLKKWKLISLE Stop SYYS  
NYDTRVERIVINAKRHLSPSNEGLEPRFPDGGWGWY Stop YI Stop HIL Stop Met WE

3'5' Frame 3  
GSTVI Met RNISAYTHKSDVNIII Stop Stop IGPRLTNG Met P Stop GITKSRESQRSNHRNWNYSIELLNSIIYKCF Stop HLTYPYH Stop RI  
Stop SHI Stop KIAQKVEG Met LG Stop LYY Met DPYWL RPHVK Met TLPEIDKVIFFFIHQKRRPF Stop SQNGFSLPINI Met HERILEGP Stop DC  
LKIISKDFDK Met LYSIEKYSPPKGSIR Stop S Stop Met IRLIADKNE DRVFTY Met KII Stop Stop EKSLIPF Stop KNGN Stop FLWSNHTPI  
Met LIV Stop KES Stop Stop Met QRRGIFHPVTGKLNQDFQ Met DGGGGISISDYYFKCG

Figura 3.8 Resultados de expresión en la herramienta ExPASy para el marcador matK

Los resultados de expresión en aminoácidos de la secuencia genética muestran que posee 3 marcos de lectura abiertos, lo que da lugar a 6 posibles proteínas expresadas: 3 si se lee en dirección 5'3' y 3 si se lee 3'5'. Estas diferentes proteínas tendrían la misma secuencia genética pero es el orden de lectura lo que las hace distintas. Con esta evidencia la diferenciación de subespecies de la *Vitis* pareciera depender más de la expresión de proteínas que del código genético de las muestras. Siendo así la entrada que tiene mayor puntaje en el xBLAST es la *Vitis rotundifolia*, especie de vid que produce un fruto oscuro y que es originaria de Norteamérica.

### 3.2.2 IDENTIFICACION USANDO MARCADOR RCBL

La secuencia de ADN obtenida con el marcador rcbL fue:

```
AGTGTGGATTCAAAGCCGGTGTAAAGATTACAAATTGACTTATTATACTCCT
GAATATGAGACCAAACCTACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAA
CCTGGAGTTCCACCCGAAGAAGCAGGGGCCGCGGTAGCTGCTGAATCTTCTAC
TGGTACATGGACAACCTGTGTGGACTGATGGACTTACCAGCCTTGATCGTTACAA
AGGACGATGCTACCACATCGAGCCCGTTGCTGGAGAAGAAAGTCAATTTATTG
CTTATGTAGCTTACCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGCTCTGTTACTAACATGTT
TACTTCCATTGTGGGTAATGTGTTTGGGTTCAAAGCTCTGCGCGCTCTACGTCT
AGAGGATCTGCGAATCCCCCTGCTTATACTAAAACCTTTCCAAGGCCCGCCTCA
TGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCTTATTGG
GATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAGAACTATGGTAGAGCA
GTTTATGAATGTCTCCGCGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAGAACGTG
AACTCCAACCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCC
ATTTTAAATCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAG
```

Esta secuencia tiene 682 nucleótidos y su lugar de inserción es entre los nucleótidos 59670 a 601603116 del gen de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, conocida comúnmente como Rubisco. Se utilizaron las mismas herramientas de nBLAST, BLASTx y ExpASy para el análisis de este marcador. Los resultados del nBLAST se muestran a continuación en las Figuras 3.9 y 3.10.

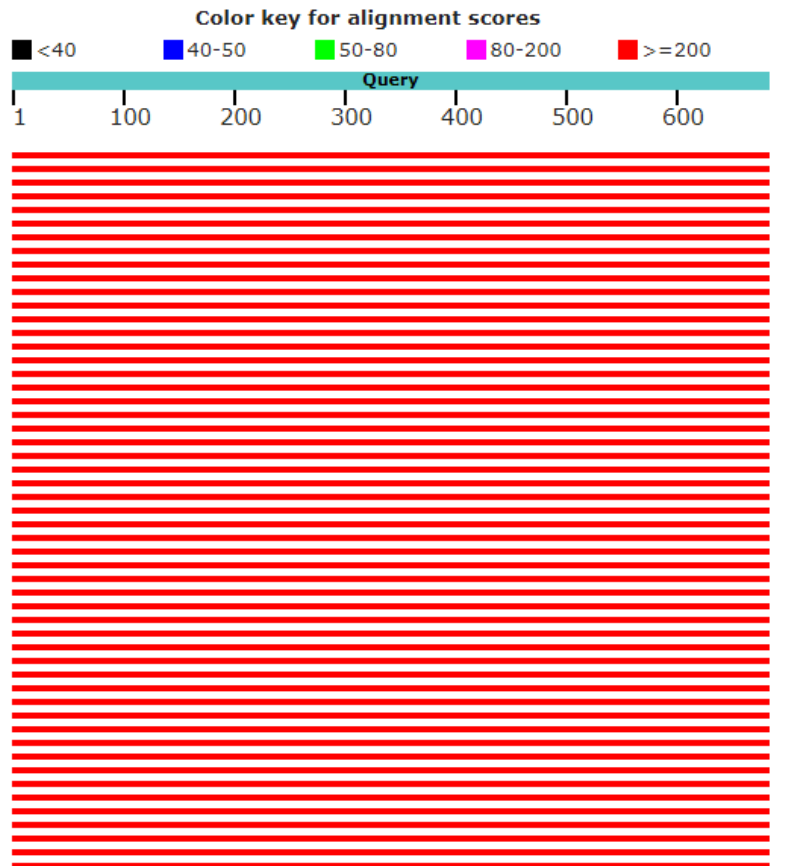


Figura 3.9 Resultados gráficos de nBLAST para el marcador *rbcL*

En este caso al igual que en el caso del marcador *matK* los resultados gráficos no demuestran una diferencia significativa entre los alineamientos realizados con la base de datos del NCBI. Los resultados de alineamiento muestran identidades de 100% y puntajes perfectos para todas las secuencias identificadas. Dado que, a diferencia del marcador *matK*, no existen diferencias en ningún nucleótido con respecto a las secuencias de la base de datos con las que se le comparó se decidió realizar el BLASTx. Se muestran en la Figura 3.11 los resultados del BLASTx.

En los resultados del BLASTx se observa que los 7 primeros resultados tienen un puntaje, “*query cover*” e identidad iguales, haciéndolos candidatos casi idénticos para el alineamiento con la secuencia de la uva de Tarapoto.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis cinerea var. helleri voucher Wen 12653 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039684.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis girdiana voucher Wen 12713 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039682.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis tiliifolia voucher Wen 12733 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039681.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis riparia voucher Wen 12938 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039680.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis aestivalis var. linsecornii voucher Wen 12680 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039806.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis arizonica voucher Ickert 2003A chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039805.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis baileyana voucher Wen 12612 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039804.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis biformis voucher Wen 12745 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039802.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis bloodworthiana voucher Wen 12743 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039801.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis cinerea var. cinerea voucher Wen 12623 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039799.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis cinerea var. floridana voucher Wen 12777 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039798.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis doaniana voucher Wen 12647 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039797.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis labrusca voucher Wen 12563 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039793.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis monticola voucher Wen 12662 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039792.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis palmata voucher Wen 12631 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039791.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Vitis peninsularis voucher Wen 12744 chloroplast, complete genome</a>	1260	1260	100%	0.0	100%	<a href="#">NC_039790.1</a>

Figura 3.10 Resultados de alineamiento para el marcador rbcL

Alignments Download GenPept Graphics

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis mustangensis]	399	399	99%	6e-139	100.00%	<a href="#">YP_009433112.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis treleasei]	399	399	99%	7e-139	100.00%	<a href="#">YP_009533661.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis biformis]	399	399	99%	8e-139	100.00%	<a href="#">YP_009535005.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis aestivalis]	399	399	99%	8e-139	100.00%	<a href="#">YP_009235351.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis rotundifolia]	399	399	99%	8e-139	100.00%	<a href="#">YP_009019799.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis rotundifolia]	399	399	99%	9e-139	100.00%	<a href="#">CAD11950.1</a>
<input type="checkbox"/> RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase large chain; Short=RuBisCO large subunit	399	399	99%	9e-139	100.00%	<a href="#">P28460.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis bellula var. pubigera]	398	398	99%	2e-138	99.56%	<a href="#">AFB74622.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis cordifolia]	398	398	99%	2e-138	99.56%	<a href="#">YP_009447654.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis vinifera]	397	397	99%	2e-138	99.56%	<a href="#">AWM67328.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis vinifera]	398	398	99%	2e-138	99.56%	<a href="#">YP_567084.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis rotundifolia]	397	397	99%	3e-138	99.56%	<a href="#">AAF34878.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis vinifera]	397	397	99%	3e-138	99.56%	<a href="#">CAG25748.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis aestivalis]	396	396	99%	8e-138	99.56%	<a href="#">BBA27163.1</a>
<input type="checkbox"/> hypothetical protein VITISV_025530 [Vitis vinifera]	395	395	99%	1e-137	93.83%	<a href="#">CAN63541.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis ficifolia]	395	395	99%	3e-137	98.68%	<a href="#">YP_009447740.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [Vitis acerifolia]	394	394	99%	1e-136	98.24%	<a href="#">YP_009428183.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis vinifera]	392	392	99%	3e-136	98.24%	<a href="#">YP_002608342.1</a>
<input type="checkbox"/> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Vitis californica]	388	388	97%	4e-135	99.55%	<a href="#">ATI10047.1</a>

Figura 3.11 Resultados de alineamiento de la herramienta BLASTx para el marcador *rbcL*

La variación del valor E, valor que indica la probabilidad de encontrar un resultado igual en la base de datos, no es significativa pues el exponente en todos los casos sigue siendo e-139 siendo sumamente bajo y haciendo estos resultados únicos. Es importante notar que de estos 7 resultados con 100% de identidad 2 pertenecen a *Vitis rotundifolia*, la misma especie de vid que obtuvo el mejor puntaje con el marcador matK haciéndola la más probable especie relacionada con la uva de Tarapoto.

A continuación se muestran en la Figura 3.12 los resultados de ExPASy para observar la expresión genética:

```

5'3' Frame 1
SVGFKAGVKDYKLTYYTPEYETKPTDILAARFVTPQPGVPPEEAGAAVAASSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEES
QFIAYVAYPLDLFEEGSVTN MetFTSIVGNVFGFKALRALRLEDLRIIPPAYTKTFQGGPPHGIQVERDKLNKYGRLPLGCTIKPKLGLSA
KNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPF MetRWRDRFLFCAEAIFKSQAETGEIK

5'3' Frame 2
VLDSKPVLKITN Stop LIILLN MetRPNLLISWQHSE Stop LLNLEFHPKKQGPR Stop LLNLLLVHGQLCGL MetDLPALIVTKDDATTSPLI
EKVNLL Met Stop LTL Stop TFLKKALLTCLLPLWV MetCLGSKLCAIYV Stop RICESPLLIKLSKARL MetASKLREIN Stop TS MetVVPY
WDVLLNLNWGYPLRT MetVEQF MetNVSAVDLILLK Met Met RT Stop TPNHLCVGETVSYFVFKPFLNHRKQVKS

5'3' Frame 3
CWIQSRC Stop RLQIDLLYS Stop I Stop DQTY Stop YLGSIPSNSSWTSSTRSRGRGSC Stop IFYWY MetDNCVD Stop WTYQP Stop SLQRT
MetLPHRARQWRKSIYCLCSLPERPE Stop RRLCY Stop HVYFHC Stop CVWVQSSARSTRGSANPPCLY Stop NFPRPASWHPS Stop E
R Stop IEQVWSSPIG MetYY Stop T Stop IGVIR Stop ELW Stop SSL Stop MetSPRWI Stop FY Stop R Stop Stop ERELPTIYALERPFLILCRSHF Stop
ITG Stop NR Stop NQ

3'5' Frame 1
L Stop FHLFPV I Stop KWL RHKIRNGLSNA Stop MetVGSRSRSHL Stop Stop NQVHRGDIHKLLYHSS Stop RITPI Stop V Stop Stop YIPIGDDHT
CSIYLSQLGCHEAGLGKF Stop YKQGGFADPLDVERAEL Stop TQTHYPQWK Stop TC Stop Stop QSLLQKGLKGLHKQ Stop IDFLLLQQR
RCGSIVLQNDQGW Stop VHQTSLQSL MetYQ Stop KIQLPRPLLLRVELQVEELLG MetLPRYQ Stop VWSHIQEYNKSICNL Stop HRL Stop IQ
H

3'5' Frame 2
FDFTCFSL Stop FKNNGFGTK Stop ETVSPTHKWLGVHVLIIFSKIKSTAETFINCSTIVLSG Stop PQRFRNSTSQ Stop GTTILVQFISLNLDA
MetRRALESFISRGDSQIL Stop T Stop SAQSFEPKHITHNGSKHVSNRAFFKVV Stop RVSYISNKLTFSSNGLDVASSFVTKAGKSI
PHSGPCTSRRFSSYRGPCFFGWNRSRLRSYSECCQDISRFLIFRSIISQVIFNTGFESNT

3'5' Frame 3
LISPVSACDLK MetASAQNKRRSLQRINGWEFTFSSSLVKSSPPRRHS Stop TALP Stop FLADNPNLGLVHPNRRGRPYLFNLSTW Met
Stop GGPWKVLV Stop AGGIRRSSRRARRALNPNTLP MetEVN MetLVTEPSSKRSKQ Stop AT Stop AIN Stop LSSPATGS MetW Stop HRP
L Stop RSLVSPSVHTVVVHPVEDSAATAAPASSGGTGP Stop GVTRNAAKISVGLVSYSGV Stop Stop VNL Stop SLTPALNPT
    
```

Figura 3.12 Resultados de expresión en la herramienta ExPASy para el marcador *rbcL*

Los resultados de expresión en aminoácidos de la secuencia genética muestran que posee 3 marcos de lectura abiertos, lo que da lugar a 6 posibles proteínas expresadas: 3 si se lee en dirección 5'3' y 3 si se lee 3'5'. De manera similar que con el marcador matK se observa que pueden existir diversas combinaciones de expresión proteica para el mismo código genético. Sin embargo teniendo en cuenta que de los 7 resultados del xBLAST, 2 corresponden a *Vitis rotundifolia* y que el marcador matK tuvo mejor alineamiento con esta especie es posible indicar una posible relación de la uva de Tarapoto con esta vid. Sin embargo viendo que existe mucha diferencia al momento de la expresión de las proteínas creemos es necesario un estudio más profundo de la expresión genética de la uva de Tarapoto utilizando ya no ADN sino mRNA, molécula que indica directamente al ribosoma el orden de los aminoácidos a producir.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

#### PRIMERA:

La porción de semilla de la uva de San Antonio de Cumbaza presenta el mayor contenido de polifenoles totales con 3.1311 gGAE/100gDM, mientras que la porción de pulpa presenta el menor contenido de polifenoles totales con 0.4618 gGAE/100gDM.

#### SEGUNDA:

La porción de semilla de la uva de San Antonio de Cumbaza presenta el mayor contenido de flavonoides totales con 2.8962 gGAE/100gDM, mientras que la porción de pulpa presenta el menor contenido de flavonoides totales con 0.2278 gGAE/100gDM.

#### TERCERA:

La porción de cáscara de la uva de San Antonio de Cumbaza presenta el mayor contenido de antocianinas monoméricas totales con 219.3816 mg/100gDM, mientras que la porción de semilla presenta el menor contenido de antocianinas monoméricas totales con 3.4094 mg/100gDM.

#### CUARTA:

El método diferencial para la determinación de taninos no rindió resultados confiables debido a la baja especificidad del PVPP para unirse a los taninos.

#### QUINTA:

La variedad de uva de San Antonio de Cumbaza presenta mayor similitud en la expresión genética mediante el uso de marcadores matK y rCBL con la especie *Vitis rotundifolia*.

## SUGERENCIAS

1. Incrementar el tiempo de secado secundario en el proceso de liofilización a fin de remover la mayor cantidad de agua posible.
2. Optimizar el proceso de extracción de compuestos fenólicos para porciones de pulpa, cáscara y semilla de uva comparando variables como tiempo de extracción, tipo de solvente, temperatura y método de extracción.
3. Analizar el contenido fenólico de la uva denominada “Isabelita” mediante la técnica de HPLC, a fin de identificar con exactitud los compuestos que presenta.
4. Analizar el contenido de taninos totales con otro método más exacto que el método diferencial utilizado en esta investigación. El método diferencial utiliza PVPP o PVP, compuestos que no son altamente específicos al momento de unirse a los taninos.
5. Analizar la expresión genética de marcadores matK y rbcL a través del estudio del mRNA o cDNA, debido a que el ADN no presenta diferencia significativa para estos marcadores.
6. Analizar el contenido fenólico de la uva denominada “Isabelita” en comparación con uvas representativas de la costa, utilizando metodologías más sofisticadas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. The Plant List. The Plant List (2013). Version 1.1. [Online].; 2013 [cited 2018 Abril 30. Available from: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Vitaceae/Vitis/>.
2. Célis Escudero FR. ELABORACIÓN DE VINO CON MOSTO CONCENTRADO DE UVA BORGOÑA NEGRA (Vitis labrusca). Tesis de grado. Tarapoto: Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ingeniería Agroindustrial; 2001.
3. Delrot S, Medrano H, Or E, Bavaresco L, Grando S, editors. Methodologies and Results in Grapevine Research. Primera edición ed.: Springer Netherlands; 2010.
4. B. Nazralla JJ. Influencia del manejo del suelo y las coberturas vegetales en el microclima de la canopia de la vid, la composición de la uva y el vino. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Ucuyo. 2008; XL(1).
5. ITIS. Integrated Taxonomic Information System on-line database. [Online].; 2017 [cited 2018 Abril 30. Available from: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=28629#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=28629#null).
6. Vallejo H, Lorenzo. Historia de la producción de vinos y piscos en el Perú. Revista Universum. 2004; II(19).
7. Cieza de León Pd. Crónica del Perú Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1986.
8. Quevedo Bardález L. Diario Voces. [Online].; 2016 [cited 2018 Mayo 1. Available from: <https://www.diariovoces.com.pe/59222/uvachado-san-martin-como-pisco-ica-dicen-vinicultores>.
9. Nutrición FE dl. Uvas. [Online]. [cited 2018 Mayo 1. Available from: <http://www.fen.org.es/index.php/alimentacion/alimento/uvas>.
- 10 Fundación Grupo Eroski. Guía Práctica de frutas. [Online].; 2004 [cited 2018 Mayo 1. Available from: <http://frutas.consumer.es/uva/propiedades>.
- 11 Minagri. Perú: Un campo fértil para sus inversiones y el desarrollo de sus exportaciones. Resumen Ejecutivo. Lima: Dirección General de Competitividad Agraria, Perú; 2011.

- 12 López Llave LJ. Evolución y Análisis de la Producción y Exportación de Uvas de . Mesa: 2000-2012. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Contables; 2012.
- 13 Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Principales Indicadores . Departamentales. Informe Estadístico. Lima: Ministerio de Economía y Finanzas, Lima; 2012.
- 14 Reinders HP. Conservación, manejo y recuperación de los recursos naturales y . desarrollo productivo en la cuenca del río Cumbaza Tarapoto: CEDISA; 2003.
- 15 Chinchilla M, Mata R, Alvarado A. CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE . ALGUNOS ULTISOLESDE LA REGIÓN DE LOS SANTOS, TALAMANCA, COSTA RICA. Agronomía Costarricense. 2011 Marzo; XXXV(1).
- 16 Tadeo Rangel MÁ. La genética forense en México su aplicación legal y el banco de . datos Genéticos. Tesis de Grado. Zaragoza: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES; 2013.
- 17 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the . Cell. V ed. Anderson M, Granum S, editors. Nueva York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.; 2008.
- 18 Sayre A. Rosalind Franklin and DNA Nueva York: W. W. Norton & Co.; 2001.
- 19 Alcoceba Gil JM. CIENCIA Y PROCESO: LA PRUEBA DEL ADN EN EL . PROCESO PENAL ESPAÑOL. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Carlos III de Madrid, DEPARTAMENTO DE DERECHO PENAL, PROCESAL E HISTORIA DEL DERECHO; 2015.
- 20 Meiliana A, Mustika Dewi N, Wijaya A. Genome Editing with CRISPR-Cas9 Systems: . Basic Research and Clinical Applications. Indones Biomedical Journal. 2017; IX(1).
- 21 van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of Genomic . Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. Clinical Microbiology Reviews. 2001 Julio; 14(3).
- 22 Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of Species with DNA-Based . Technology: Current Progress and Challenges. Recent Patents on DNA & Gene Sequences. 2008;(2).

- 23 Salazar Montes A, Sandoval Rodríguez A, Armendáriz Borunda J, editors. *Biología Molecular: Fundamentos y Aplicaciones en las Ciencias de la Salud* México D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES; 2013.
- 24 Zavala Castro JE. *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular* Yucatán: Universidad Autónoma de Yucatán; 2005.
- 25 Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J, editors. *Advances in Biotechnology* Nueva Delhi: Springer; 2014.
- 26 Bisht S. DNA Sequencing: Methods and Applications. In Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J, editors. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer India; 2013. p. 11-21.
- 27 Shendure J, Balasubramanian S, M. Church G, Gilbert W, Rogers J, A. Schloss J, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017 Octubre; DL(7676).
- 28 Munshi A, editor. *DNA SEQUENCING-METHODS AND APPLICATIONS*. 1st ed. Rijeka: InTech; 2012.
- 29 Pellerone FI, Edwards KJ, Thomas MR. Grapevine microsatellite repeats: Isolation, characterization and use for genotyping of grape germoplasm from Southern Italy. *VITIS*. 2001; 40(4).
- 30 Prasad MP. Molecular characterization and genetic diversity determination of Hibiscus species using RAPD molecular markers. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2014; IV(3).
- 31 Cabrera-Soto ML, Salinas-Moreno Y, Velázquez-Cardelas GA, Espinosa Trujillo E. CONTENIDO DE FENOLES SOLUBLES E INSOLUBLES EN LAS ESTRUCTURAS DEL GRANO DE MAÍZ Y SU RELACIÓN CON PROPIEDADES FÍSICAS. *AGROCIENCIA*. 2009 Diciembre;(43).
- 32 Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*. 2014 Diciembre; 31(2).
- 33 Martínez-Flores S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002 Agosto; XVII(6).
- 34 Wang SP, Huang KJ. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*. 2004; A (1032).

- 35 Andersen ØM, Markham KR, editors. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and . Applications Boca Ratón: Taylor & Francis Group; 2006.
- 36 M.G. , Miguel. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory acitivities. Journal . of Applied Pharmaceutical Science. 2011; I(6).
- 37 del Valle Leguizamón G, González León A, Báez Sañudo R. ANTOCIANINAS EN . UVA (*Vitis vinifera* L.) Y SU RELACIÓN CON EL COLOR. Revista Fitotecnica Mexicana. 2005; XXVIII(4).
- 38 Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic . Fractions Separated from an Italian Red Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998 Febrero; 46(2).
- 39 Wang SY, Jiao H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, . hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000 Noviembre; 48(11).
- 40 Colín-Urieta S, Ochoa-Ruiz HG, Rutiaga-Quñones JG. CONTENIDO DE TANINOS . EN LA CORTEZA DE DOS ESPECIES DE PARÁCATA (*Erythroxyton*). Revista Chapingo. 2013; 19(1).
- 41 Cardoso Vieira M, Costa Lelis RC, Couto da Silva B, de Lima Oliveira G. Tannin . Extraction from the Bark of *Pinus oocarpa* var. *oocarpa* with Sodium Carbonate and Sodium Bisulfite. Floresta e Ambiente. 2011; 18(1).
- 42 Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez- . Parrilla E, de la Rosa LA, et al. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. Nutrición Hospitalaria. 2015 Enero; 31(1).
- 43 Rajha HN, El Darra N, Hobaika Z, Bousetta N, Vorobiev E, Maroun RG, et al. . Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. Food and Nutrition Sciences. 2014 Febrero; V(4).
- 44 Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Jorge S, Núñez MJ. Effect of Solvent, Temperature, and . Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005; LIII(6).

- 45 Waterhouse A. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. [Online].; . 2012 [cited 2018 Mayo 22. Available from: <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/folin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>.
- 46 Isla MI, Salas A, Danert FC, Zampini IC, Ordoñez RM. Analytical methodology . optimization to estimate the content of non-flavonoid phenolic compounds in Argentine propolis extracts. *Pharmaceutical Biology*. 2014 Febrero; LII(7).
- 47 Lee J, Durst RW, Wrolstad R. Determination of Total Monomeric Anthocyanin . Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 2005; LXXXVIII(5).
- 48 Makkar HPS. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage: A Laboratory . Manual: Springer Science & Business Media; 2013.
- 49 Ciużyńska A, Lenart A. Freeze-Drying – Application in Food Processing and . Biotechnology – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2011; LXI(3).
- 50 Cortez MV, Soria EA. The Effect of Freeze-Drying on the Nutrient, Polyphenol, and . Oxidant Levels of Breast Milk. *BREASTFEEDING MEDICINE*. 2016; XI(10).
- 51 Shofian NM, Hamid AA, Osman A, Saari N, Anwar F, Pak Dek MS, et al. Effect of . Freeze-Drying on the Antioxidant Compounds and Antioxidant Activity of Selected Tropical Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; XII(7).
- 52 Tournour HH, Segundo MA, Magalhães LM, Barreiros L, Queiroz J, Cunha LM. . Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*. 2015 Noviembre; LXXIV.
- 53 Cocklar H, Akbulut M. Anthocyanins and phenolic compounds of *Mahonia aquifolium* . berries and their contributions to antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2017; XXXV.
- 54 Katalinic' Va, Smole Mozina S, Skroza D, Generalic' I, Abramovic H, Miloš M, et al. . Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*. 2010;(119).

- 55 Márquez Mendoza GdC. Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las . antocianinas de los frutos rojos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. "red globe" cultivados en Perú. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2011.
- 56 Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. Use of tanning-binding chemicals to . assay for tannins and their negative posingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 2001;(91).
- 57 MAKKAR HPS, BLUMMEL M, BECKER K. Formation of complexes between . polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in in vitro techniques. *British Journal of Nutrition*. 1995;(73).
- 58 Filgueira Garro I. CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE . EXTRACTOS ACUOSOS DE ORUJOS DE UVA. Navarra: Universidad Pública de Navarra, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos; 2017.

