

00528
35



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

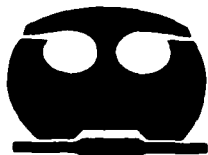
**ANTIOXIDANTES NATURALES DERIVADOS
DE
LA CÁSCARA DE UVA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA.

DULCE MARIA FLORES ALVAREZ



MEXICO, D. F.

2003



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidenta

FRANCISCA ITURBE CHINAS

Vocal

ARTURO NAVARRO OCAÑA

Secretario

LUIS ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR

1er. Suplente

CLAUDIA LUCIA MANCILLA ASCENCIO

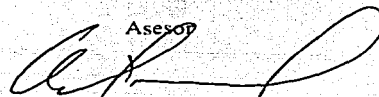
2do. Suplente

BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA

Laboratorio 321, Conjunto E.
Facultad de Química, UNAM.

Asesor


Dr. Arturo Navarro Ocaña

Sustentante


Dulce María Flores Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Arturo Navarro Ocaña y Esposa, por el apoyo, paciencia, orientación y consejos que durante cada una de las etapas de la realización de este trabajo me brindaron, porque siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos en que me acerque a ellos, por su interés en la culminación de mi carrera y sobre todo por la confianza que me tuvieron en todo momento. Gracias.

A los Profesores Francisca Iturbe Chinas, Luis Orlando Abrajan Villascñor por sus sugerencias y aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A Julieta Sandoval Guillén y Lucia Mancilla Ascencio, por sus consejos y por estar siempre al pendiente con los avances y conclusión de esta tesis.

A las Profesoras Graciela Fernández, Silvia Mendoza y Ernestina Cerveira que con su tiempo, enseñanzas y motivaciones, contribuyeron a la culminación de mi carrera.

A los Doctores Sergio Mateos y Francisco Ruiz Terán que siempre tuvieron un consejo oportuno y por brindarme su amistad y confianza.

A la Profesora Imelda Velásquez por su ayuda y colaboración durante la etapa de investigación de éste trabajo.

A TODOS USTEDES MIL GRACIAS.

DEDICATORIAS

A DIOS

Que ha sido la luz que ha alumbrado mi camino durante el transcurso de mi vida, por la fe, confianza, fuerza y sabiduría que me ha brindado, para tomar cada una de las decisiones que han marcado las etapas de mi crecimiento como ser humano. Por la hermosa familia y amigos que me ha dado.

Por permitirme alcanzar esta meta.

A MI PADRES

Rosario Álvarez Muñoz y Gustavo Flores Piedra, por darme la vida, un hogar, una familia, y ser mis primeros maestros, que me han llevado de la mano, paso a paso en el transcurso de mi vida; por inculcarme valores como la honestidad, el respeto y la responsabilidad, por enseñarme que las equivocaciones o errores también ayudan a crecer, madurar y ser más fuerte día a día; por sus consejos; porque me han impulsado y apoyado en cada una de las metas que me he fijado, y que a base de esfuerzo y sacrificio pudieron darme la Herencia más grande que pude haber recibido, MI EDUCACIÓN,

Y sobre todo por ser las personas más nobles, buenas, maravillosas e importantes de mi vida, por su amor y confianza.

A MIS HERMANOS

Gustavo, Rosario y Sandro, que con su cariño, apoyo, respeto y consejos, pude salir adelante de todos los obstáculos en mi camino, que nunca me han dejado sola y nos hemos mantenido unidos. Por su motivación en las altas y bajas de mi vida, por ser grandes ejemplos, ya que son unas excelentes personas, por su fe y confianza en mi. Y porque siempre seremos una gran familia.

A las familias Flores Casio (Lucy y Valeria), Moreno Flores (Paola y Andrea), Flores , Álvarez, a mis abuelos, tíos (as), primos (as) en especial Elena, por el apoyo que me han brindado en todo momento.

A SAIR SANTAMARÍA JIMÉNEZ

Con quién he compartido los últimos años de mi vida académica y personal, de quién aprendí grandes lecciones de vida, como el que de tropiezos, golpes y caídas dolorosas siempre podremos levantarnos si tenemos la fuerza suficiente para hacerlo; que para alcanzar las metas fijadas no siempre es necesario sacrificar algo o a alguien en el camino, y que los momentos más importantes de nuestra vida, son para compartirlos con las personas que te quieren, te han brindado su apoyo y confianza, y sobre todo porque son irrepetibles

Por ser la persona que me alentó para realizar este trabajo, y que en su momento pudimos sacar adelante, con desvelos y sacrificios, pero al final con recompensas y satisfacciones.

Por lo que significas para mi, por tu apoyo, cariño, paciencia, comprensión y confianza.
GRACIAS.

A MIS GRANDES AMIGOS

Para ustedes que me han acompañado en el transcurso de mi carrera, que me han hecho ver la vida con optimismo, han ayudado y cuidado durante las tormentas más grandes, para ver la luz de un sol brillante en su compañía, con su cariño y sinceridad, por creer y confiar en mi en todo momento y enseñarme a valorar ese sentimiento tan hermoso como lo es LA VERDADERA AMISTAD, por formar parte de esta meta y sobre todo por nuestra amistad que perdurará mientras estemos vivos. Los quiero. Mil gracias a Antonio Hernández, Gabriel Padilla, Iliana Angeles, Jazmín Martínez, Juan Carlos Martínez, Luis Israel Morales y Mariluz López.

Para David Pimentel, Guillermo Carranza, Oscar Fernández, Hiram Carro, Angélica Villalobos, Salvador Rangel, Cristian de la Cruz, y Luis Enrique Hernández, que han estado al tanto de mí y de lo que me pasa, que la distancia y el tiempo no han podido desaparecer ese lazo de compañerismo y amistad, con quienes en su momento tuve la fortuna de convivir y aprender muchas cosas durante mi formación personal y profesional, para ustedes.

A mis compañeros del laboratorio 321-E, Adriana, Leonardo, Victor, Teresa, Carmen y Alfonso, que vivieron de cerca la realización de este trabajo, por su apoyo y consejos, por los momentos agradables que compartimos. Y para todos los que me faltaron.

Y finalmente a mi Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química por haber sido mi segunda casa en los últimos años de mi vida, en la cual crecí como persona en todos los ámbitos, por darme unos buenos Profesores y compañeros de quienes aprendí y que contribuyeron en mi formación académica, por todos los momentos vividos en tus instalaciones y por permitirme ser orgullosamente Puma.

*CON TODO MI AMOR, ADMIRACIÓN Y RESPETO
MUCHAS GRACIAS*

F



INDICE

Página

CAPITULO I- INTRODUCCIÓN

1.1	Justificación	1
1.2	Objetivos	2
1.3	Hipótesis	3

CAPITULO II- ANTECEDENTES

2.1	Residuos Agroindustriales y sus Aplicaciones	4
2.1.1	Subproductos derivados de verduras	7
2.1.2	Subproductos derivados de granos y semillas	8
2.1.3	Subproductos derivados de Frutas	9
2.2	Orujo de uva y su composición	12
2.2.1	Estudios realizados al orujo de uva (cáscara y semilla)	13
2.3	Producción del vino	14
2.3.1	Composición química del vino	15
2.3.2	La viticultura en México	18
2.3.2.1	Varietades de uva en México	19
2.4	Fisiología de la uva	23
2.5	Aditivos para Alimentos	25
2.5.1	Clasificación de los Aditivos	26
2.6	Antioxidantes	29
2.6.1	Características de los Antioxidantes	29
2.6.2	Mecanismo de acción de los Antioxidantes	33
2.7	Clasificación de los Antioxidantes	34
2.7.1	Antioxidantes Sintéticos	34
2.7.1.1	BHA Butilhidroxianisol	34
2.7.1.2	BHT Butilhidroxitolueno	36
2.7.1.3	TBHQ Terbutilhidroquinóna	37
2.7.1.4	PG Galato de propilo	38
2.7.2	Antioxidantes sinérgicas	38
2.7.3	Antioxidantes Naturales	39
2.7.3.1	Tocoferoles	39
2.7.3.2	β - caroteno	41
2.7.3.3	Ácido Ascórbico	42
2.8	Compuestos polifenólicos	43
2.8.1	Aplicación de los polifenoles naturales	44
2.9	Flavonoides y su importancia	45
2.9.1	Métodos de extracción de Flavonoides	49
2.9.2	Caracterización de Flavonoides	50
2.9.3	Evaluación de Antioxidantes	51
2.9.3.1	Radical-DPPH	51
2.9.3.2	ABTS	52
2.9.3.3	Blanqueo con β -caroteno	53

**CAPITULO III- DESARROLLO EXPERIMENTAL**

3.1	Material y Reactivos	56
3.1.1	Primera Etapa: Acondicionamiento de la muestra y Extracción de Antioxidantes	56
3.1.2	Segunda Etapa: Evaluación Cualitativa y Cuantitativa	56
3.1.3	Tercera Etapa: Purificación de Extractos	56
3.1.4	Cuarta Etapa Extracción Selectiva	56
3.2	Equipo	57
3.3	Metodología	58
3.3.1	Primera Etapa (Acondicionamiento de la Muestra y Extracción de Antioxidantes	60
3.3.2	Segunda Etapa (Evaluación Cualitativa y Cuantitativa)	
3.3.2.1	Evaluación Cualitativa	60
3.3.2.2	Evaluación Cuantitativa	
3.3.2.2.1	Actividad Secuestrante. Radical-DPPH	60
3.3.2.2.2	Actividad Antioxidante. Blanqueo con β -caroteno	61
3.3.2.2.3	Fenoles Totales. Método de Davis.	61
3.3.3	Tercera Etapa (Purificación de Extractos)	
3.3.3.1	Cromatografía en columna de celulosa	63
3.3.3.2	Cromatografía en columna de Sephadex LH-20	63
3.3.4	Cuarta Etapa (Extracción Selectiva)	
3.3.4.1	Fraccionamiento del extracto Crudo	64

CAPITULO IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Primera Etapa (Acondicionamiento de la muestra y Extracción de Antioxidantes)	66
4.2	Segunda Etapa (Evaluación Cualitativa y Cuantitativa)	
4.2.1	Evaluación Cualitativa	67
4.2.2	Evaluación Cuantitativa	
4.2.2.1	Actividad Secuestrante. Radical-DPPH	69
4.2.2.2	Actividad Antioxidante. Blanqueo con β -caroteno.	71
4.2.2.3	Fenoles Totales. Método de Davis.	73
4.3	Tercera Etapa (Purificación de los extractos)	
4.3.1	Cromatografía en Columna de Celulosa	75
4.3.2	Cromatografía en Columna de Sephadex LH-20	77
4.4	Cuarta Etapa (Extracción Selectiva)	
4.4.1	Fraccionamiento del Extracto Crudo	78
4.4.2	Evaluación Cualitativa	80
4.4.3	Evaluación Cuantitativa	
4.4.3.1	Actividad Secuestrante. Radical-DPPH	82
4.4.3.2	Actividad Antioxidante. Blanqueo β -caroteno	84
4.4.3.3	Fenoles Totales. Método de Davis	85

**CAPITULO V- CONCLUSIONES**

5.1 Conclusiones	87
RECOMENDACIONES	88
ANEXO I	89
BIBLIOGRAFÍA	90



1 INTRODUCCION

1.1 JUSTIFICACIÓN.

La preocupación de la opinión pública por la adición de antioxidantes sintéticos y la seguridad de los alimentos, han desencadenado una continua búsqueda de nuevos antioxidantes que existan en forma natural en los alimentos (vegetales, semillas, cereales y frutos), entre los cuales se pueden mencionar los jitomates, espinaca, pimienta verde, tamarindo, semilla de girasol, canola, grano de maíz, manzana, kiwi, cerezas y la frambuesa. Pueden ser compuestos como la vitamina C, vitamina E, β -caroteno, así como los de tipo fenólico (ácidos fenólicos y cinámicos, estilbenos y flavonoides). En la industria vitivinícola, hay gran cantidad de residuos de uva (aproximadamente entre 7 y 9 millones de toneladas por año¹) que pueden ser tratados y reutilizados, en la actualidad existen en el mercado extranjero 5 productos derivados de la cáscara de uva como fibra dietética, colorantes (aprobados por la FDA), antioxidantes como suplemento alimenticio, cremas, barnices, labiales, etc., que son empleados en la industria alimentaria y farmacéutica.

Aprovechar a la cáscara de uva (variedad *Barbera*, proveniente de los residuos de Casa Pedro DOMEQ) como materia prima para la obtención de antioxidantes de origen natural, principalmente los de tipo fenólico (Flavonoides) resulta una alternativa atractiva para darle valor agregado e incrementar la disponibilidad de los antioxidantes de uso comercial: así como para obtener estándares de compuestos que tienen un alto valor económico en el mercado.



1.2 OBJETIVOS

GENERAL:

- Aprovechar un residuo industrial (cáscara de uva, variedad *Barbera*) como fuente de antioxidantes para su aplicación en la industria alimentaria.

PARTICULARES:

- Extracción de los antioxidantes presentes en la cáscara de uva (variedad *Barbera*), con disolventes de diferente polaridad (acetona-agua, etanol-agua y metanol-agua).
- Aplicación de métodos espectrofotométricos y cromatográficos para la caracterización y cuantificación de los antioxidantes presentes en la cáscara de uva.
- Comparación cuantitativa de la actividad secuestrante, antioxidante y contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos de la cáscara de uva.
- Emplear y comparar dos métodos diferentes de purificación (cromatografía en columna y extracción selectiva) y determinar cual de los dos es más eficiente.



1.3 HIPOTESIS

- Considerando que por lo general los antioxidantes a estudiar (flavonoides) presentan características polares, su extracción con disolventes con comportamiento similar, proporcionaran un mayor rendimiento y actividad, mismo que se comprobará mediante su evaluación cualitativa y cuantitativa.

- Habiéndose realizado estudios a la cáscara de uva de diversas variedades se han podido fraccionar los diversos componentes que la integran por cromatografía en columna en celulosa y Sephadex LH-20, por lo cual al someter a la cáscara de uva (variedad *Barbera*) se espera obtener una separación similar.

- En un estudio previo se empleo la extracción selectiva como una alternativa en los métodos de separación a extractos de la semilla de uva, los cuales se separaron en fracciones que van desde polímeros, oligómeros y monómeros. Al aplicar este método a los extractos de la cáscara de uva (variedad *Barbera*) se obtendrán fracciones semejantes a las de las semillas.



2 ANTECEDENTES

2.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SUS APLICACIONES

En las distintas actividades humanas, tanto domésticas como industriales, existe generación de residuos diversos, que a causa del volumen alcanzado y una eventual peligrosidad, deben ser manejados adecuadamente con el fin de minimizar su impacto ambiental. Los residuos agroindustriales, a pesar de que no tienen carácter peligroso, pueden provocar problemas medioambientales importantes si no son gestionados correctamente. Por tanto, la caracterización de los residuos es imprescindible no sólo con el fin de determinar la metodología apropiada para su disposición final, sino también para su evaluación como materias primas en otros procesos de producción o para la recuperación de productos de valor agregado (colorantes, aceites vegetales, aceites esenciales, proteína, almidón, gomas, fibra, y antioxidantes). De este modo es posible obtener productos a partir de residuos, aumentando la rentabilidad global del proceso productivo, contribuyendo al sostén económico de la actividad industrial y al mismo tiempo reduciendo sensiblemente el impacto al medio ambiente ⁽¹⁾.

El problema que muchas industrias enfrentan es que son incapaces de capturar el valor de este material. Este hecho puede atribuirse a tres factores; primero, el número de industrias auxiliares que puedan hacer uso de estos subproductos es pequeño; segundo, los campos de mercado, no son tan amplios para promocionar y vender como alimento para los animales estos materiales, además de que requiere de una inversión y en ocasiones de tecnología; y el tercero es la falta de información que generalmente es difusa para el aprovechamiento y uso de estos derivados, porque se enlaza estrechamente a industrias específicas que generan los subproductos ⁽²⁾.



Algunas empresas buscan información para mejorar el uso de sus residuos, aunque en algunos campos agrícolas ya se han establecido negocios exitosos a base de los subproductos, algunos supermercados compran estos, considerados en la industria como de desecho provenientes de rastros, productores de comida, granjas, fábricas de conservas, productos de comida congelada, comida deshidratada, restaurantes, etc., para la preparación de compostas o como fuente de energía ⁽²⁾.

Los que representan una especial atención son los residuos de la agricultura y de las industrias alimenticias, que son abundantes y cuya eliminación representa a menudo un problema. Sin embargo son fuentes de bajo costo y con potencial riqueza en vitaminas, proteínas, fibra, aceites vegetales y esenciales, además de antioxidantes naturales.

Estudios recientes han demostrado que en residuos como la cáscara de papa, pulpa de zanahoria, aceitunas, cáscaras y bagazos de frutas cítricas, pomace de manzana y orujo de uva, se han identificado algunos compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, que a las frutas y verduras les proporcionan protección contra algunas enfermedades ^(4,5), así también los extractos obtenidos de estas fuentes residuales, han presentado excelentes resultados en actividad antioxidante; en algunos casos han sido comparados con antioxidantes sintéticos y más eficientes.

Estos antioxidantes pueden aumentar la vida de anaquel de algunos alimentos, previniendo el daño oxidativo que estos pudieran sufrir. También se han propuesto para prevenir la pérdida o mejorar la estabilidad de algunos pigmentos en jugos en la industria de los alimentos, o para la estabilización de algunas fórmulas farmacéuticas, como suplementos alimenticios o en cosméticos ⁽⁶⁾.



Material considerado para algunos de desecho, ha sido estudiado y aprovechado por otros para la obtención de productos considerados como nutraceuticos, probando con investigaciones los beneficios que estos pueden aportar si son consumidos en los alimentos. entre estos se pueden mencionar antioxidantes como la vitamina E, los tocotrienoles, compuestos derivados de limón, entre otros ⁽³⁾.

Con esto se abre un amplio campo de investigación en el sector de los antioxidantes, con perspectivas incluso medicinales.

Actualmente los consumidores son más conscientes de los problemas de salud que pueden originarse por no llevar una dieta alimenticia balanceada en el consumo de frutas y verduras, pero existen grupos grandes entre la población que carecen de este tipo de alimentos, por ello es importante introducir suplementos alimenticios o fortificados como una ruta alterna para el consumo de los antioxidantes, esto en forma particular para los compuestos de tipo fenólico que en contraste con la mayoría de los carotenoides y vitaminas, no se sintetizan químicamente, sino que necesitan ser extraídos del material de las frutas y verduras.

La explotación de subproductos de frutas y verduras como una fuente de compuestos funcionales y su aplicación en los alimentos es un campo prometedor que requiere investigación interdisciplinaria de tecnólogos de alimentos, químicos en alimentos, nutriólogos y toxicólogos. En un futuro cercano, nosotros nos desafiamos para responder a las siguientes necesidades de la investigación: Primero, la tecnología debe perfeccionarse en los procesos de alimentos para minimizar las cantidades de desecho. Segundo, hay una necesidad en la aplicación de los métodos analíticos específicos para la caracterización y cuantificación de micronutrientes orgánicos y otros compuestos funcionales. Tercero, la necesidad de que los compuestos que se obtengan de estos residuos puedan ser evaluados cuidadosamente a nivel toxicológico ⁽³⁾.



A continuación se presenta una clasificación de los subproductos de acuerdo al origen del que provienen, con los respectivos compuestos que pueden ser aprovechados ⁽²⁾.

2.1.1 Subproductos derivados de las verduras.

Estas pérdidas generalmente se presentan en productos hortícolas (por ejemplo, tallos de brócoli, tallos de zanahoria, hojas de espinaca, rábano, etc.) y generalmente es un porcentaje pequeño (por el peso) del movimiento de mercancías del producto total. Los tallos y hojas generalmente son triturados y reutilizados en los campos como fertilizantes en la tierra. Cuando hay cantidades apreciables de los desechos, hay oportunidades para diferentes empresas ya sea para producir biogas o para la generación de energía eléctrica ⁽²⁾.

Jitomate. El aceite de semilla de jitomate ha atraído el interés puesto que es rico en ácidos grasos insaturados, sobre todo en *ácido linoleico*. El Licopeno es el principal *carotenoide* (antioxidante) que causa el color rojo característico de jitomate, se ha extraído de residuos de pasta de jitomate, encontrándose que una cantidad grande de carotenoides se pierde como desecho en el proceso ⁽³⁾.

Zanahoria. El color anaranjado de la raíz se debe al colorante llamado caroteno, que constituye la provitamina A. Varios esfuerzos se han hecho en utilizar el residuo de la zanahoria en alimentos como pan, pasteles, preparación de encurtidos, y para la producción de bebidas funcionales. Sin embargo, la aceptación del consumidor de tales productos necesita todavía ser demostrada ⁽³⁾.

Cebolla. Debido a su fuerte aroma característico y su susceptibilidad a los fitopatógenos, los residuos de la cebolla no son convenientes como forraje. Solo es empleado como sazónador o bien empleado como fuente de antioxidantes (kaemferol, quercetina y sus glicósidos) ^(3,4).



Aceituna. La cáscara puede reutilizarse para la recuperación de aceite de oliva (rico en ácido oleico y linoleico). La cáscara seca se utiliza como combustible o para alimento de ganado. Las aguas desechadas del aceite de oliva son ricas en compuestos antioxidantes naturales por su contenido en α -tocoferol (vitamina E) y en polifenoles, cuyo componente principal es el tirosol. Su color dorado verdoso se debe a los residuos de clorofila y pigmentos carotenoides ⁽³⁾.

Betabel rojo. El betabel se encuentra entre las 10 verduras más potentes con respecto a capacidad antioxidante atribuida a un contenido de fenoles totales de 50-60 μ mol / g en peso seco. Su principal aplicación es como colorante natural (betalainas), además de que contiene algunos antioxidantes como la betacianina, el ácido p-cumárico y ácido ferúlico. ⁽³⁾.

Papa. Las cáscaras son el residuo que se obtiene en mayores cantidades de los procesos de la papa. Se ha mostrado que los extractos acuosos de la cáscara son una fuente de ácidos fenólicos, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina y kaemferol, además de fuente de almidón ^(3, 5).

2.1.2 Subproductos derivados de granos y semillas.

El salvado y germen son subproductos que se obtienen de la molienda de otros granos, generados principalmente de industrias harineras. La cantidad de residuos es relativamente grande en los molinos como la soja y semilla del algodón que se procesan para extraer aceite. Los subproductos del trigo contienen una concentración alta de fibra dietética y proteína, salvado de trigo (ácidos cafeico, vanílico, cumárico, clorogénico, gálico y ferúlico) ⁽²⁾. Hay también valiosos subproductos de la avena incluso la harina de avena (proteína, β -glucano, amidas y ácidos hidroxicinámicos). En el caso del arroz, de su cáscara se puede obtener ácido ferúlico, fibra dietética, aceite de arroz y δ -orizanol ⁽⁵⁾.



Industria del chocolate. La cantidad de residuos es grande, sus principales industrias generadoras son leches de chocolate (malteadas), chocolateras, galleteras, golosinas, etc. Una de las principales aplicaciones de estos residuos es como suplemento alimenticio por la cantidad de antioxidantes naturales que contiene ((+)-catequina, (-)-epicatequina y dímeros de procianidinas), ya que ayudan a disminuir el colesterol, y a prevenir enfermedades cardiovasculares y cáncer ⁽⁶⁾.

El maíz es procesado a menudo por molienda húmeda que se usa en la fabricación de jarabe de maíz, almidones y dulcificante. Los subproductos obtenidos de este proceso que se les da un valor agregado incluyen la fibra de maíz. Generalmente se venden subproductos del proceso de la molienda seca como alimento para animales. Además del etanol y anhídrido carbónico, el glicerol es uno de los mayores subproductos de la fermentación del maíz. De las aguas madres obtenidas del procesamiento del maíz se obtienen grandes cantidades de antioxidantes naturales (ácido ferúlico y clorogénico) ⁽²⁾.

2.1.3 Subproductos derivados de Frutas

La disposición de este desecho representa un problema cuando el material de la planta no es usado al instante, el cual normalmente sufre contaminación microbiana, por lo que limita su posterior explotación ⁽³⁾. Un poco de estos residuos de cáscaras y centros de frutas tienen un alto valor, por ejemplo, algunas se emplean generalmente para la obtención de colorantes naturales, aceites esenciales, ceras, vitaminas, fibra y antioxidantes.

Durazno. la semilla es empleada como suplemento alimenticio ya que es fuente rica de vitamina B₁₇, antioxidantes como quercetina, kaemferol y mirecitina ^(2,5).

Industria azucarera. Médula de caña (ácidos ferúlico, clorogénico) ⁽²⁾.

Manzana. La alta variabilidad en la composición del pomace (cáscara) de manzana y las posibles estrategias de utilización han sido revisadas recientemente. La producción de pectina es considerada la



manera más razonable de utilizar el pomace de la manzana desde el punto de vista económico y ecológico ⁽³⁾. Por otro lado ha mostrado ser una buena fuente de polifenoles, que se localizan predominantemente en las cáscaras (ácido clorogénico, ácido ferúlico, (-)-epicatequina, procianidina B2, quercetina-3-glucosa) y se extraen en el jugo a una magnitud menor. La explotación comercial para la recuperación de estos compuestos parece prometedora. Los efectos de los polifenoles de la manzana inhiben la caries por estreptococos, por lo que podrían aplicarse en cremas dentales ^(7, 8).

Frutas Cítricas. Debido a las grandes cantidades que se procesan en la industria de los jugos, una industria de derivados ha evolucionado considerablemente para utilizar las cáscaras residuales, membranas, semillas, y otros componentes. Los residuos de producción de jugos de cítricos son una fuente de pulpa seca y melazas, fibra-pectina, esencias, etanol, aceite de la semilla. En las cáscaras de los cítricos se ha encontrado que tienen alta actividad antioxidante (limonoides y flavonoides) ^(3, 5), naranja (naringina y rutina), semilla de limón (naringina y diosmina) ⁽⁹⁾.

Mango. Las semillas del mango pueden usarse como una fuente de antioxidantes naturales como el ácido galico y sus ésteres: ácido 3, 4-dihidroxi benzoico, mangiferina, (+)-catequina, (-)-epicatequina. Siendo también una fuente prometedora de aceite comestible, ha llamado la atención porque su perfil de ácidos grasos es similar a la de la mantequilla de cacao ^(3, 10).

Piña. El material desechado carnoso que es el resultado de la producción de jugo, contiene cantidades sustanciales de sacarosa, almidón y hemicelulosa, y puede usarse por consiguiente para la producción de etanol, el centro de la piña y otras frutas se usan como dulcificantes naturales. El deterioro enzimático que producen las manzanas frescas se inhibe con el jugo de la piña, ya que se ha demostrado que éste tiene propiedades antioxidantes ((+)-catequina, (+) -epicatequina, ácido ferúlico), además de ser empleado para obtener enzimas proteolíticas ⁽³⁾.



Papaya. Aporta vitamina C además de muchos β -carotenos. De la papaya se obtiene una enzima proteolítica (Papaina), usada como ablandador de carne y como agente estabilizante en la industria de bebidas y pinturas, se recupera del látex de la papaya, en gelatinas para aumentar su solubilidad, para procesos de curtido de cuero. De las semillas de la papaya se obtiene un aceite que es rico en ácido linoleico (65 %) ⁽³⁾.

Plátano. Rico en vitamina A, complejo de vitamina B y vitamina C. Algunos productores le han dado un valor agregado a sus subproductos como ejemplo podemos mencionar el tallo y cáscara que se emplea como fibra para papel hecho a mano ⁽³⁾.

Uva. Aproximadamente 9 millones de toneladas de su residuo se producen al año a nivel mundial ⁽¹⁾, este proviene principalmente de la elaboración de los vinos y está constituido de cáscara y semilla (orujo de uva) ⁽³⁾. Recientemente se ha encontrado que la cáscara es fuente rica de fibra, colorantes y antioxidantes, y las semillas de la uva son fuentes ricas de aceites (ácido linoleico y oleico), además de polifenoles, sobre todo de procianidinas que estas poseen un alto poder antioxidante ^(1,2,5).

Los subproductos del orujo de uva (cáscara, semilla), como lo son el aceite y extractos crudos ricos en antioxidantes se les pueden dar aplicaciones en la industria, por ejemplo ⁽¹⁴⁾, en el caso del aceite este puede ser utilizado en ensaladas, para la elaboración de frituras, como constituyentes en mayonesas y margarinas, en la industria de cosméticos como barnices, cremas, maquillajes y labiales (ayudan a suavizar la textura y unificar el tono del rostro) ⁽¹³⁾; en el caso del extracto crudo puede ser utilizado como colorante para bebidas que ya está aprobado por la FDA en los E.U. en galletas, golosinas como paletas, pulpas, caramelos ó como suplemento alimenticio (fibra dietética y antioxidantes) ⁽¹²⁾.



Debido a esto se da énfasis al uso de residuos como fuente de antioxidantes, siendo el orujo de uva (cáscara y semilla) el más prometedor, por el contenido de compuestos de tipo fenólico, como los flavonoides.

2.2 ORUJO DE UVA Y SU COMPOSICIÓN

Los principales derivados industriales del fruto de la uva son el vino y el zumo natural. La vinificación consume la mayor parte de producción de uva, de esta forma se obtiene una gran cantidad de residuos industriales ⁽¹¹⁾.

Del tratamiento de la uva para producir vino se obtiene un residuo o remanente, llamado orujo de uva, consiste principalmente de la piel u hollejo, parte de pulpa o células destruidas de la pulpa, semillas y tallos. En porcentajes esta constituido de un 60 a 70 % de agua y de un 30 a 40 % de parte sólida. La cantidad de orujo es de un 20 al 30 % del peso de la uva tratada. Cuando este orujo se prensa, su composición media es: agua, del 45 al 55 %, parte sólida, del 45 al 55 % ^(11, 12).

El orujo se puede aprovechar de muchas maneras. La mayoría de la pérdida se extiende en las viñas. Su efecto benéfico en la tierra esta dado por su materia orgánica agregada, ya que mejora la penetración del agua y la disponibilidad de nutrientes. Se usa como alimento de ganado, y en algunas áreas se quema en las plantas para producir energía. Cada vez más se preparan compostas para uso en jardines, paisajes, viñas, y otras cosechas ^(2, 12).

Los componentes químicos del orujo de la uva son numerosos: alcoholes, ácidos, aldehídos, ésteres, pectinas, sustancias minerales, fibra, glicerina, azúcares, polifenoles (antioxidantes) ⁽¹⁴⁾ quercetina-3-glucosa, ácido ferúlico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina y procianidinas, los cuales han sido evaluados cualitativamente y cuantitativamente en actividad antioxidante por diferentes métodos, obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a su actividad antioxidante con respecto a antioxidantes de uso comercial (BHT, TBHQ, etc), además de que es fuente de ácido tartárico y otros ingredientes ^(11, 13, 15).



La calidad del orujo de la uva está basada en la madurez de las uvas en la vinificación, calidad del vino producido, volumen alcohólico, cantidad de uva y vino que contiene, y en el sistema que se ha usado para obtener el vino ⁽¹⁶⁾.

2.2.1 ESTUDIOS REALIZADOS AL ORUJO DE UVA (cáscara y semilla)

Entre las variedades de uva que se han analizado se puede mencionar la Merlot, Thomson seedless, Flame seedless y black seedless, entre los compuestos que se han encontrado en este tipo de variedades están los flavonoides (catequinas, resveratrol, procianidinas B1, B2, B3, B4, epicatequinas, así como galatos de epicatequina y en menores cantidades galatos de catequinas), pero los resultados solo se han reportado como concentraciones de fenoles totales (no se especifica la cantidad de cada antioxidante), siendo la black seedless la que tiene mayor contenido (920 mg/ Kg) ⁽¹⁷⁾.

Estos polifenoles han sido extraídos de los tallos ⁽¹⁵⁾, cáscara y semillas de orujo de uva ^(18, 19, 20), usando mezclas de disolventes como etanol-agua 80:20, acetona-agua 60:40, etanol 100%, metanol 80:20, acetato de etilo 10%, metanol 50%.

Para conocer como están constituidos los diferentes extractos de la cáscara de uva ^(12, 14, 21), se usan técnicas que permiten identificar y separar como Cromatografía en capa fina (gel de sílice y celulosa), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases, cromatografía en columna (resinas de intercambio iónico, celulosa, poliamida, alumina, magnesol, gel de sílice) ^(22, 23), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Últimamente se ha recurrido a dos técnicas que valen la pena destacar, cromatografía en columna Sephadex LH-20 y extracción selectiva indicada en la patente USA-5 484 594 ^(12, 24), ya que estas técnicas permiten obtener fracciones enriquecidas y menos complejas (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.), además de que son sencillas, y no se requieren de reactivos de alto costo ^(25, 26, 27).

Después de obtener los compuestos en forma individual (monómeros, oligómeros y polímeros) se realizan pruebas para saber que tan efectivos son estos en cuanto a su capacidad antioxidante (método de blanqueo



con β -caroteno), actividad secuestrante (radical-DPPH y ABTS⁺), y contenido de fenoles totales (Folin-Ciocalteu, Trolox y método de Davis) correspondientes a equivalentes de ácido gálico o ácido tánico⁽⁹⁾.
(28, 29, 30, 31, 32).

Para conocer el origen de este residuo, se explica a continuación de manera breve la producción del vino, así como su composición; ya que la cantidad de antioxidantes polifenólicos en el vino, así como en su residuo, depende del proceso de obtención y del tipo de vino.

2.3 PRODUCCIÓN DEL VINO

La palabra vino es utilizada en forma indiscriminada, y por lo tanto equivocadamente, para designar cualquier tipo de bebida etílica. Todas las demás bebidas espirituosas no deben ser llamadas vino. La designación de vino de mesa proviene del hecho que normalmente estas bebidas son degustadas en la mesa, acompañando los alimentos de la comida o de la cena^(28, 33).

La uva es cosechada y colocada en cubas, que posteriormente se llevarán a la máquina despalilladora o estrujadora, que separará las uvas de sus escobajos y las esujara ligeramente, rompiendo los hollejos y liberando su jugo. Esta masa jugosa compuesta de pulpa, semillas y cáscaras de uva, es transvasada a un depósito de fermentación (que puede ser de acero inoxidable, cemento o madera)^(28, 33).

Una vez en la cuba de fermentación, las levaduras (*Sacharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus*, para fermentación alcohólica y bacterias como *Micrococcus malolacticus*, *M. variococcus* y *M. Acidovorax* para la fermentación maloláctica) consumen el azúcar del mosto, formando alcohol y gas carbónico, el cual empuja al sombrero (partículas sólidas de semillas y cáscara) hacia la superficie. El tiempo que dicho mosto pasa en contacto directo con el sombrero será determinante para el vino, ya que cuanto más tiempo pase, más color, cuerpo, astringencia y aptitud para el envejecimiento tendrá este.

En la tercera fase, se trasegará el líquido ya hecho vino desde el depósito o cuba de fermentación u otro depósito, separándolo así del sombrero. La pasta sólida o sombrero se enviará a la prensa para obtener vino de prensa, mismo que se añadirá al vino joven en menor o mayor proporción^(28, 33).



Una vez terminado el proceso de fermentación y después de un filtrado y clarificado, una parte se embotellará y la otra se introducirá en barricas de madera para su envejecimiento ^(28, 33).

2.3.1 Composición química del vino.

El vino contiene una elevada proporción de agua el resto del líquido esta dado por el alcohol etílico. Los 200 componentes de esta bebida (glucósidos, lípidos, próticos, sales minerales y vitaminas, entre otros), le confieren propiedades altamente benéficas para el cuerpo humano, ya que la interacción de estas sustancias químicas encierra para el organismo efectos saludables, cuando se ingieren vinos con moderación ⁽²⁸⁾.

Los compuestos del vino que se consideran importantes para este trabajo son los taninos, sabor y color, ya que las características de los extractos crudos de antioxidantes dependen de éstos. A continuación se describen brevemente.

Tanino

La formación del tanino en la uva va acompañada por la utilización de los azúcares. Otros componentes de la vid, como el inositol y la floroglucina también entran en sus síntesis.

En las uvas maduras, el tanino se presenta fundamentalmente en cáscara y semillas. El zumo fresco en uvas de color contiene del 0.02 al 0.05 % de tanino, y el de las uvas blancas del 0.01 al 0.03 %.

El tanino influye en el sabor de las uvas y de sus productos. En pequeñas cantidades, aumenta el atractivo del sabor de las uvas de mesa, del zumo de las uvas y del vino ⁽²⁸⁾.

Sabor

El sabor es una reacción compleja de los receptores olfativos y del gusto. Muchas sustancias contribuyen a dar el sabor de las uvas. Los sabores primarios de los azúcares (dulces) y ácidos (agrios) son los dominantes. En una menor escala el tanino influye en la astringencia del fruto y, por tanto en su sabor, una cantidad pequeña de tanino da a las uvas y a su jugo un gusto vivo, una porción mayor vuelve astringente al fruto (áspero) y otra demasiado pequeña produce un sabor ligero.



El sabor no se determina por las cantidades efectivas de azúcares, ácidos y taninos presentes, sino por las cantidades de estas sustancias en su relación de una con otra: una cantidad de ácido o astringencia puede producir un sabor poco agradable en las uvas que estén bajas de azúcar y un sabor agradable en uvas que tengan mucho azúcar. Las satisfacciones que se obtienen al comer diversas variedades de uvas se deben, principalmente, al aroma y al sabor de los constituyentes olorosos combinados ⁽²⁸⁾.

Color

La coloración verde del hollejo de las uvas es la clorofila. Conforme esta clorofila se desvanece durante la maduración, otros colores previamente encubiertos se vuelven más discernibles. Las uvas blancas que maduran gradualmente en un período largo pierden generalmente la clorofila casi completamente o toman un color pajizo translucido. Generalmente la materia colorante de las uvas sólo se encuentra en las células del hollejo tanto para las variedades blancas como para las de color. La pulpa o parte carnosa de la baya permanece de un color verde pálido o toma un color verde amarillento. Pero hay variedades de uvas negras llamadas tintoreas, cuyo zumo es tinto tanto en el hollejo como en la pulpa. Conforme estas variedades tintas maduran o sobremaduran, las células internas del hollejo se rompen y exudan color de modo que la pulpa, especialmente aquella cerca del hollejo, se colorea.

La intensidad del color varía con la variedad, madurez, condiciones estacionales y nivel de la cosecha. Algunas variedades, especialmente cuando se cultivan en condiciones de clima frío, mantienen el color verde en la madurez. Otras variedades se vuelven amarillas o anaranjadas por la presencia de caroteno o xantofila, en las partes exteriores del hollejo.

La oxidación de estos pigmentos de las variedades tintas de *Vitis vinifera* son monoglucosidos de <delphinina>, <petunidina> y <malvidina> mientras que el color rojo de las variedades de las especies americanas, contienen <cianidina> y <paenoidina> que son diglucosidos. El tinte del zumo o del vino está influido por la acidez, el pH, el tanino y el hierro. Lo azulado del tinte se acentúa por el tanino ⁽²⁵⁾.



Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son derivados de los ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina, estilbenos y flavonoides. Se encuentran en mayor concentración en vinos tintos que en vinos blancos (tabla 1) ⁽²⁸⁾.

Tabla 1. Compuestos fenólicos en la uva tinta ⁽²⁸⁾

Compuesto	Tallo	Piel	Pulpa	Semillas
Ácidos benzoicos	-	0.02	-	-
Ácidos cinámicos	-	0.03	-	-
Flavonoides	-	0.01	-	-
Antocianos	-	1.1	-	-
Leucoantocianos	0.6	0.9	0.05	0.4
Catequinas	0.5	0.5	-	0.6

- Flavonoles. en la piel de las uvas tintas y blancas se han encontrado flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) como lo son la catequina, quercetina, miricetina y el kaemferol (*Fig. 1*), estos pigmentos son amarillos y se encuentran como monoglucosidos ^(5, 8, 16).

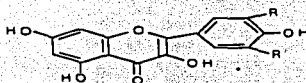
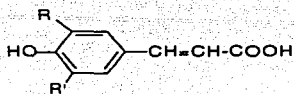


Fig. 1. kaemferol ($R=R'=H$). Quercetina ($R=OH$, $R'=H$)

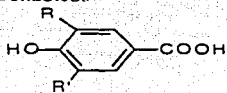
- Taninos, los taninos de la uva son sobre todo leucoantocianidinas, ácidos fenólicos el termino incluye a los ácidos cinámicos C_6-C_3 (*Fig. 2*) y los ácidos benzoicos (*Fig. 3*).

Fig. 2. Ácidos Cinámicos ^(8, 34)



p-Ácido cumárico ($R=R'=H$)
Ácido cafeico ($R=OH$, $R'=H$)
Ácido ferúlico ($R=OCH_3$, $R'=H$)

Fig. 3. Ácidos Benzoicos ^(8, 34)



p-Hidroxibenzoico ($R=R'=H$)
Ácido Vanillico ($R=OCH_3$, $R'=H$)
Ácido gálico ($R=R'=OH$)



De manera general la industria vitivinícola en nuestro país (México) se encuentra distribuida de la siguiente manera.

2.3.2 La viticultura en México.

Las primeras noticias fehacientes de viñedos formalmente establecidos en México se tienen de Fray Toribio de Benavente (Motolinia) entre los años 1536 y 1541, que manifiesta que a cuatro leguas de Puebla de los Ángeles, en la Vega de Val de Cristo, existían viñas, junto con huertas y arboleda. También se sabe que ya en 1541 en tierras de Michoacán existían viñas y se solicitaban tierras para hacer nuevas plantaciones "a fin de que los conquistadores tuvieran con que sustentarse" ⁽³³⁾.

El cultivo de la vid fue avanzando conforme se iban ampliando los límites de las zonas exploradas, llegándose a Texas y Baja California, misión de Loreto, en el año de 1679, de donde irradió a la Alta California, hoy día territorio de Estados Unidos.

Actualmente la superficie vitícola de México ocupa unas 36 300 hectáreas (355 492.85 toneladas), de las cuales 5480 (38 423.45 toneladas) son sembradas de uva para producción de vino, y están repartidas en las siguientes regiones ⁽³³⁾.

Región	Zonas
Sonora	Hermosillo y Caborca
Central	Aguascalientes y Querétaro
Baja California	Valles de Calafia y Guadalupe, Zona de Tecate, Valle de Santo Tomás, San Vicente y Valle de Mexicali.
Comarca Lagunera	Coahuila

Una de las regiones más importantes es la de Baja California; en estos viñedos se localiza la más importante vinícola en alta capacidad y tecnificación que es la Casa Pedro Domecq, y también las vinícolas L. A. Cetto, Monte Xanic y Bodegas Santo Tomás, que así mismo, producen vinos de calidad.



La Casa Pedro Domecq ha sido protagonista importante en el desarrollo y tecnificación de las regiones vinícolas del país así como en la elaboración y mercadeo de productos procedentes de la uva; vinos blancos, limpios, frescos y afrutados; en vinos tintos, vigorosos, secos, ligeramente austeros pero no demasiado tánicos⁽³³⁾.

2.3.2.1 Variedades de uva en México

Las principales variedades de uva que se cultivan en México son:

Cepas blancas

Chardonnay.

Celebre y noble, fácil de cultivar, resistente, vigorosa y generalmente productiva en la mayoría de los suelos y climas. La uva Chardonnay procede de la región de Borgoña, en Francia. Exitosa también por su maleabilidad en la vinificación y por el gran abanico de estilos que presenta. Es la uva blanca más apreciada; en sus aromas varietales destacan el heno, la avellana, el melocotón, la nuez y la manzana; cuando se fermentan y se crían en madera los vinos se muestran más complejos, con notas de manzana madura, humo, pan tostado y vainilla. Como resultado de la fermentación maloláctica en la vinificación, sus caldos adquieren notas nitidas de mantequilla, avellana y levaduras⁽³³⁾.

Sauvignon Blanc

Variedad blanca que produce vinos elegantes marcados por ricos aromas herbáceos y vegetales como las hojas de grosella, la hierba recién cortada, a los que a veces se aunan notas ahumadas y especiadas, sobre todo cuando reciben crianza de roble y madura en botella. En algunos terruños, estas uvas presentan aromas minerales. Protagoniza distintos tipos de vinos, desde blancos jóvenes secos, frescos, perfumados y agradables, hasta los majestuosos y licorosos vinos de sauternes⁽³³⁾.



Chenin blanc

Una cepa de alta acidez y potencialmente de gran longevidad que procede del valle de La Loire. Vinos redondos, alcohólicos y con perfecta aptitud de envejecimiento son los grandes blancos que maduran lentamente. Según la añade, esta variedad nos puede dar una gran gama de vinos que van desde los espumosos de una sequedad extrema hasta las cosechas bien maduras y con unos restos dulces bastante concentrados. Requiere de mucho sol para realzar su sabor intenso afrutado y suavizar su áspera acidez. Sus mejores manifestaciones son los vinos dulces como botritis de larga vida del valle de La Loire, en los que encontramos sabores de manzana, chabacanos, nueces, miel y mazapán ⁽³³⁾.

Riesling

De origen alemán, está considerada junto con la Chardonnay como una de las mejores uvas blancas del mundo. Una clase próspera en climas fríos como el de Alemania y cálidos como el de Australia, que produce un espectro de vinos desde ligero y muy dulce al extremadamente seco y muy alcohólico. Con grandes cualidades para la maduración tardía, ofrece excelentes vinos minerales de sabor afrutado, sobre todo a orillas del Mosela, su principal zona de cultivo. Su gran cualidad: conservar la acidez en la maduración, por esto resulta ideal en la vendimia tardía; sin embargo, el calor la hace perder su temperatura. Manzana verde crujiente, manzanas asadas con especias, membrillo, naranja, tila, fruta de la pasión, mieles (en los dulces), notas minerales, gasolina y tostados son algunos de los sabores que encontramos en los vinos con esta cepa ⁽³³⁾.

Cepas tintas

Barbera

Variedad tinta. En su búsqueda por incorporar nuevos estilos a Baja California se introdujeron a los viñedos de la región un importante número de variedades del norte de Italia. Variedad de color intenso, un acusado sabor frutado no exento de una buena dosis de acidez, un bajo contenido tánico y un acabado tan



astriigente como seco, esta uva ofrece todo su esplendor cuando es joven. Da vinos robustos, de tono sombrío, muy apreciados ⁽³³⁾.

Viognier

Típica de las Cotes-du-Rhone septentrionales en Francia, produce vinos muy aromáticos como los Condrieu o cote Rotie. Aunque es una uva poco productiva, ofrece gran potencial aromático que recuerda en vinos jóvenes a las violetas, duraznos y chabacanos, pasado el tiempo, a mieles y especias. También se utiliza para vinos dulces y espumosos ⁽³³⁾.

Cabernet Sauvignon

Variedad tinta apreciada en todo el mundo para elaborar vinos de crianza que se adapta fácilmente a los climas templados. Su piel gruesa y oscura y su intensidad de color producen un vino profundo con taninos intensos de gran estructura y extrema elegancia. Los vinos resultado de esta cepa tienen la cualidad de envejecer por mucho tiempo y ganan aún más si son envejecidos en roble. Como base de los célebres cruz clases des Médoc se ha elevado a nivel internacional y se ha convertido en la variedad de tinto más apreciada. Vinos con fuerza, aromas a cedro y cassis, pimienta, chocolate negro y aceitunas definen a los Cabernet Sauvignon. De los vinos tintos que se beben en la vida, prácticamente el 80% de las veces será un Cabernet Sauvignon ⁽³³⁾.

Merlot

Menos tánica que la Cabernet Sauvignon, esta uva es apropiada para la elaboración de vinos varietales o para mezclas con otras especies más fuertes y con mayor potencial tánico. En la zona de Burdeos (Pommerol), donde esta uva consigue los mejores resultados, reina sobre el Petrus y Le Pin. La Merlot, afrutado y aterciopelada, madura con mayor rapidez que la Cabernet y se muestra como varietal (no mezclada con ninguna otra) en todo el mundo. Esta variedad aporta a los vinos una sensualidad frutal



sorprendente con algunas notas vegetales. En sus sabores encontramos las ciruelas negras, confituras de frambuesa y de moras, rosas, especias y de pastel de frutas ⁽³³⁾.

Misión.

Variedad antigua de México, que se sembraba en las misiones de California. Adecuada para la producción de vinos tintos ligeros. Fue llevada a Argentina para iniciar su viticultura, con el nombre de Criolla ⁽³³⁾.

Pinot Noir

Variedad tinta noble cuyo cultivo ha traspasado todas las fronteras por su elegancia y redondez, situándola en la cumbre de los tintos de Borgoña. Cepa sutil que resiste bien los fríos del invierno, pero debido a su temprana vegetación, esta expuesta a las heladas de la primavera. Una variedad de cultivo difícil, pero sus vinos poseen una personalidad admirable desde su juventud con grandes cualidades para crianza en botella en la que adquieren una bella complejidad con el tiempo. Los tintos de Pinot Noir, nos aportan notas de cereza, frambuesa, fresa, violeta y regaliz ⁽³³⁾.

Sirah.

Vinos intensos de tonos violeta cargados, potentes y con gran capacidad de envejecimiento son los clásicos de la cepa Sirah, cultivada en el valle del Ródano en Francia y uva central del grange australiano (donde se conoce como shiraz). Esta cepa ha aportado al mundo, en los últimos años, vinos de gran calidad bien pigmentados, aromáticos, con taninos jugosos y nobles por la extraordinaria calidad de sus cosechas. Uno de sus grandes talentos es la personalidad que imprime a sus vinos según su origen: exquisitas notas a frambuesa, grosellas, cerezas negras caracterizan el shiraz australiano, mientras que en el Hermitage y Cote Rotie francés se encuentran matices de especias y cuero ⁽³³⁾.



Cabernet Franc

Considerada por muchos años como la hermana menor de la *Cabernet Sauvignon*, su temprana maduración la hace apropiada para las zonas frías como Saint Emilion. Esta cepa produce vinos más ligeros, vivos y menos tánicos, con un carácter vegetal y herbáceo, evoca frutas frescas como la frambuesa o matices florales como la violeta; con la edad puede desarrollar notas de fruta y un pequeño toque ahumado ⁽³³⁾.

En general los vinos de esta cepa se utiliza para ensamblar con otros, en especial con los Cabernet Cheval Blanc, un premier grand cru classé A, es predominante y contribuye ampliamente al bouquet del Chateau Aut.-Brion. Otro de los grandes bordeleses ⁽³³⁾.

2.4 FISILOGIA DE LA UVA

La botánica sistemática sitúa a la vid en la más importante agrupación del reino vegetal: las Cormofitas (plantas con raíz, tallo y hoja, autótrofas con clorofila y reproducción constante sexual, además de la vegetativa); Tipo Fanerógamas o Espermafitas (plantas con flores y semillas); subtipo Angiospermas (plantas con semillas encerradas en un ovario); clase Dicotiledóneas (con dos hojas embrionarias en la base de la plántula); Orden Ranales (plantas leñosas con un solo ciclo de estambres situadas delante de los pétalos); Familia Vitáceas (flores con corola de pétalos soldados superiormente y de prefloración valvar, con cáliz poco desarrollado, gineceo generalmente bicarpelar y bilocular, con fruto en baya) y género *vitis* (con flores exclusivamente dioicas en las especies silvestres, y hermafroditas o unisexuales en las cultivadas) ^(35, 36).

El fruto de la vid, la uva, ha sido muy apreciado por el hombre desde la más remota antigüedad. Como fruta, por sus buenas características nutritivas, excelente sabor y aroma.



Las bayas tienen un peso unitario del orden de 1 a 2 gramos, pero pueden llegar hasta los 4 gramos. Cada baya está constituida por un hollejo, que es una piel o película delgada y elástica con una delgada capa cerosa que hace resaltar el aspecto de la baya e impide pérdidas de agua y daños mecánicos, de ésta forma el hollejo contiene la mayor parte de los constituyentes del aroma, color y sabor; un mesocarpio carnoso y jugoso, o pulpa; y de un endocarpio, tejido que recubre las oquedades donde se alojan las semillas o pepitas, que prácticamente no se diferencia del resto de la pulpa. Las proporciones relativas de piel, pulpa y semillas son, respectivamente, 6-10, 80-90 y 1-6 % ^(35, 36).



La piel se denomina también pellejo u hollejo y esta formada por una epidermis y unas capas de células subyacentes; son importantes en ella los pigmentos amarillos y rojos y las sustancias aromáticas. Los antocianos, salvo raras excepciones, están localizados en la piel de las uvas tintas, pero en casos excepcionales la pulpa puede estar también pigmentada ^(35, 36).

La piel tiene un importante papel tecnológico (tabla 2), aportando sus componentes al mosto y al vino, en mayor o en menor proporción según el proceso de elaboración seguido, el color y la astringencia de los mismos dependen de la forma en que se realiza la extracción del mosto ⁽³⁷⁾.

Tabla 2. Composición e importancia de la piel

PIEL	Ceras	
	Colorantes: Carotenoides en uvas blancas. Antocianos en uvas tintas	Define el color del zumo.
	Taninos Ácidos Fenólicos	Astringencia, pardeamiento y precipitaciones o enturbiamientos.
	Aromas	Define el aroma del zumo.

¡ESTÁS CON
FALTA DE ORIGEN!



El color de la piel de la uva se debe principalmente a los antocianos, también se modifica por la formación de complejos con taninos, flavonoides y polisacáridos. Los antocianos de la uva, junto con las catequinas y otros compuestos fenólicos son antioxidantes, captan los peróxidos celulares, retrasan el envejecimiento celular e inhiben la oxidación de las lipoproteínas LDL plasmáticas y de las membranas ^(6, 13).

La mayoría de los compuestos que integran a la uva son considerados aditivos naturales, en mayor importancia los antioxidantes (derivados polifenólicos), los cuales son motivo de estudio en este trabajo, pero para ello debemos entender lo que significa el término aditivo en alimentos.

2.5 ADITIVOS PARA ALIMENTOS

Un aditivo es una sustancia o mezcla de sustancias diferentes al alimento, que se encuentran en el mismo, como resultado de producción, almacenamiento o empaçado, añadido intencionalmente para lograr ciertos beneficios como mejorar el nivel nutritivo, conservar la frescura, impedir el deterioro por microorganismos o insectos, generar alguna propiedad sensorial deseable o bien como ayuda de proceso.

Su uso se debe limitar a las sustancias que han demostrado un beneficio al consumidor y en caso de considerarlo riesgoso para la salud, este debe ser debidamente evaluado en sus aspectos toxicológicos, siendo prácticamente no tóxico, por ética profesional, ya que deben aportar un beneficio al alimento, ya sea mejorándolo o aumentando su vida de anaquel. Es decir, que un aditivo no debe ser usado indiscriminadamente por el sólo hecho de que existe o bien para encubrir defectos en los alimentos, deben de usarse dentro de las normas nacionales e internacionales, ya que un exceso significaría que en vez de ser aditivos serían contaminantes o se estaría cometiendo un fraude. Sin embargo algunas legislaciones prefieren considerarlos como contaminantes intencionales en una forma consciente y para un propósito específico ⁽¹⁸⁾.



Al hablar de aditivos, muchas veces implica peligro para la mayoría de los consumidores, ignorando los beneficios que de ellos se obtienen, por esto hay resaltar que algunos compuestos se emplean para aumentar el contenido nutricional, evitar la formación de tóxicos, evitar intoxicaciones, reducir costos de producción, aumentar la disponibilidad de productos e incluso por razones de conveniencia y apariencia. Es decir que se debe considerar el balance entre riesgo y beneficio al emplearse aditivos. El riesgo se define como la amenaza a la vida o a la salud humana por el uso de químicos, mientras que los beneficios se pueden considerar en cuatro categorías ⁽³⁷⁾:

- a) para la salud y la nutrición humana;
- b) apariencia;
- c) conveniencia, y
- d) proporcionar mayor disponibilidad de alimentos.

En términos generales, al productor le representa un tiempo mayor de almacenamiento; mientras que para el consumidor le puede significar menos desperdicios, así como seguridad en el consumo de alimentos ⁽³⁷⁾.

2.5.1 Clasificación de los aditivos

Los aditivos se pueden clasificar principalmente en tres grandes grupos:

- a) Aditivos que mejoran las propiedades organolépticas
- b) Mejoradores de la textura de los alimentos
- c) Aditivos que impiden o retrasan alteraciones de los alimentos ⁽³⁷⁾.

Dentro de este último grupo se encuentran los **antioxidantes**, los cuales su función se describe a continuación de manera más detallada.

Para conocer el papel que tienen los antioxidantes en los alimentos y en el cuerpo humano se requiere saber como se lleva a cabo la oxidación y los productos que de esta se derivan (radicales libres).



Reacciones de tipo redox son la base del mecanismo de oxidación que tiene lugar en múltiples procesos fisiológicos, así como de los alimentos, dando lugar a la formación de radicales libres (RL) ⁽³⁹⁾.

Los procesos normales del organismo producen radicales libres como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. También estamos expuestos a elementos del medio ambiente que crean radicales libres como la contaminación industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados y pesticidas, solo para nombrar los más comunes.

Los radicales libres son moléculas inestables (perdieron un electrón) y altamente reactivas; por ejemplo: ión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcóxido ($RO\cdot$), peróxido ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno ($NO\cdot$). Estos se encargan de remover el electrón que les hace falta, de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada (que ahora no tiene un electrón) se convierte entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen o si no reaccionan con otro radical, formando así una molécula más estable ⁽³⁹⁾.

A nivel fisiológico los RL toman electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que al ser dañada, no podrá cumplir sus funciones como el intercambio de nutrientes y la limpieza de materiales de desecho, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. Los RL contribuyen al proceso del envejecimiento cuando toman el electrón que les hace falta de las células del tejido colágeno de la piel. Como resultado, la piel pierde su elasticidad y luce seca y arrugada. También pueden contribuir al crecimiento anormal de las células, al perder éstas la capacidad de "reconocer" las células vecinas. Esa proliferación sin control se produce en los tumores benignos o malignos (cáncer) ^(39, 40).

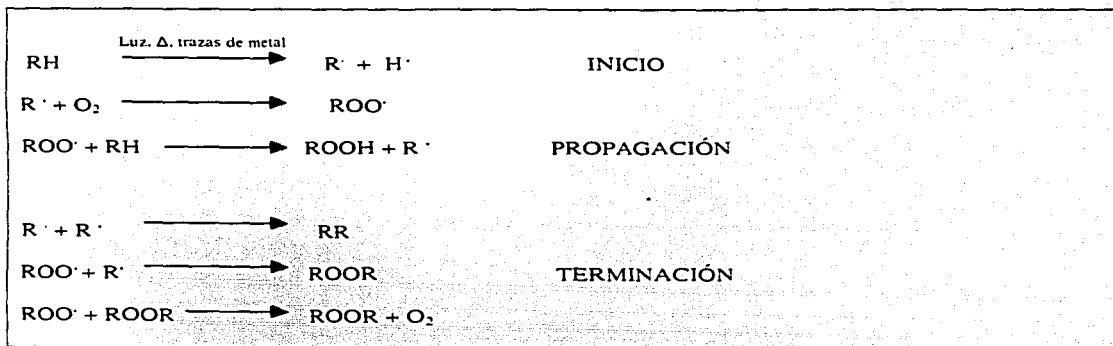
Muchas enfermedades crónicas se han ligado directamente con los radicales libres, como la enfermedad cardiovascular, Alzheimer, accidente vascular cerebral, hepatitis, hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, enfermedad periodontal, colitis ulcerativa, aterosclerosis, fallo renal crónico y muchas otras.



No todos los RL son dañinos. Las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control (ejercido por los antioxidantes), las células sanas pueden ser dañadas.

A nivel de alimentos los RL son origen de la auto-oxidación de los lípidos por acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados, con la subsecuente producción de los hidroperóxidos ^(37, 39, 40). Esta reacción de oxidación de los lípidos ocurre a través de un mecanismo en cadena por los RL y consta de tres pasos principalmente: iniciación, propagación y terminación, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reacciones de oxidación de los lípidos ⁽⁴¹⁾.



La etapa de inicio es la formación de RL que esta catalizada por trazas de metal, irradiación, luz y calor. La etapa de propagación es la reacción en cadena para la formación de nuevas especies de RL (radicales peroxi) o la formación de peróxidos por el oxígeno singulete y enzimas como la lipooxigenasa. En la etapa de terminación se llevan a cabo reacciones entre radicales ⁽⁴¹⁾.

Para evitar que este tipo de reacciones se lleven a cabo, es necesario que intervengan compuestos como los antioxidantes.



2.6 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres. Fisiológicamente hablando actúan a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas ⁽⁴¹⁾.

A nivel alimenticio los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables, independientemente de su mecanismo de acción.

A causa de las diferencias existentes en su estructura molecular, los distintos antioxidantes manifiestan diferencias sustanciales en su eficacia cuando se utilizan con distintos tipos de aceites, o alimentos que contienen grasas, o en diferentes condiciones de procesado y manipulación. Además de la potencia de un antioxidante o de una mezcla de antioxidantes, debe tenerse en cuenta en una aplicación particular, otros factores tales como la facilidad de incorporación a los alimentos, la sensibilidad al pH, la tendencia a producir alteraciones del color u olores desagradables, la disponibilidad y el costo ^(37, 41).

2.6.1 Características de los antioxidantes

Potencia. Cada uno de ellos presenta una capacidad o potencia para inhibir la rancidez en un determinado sistema lipídico, lo cual depende de la facilidad de donación de protones de acuerdo con su molécula y del medio que lo rodea: esto es, esta característica varía con la naturaleza química del producto en que se use ⁽⁴²⁾.

Solubilidad. Para que cumplan con su función, los antioxidantes se deben solubilizar adecuadamente en la fase lipídica, ya que de otra manera no podrían actuar sobre los radicales libres. Cada uno de estos compuestos tiene una relación hidrófila / lipófila que determina su solubilidad: aquellos que son más lipófilos, son adecuados para los sistemas con muy poco agua, como los son aceites y grasas puras. Por otra parte, los aderezos y los productos cárnicos embutidos, con un porcentaje elevado de agua, requieren de antioxidantes hidrófilos.



La solubilidad y la distribución homogénea del antioxidante son muy importantes: en ocasiones, aunque se adicione se inicia la autooxidación en los sitios internos del alimento que carecen del aditivo por una deficiente homogeneización. La mayoría de los antioxidantes se usan en una concentración menor de 200 ppm, situación que es complicada, ya que resulta difícil solubilizar y distribuir esta fracción tan pequeña en un aceite puro, o más aún, en un alimento con una composición muy compleja ⁽⁴²⁾.

Concentración inadecuada. Generalmente los niveles de concentración de antioxidante permitidos por las legislaciones son los adecuados para obtener una buena estabilidad de los aceites. Su efectividad varía según la cantidad que se emplee; tanto un exceso como una deficiencia acarrearán problemas de estabilidad ⁽⁴²⁾.

Tendencia a la coloración. En determinadas circunstancias, los antioxidantes llegan a producir compuestos coloridos indeseables en los alimentos. El caso típico del galato de propilo es ejemplo de ello: este compuesto, en presencia de concentraciones muy bajas de hierro, produce un complejo azul-negro en una reacción tan sensible que se lleva a cabo con el propio hierro de la mioglobina de la carne en los embutidos. En los alimentos que tienen una composición compleja es factible que se induzca esta interacción en la fase acuosa ya que es ahí donde se encuentra el hierro. Además el galato de propilo no debe almacenarse en recipientes metálicos o usarse en productos cuya elaboración requiere de equipos que no sean de acero inoxidable.

Por otra parte, los propios antioxidantes pueden oxidarse, polimerizarse y generar complejos ligeramente oscuros: esta transformación se acelera con la luz y las altas temperaturas, pero generalmente no disminuye su poder protector ⁽⁴²⁾.

Adición fuera de tiempo. Es muy importante recordar que la acción de los antioxidantes es preventiva, ya que no tienen efecto en las grasas oxidadas: por esta razón, se deben añadir antes de que aparezcan los primeros indicios de la autooxidación ⁽⁴²⁾.

pH del alimento. En general, los antioxidantes fenólicos tienen más carácter ácido que básico, por lo que son compatibles en productos con pH menor de 7: algunos, como el galato de propilo, se inactivan en



condiciones alcalinas como ocurre en las mantecas usadas en la panificación, que son de naturaleza alcalina ⁽⁴²⁾.

Temperatura de proceso. Cada antioxidante tiene una temperatura a la que se volatiliza, lo cual es preciso tomar muy en cuenta si se emplea en aceites para freír, pues esta operación se lleva a cabo entre 180 y 220 °C: si por efecto de la alta temperatura se pierde el antioxidante, ocurre que el lípido se vuelve más susceptible a la oxidación ⁽⁴²⁾.

Estabilidad en el almacenamiento. Es necesario considerar que los antioxidantes sufren cambios químicos en el almacenamiento y que sus soluciones llegan incluso a cristalizar lo que ocasiona una reducción de su poder. Además también pueden oxidarse bajo las mismas condiciones que alteran a los lípidos ⁽⁴²⁾.

Modo de aplicación. La aplicación del antioxidante, según el alimento o la función que se quiera de él, se hace de alguna de las siguientes maneras.

- a) adición directa. El antioxidante o la mezcla de ellos en forma de polvo o líquido se incorpora a la grasa o al aceite directamente por medio de un sistema mecánico para homogenizarlo en el seno del producto. El calentamiento y la agitación facilitan su incorporación, pero al mismo tiempo favorecen la autooxidación, por lo que esto debe hacerse incluyendo la menor cantidad de oxígeno posible. En el caso de grandes volúmenes de aceite o grasa, el aditivo se puede añadir con una bomba dosificadora conectada directamente a la línea que transporta el lípido caliente, justo antes del envasado.
- b) adición por aspersión. Este sistema se emplea para productos de forma irregular y de tamaño variable, en cuya superficie se puede producir la rancidez, como es el caso de las nueces; de esta manera se adiciona el mínimo requerido de antioxidante sin alterar las características sensoriales del alimento.
- c) uso de acarreadores. En ocasiones se emplea un componente de los alimentos para incorporar el antioxidante como ocurre cuando se disuelve en los condimentos y las especias que deben ser homogenizados en los productos cárnicos. En otros casos, se mezcla con la sal común que se aplica en la superficie de las galletas. Los antioxidantes también se usan mezclados con alguna goma, o con



emulsiones, de manera que se pueda utilizar en el exterior de los alimentos muy húmedos, como son las carnes.

d) materiales de empaque. Muchos alimentos se conservan mejor cuando su envase esta tratado con algún antioxidante, ya que este puede emigrar hacia el producto, o inhibir la autooxidación en caso de que la grasa se vaya al envase.

El problema de seleccionar el antioxidante óptimo, o una combinación de antioxidantes, se complica además por la dificultad de predecir la forma en la que el antioxidante o antioxidantes añadidos actúan en presencia de pro-oxidantes y de otros antioxidantes existentes en el alimento o producidos a lo largo del procesado ⁽⁴²⁾.

Más recientemente el término antioxidante alimentario se ha aplicado a aquel compuesto que interrumpe la reacción en cadena de los radicales libres formados en la etapa de iniciación o propagación de los lípidos ⁽⁴¹⁾.

Las reacciones de degradación oxidativa más comunes de los alimentos son las de las vitaminas, pigmentos y lípidos, provocando pérdida del valor nutritivo y el desarrollo de malos olores.

Los antioxidantes además de conservar y preservar los alimentos, también tienen un efecto benéfico para el ser humano a nivel fisiológico ya que estos ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis así como disminuir el nivel de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos.

Estos ocupan una situación privilegiada, son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno, además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacado por el oxígeno molecular ⁽⁴¹⁾.



2.6.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIOXIDANTES

En general los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que rodea al alimento.

Eliminando las trazas de ciertos metales como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación ⁽³⁷⁾.

Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos (*Fig. 4*), mientras que los que actúan de la tercera forma se agrupan en la denominación legal de "antioxidantes sinérgicos", o más propiamente, de agentes quelantes ⁽³⁷⁾.

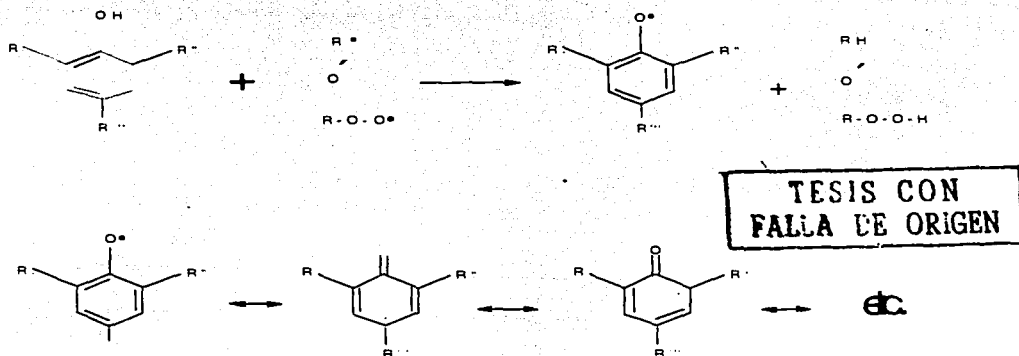


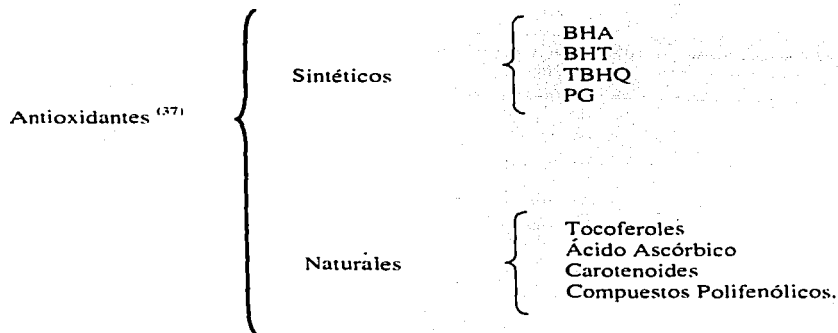
Fig. 4. Mecanismo de acción de los antioxidantes ⁽³⁷⁾

Aquí se muestra como el antioxidante cede un H a un radical de la grasa y se transforma en un radical fenólico que no se propaga porque se estabiliza, por resonancia, rompiendo así la propagación de la cadena. El radical estabilizado del antioxidante no es capaz de continuar con la cadena de reacciones radicales, que queda interrumpida. De este modo, el efecto multiplicador del mecanismo queda anulado y, con solo pequeñísimas cantidades de fenoles, se retarda considerablemente la autooxidación ⁽³⁷⁾.



2.7 CLASIFICACION DE LOS ANTIOXIDANTES

En cuanto a la clasificación de los antioxidantes hay diferencias entre autores, pues algunos los clasifican en primarios y secundarios, por el mecanismo de acción y otros por su origen, a continuación se muestra un esquema con la clasificación de acuerdo al origen de estos.



2.7.1 ANTIOXIDANTES SINTETICOS

El grupo más importante es de los fenoles sustituidos, y sobre todo, el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), la diterbutilhidroquinona (TBHQ), entre otros están los éteres del ácido gálico. Estos en cantidades mayores de adición en los alimentos pueden resultar tóxicos, y con costo más elevado ^{(4), (3)}.

2.7.1.1 BHA Butilhidroxianisol

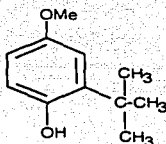
Es uno de los antioxidantes mas empleados en la industria de los alimentos, constituido por una mezcla de dos isómeros (2-terbutil- 4-hidroxianisol y 3-terbutil-4-hidroxianisol).

Es altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua, algunas veces el BHA residual transmite ciertas propiedades a los alimentos durante la cocción o el freido, pueden desarrollar un color rosa en presencia de metales alcalinos en los alimentos procesados.



Es empleado en una amplia variedad de productos como: grasas, aceites, papa deshidratada, dulces, aceites esenciales, bases para goma de mascar, materiales de empaque para alimentos, productos de panadería así como productos derivados de cereales. Se utiliza para proteger las grasas utilizadas en repostería, fabricación de galletas, sopas deshidratadas, etc.; se emplea en concentraciones de 0.02%, algunas veces actúa en sinergismo con otros antioxidantes como los galatos, tocoferoles, BHT, TBHQ, ácido cítrico y ácido fosfórico. En carnes rojas y pavo impiden la oxidación de los lípidos en concentraciones de 0.01%, en combinación con tripolifosfato de sodio y ácido ascórbico retardan el desarrollo de rancidez de los congelados de cerdo, así como deshidratados de carne de res, puerco y pescado. Es poco efectivo en leches deshidratadas y quesos para estabilizar y prolongar la vida de anaquel, en combinación con BHT es altamente efectivo en nueces, almendras y cacahuates previniendo la rancidez.

No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, en función del carcinógeno de que se trate. Esto puede estar relacionado con su actividad sobre los enzimas hepáticos encargados de la eliminación de sustancias extrañas al organismo, que activan o destruyen a ciertos carcinógenos ^(41, 43).



Butilhidroxianisol (B.H.A)

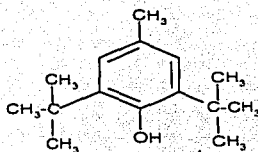


2.7.1.2 BHT Butilhidroxitolueno

Es ampliamente usado en los alimentos y es similar al BHA en muchas propiedades, es altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Tiende a formar una coloración amarilla en los alimentos en presencia de iones de hierro en los alimentos o en el material de empaque.

Sus aplicaciones son similares a las del BHA, tiene funciones sinérgicas con BHA, TBHQ y quelantes como el ácido cítrico, pero no las tiene con el propil galato, la concentración más alta empleada es de 0.02% algunas veces imparte un olor a fenol a las grasas. Es más efectivo para estabilizar la grasa animal que el BHA en concentraciones de 0.005-0.02%, tiene poco efecto estabilizante en los aceites vegetales y en la vida de anaquel de las margarinas, pero es altamente efectivo en los aceites esenciales. En alimentos horneados o fritos es menos efectivo que el BHA, pero en productos derivados de cereales y alimentos bajos en grasas es empleado ampliamente, como el BHA es efectivo en alimentos congelados y deshidratados como la carne de res, cerdo y pescado. En concentración de 0.008% es empleado para estabilizar la leche entera. En nueces y confituras en combinación con el BHA extienden la vida de anaquel de las nueces y almendras retardando la aparición de la rancidez. En las bases para goma de mascar se emplean para retardar el endurecimiento y quebrantamiento de estas, así como la pérdida del sabor.

El BHT, a dosis relativamente altas, afecta la reproducción en la rata, especialmente el número de crías por camada y la tasa de crecimiento durante el período de lactancia. En función de estos datos, la OMS ha rebajado recientemente la ingestión diaria admisible ^(41, 43).



Terbutil Hidroxitolueno
(BHT)

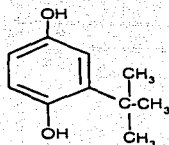


2.7.1.3 TBHQ Terbutilhidroquinona

Es muy efectivo en las grasas y aceites, especialmente aceites crudos vegetales poli insaturados. Los dos grupos hidroxilo son los responsables de esta actividad antioxidante, es estable a altas temperaturas, es poco soluble en agua y no forma complejos con el hierro y el cobre. Es altamente soluble en grasas, aceites y algunos solventes.

Su actividad es equivalente a la que presentan BHA, BHT y PG, pero no contribuyen al color y al olor de las grasas y aceites. Tiene funciones sinérgicas con el PG, BHA, BHT, tocoferoles, ascorbil palmitato, ácido cítrico y EDTA.

Es potencial estabilizante en grasas y aceites crudos vegetales refinados, especialmente en aceite de algodón, soya y girasol, aunque si hay presencia de otros antioxidantes puede ser ineficiente en algunos alimentos; pero en combinación con ácido cítrico es efectivo en margarinas. En concentraciones al 0.02 % incrementa la estabilidad oxidativa del aceite de oliva de 7 a 12 horas. Es efectivo en productos como las papas, los plátanos fritos o tallarines instantáneos, en productos como hojuelas de maíz y avena protegiéndolos de la oxidación de los lípidos cuando son adicionados directamente al producto o al material de empaque de los alimentos. En carne de res retarda la aparición de sabores desagradables en alimentos congelados, en combinación con BHA retarda la aparición de olores y colores no deseables en carne de cerdo y res, y en algunos productos de pescado ^(41, 43).

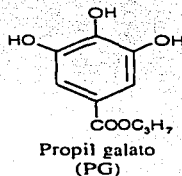


Terbutil hidroquinona
(TBHQ)



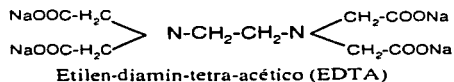
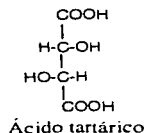
2.7.1.4 Galato de Propilo (PG)

Su propiedad tecnológica más importante es su poca resistencia al calentamiento, por lo que son poco útiles para proteger aceites de fritura o alimentos sometidos a un calor fuerte durante su fabricación, como las galletas o los productos de repostería. Por su parte, el galato de propilo es algo soluble en agua, y, en presencia de trazas de hierro, procedentes del alimento o del equipo utilizado en el procesado, da lugar a la aparición de colores azul oscuro poco atractivos. Esto puede evitarse añadiendo también al producto ácido cítrico. Se utilizan, mezclados con BHA (E 320) y BHT (E 321) para la protección de grasas y aceites comestibles. En España, se utilizan galatos, BHA y BHT en conjunto, en aceites, con la excepción del aceite de oliva. También se utilizan en repostería o pastelería, galletas, en conservas y semiconservas de pescado y en queso fundido ^(41, 43).



2.7.2 ANTIOXIDANTES SINERGISTAS

El fenómeno de sinergismo se produce cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes individuales utilizados separadamente. Bajo ésta denominación se engloban sustancias que refuerzan la acción de los antioxidantes como la lecitina, aminoácidos, ácidos cítrico, fosfórico, fumárico, compuestos que forman complejos con los iones de los metales pesados como el EDTA (etilen-diamino-tertra-acético), los polifosfatos y los ácidos glucónicos. Este efecto se debe a su acción secuestradora de los metales, principalmente hierro y cobre, que como se ha visto catalizan la formación de radicales y de peróxidos en la fase de iniciación ⁽³⁷⁾.



2.7.3 ANTIOXIDANTES NATURALES

Se pueden encontrar gran variedad de antioxidantes en vegetales, semillas, cereales y frutos, entre los cuales se pueden mencionar la vitamina C, vitamina E y β -caroteno, compuestos fenólicos así como ácidos cinámicos (ácido ferúlico) y estilbenos (resveratrol), que se encuentran en los tomates, espinaca, pimiento verde, tamarindo, semilla de girasol, canola, grano de maíz, manzana, kiwi, cerezas, frambuesa y uva ^(6, 37).

2.7.3.1 Tocoferoles

Tienen una elevada actividad como vitamina E pero son menos eficaces como antioxidantes. Su orden de actividad esta dado por $\delta > \gamma > \beta > \alpha$. La actividad relativa de estos compuestos se ve influida significativamente por la luz y la temperatura, en aceites sobrevive las etapas de procesado para proporcionar estabilidad a la oxidación del producto, ejercen su máxima eficacia a niveles relativamente bajos ⁽⁴³⁾.

Comprenden a un grupo relacionado químicamente con compuestos como los tocoles y los tocotrienoles que están ampliamente distribuidos en los tejidos de las plantas, especialmente en nueces, aceites vegetales, frutas y vegetales. Algunas fuentes ricas son el germen de trigo, maíz, semilla de girasol, semilla de colza, soya, alfalfa y lechuga. En ocasiones es menos eficiente que el BHA y BHT y PG. Los tocoles y tocotrienoles incluyen los α , β , γ y homólogos δ la estructura base de todos los homólogos es un anillo 6-cromanol con una cadena de fitol a un lado. Los homólogos difieren en el número de grupos metilo unidos al anillo aromático, los tocotrienoles difieren de los tocoles cuando tienen insaturaciones en la cadena, con dobles enlaces en las posiciones 3'-, 7'-, y 11' ^(37, 43).



La actividad antioxidante de los α , β , γ , y homólogos δ varían con el grado de impedimento y temperatura. En condiciones fisiológicas cerca de los 37 °C la actividad antioxidante esta en el orden de $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, similar a la actividad biológica, en temperaturas altas de 50-100 °C se invierte el orden de actividad antioxidante $\delta > \gamma > \beta > \alpha$. El α -tocoferol es el más abundante de todos y su actividad es dos veces la del β y homólogos de γ y 100 veces la de los homólogos de δ . Tiene una coloración amarillo pálido, es viscoso, presenta características de sustancia aceitosa, insoluble en agua y soluble en grasas y aceites ^(37, 43).

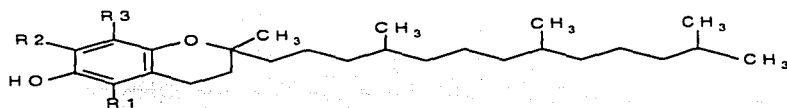
El Tocoferol es considerado el antioxidante más abundante en las grasas animales y vegetales, es relativamente el antioxidante más débil comparado con los fenoles sintéticos, en concentraciones necesarias da poca estabilidad a las grasas, funcionan sinérgicamente con otros antioxidantes como BHA, TBHQ, ascorbil palmitato, lecitina, aminoácidos, ácido ascórbico y otros extractos de especias. Su uso es limitado en grasas, aceites y alimentos que contengan grasas ^(37, 43).

Al igual que el ácido ascórbico, evitan la formación de nitrosaminas en los alimentos. La función biológica de la vitamina E es similar a su función como aditivo, es decir, la de proteger de la oxidación las grasas insaturadas. Aunque es esencial para el organismo humano, no se conocen deficiencias nutricionales de esta vitamina. No obstante, dosis muy elevadas (más de 700 mg de alfa-tocoferol por día) pueden causar efectos adversos ^(37, 43).

Productos preparados con lardo como pastas y papas fritas son tratados con 0.01-0.1% de tocoferol en combinación con BHA (0.01%) siendo más resistentes a la rancidez. Puede estabilizar a carotenoides y bebidas de naranja. En productos como el salami es efectivo para retardar la oxidación de los lípidos y en la formación de sabores desagradables, pero es ineficaz en la estabilidad de colores. Cuando a los animales se les da una dieta rica en tocoferoles, después de la matanza se retarda la oxidación de los lípidos y la aparición de colores y olores desagradables en carne de res, cerdo, pavo y pollo. En el caso del

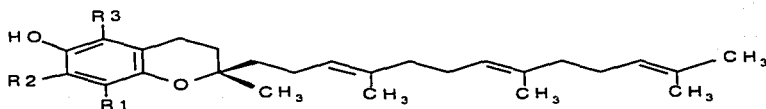


pescado se requiere de ascorbato para poder preservarlo. En el caso de nueces y almendras el α -tocoferol es eficiente con ascorbil palmitato, en combinación con ácido cítrico protegen a los caramelos y a con BHT ofrecen protección a dos tipos de base de goma de mascar ^(37, 43).



Estructura básica de los tocoferoles

R1	R2	R3	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tocoferol
CH ₃	H	CH ₃	β -tocoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ -tocoferol
H	H	CH ₃	δ -tocoferol



Estructura básica de los tocotrienoles

R1	R2	R3	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tocotrienol
CH ₃	H	CH ₃	β -tocotrienol
CH ₃	CH ₃	H	γ -tocotrienol
CH ₃	H	H	δ -tocotrienol

2.7.3.2 β - Caroteno

Los carotenoides también capturan radicales libres acil-peroxi tiene su actividad máxima en concentraciones bajas, a niveles elevados podría presentar acción prooxidativa.

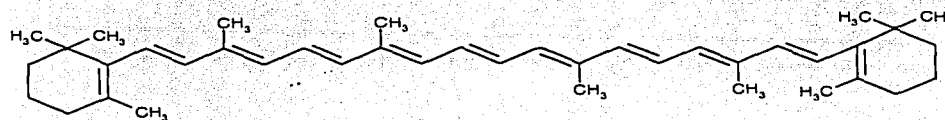
Provitamina A. Se encuentra ampliamente distribuido en las plantas, zanahorias, hojas verdes de los vegetales, frutas tropicales como la papaya y mango. Es usado principalmente como colorante. Estructuralmente consiste de dos anillos β -iononas y una cadena larga de 18 carbonos polienos. La acción



antioxidante es limitada en bajas presiones parciales de oxígeno y en altas presiones el β -caroteno puede actuar como prooxidante.

Es insoluble en agua y soluble en grasas y aceites, por los dobles enlaces conjugados en la estructura de su molécula, es sensible a la exposición del aire sufriendo una oxidación, así también es sensible a la luz, a la temperatura y a medios ácidos.

β -caroteno inhibe la oxidación de las grasas y aceites como la mantequilla, aceite de maíz, aceite de coco, semilla de colza, nueces, soya y aceite de oliva. Es efectivo en la inhibición de la oxidación de los lípidos iniciada por la xantina oxidasa ^(37, 43).



β -caroteno.

2.7.3.3 Ácido Ascórbico

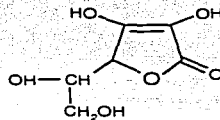
L-Ácido Ascórbico (vitamina C) y ascorbato de sodio son usados como secuestradores de oxígeno y sinérgicos en una gran cantidad de productos alimenticios. Frutas y vegetales son fuentes importantes de ácido ascórbico. Es usado como antioxidante en muchos productos, incluyendo frutas procesados, vegetales, carne, pescado y bebidas, en algunos sistemas es oxidado a ácido dehidroascórbico. En funciones sinérgicas con el BHA, PG y tocoferoles retardan la oxidación de las grasas y aceites. En sistemas con grasas acuosas, particularmente en ausencia de antioxidantes fenólicos y en presencia de cobre, el ácido ascórbico puede actuar como prooxidante, formando un complejo, esto se podría presentar en productos como mantequilla o cremas, si se adiciona EDTA se eliminan estos efectos prooxidantes.

En aceites vegetales que contienen tocoferoles y ácido ascórbico, actúa como sinérgico y en combinación con ascorbil palmitato y lecitina son efectivos en aceite de soya, de girasol y cacahuete, con histidina en aceite de maíz, y con antioxidantes como BHA y PG son efectivos para retardar el desarrollo de la



rancidez en aceites hidrogenados, en mantequilla de cacao y margarina. Es altamente efectivo contra el proceso de oscurecimiento en frutas y vegetales, removiendo el oxígeno, reduciendo las ortoquinonas de las formas ortofenólicos, y posible inhibición de la polifenol oxidasa. Es efectivo cuando se adiciona a frutas enlatadas y jugos de frutas, congelados de durazno, pera, plátanos y manzanas ya que estas lo contienen en bajas concentraciones. Frutas con niveles intermedios de ácido ascórbico como frambuesa, cereza y piñas se benefician con la adición de este, algunos purés o néctares de frutas y vegetales previniendo su decoloración; así mismo en el pescado y carnes curadas manteniendo el color de la carne fresca bajo refrigeración y retardando la oxidación de los lípidos en combinación con sales de sodio y fosfatos aumentan la vida de anaquel de los productos; retrasa el sabor rancio en la leche entera protegiendo a los lípidos, sabor y vitaminas A y D, es efectivo antioxidante y antihidrolítico en mantequillas.

En bebidas es empleado como un secuestrador de oxígeno en bebidas embotelladas y carbonatadas para prevenir el deterioro del sabor y color de la bebida, protegiendo a los carotenoides presentes de la luz solar y estabiliza también los potenciales de óxido reducción de los vinos ^(37, 43).



Ácido ascórbico.

2.8 COMPUESTOS POLIFENOLICOS

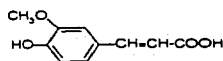
Los **polifenoles** ofrecen protección a algunas especies a la autooxidación de las grasas, entre los que se encuentran los ácidos cinámicos, estilbenos (resveratrol) y **flavonoides**, ^(15, 21).

Los polifenoles se adquieren a través de la dieta, en alimentos y bebidas como frutas (manzana, pera, frambuesa, piña, naranja, etc.), verduras (espinaca, tomates, papa, cebolla, etc.) y vino, se absorben en el

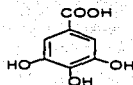


organismo apareciendo en la sangre y en los tejidos. Simultáneamente, asociado a su consumo se detecta un aumento de la capacidad antioxidante en la sangre, lo que sustenta la acción antioxidante de los polifenoles *in vivo* ^(12, 16, 22). A continuación se muestran las estructuras de algunos ácidos cinámicos y estilbenos.

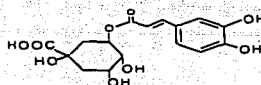
Ácido ferúlico*



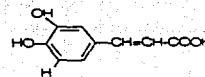
Ácido gálico*



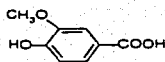
Ácido clorogénico*



Ácido cafeico*



Ácido vanillico*



Resveratrol

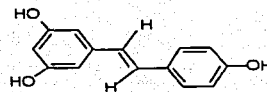


Fig.5 Principales estructuras de los ácidos cinámicos* y estilbenos

2.8.1 Aplicaciones de los Polifenoles naturales

Farmacéuticas: Tratamientos en la prevención del cáncer. Efecto supresor de la formación de la toxina urémica. Equilibrio de la flora intestinal. **Industria Alimentaria:** Conservación del color en el marisco y β -caroteno. Antioxidantes del aceite. Desodorantes alimentarios. Fermentación de la cerveza y el vino. En la producción de dulces y refrescos. **Alimentación Animal:** Tratamiento de diarrea. Prevención del meteorismo del pasto, timpanitis en rumiantes. **Industria Cosmética y Productos de Higiene Personal:** Su actividad desodorante permite el uso en cosméticos, productos del cuidado oral y perfumería, control del mal aliento y de la placa dental. **Aplicaciones Agrícolas:** Reducción de olores en fertilizantes orgánicos. **Otras aplicaciones:** Adhesivos de madera. Producción de cuero. Conservantes de la madera ⁽⁴²⁾.



Entre los compuestos polifenólicos de mayor relevancia se encuentran los Flavonoides que se hallan ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales y juegan un papel como antioxidantes.

2.9 FLAVONOIDES Y SU IMPORTANCIA

Incluye una variedad de compuestos fenólicos con una estructura química de $C_6-C_3-C_6$. Estos se encuentran comúnmente en las frutas (p.ej. semilla de naranja con 0.0544% de polifenoles, en cáscara 2.526% de polifenoles)⁽⁵⁾ y otras partes de las plantas comestibles (p.ej. en la flor de manzanilla hay 9.1% de polifenoles y en el resto de la planta 12.7% de polifenoles)⁽⁵⁵⁾ ya sea glicosilados o como aglicones. Los subgrupos se clasifican basados en la sustitución en el carbono del anillo A y la posición del anillo B (Fig. 6). La mayoría de los grupos esta constituida por los flavonoles, antocianinas, flavonas, isoflavonas, catequinas, proantocianidinas y auronas. Las chalconas, flavononas, leucoantocianinas y dihidroflavonoles son los intermediarios de los flavonoides biosintéticos. Otros compuestos relacionados son los ácidos cinámicos, algunos son precursores de los flavonoides. Muchos de estos compuestos tienen propiedades antioxidantes ^(16, 43, 44).

En general los flavonoides funcionan como antioxidantes, quelantes o secuestradores de aniones superóxido. Los aglicones son más activos que los glicósidos siendo la glucosa el residuo de glicosilación más frecuente, también puede estar presente la galactosa y pentosas como la arabinosa y xilosa, por lo regular ocupan la posición 3, 5 ó 7 de la estructura general. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. La actividad antioxidante esta determinada por la posición y grado de hidroxilación del anillo B. La presencia de grupos hidroxil en las posiciones 3', 4' y 5' en el anillo B aumenta la actividad antioxidante comparada a la de la presencia de un solo grupo hidroxil (-OH). Algunos compuestos con alta actividad están la quercetina, mirecitina, robinetina, catequinas y procianidinas. Intermedios como la dihidroquercetina, eriodictiol, chalconas y dihidrochalconas son muy efectivos. Ácidos Fenólicos como el ácido cafeico y el



ácido clorogénico tienen actividad antioxidante significativa ⁽⁴³⁾. En la actualidad los flavonoides solo se emplean como suplementos alimenticios o como colorantes con propiedades antioxidantes.

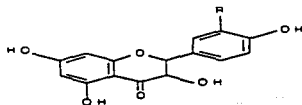


Fig. 6 Estructura general de flavonoides

Antocianinas

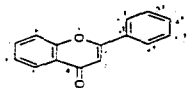
Son un grupo amplio de sustancias naturales, bastante complejas, formadas por un azúcar unido a la estructura química directamente responsable del color. Son las sustancias responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. Usualmente cada vegetal tiene de 4 a 6 distintos, pero algunos tienen prácticamente uno solo (la zarzamora, por ejemplo) o hasta 15. No existe una relación directa entre el parentesco filogenético de dos plantas y sus antocianinas. Las antocianinas utilizadas como colorantes deben obtenerse de vegetales comestibles. La fuente más importante a nivel industrial son los subproductos (cáscara, semilla, etc.) de la fabricación del vino, son los colorantes naturales del vino tinto, y en algunos casos permiten distinguir químicamente el tipo de uva utilizada. Son, evidentemente, solubles en medio acuoso ⁽⁴³⁾. El material extraído de los subproductos de la industria vinícola, denominado a veces "enocianina", se comercializa desde 1879, y es relativamente barato. Las antocianinas, en estado puro, son muy caras. Estas son sustancias relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido. Se degradan, cambiando el color, durante el almacenamiento, tanto más cuanto más elevada sea la temperatura. También les afecta la luz, la presencia de sulfitos (E-220 y siguientes), de ácido ascórbico y el calentamiento a alta temperatura en presencia de oxígeno. El efecto del sulfito es especialmente importante en el caso de las antocianinas naturales de las frutas que se conservan para utilizarlas en la fabricación de mermeladas. Se utilizan relativamente poco, solamente en algunos derivados lácteos, helados, caramelos, productos de pastelería y conservas vegetales (hasta 300 mg/kg), aunque están también autorizados en conservas de



pescado (200 mg/kg), productos cárnicos, licores, sopas y bebidas refrescantes. Como los demás colorantes naturales, en bastantes casos no tienen más limitación legal a su uso que la buena práctica de fabricación, aunque esta situación tiende a cambiar progresivamente. Cuando se ingieren, las antocianinas son destruidas en parte por la flora intestinal. Las absorbidas se eliminan en la orina, muy poco, y fundamentalmente en la bilis, previas ciertas transformaciones. En este momento son sustancias no del todo conocidas, entre otras razones por su gran variedad, siendo objeto actualmente de muchos estudios. La ingestión diaria de estas sustancias, procedentes en su inmensa mayoría de fuentes naturales, puede estimarse en unos 200 mg por persona ^(43, 45).

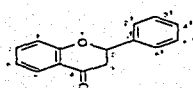
Las procianidinas son compuestos polifenólicos y tienen un papel importante en la contribución de la astringencia en la mayoría de los vinos. Interactúan con las proteínas de la saliva dando una sensación de sequedad en el paladar. Los dímeros de procianidinas presentan una actividad más alta que el α -tocoferol, son efectivas secuestrantes de aniones superóxido e inhiben la oxidación de los lípidos, además de que se pueden emplear en aderezos, algunas frituras y lardos ^(43, 45).

Algunas fuentes naturales de flavonoides con importante actividad antioxidante se encuentran las cerezas (quercetina, kaemferol, miricetina y (+)-catequina-3-glucosa), cítricos (naringina, rutina), ciruela, kiwi, plátanos, pera, fresas, (quercetina, kaemferol y mirecitina), además de una amplia variedad de verduras como tomate, cebolla, coliflor, brócoli (quercetina, kaemferol y mirecitina), espinaca (quercetina-3-glicosido y kaemferol) ^(15, 43, 44, 46, 47). Compuestos antioxidantes cuyas estructuras se muestran en la Fig. 7.

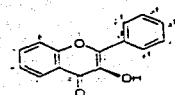


FLAVONAS

Apigenina 5 = 7 = 3' = 4' = OH

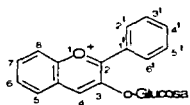


FLAVANONAS

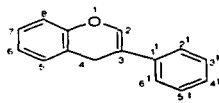
Herperetina: 5 = 7 = 3' = 4' = OH, 4'-OCH₃

FLAVANOLES

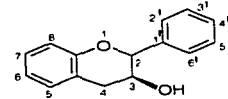
Quercetina: 5 = 7 = 3' = 4' = OH



ISOFLAVONAS
Cianidina-3-glucosa: 5' = 4' = 5 = 7 = OH

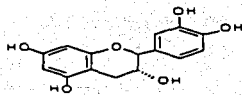


FLAVAN-3-OLES
Genisteina: 5 = 7 = 4' = OH

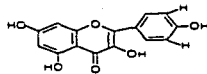


DIHIDROFLAVONOLES
(+)-Catequina: 5 = 7 = 3' = 4' = OH

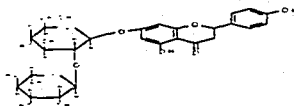
(-)-Epicatequina



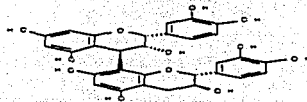
Kaemferol



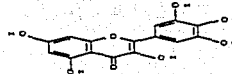
Naringina



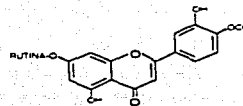
Procianidinas (B1)



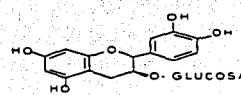
Mirecítina



Diosmina



(+)-Catequina-3-glucosa



Rutina

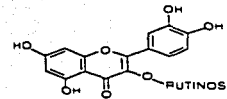


Fig. 7 Principales compuestos flavonoides presentes en frutas y verduras

Algunos los denominan como los Súper Antioxidantes, ya que dan soporte a otros antioxidantes e incluso son más efectivos en la prevención del daño provocado por los radicales libres. Estudios han indicado que pueden ser 50 veces más poderosos que la vitamina E y 20 veces más poderosos que la vitamina C (16).

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides tienen interés por la evidencia creciente de que los peróxidos metabólicos o ingeridos contribuyen al envejecimiento celular y al desarrollo de diversos síndromes patológicos; por lo que los antioxidantes naturales pueden bloquear la aparición de dichas



sustancias, actuando como anti-tumoral, anti-inflamatorio, anti-alergénico e inhibidor de radicales libres (15).

Estudios han informado que tienen propiedades anti-fúngicas en los alimentos, son anti-cancerígenos, y reducen la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (15, 12, 16, 48).

2.9.1 METODOS DE EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES

Los flavonoides, como fenoles, son solubles en medio alcalino y pueden extraerse con soluciones de NaOH, y precipitarse con ácidos. Los solventes apolares están entre los solventes más empleados para separar a los polifenoles del agua, se ha usado acetato de etilo para antioxidantes con actividad fuerte⁽¹³⁾.

El etanol y agua son los solventes más empleados por higiene y abundancia, aunque debe buscarse el solvente óptimo, que proporcione la actividad máxima del antioxidante para cada sustrato. Por mencionar otros solventes empleados ya en investigaciones similares están el metanol y la acetona estos mezclados en proporciones 80:20 con agua (15, 16).

Se ha buscado desarrollar y aplicar mejores técnicas de obtención de estos compuestos (extracción con mezclas supercríticas, técnicas de ultrasonido o microondas y extracción por maceración con disolventes). Extracción por solvente: Es necesario un capital moderado para adquirir los equipos y los servicios auxiliares, el rendimiento es casi del doble, en comparación con fluidos supercríticos (EFS) y se obtienen "prácticamente todos" los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. El uso de solventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc., conlleva a establecer varias etapas adicionales de purificación si el extracto va a ser para el consumo o higiene humana. Normas internacionales de calidad imponen límites muy exigentes en este aspecto. Esta restricción ha provocado buscar nuevos solventes y optimizar al máximo su recuperación, pero también ha elevado su costo y su aplicación (19, 49). Los métodos de ultrasonido o microondas, emplean disolventes como metanol, etanol, en ciertas ocasiones con pequeñas porciones de agua, por lo cual la extracción de los compuestos, se realiza por difusión disminuyendo así los tiempos de análisis 20-200 s. sus únicas implicaciones son la



utilización de equipo costoso y el adecuado manejo de las condiciones de presión y temperatura para cada muestra ^(50, 51).

2.9.2 CARACTERIZACIÓN DE FLAVONOIDES

Pruebas Cualitativas

Para identificar este tipo de compuestos (flavonoides) en los extractos se realizan pruebas cualitativas con la ayuda de diferentes técnicas cromatográficas. En el caso de cromatografía de capa fina, se han empleado como reveladores Vainillina, sulfato cérico y cloruro férrico, estos actúan oxidando al extracto y produciendo una coloración característica del antioxidante a una determina distancia (Rf), dependiendo de esto se identifica de que tipo de compuesto(s) se trata ^(44, 52, 53).

Para las pruebas de actividad secuestrante y antioxidante se emplean reveladores como es una solución de β -caroteno y una de radical-DPPH, en la primera se observa la actividad antioxidante de los compuestos presentes en el extracto mediante una coloración café parda en las placas cromatográficas, en referencia a la segunda solución se emplea para determinar la actividad secuestrante, visualizando en las placas una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así dicha actividad ^(44, 52, 53).

Como se sabe la complejidad de los extractos va desde polímeros, oligómeros y monómeros, por lo cual diferentes estudios han utilizado técnicas de separación y purificación entre las cuales se pueden mencionar la cromatografía en columna (intercambio iónico, celulosa, gel de sílice, y sephadex LH-20), estas metodologías permiten fraccionar los diferentes componentes del extracto por partición o bien por exclusión molecular, y así poder conocer y distinguir entre monómeros, dímeros y trímeros, para que finalmente puedan ser analizados cualitativa y cuantitativamente por otras técnicas analíticas más específicas (HPLC, Espectroscopia de masas, Cromatografía de gases, etc). Este tipo de técnicas nos da una caracterización parcial, que podría complementarse con pruebas físicas y químicas de los compuestos "puros" obtenidos, comparando los resultados con los reportados en la literatura ^(10, 19, 20, 22, 25, 44).



2.9.3 EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES

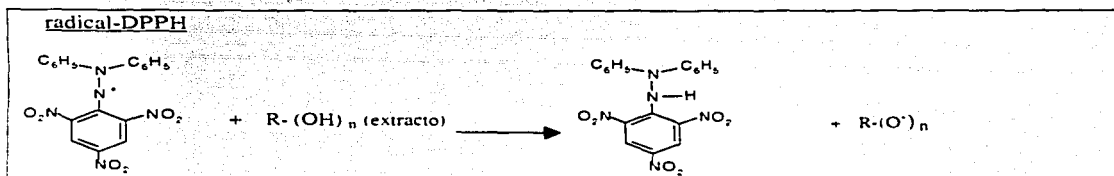
Pruebas cuantitativas

Se han desarrollado distintos métodos de evaluación, generalmente basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres. Estos métodos ofrecen información muy diversa a la que aportan aquellos basados en medidas biológicas o metabólicas que determinan o evalúan capacidades antioxidantes específicas. La información que aportan ambos métodos es complementaria, pero dada su particular naturaleza no tienen porqué estar correlacionados los resultados de ambos métodos. De hecho, algunos permiten, en general, obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo tienen ligeras aproximaciones a los efectos protectores de la salud ^(5, 44).

Los métodos más comúnmente empleados son el del radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS[•] (2,2-azino-bis-(3-etilbencetizoline-6-ácido sulfónico)). Blanqueo con β -caroteno ^(5, 44, 55).

2.9.3.1 radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Estos ensayos consisten en medir la capacidad del extracto o compuestos que lo integran de secuestrar al radical o reducirlo mediante la donación de átomos de hidrógeno, empleando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 517 nm, donde el mecanismo de reacción es el siguiente ^(54, 56):

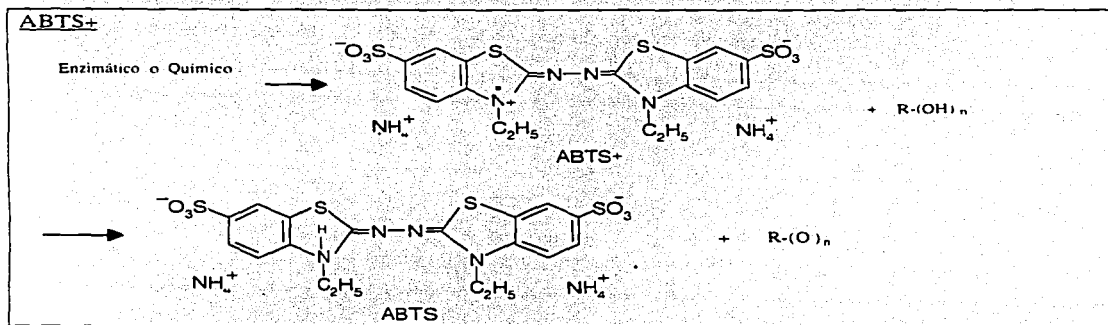




2.9.3.2 **ABTS^{•+}** 2,2-azino-bis-(3-etilbencetizoline-6-ácido sulfónico).

El ensayo es muy similar al del radical-DPPH con la diferencia que este radical es generado por dos vías diferentes: **Enzimática** (peroxidasa, mioglobina) y **Química** (dióxido de magnesio, persulfato de potasio), dónde según el tipo de muestra, se aplica el método **Actividad Antioxidante Hidrofílica** para muestras de naturaleza polar, **Actividad Antioxidante Lipofílica** para muestras de naturaleza no polar.

En las dos se mide el decremento de la absorbancia del radical-ABTS^{•+}, en presencia de un compuesto con actividad antioxidante, que mostrara la capacidad que tiene para donar átomos de hidrógeno ⁽³²⁾.



Ventajas y Desventajas de los métodos DPPH, ABTS^{•+}.

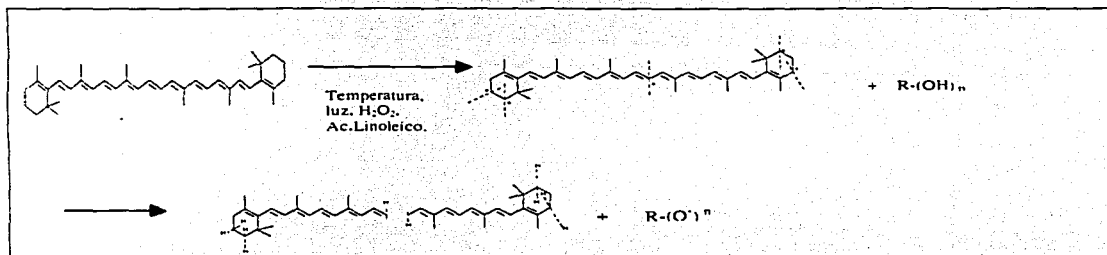
Las técnicas para determinar actividad secuestrante (radical DPPH y ABTS^{•+}), ambos métodos son rápidos, sensibles, repetitivos, fáciles, el único inconveniente es que en el método del ABTS su radical no esta formado debe generarse por medio enzimático o químico, en cambio el radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un radical libre que es directamente adquirido sin la preparación (listo para disolver).

El radical-ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-(3-etilbencetizoline-6-ácido sulfónico)) puede ser solubilizado en medio acuoso y en medios orgánicos y la actividad antioxidante puede medirse dada la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los compuestos de los extractos, en contraste el radical-DPPH solo puede disolverse en medios orgánicos sobre todo alcoholes, no en medios acuosos que son una limitación importante al interpretar el papel de antioxidantes hidrofílicos ^(29 31).



2.9.3.3 Blanqueo con β -caroteno

El ensayo consiste en medir la capacidad del extracto o de los compuestos que lo integran para impedir la oxidación (formación de radicales libres) del β -caroteno, por las condiciones en que este se encuentra (luz, temperatura, H_2O_2 , ácido linoleico). Donde el mecanismo de acción se muestra a continuación, en el que se observa que el β -caroteno es fraccionado por la mitad por diferentes condiciones como la luz, temperatura, H_2O_2 y ácido linoleico (rompiendo principalmente enlaces alílicos), para así posteriormente el β -caroteno forme radicales libres que finalmente son estabilizados por el extracto ^(17, 20, 57).



En el caso del β -caroteno, esta técnica como las anteriores es rápida, sencilla, reproducible, lo que lo diferencia de las otras es que aquí se induce la formación de los radicales (luz, H_2O_2 , ác. linoleico, temperatura), además de que los radicales libres formados son similares a los que se presentan en un alimento.

De manera general estas técnicas (radical-DPPH, ABTS⁻ y β -caroteno) miden la cantidad total de radicales libres que pueden ser atrapados por una muestra que contenga antioxidantes, no la calidad de los antioxidantes presentes en la muestra.

En evaluaciones realizadas a antioxidantes de origen natural se ha recurrido a técnicas complementarias para tener datos más precisos sobre la estructura y funcionalidad de los compuestos, dentro de las pruebas de evaluación se encuentra el Método Trolox, este es un ácido carboxílico derivado del α -tocoferol, y es



empleado como antioxidante estándar para medir actividad secuestrante, aunque hay algunos que sustituyen al Trolox por equivalentes de ácido gálico. Método de Davis ⁽⁹⁾ y Folin-Ciocalteu ⁽³²⁾ para fenoles totales esta prueba se basa en cuantificar la cantidad de grupos hidroxilos totales disponibles que tiene la muestra. Evaluación del IPT (Índice de Polifenoles Totales) ⁽²⁸⁾ su valor puede compararse al del ácido gálico de modo que 20 unidades de IPT equivalen a 1g por litro de ácido gálico. Pruebas como la de ácido tiobarbiturico ⁽⁴³⁾, N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD útil para medios no lipídicos), captura del anión superóxido, estas pruebas se han aplicado a los extractos como tales, no en forma individual de los compuestos que los integran.

La actividad del antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente en que se encuentre, ya que los procedimientos de aislamiento y pureza de compuestos activos pueden protegerse con el antioxidante, un factor determinante para su actividad es la naturaleza de las moléculas lipofílicas y la afinidad del antioxidante con el lípido ⁽⁵⁾.

La calidad de los extractos naturales y su función como antioxidantes no sólo depende de la calidad del fruto original, el origen geográfico, la condición climática, el tiempo de almacenamiento, sino de los factores ambientales y tecnológicos puede afectar la actividad y estabilidad del antioxidante de los residuos industriales ⁽¹⁶⁾.

El reemplazo de antioxidantes sintéticos por naturales puede tener beneficios debido a las implicaciones de salud y funcionalidad, además la legislación es menos restringida, no así el caso de los sintéticos, estudios toxicológicos para determinar su toxicidad aguda, subaguda y crónica han permitido rechazar rotundamente varios, como la tiourea, que se emplea para evitar el ennegrecimiento de las frutas cortadas y jugos de frutas pues puede causar en dosis bajas cáncer en el hígado ⁽⁵⁸⁾.



Recientemente hay un gran interés en la industria de los alimentos y la medicina preventiva, en el desarrollo de antioxidantes naturales provenientes de plantas. Se han evaluado ya propiedades de antioxidantes que presentan los extractos de romero, mismos que ya están a la venta. Los antioxidantes se pueden obtener de diversas fuentes vegetales como: soya, cáscara de cítricos, olivos, así como hojas de té verde y frutas como la uva entre otras ^(5, 59).

El orujo de uva tiene un alto contenido de polifenoles con actividad antioxidante por lo que representa una invaluable fuente potencial de antioxidantes fenólicos que pueden ser tecnológicamente aplicados como aditivos en alimentos con posibles beneficios nutricionales ⁽⁶⁰⁾.

De aquí surge el interés por aprovechar este subproducto como fuente de otros productos por lo que a continuación se describen los materiales y reactivos, que se emplearon para poder llevar a cabo este trabajo.



3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo se llevó a cabo en cuatro etapas, las cuales se mencionan a continuación:

Primera Etapa (*Acondicionamiento de la muestra y Extracción de Antioxidantes*)

Segunda Etapa (*Evaluaciones cualitativa y Cuantitativa*)

Tercera Etapa (*Purificación de los extractos*)

Cuarta Etapa (*Extracción selectiva*)

3.1 MATERIAL Y REACTIVOS

Materia prima: Orujo de uva (variedad *Barbera*) 3 kg, proporcionado por la casa Pedro DOMEQ (Baja California México).

3.1.1 Primera Etapa (*Acondicionamiento de la muestra y Extracción de Antioxidantes*)

Alcohol etílico, metílico y acetona (Grado Reactivo Analítico).

3.1.2 Segunda Etapa (*Evaluaciones cualitativa y Cuantitativa*)

Evaluación Cualitativa: Placas de Silica G /UV 254 Alugram para TLC (20x20 cm) Macherey-Nagel, mezcla del eluyente Ácido Acético, Cloroformo (Grado Reactivo analítico), reveladores Radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), β -caroteno, Vainillina (SIGMA-CHEM).

Evaluación cuantitativa: Radical-DPPH y β -caroteno: estándares comerciales como Ácido ferúlico, Catequina, Quercetina, BHT, TBHQ, BHA, Ácido Ascórbico (SIGMA-CHEM), DMSO (dimetilsulfóxido) 99.9% (Grado espectrofotométrico ACS), Nitrógeno ultra alta pureza 99.9% (AGA) y Oxígeno extra seco pureza 99.5% (INFRA).

Para la cuantificación de fenoles totales se requirió de DEG (dietilenglicol) 99% (Grado espectrofotométrico, Merck-Schuchardt) y perlas de NaOH, así como el estándar de Catequina.

3.1.3 Tercera Etapa (*Purificación de los extractos*)

(1) celulosa cristalina para cromatografía en columna, (2) sephadex LH-20 (SIGMA)

3.1.4 Cuarta Etapa (*Extracción selectiva*)

Acetato de Etilo, Cloruro de Metileno (Reactivo Analítico).



3.2. EQUIPO

Rotovapor, bomba de alto Vacío, Liofilizadora, baño de Agua, espectrofotómetro, Lámpara de UV, Columna Cromatográfica (65 mm x 7 mm) para celulosa y columna Cromatográfica (20 cm x 2 cm) para Sephadex.

A continuación, se describe la metodología de cada una de las etapas para obtener, evaluar y cuantificar los extractos crudos y antioxidantes, provenientes de la cáscara de uva.



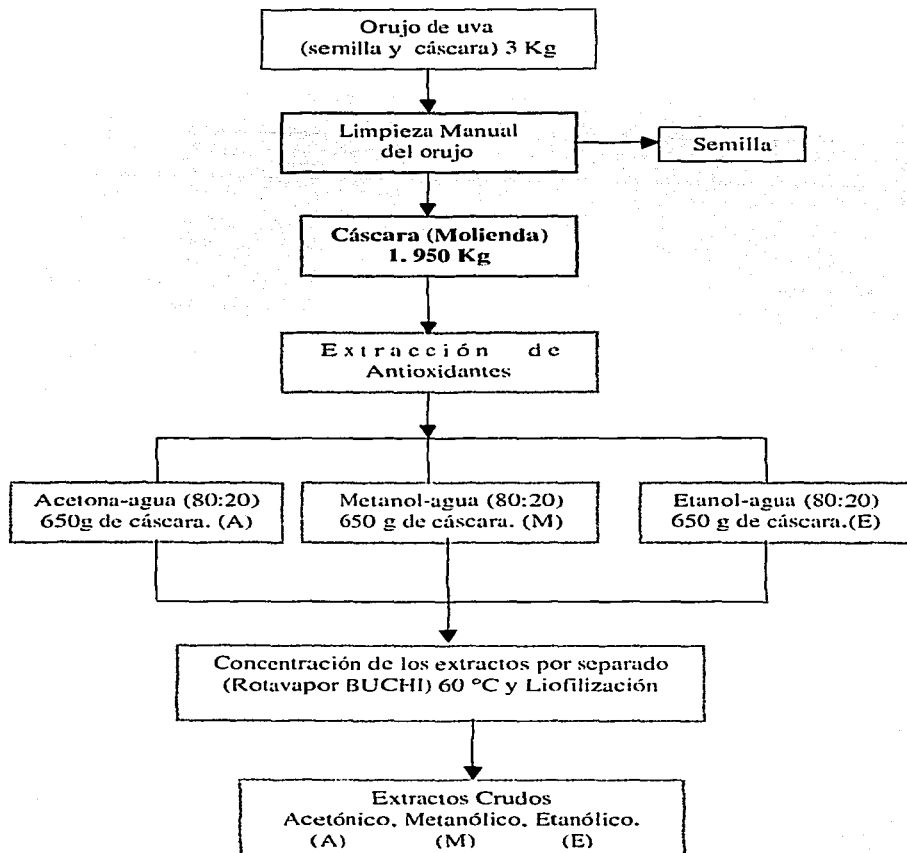
3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Primera etapa

ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES. (Diagrama 1)

Se partió de una materia prima (orujo de uva) que esta formado por la cáscara y semilla de la uva, donde se llevo a cabo una separación manual, para obtener solamente la cáscara de la uva, la cual se sometió a una operación de molienda. El proceso de secado se omitió debido a que el contenido de humedad presente en la cáscara (12%) era adecuado para la extracción de los antioxidantes.

La cáscara fue dividida en tres lotes con un peso de 650 g cada uno, los cuales se colocaron en tres matraces diferentes los cuales contenían 2 L de una mezcla de disolventes (1) acetona-agua (80-20), (2) etanol-agua (80-20) y (3) metanol-agua (80-20). Se realizó una extracción por maceración, por un tiempo determinado (24 hr.). Posteriormente se elimina el exceso de disolvente con un rotovapor a temperatura de 60°C. Posteriormente se congelaron y liofilizaron, para obtener así los extractos crudos.

**Diagrama 1**



3.3.2 Segunda Etapa

3.3.2.1 EVALUACIÓN CUALITATIVA (Diagrama 2)

A los tres extractos se les realizaron determinaciones por cromatografía de capa fina (CCF).

La placa que se empleó fue de gel de sílice, los extractos se eluyeron en cloroformo- ácido acético-agua (0.4-0.5-0.1), los reveladores empleados para esta evaluación fueron:

Solución de radical-DPPH, solución de β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico. (ANEXO I)

3.3.2.2 EVALUACIÓN CUANTITATIVA

3.3.2.2.1 Actividad secuestrante determinada con radical-DPPH: Para cada extracto crudo, en una serie de 4 tubos de ensayo se realizaron las siguientes reacciones. En el primer tubo se agrega 1 mL del extracto crudo (200 ppm) disuelto en metanol con 1 mL de solución de radical-DPPH en DMSO (ANEXO I). Al segundo tubo se le adicionó 1 mL del mismo extracto y 1 mL del DMSO. Al tercer tubo se le agregó 1 mL de la solución de DPPH y 1 mL de DMSO. Al cuarto tubo (blanco) se le adicionaron 2 ml de DMSO.

Posteriormente se burbujeó nitrógeno y se dejaron en reposo durante 60 min. Transcurrido el tiempo de reacción, se registro la absorbancia a 517 nm. Se usan como patrones de referencia antioxidantes de uso comercial: ácido ascórbico, ácido ferúlico, catequina, quercetina, BHA, BHT, TBHQ. De las absorbancias obtenidas se calcula el porcentaje de actividad secuestrante del radical-DPPH de la siguiente manera:

$\%$ de actividad secuestrante = $1 - [(A_i - A_j) / A_c] \times 100$, Donde: A_i = Absorbancia del extracto mezclado con la solución de DPPH, A_j = absorbancia del mismo extracto mezclado con DMSO y A_c = Absorbancia de la solución DPPH con DMSO.



3.3.2.2.2 Actividad antioxidante determinada por el blanqueo con β -caroteno (a este ensayo se le realizó una ligera modificación del mencionado en los antecedentes): se saturó agua destilada desionizada con oxígeno por 30 min. Se preparó una solución de β -caroteno (**ANEXO I**).

En un frasco se adicionaron 2 mL de esta solución con 25 mL de agua destilada oxigenada. En un tubo de ensayo se adicionaron 5 mL de la mezcla anterior la cual contenían 0.2 mL del extracto crudo en metanol, inmediatamente se registró la absorbancia a 470 nm (tiempo cero), se mantuvo en baño maría a 50 °C durante 60 minutos y se registró nuevamente la absorbancia (tiempo final).

Paralelamente se preparó un ensayo control adicionando 0.2 mL de metanol con la solución de β -caroteno-agua oxigenada, y se registró como en el caso anterior. Como blanco se utilizó 0.2 mL de metanol en 5 mL de agua destilada. La velocidad de degradación de los extractos se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación: velocidad de degradación de la muestra = $Ln(a/b)/t$, donde Ln = log natural, a = absorbancia inicial, b = absorbancia final y t = tiempo (min.).

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de actividad relativa usando la siguiente ecuación: $AA = [(velocidad\ de\ degradación\ del\ control - velocidad\ de\ degradación\ de\ la\ muestra) / velocidad\ de\ degradación\ del\ control] \times 100$.

3.3.2.2.3 Fenoles Totales (Método de Davis)⁽⁹⁾: Se preparó una solución de dietilenglicol (DEG) y una solución de hidróxido de sodio (**ANEXO I**), posteriormente se realizó una curva estándar de catequina disuelta en metanol a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 ppm). Para llevar a cabo la cuantificación se colocaron 0.2 ml de la muestra en un tubo de ensayo, se adicionaron 10 ml de la solución de DEG y 0.2 ml de NaOH 4 N, se agitó vigorosamente y se coloca una alícuota en una celda espectrofotométrica y se registró a 420 nm, empleando como blanco 0.2 ml de metanol en 10 ml de DEG y 0.2 ml de NaOH. Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la cantidad total de grupos hidroxilos $R-(OH)_n$, mismos que se relacionan con la actividad antioxidante de cada extracto.



Esta prueba se aplicó a los 3 extractos crudos (acetona-agua, etanol-agua y metanol-agua) disueltos en metanol a una concentración de 200 ppm.

Después de realizar estas pruebas, se seleccionó el extracto que presentó mejor comportamiento en las tres evaluaciones efectuadas (actividad secuestrante, antioxidante y prueba de fenoles totales), para someterlo a un fraccionamiento de sus componentes, mediante una cromatografía en columna.

S
E
G
U
N
D
A

E
T
A
P
A

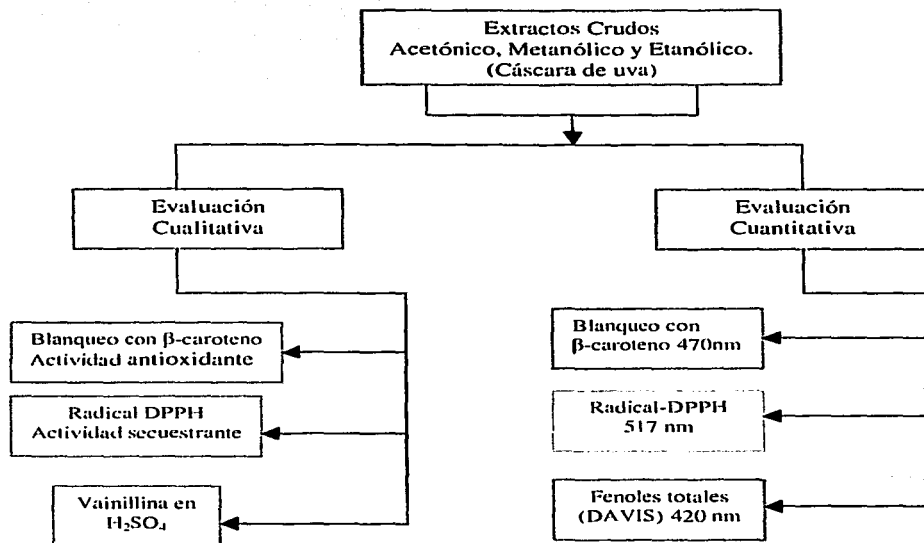


Diagrama 2



3.3.3 Tercera etapa

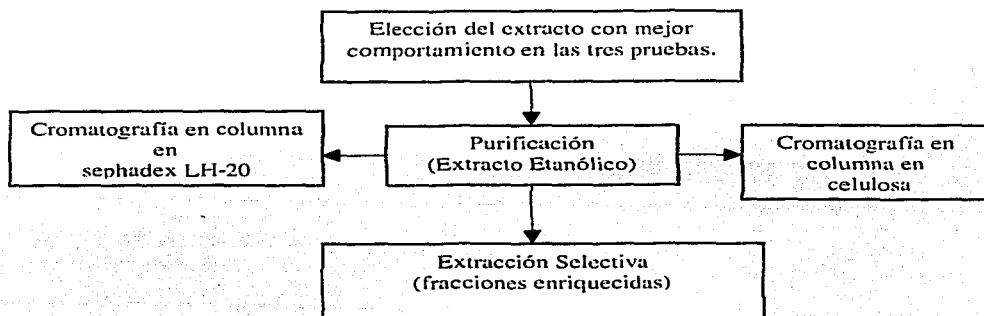
PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS (Diagrama 3)

3.3.3.1 Cromatografía en Columna de Celulosa

Se eligió al extracto que presentó mayor actividad secuestrante y antioxidante, para lo cual se preparó una micro columna (65 mm x 7mm) con 1g de celulosa cristalina empacada y se emplearon 100 mg del extracto, la fase móvil empleada consistió de cloroformo, ácido acético, agua (4:5:1), las fracciones que se recolectaron fueron de 0.5 ml cada una, a las cuales se les realizó una cromatografía en capa fina para verificar si hubo una adecuada separación de los compuestos (se empleó solución de radical-DPPH como revelador). Esta columna se montó con el propósito de fraccionar los diferentes compuestos presentes en el extracto.

3.3.3.2 Cromatografía en columna de Sephadex LH-20: Se realizó una segunda columna para comparar ambos sistemas de separación en esta la fase estacionaria estaba constituida por 15g de sephadex y se aplicaron 500 mg del extracto que presentó mayor actividad, la fase móvil empleada fue cloroformo-metanol (1:9) y se recolectaron fracciones de 10 ml cada una, a las cuales se les realizó una cromatografía en capa fina para verificar si hubo una adecuada separación de los compuestos (se usó como revelador radical-DPPH). Esta columna se montó con el propósito de fraccionar los diferentes compuestos presentes en el extracto de acuerdo al principio de la exclusión molecular.

T
E
R
C
E
R
A

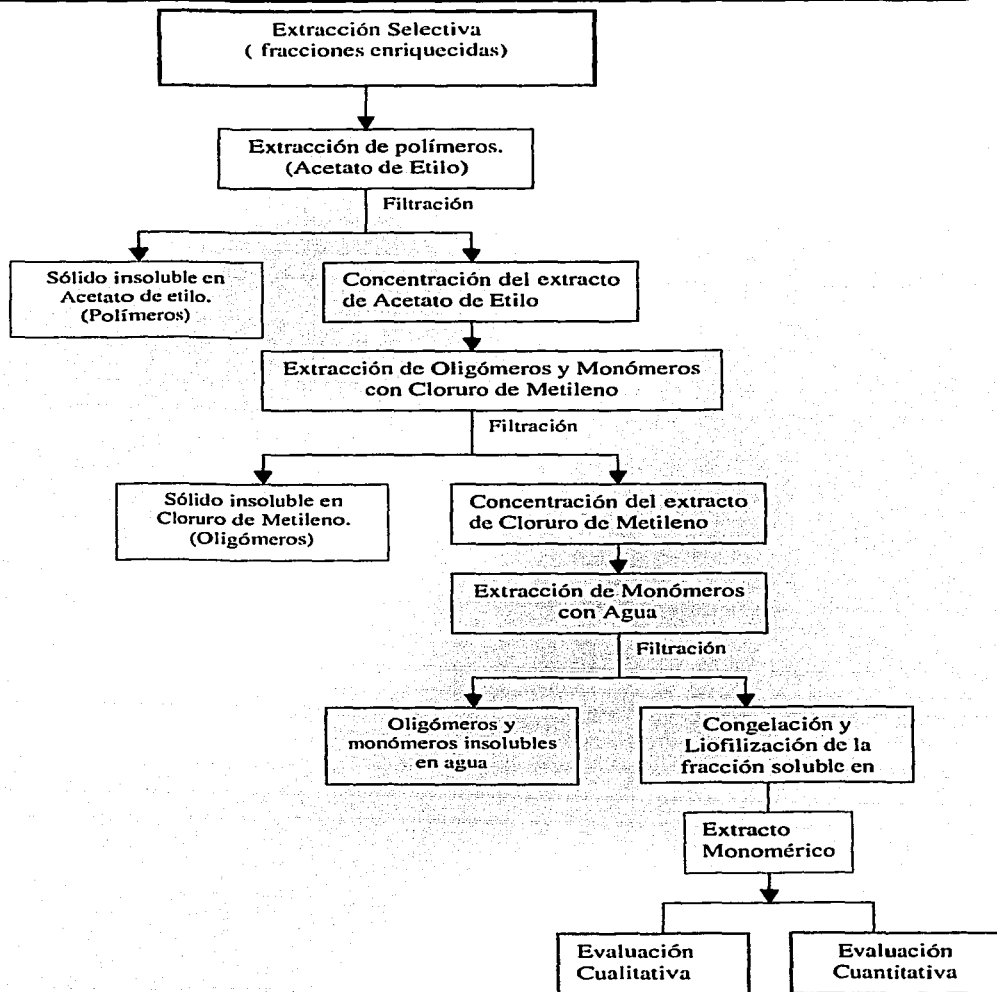
E
T
A
P
A**Diagrama 3**

3.3.4 Cuarta Etapa

EXTRACCIÓN SELECTIVA. (Diagrama 4)

3.3.4.1 Fraccionamiento del Extracto Crudo.

A 5 g del extracto correspondiente, se le adicionaron 70 ml de acetato de etilo con el fin de precipitar a los polímeros presentes en el extracto. El acetato de etilo se evapora y al residuo se le agregaron 40 ml de cloruro de metileno para precipitar a los oligómeros. El cloruro de metileno se evapora y al residuo se le adicionaron 20 ml de agua destilada con el fin de solubilizar a los fenoles presentes, teniendo por último a los monómeros. Finalmente, la solución obtenida se congeló y liofilizó. A las tres fracciones se les realizó una cromatografía en capa fina para verificar si hubo una adecuada separación de los compuestos (se empleó como revelador radical-DPPH, blanqueo con β -caroteno y solución de vainillina). Así como pruebas cuantitativas de actividad secuestrante, antioxidante y fenoles totales.

**Diagrama 4**



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primera etapa

Acondicionamiento de la muestra y Extracción de antioxidantes.

Se realizó una separación manual del orujo para tener solamente la cáscara de uva (variedad Barbera) (1.950 Kg), que presentaba una humedad del 10%. esta cáscara se molió y se tamizó utilizando una malla de 0.5 cm y se fraccionó en tres lotes (650 g cada uno) para después continuar con la extracción de los antioxidantes por maceración hasta agotamiento (4 días), empleando un disolvente diferente por lote (Acetona, metanol y etanol en proporciones 80-20 con agua), se emplearon estos disolventes, puesto que los reportes de estudios similares a este han indicado que se obtienen mayores rendimientos, así como compuestos activos (flavonoides).

Obteniendo finalmente las siguientes proporciones de extracto crudo (EC) por lote de cáscara de uva.

Lote 1 Acetona- H₂O: 20.0245 g de EC, equivalente a **3. 0806 g de EC / 100 g de cáscara**

Lote 2 metoh-h₂o: 13.3692 g de EC, equivalente a **2 .0568 g de EC / 100 g de cáscara**

Lote 3 EtOH-H₂O: 16.2879 g de EC, equivalente a **2. 5058 g de EC / 100 g de cáscara**

De acuerdo a los resultados de estudios realizados a residuos de una variedad de uva (*Parellada*), reportan se partió de 16 kg, obteniendo 587 g de extracto crudo de etanol-agua obteniendo un rendimiento equivalente a 3.66 g de extracto crudo/ 100 g de residuo ⁽²³⁾. Siendo este resultado similar al obtenido en nuestro caso con el extracto de acetona-agua.

Consideramos que estos resultados son favorables, ya que se partió de una cantidad relativamente pequeña, respecto a la que fue empleada en el otro ensayo.



A continuación se muestra una comparación de las cantidades de extracto crudo obtenido a partir de dos diferentes partes que conforman el orujo de uva (semilla y cáscara). Los datos de la semilla se adquirieron de un estudio realizado alterno a este proyecto ⁽⁶¹⁾.

Extracto	Semilla de orujo de uva (variedad Barbera) (g de EC / 100 g de semilla)	Cáscara de orujo de uva (variedad Barbera) (g de EC / 100 g de cáscara)
Acetona-Agua	1.8558	3.0806
Metanol-Agua	1.5805	2.0568
Etanol-Agua	1.6195	2.5058

Donde se aprecia que los extractos de acetona-agua tanto en la semilla como en la cáscara son los que presentaron un mejor comportamiento en comparación con los otros dos extractos (etanol-agua y metanol-agua). sin embargo los tres extractos de la cáscara muestran rendimientos más altos con respecto a la semilla.

4.2 Segunda etapa

4.2.1 Evaluación Cualitativa.

Como siguiente paso se procedió a realizar las pruebas cualitativas con el fin de identificar los diferentes componentes que están presentes en los tres extractos, para lo cual se busco el eluyente y la fase estacionaria (CCF) adecuada basándonos en estudios realizados a flavonoides, donde se emplearon eluyentes como: Cloroformo-metanol (9:1), cloroformo-ácido acético (9:1), cloroformo-ácido acético-agua (4:5:1), cloroformo-ácido acético-agua (5:45:0.05), Acetato de etilo-metanol-agua (50:3:10), butanol- ácido acético-agua (4:1:5), acetato de etilo-ácido fórmico-agua (8:2:3): en placas de sílica gel, celulosa y papel, encontrando finalmente que en nuestro caso la fase estacionaria fue la de sílica gel y el eluyente Cloroformo-AAcético-Agua (4-5-1) ⁽⁴⁴⁾. Por lo cual se procedió a evaluar cualitativamente la actividad de los tres extractos crudos, mediante el uso de tres diferentes reveladores (radical-DPPH, β -caroteno y Vainillina), presentándose el siguiente comportamiento al compararlos ante cada uno de ellos.



Placas de sílice

Eluyente Cloroformo-AAcético-Agua (4-5-1)

Muestras:

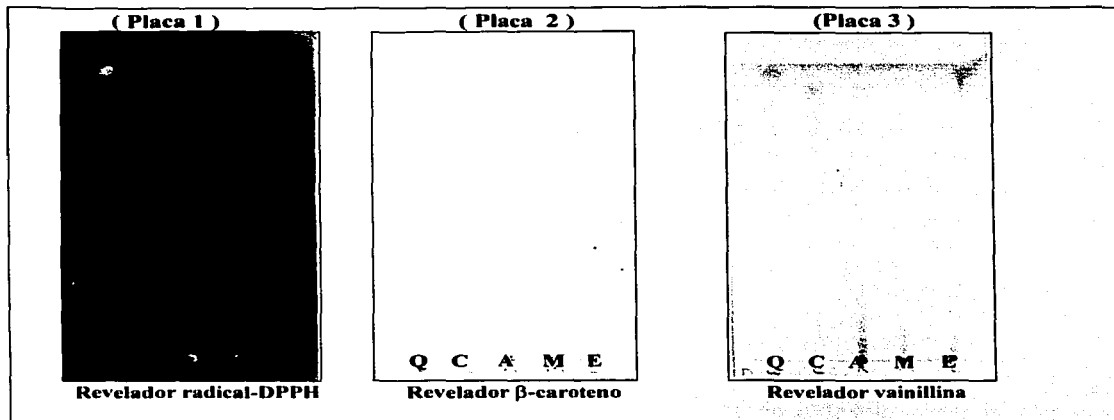
Q (quercetina)

C (catequina)

A (Extracto Acetona-agua)

M (Extracto Metanol-agua)

E (Extracto Etanol-agua)



Estudios previos indican que tanto en la uva, como en el vino hay presencia de compuestos de tipo polifenólico con propiedades antioxidantes (principalmente catequinas), en el caso de la cáscara que ha pasado por el proceso de vinificación buscamos este tipo de compuestos con actividad antioxidante, por ello hacemos uso de técnicas para determinar actividad secuestrante (radical-DPPH) y actividad antioxidante (blanqueo con β -caroteno), ya que estas pruebas nos permiten conocer y comparar cual de los tres extractos presenta mayor actividad (secuestrante y antioxidante).

En estas cromatoplasas se muestran los tres extractos crudos obtenidos de la cáscara con dos estándares de antioxidantes naturales, esto con el fin de comparar si alguno de los compuestos que están en los extractos emigran a la misma distancia que los estándares.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN



Placa 1 placa revelada con radical-DPPH se observa una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así que los extractos y estándares presentan actividad secuestrante; es decir que estos tienen la capacidad de reducir al radical-DPPH. también se observa que en los tres extractos hay dos bandas, una de ellas se encuentra al mismo R_f del estándar Catequina.

Placa 2 el revelador usado es una solución de β -caroteno en la cual se observan unas manchas café en fondo blanco, debido a que la placa se expone a luz U.V durante 1 hora produciéndose de esta forma la oxidación del β -caroteno, dando lugar a la formación de radicales libres indicando que tanto los extractos y estándares actúan evitando la oxidación de los carotenos poniendo de manifiesto la actividad antioxidante. En esta placa se observan varias bandas que indican la presencia de una mezcla compleja de compuestos, sin embargo se destacan dos bandas y una de ellas coincide con el estándar Catequina, y la otra no coincidió con ninguno de las referencias empleadas.

Placa 3 para revelar esta placa se usó vainillina en H_2SO_4 en la placa se observa baja resolución de los extractos, porque no hay una separación adecuada, puesto que la complejidad de la muestra no lo permite. En las tres cromatoplasmas reveladas tanto con radical-DPPH, solución con β -caroteno y vainillina se observan que uno de los compuestos de los tres extractos presentan un R_f similar que el estándar Catequina, lo que sugiere pensar que este compuesto pueda estar en los extractos crudos de la cáscara de orujo de uva, tal como se había indicado previamente.

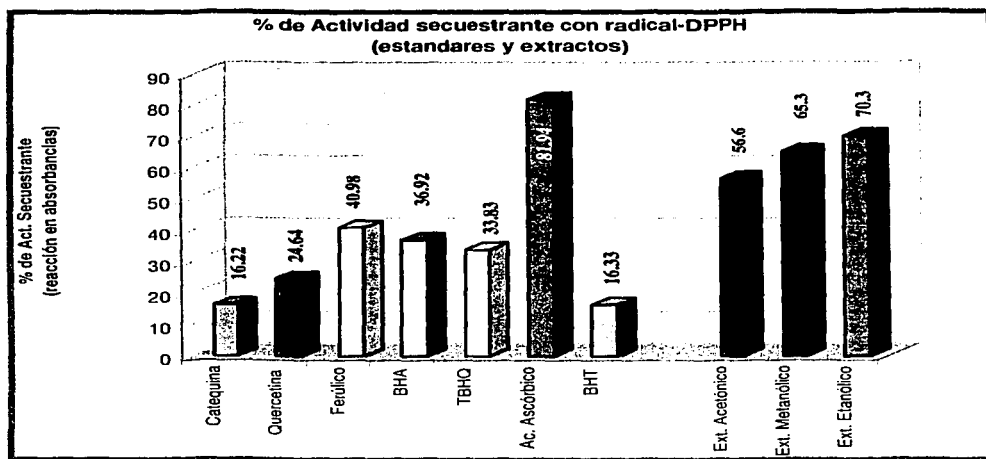
4.2.2 Evaluación Cuantitativa.

4.2.2.1 Actividad secuestrante de los extractos. Radical-DPPH

Este método se basa en medir la capacidad secuestrante que tienen los compuestos presentes en el extracto para reducir al radical, mediante la donación de átomos de hidrógeno, siguiendo espectrofotométricamente la decoloración que sufre el reactivo del púrpura al amarillo a 517 nm, que se manifiesta en la disminución de la absorbancia con el transcurso del tiempo en que se lleva a cabo la reacción.



Para realizar estas pruebas se prepararon las muestras a 200 ppm en metanol (0.2 mg / ml) con el fin de estandarizar las pruebas y obtener resultados reproducibles y poder así tener una media de los datos. Obteniendo como resultado un gráfico (1) donde se muestran la actividad secuestrante con radical-DPPH de las muestras, comparándola con la actividad de varios antioxidantes comerciales, en la misma concentración.



1331
FALLA DE ORDEN

Gráfica 1. Porcentajes de Actividad Secuestrante con radical-DPPH (extractos crudos de cáscara de uva y estándares comerciales).

En el gráfico 1 se muestra una comparación de la actividad secuestrante con radical-DPPH de los extractos acetona-agua, etanol-agua y metanol-agua frente a antioxidantes existentes en el mercado, donde se observa que el extracto de etanol-agua (70.3 %) fue el que presentó una mayor actividad secuestrante con respecto al extracto de metanol-agua (65.3 %) y el extracto de acetona-agua (56.6 %), esto se puede explicar por la polaridad y composición de cada extracto, ya que los compuestos polifenólicos presentes en la cáscara de uva son por lo general polares (flavonoides), además de que algunos autores indican que la actividad secuestrante de los compuestos polifenólicos esta determinada por su estructura química (por



ej. la actividad de un flavonoide (catequina) es mayor que la del ácido ferúlico), y en el caso de los extractos además de la estructura también la actividad antioxidante esta determinada por la presencia de polifenoles (polimeros) y la mezcla de varios tipos pueden actuar de manera sinérgica, que se manifiesta en una buena actividad secuestrante.

En datos reportados de esta prueba a extractos de otra variedad de uva indican que el extracto metanol-agua presenta actividad de 92.99% y el extracto etanol-agua de 79.4% ⁽¹⁾, de acuerdo a este resultado vemos que el dato del extracto etanol-agua de nuestro ensayo está muy cercano al que se obtuvo en este estudio. Por otro lado si comparamos este resultado con el obtenido en la semilla de la misma variedad este presentó 57.84% en el extracto etanólico, 37.34% en el metanol-agua y 27.38% en el extracto acetona-agua, indicando así que los extractos de la cáscara en esta prueba son más eficientes para secuestrar al radical-DPPH.

En referencia a los antioxidantes comerciales el extracto de etanol-agua (70.3%) permaneció con valores por encima del Ácido Ferúlico (40.98%), BHA (36.92%), TBHQ (33.83%), Quercetina (24.64%), BHT (16.33%) y Catequina (16.22%). Sin embargo no fue mayor a la del Ácido ascórbico que presento una actividad de 81.94%, esto se debe a que en estudios realizados a este antioxidante de origen sintético han presentado algunos isómeros, estos componentes junto con la vitamina C le proporcionan en forma global una buena estabilización al radical-DPPH repercutiendo en una alta actividad secuestrante.

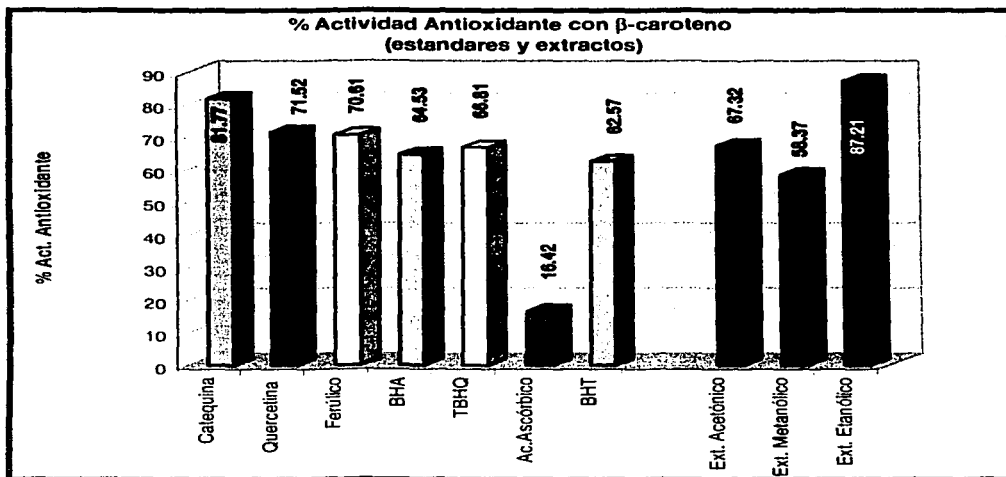
4.2.2.2 Actividad Antioxidante de los extractos. Blanqueo con β -caroteno.

Para obtener el % de actividad antioxidante se aplica la prueba de blanqueo con β -caroteno que se basa principalmente en medir la capacidad que tienen los compuestos con actividad antioxidante presentes en el extracto para minimizar o inhibir la oxidación del β -caroteno en la solución, provocada por diversos factores (luz, H_2O_2 , temperatura), evitándose así la ruptura de la molécula y la formación de radicales libres, estabilizando a la molécula mediante la donación de hidrógenos o el secuestro de radicales.



Esta prueba se mide espectrofotométricamente a 470 nm, donde se observa la decoloración que sufre el β -caroteno pasando de amarillo a incoloro, en el transcurso del tiempo en que se lleva a cabo la reacción.

Esta prueba de actividad antioxidante, determinada con β -caroteno, de la misma forma que la técnica anterior, las muestras (extractos crudos y antioxidantes comerciales) se estandarizaron a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) en metanol para que de esta forma la prueba sea reproducible y obtener una media de los datos. En la *gráfica 2* se presentan los resultados obtenidos en esta prueba.



Gráfica 2. Porcentajes de actividad antioxidante con β -caroteno (extractos crudos de cáscara de uva y estándares comerciales).

La *gráfica 2* presenta una comparación de la actividad antioxidante con β -caroteno de los extractos acetona-agua, etanol-agua y metanol-agua frente a antioxidantes existentes en el mercado, donde el extracto etanol-agua (87.21%) presenta un valor mayor que el extracto acetona-agua (67.32%), metanol-agua (58.37%), así como a los antioxidantes comerciales Catequina (81.77%), Quercetina (71.52%), Ácido Ferúlico (70.61%), BHA (74.53%), TBHQ (66.81%), BHT (62.57%), y Ácido ascórbico (16.42%). Los datos reportados de la semilla fueron para el extracto etanol-agua 91.73%, metanol-agua 81.01% y

LEGIS CON
FALLA LE ORIGEN



para acetona-agua 76.27%, siendo en esta prueba mayores que los de la cáscara, aún así el extracto etanol-agua en ambos casos es quién presento mayor actividad antioxidante.

Otro punto que cabe destacar es la comparación del extracto etanólico (87.21 %) y la catequina (81.77 %), ambos presentaron una actividad antioxidante semejante, esto puede deberse a que los dos presentan un mismo mecanismo de acción para inhibir la oxidación del β -caroteno, además de que en las pruebas cualitativas presentaron la misma resolución (Rf).

El comportamiento que presentó el extracto etanólico respecto a la alta actividad secuestrante y antioxidante frente a los otros dos extractos, así como ante los antioxidantes comerciales, en las dos pruebas se debe a que la cantidad de compuestos polifenólicos que lo integran (polímeros, oligómeros y monómeros) actúan de manera más rápida y eficaz por los grupos hidroxilo que contienen, este hecho ya ha sido descrito en otros estudios de extractos con actividad secuestrante y antioxidante, estabilizando de esta forma los radicales libres presentes (radical-DPPH) y los formados por la oxidación del β -caroteno, evitando así que la reacción de oxidación se propague y como consecuencia se presente la decoloración en ambas pruebas ⁽⁵⁾.

Estas pruebas no pueden ser comparables debido a que son dos sistemas diferentes, por un lado en la prueba de radical-DPPH este ya se encuentra en la solución, en cambio el β -caroteno tiene que ser expuesto a diferentes factores para generar los radicales, por lo tanto, dado los resultados que aportaron estas dos pruebas (radical-DPPH y β -caroteno) el extracto que presenta relativamente mayor actividad es el de etanol-agua, por lo que se aplicó una prueba adicional (fenoles totales) para correlacionar de manera global estos datos.

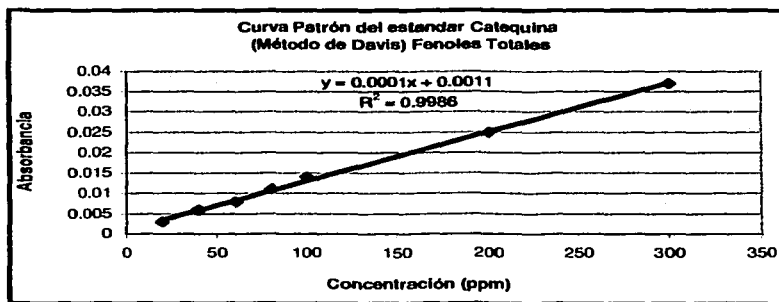
4.2.2.3 Fenoles Totales. Método de Davis⁽⁹⁾

Esta prueba se realiza con la finalidad de determinar la cantidad total de grupos hidroxilos de tipo fenólico ($R-OH$) que se encuentran en el extracto, mismos que se relacionan con la actividad antioxidante de este. Es una prueba colorimétrica, en la cual al reaccionar el extracto con el dietilenglicol y la sosa, dará paso a la formación de un cromóforo, dejando libres los anillos que forman al antioxidante y de esta forma



expondrá a los grupos hidroxilos de tipo fenólico que ahí se encuentran, se coloca en una celda espectrofotométrica y se lee a 420 nm. Para efectuar el cálculo de fenoles totales se realiza una curva patrón (*Gráfica 3*) con el estándar de Catequina a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 ppm) y en base a esta se cuantifican los fenoles totales en el extracto, reportándose como equivalentes de catequina en el extracto.

A continuación se muestra la curva patrón obtenida con el estándar y que se empleo para cuantificar la cantidad de fenoles totales de Catequina presentes en cada extracto crudo.



Gráfica 3. Curva patrón de Catequina para la prueba de Fenoles Totales.

Estos son los resultados que se obtuvieron de los extractos crudos en la prueba de fenoles totales.

Cuadro 1. Cantidad de Fenoles Totales de Catequina presentes en los extractos crudos de semilla de uva.

Muestra (200 ppm)	ppm catequina
Acetona-C	65.45
metanol-C	52.5
etanol-C	192

Estos datos respaldan a los que se muestran en la actividad antioxidante siendo nuevamente el extracto de etanol-agua el cual presentó mayor contenido de grupos fenólicos de Catequina en comparación con los otros dos extractos (acetona-agua y metanol-agua).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Los resultados obtenidos en esta prueba no pueden compararse con los de otros estudios (Índice de Polifenoles Totales IPT, Folin-Ciocalteu o Trolox), ya que nuestros resultados están referidos a ppm de catequina y las otras pruebas están expresadas en equivalentes de ácido gálico, lo que representa una limitante en nuestro método. Por mencionar un resultado encontramos que el extracto etanol-agua de la cáscara de uva variedad *Parellada* presentó como fenoles totales 70.5 equivalentes de ácido gálico ⁽²³⁾.

Por los resultados aportados en estas tres pruebas se eligió al extracto etanol-agua como el adecuado para realizar una purificación, ya que fue el que presentó una mayor actividad secuestrante, antioxidante y contenido de fenoles totales.

De acuerdo a la primera hipótesis planteada, se confirmó que con disolventes polares se obtiene un mejor rendimiento y actividad (antioxidante y secuestrante) así como de fenoles totales en los extractos, en este caso fue en el extracto etanólico.

La tercera y cuarta etapa de este proyecto consistieron en realizar tres fraccionamientos diferentes (celulosa, sephadex LH-20 y extracción selectiva) con el fin de separar los componentes que integran al extracto etanólico, las cuales se describen a continuación de manera más detallada.

4.3 Tercera etapa

Purificación de los extractos

4.3.1 Cromatografía en columna (celulosa)

Para la separación de los compuestos con Actividad Antioxidante, el extracto crudo obtenido con etanol (100 mg) se fraccionó en una microcolumna cromatográfica (65 mm x 7mm) compuesta de una fase estacionaria de celulosa microcristalina y como sistema de elución una mezcla de los disolventes empleados ya para la cromatografía en capa fina que consiste de cloroformo, ácido acético y agua (sustituyendo en este caso al cloroformo por Cloruro de metileno) variando la concentración desde



35:55:10, 4:5:1 y 55:45:05; para verificar que la separación se estaba llevando a cabo se realizaron cromatografías en capa fina, aplicando reveladores como radical-DPPH y β -caroteno. Esto nos permitió comparar las fracciones más parecidas y juntarlas, en total se obtuvieron 24 fracciones de 0.5 ml cada una, que al agruparse finalmente dieron como resultado 8 fracciones (*Placa 4*).

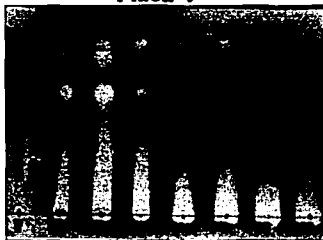
Fase móvil: cloroformo, ácido acético, agua (4-5-1)

Fracciones obtenidas: 24 de 0.5 ml cada una.

Placa empleada: silica gel.

Fase móvil: cloroformo, ácido acético, agua (4-5-1)

Placa 4



Revelador radical-DPPH

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
I II III IV V VI VII VIII

Como lo muestra la placa (4) en todas las fracciones recolectadas se observa poca resolución (R_f) y separación, debido a la complejidad y polaridad de los compuestos del extracto, por lo tanto se descarta la posibilidad de que la columna de celulosa puede ser la adecuada en este caso para separar los diferentes componentes del extracto etanólico, por ello se realizó una segunda columna con el fin de comparar ambos sistemas de separación (sephadex LH-20).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



4.3.2 Cromatografía en columna de Sephadex LH-20

En esta técnica se utilizaron 500mg del extracto, en una columna de sephadex LH-20 (20 cm x 2 cm) empleando una fase móvil distinta a la anterior (cloroformo, metanol 9:1, 1:1, 1:9 y metanol solo), esto es debido a que diferentes estudios bibliográficos han obtenido una adecuada separación con este sistema de elución, además de que la concentración del ácido en caso de emplearse ácido acético podría dañar la columna de sephadex.

De la misma forma que en la columna de celulosa se realizó un seguimiento del fraccionamiento en cromatografía de capa fina, empleando como reveladores radical-DPPH y β -caroteno, comparando nuevamente las fracciones entre si, llegando a un total de 34 de 10 ml cada una, reuniendo las que mayor parecido presentaban, se juntaron a 9 fracciones finalmente, presentando poca separación, misma que se puede observar en la *placa 5*.

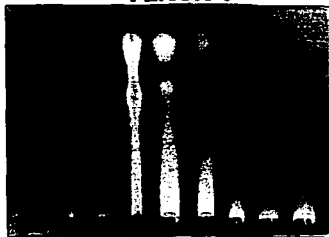
Fase móvil: cloroformo, metanol (1-9)

Fracciones obtenidas: 34 de 10 ml cada una.

Placa empleada: silica gel.

Fase móvil: cloroformo, ácido acético, agua (4-5-1)

PLACA 5



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Revelador radical-DPPH

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34

1' 2' 3' 4' 5' 6' 7' 8' 9'



Como en el caso anterior (columna de celulosa), la resolución (Rf) y separación no fue adecuada, nuevamente se atribuye esto a la diferencia de polaridad y tamaño de los compuestos, a pesar de que la columna de sephadex LH-20 es más selectiva, esto es que su separación es de acuerdo al principio de exclusión molecular de los compuestos presentes.

El que en ambas columnas no se hayan obtenido resultados satisfactorios, no implica que las fases estacionarias no sean eficientes, ya que han habido otros estudios donde se han logrado separar e identificar los compuestos que integran a los extractos empleando este tipo de columnas^(44,62). Un factor importante en esta etapa fue la cantidad de extracto y el tamaño de la columna, que tal vez se requería de mayor cantidad de extracto y una columna más alta.

De esta forma se aplicó la siguiente técnica de separación (Extracción Selectiva) obteniéndose así los siguientes resultados:

4.4 Cuarta Etapa

Extracción Selectiva

4.4.1 Fraccionamiento del extracto Crudo

La técnica de extracción selectiva (enriquecimiento de monómeros, oligómeros y polímeros), basada en la patente USA-5 484 594, consistió principalmente en separar el extracto en fracciones ricas en monómeros, oligómeros y polímeros, buscando disminuir la cantidad de polímeros ya que estos son los responsables de la astringencia, estudios realizados anteriormente han mostrado que las cáscaras de uva contienen procianidinas del tipo B1-B4 (polímeros) que son quienes le confieren esta característica, los cuales se busca eliminar. Para lograr la separación en fracciones ricas en monómeros, oligómeros y polímeros del extracto etanólico (3.33 g), se realizó una extracción selectiva, donde la fracción polimérica se obtuvo con acetato de etilo, de esta fracción se precipitó la fracción oligomérica con cloruro de metileno y



posteriormente se solubilizó en agua la fracción rica en monómeros. Obteniendo así las siguientes relaciones.

Fracción polimérica (n-unidades): **2.732 g (82.06 %)**

Fracción oligomérica (de 3-7 unidades): **15 mg (0.45%)**

Fracción monomérica (1 o 2 unidades): **42.3 mg (1.27%)**

Estos resultados se compararon con los obtenidos en la semilla de la misma variedad de uva (*Barbera*), donde la fracción polimérica se obtuvo 77.65%, fracción oligomérica 0.45% y la fracción monomérica 1.18%, tomando en cuenta que se empleó la misma cantidad inicial de extracto, observando así un comportamiento semejante en los rendimientos; pero al comparar los datos con los de la patente ⁽²⁴⁾, esta indica que el rendimiento debe ser de 1.5% para monómeros de flavonoides y de este el 1% le corresponde a catequina, entre un 24 y 26% le corresponden a dímeros de procianidinas, alrededor del 15% a algunos oligómeros y el resto a polímeros, viendo estos resultados y comparándolos con los que se obtuvieron de la cáscara, en el caso de los monómeros están muy cercanos nuestros valores, más no para el caso de oligómeros y polímeros; aún así hay artículos que mencionan pueden obtenerse hasta un 10% de monómeros, 65% de oligómeros y 15% de polímeros. Una explicación a esto es el manejo de las fracciones durante el desarrollo de la técnica, ya que en la concentración y separación se puede perder parte de estas.

Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas cualitativas con radical DPPH, β -caroteno y vainillina para verificar si se llevó a cabo una adecuada separación de los componentes del extracto crudo y observar si estas presentan actividad sequestrante y antioxidante.



4.4.2 Evaluación Cualitativa.

Placas de sílice

Eluyente: Cloroformo-AAcético-Agua (4-5-1)

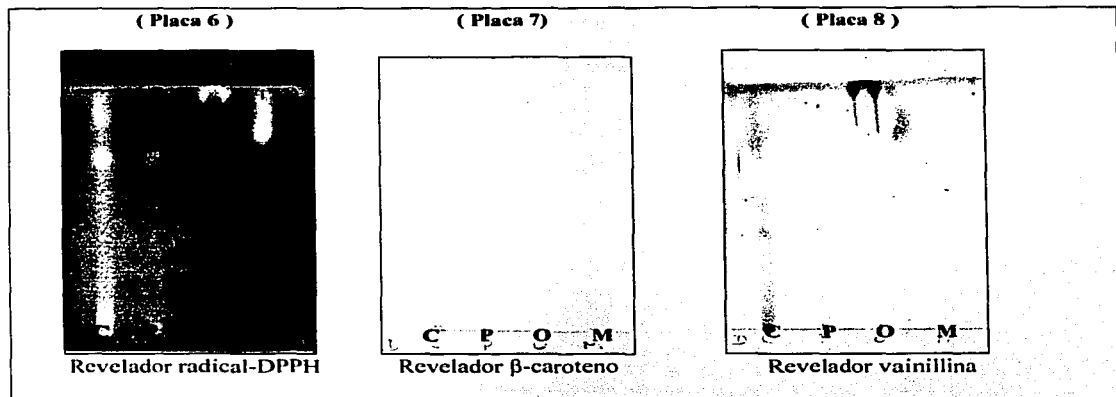
Muestras:

C (Extracto Crudo Etanol-Agua)

P (Extracto Polimérico)

O (Oligómero del extracto de Etanol-Agua)

M (Monómero del extracto de Etanol-Agua)



En estas cromatoplas se muestran las fracciones obtenidas del enriquecimiento.

Placa 6 revelado con radical-DPPH se observa una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así que las fracciones presentan actividad secuestrante, además de que la resolución es más clara en cada fracción, además en la banda del extracto crudo se observan claramente tres bandas intensas, una de las cuales aparece nuevamente en la fracción polimérica, una banda en la fracción oligomérica y una banda intensa en la fracción monomérica.

Placa 7 el revelador usado es blanqueo con β -caroteno. Dónde las fracciones obtenidas presentan una resolución más clara y definida. En el extracto crudo se observan tres bandas con actividad antioxidante, una de ellas coincide nuevamente con una banda de la fracción polimérica, en el oligómero hay una sola banda en la parte más alta y el monómero presenta también una banda con actividad.



Placa 8 el revelador usado es vainillina en H_2SO_4 en la placa se observa poca resolución del extracto crudo y la fracción polimérica, pero no así en el caso del oligómero y monómero puesto que estas fracciones son más definidas, esto es que solamente se observa una banda con una mayor resolución.

En general de los tres métodos utilizados para la purificación del extracto etanólico, el que resulto tener una mejor separación fue la extracción selectiva (polímeros, oligómeros y monómeros), esto en comparación con los otros métodos utilizados (columna cromatográfica de celulosa y sephadex LH-20).

Al mismo tiempo se realizaron dos placas en donde se colocan dos estándares naturales con la fracción monomérica, con la finalidad de observar si en esta fracción se encuentra alguno de estos antioxidantes, ya que en las primeras placas (extractos crudos) se observó un comportamiento similar a la catequina.

Placas de silica

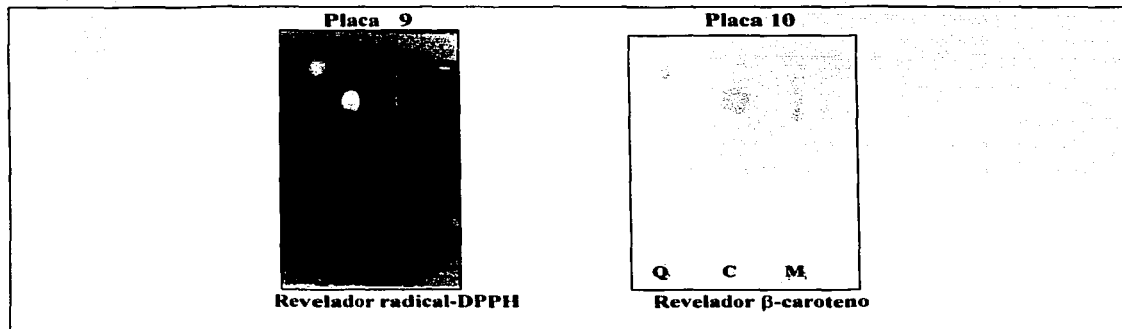
Eluyente Cloroformo-AAcético-Agua (4-5-1)

Muestras:

Q (quercetina)

C (catequina)

M (Monómero del extracto de Etanol-Agua)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Obteniendo como resultado que tanto en la placa revelada con radical-DPPH (**Placa 9**) como la de blanqueo con β -caroteno (**Placa 10**), las bandas de la fracción monomérica presentan una similar resolución (Rf) que el estándar Catequina, además de que las tres muestras presentan actividad secuestrante y antioxidante.

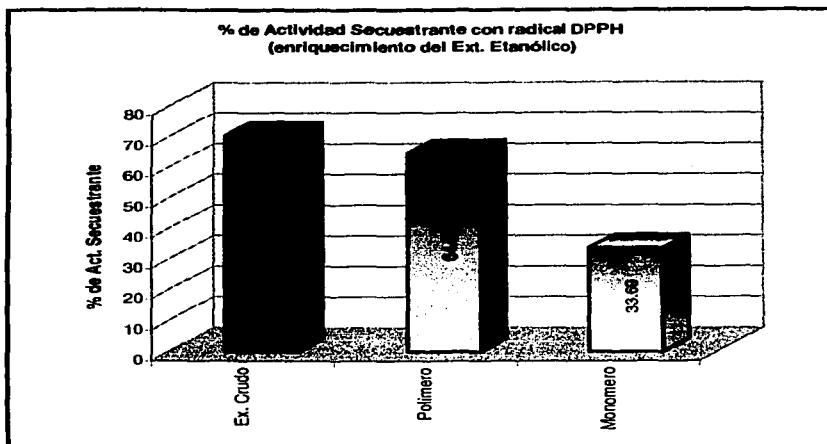
De la misma forma se procedió a realizar las evaluaciones cuantitativas de actividad antioxidante, secuestrante, así como de fenoles totales a las fracciones polimérica y monomérica, comparándolas con las del extracto crudo inicial.

4.4.3 Evaluación Cuantitativa

4.4.3.1 Actividad secuestrante: (radical-DPPH)

El método se basa en medir la capacidad secuestrante que tienen los compuestos presentes en el extracto para reducir al radical, mediante la donación de átomos de hidrógeno, siguiendo espectrofotométricamente la decoloración que sufre el reactivo del púrpura al amarillo a 517 nm, que se manifiesta en la disminución de la absorbancia con el transcurso del tiempo en que se lleva a cabo la reacción.

Para realizar estas pruebas se prepararon las muestras a 200 ppm en metanol (0.2 mg / ml) con el fin de estandarizar las pruebas y obtener resultados reproducibles y poder así tener una media de los datos. Dando como resultado un gráfico donde se muestra la actividad secuestrante con radical-DPPH de las muestras. En la *gráfica 4* se muestran los resultados de esta prueba, cabe señalar que no se incluyó al oligómero, debido a que la cantidad obtenida fue muy poca.



Gráfica 4. Porcentajes de actividad secuestrante con radical-DPPH del extracto crudo etanólico y dos fracciones obtenidas de la extracción selectiva.

En la **gráfica 4** se observa el % de actividad secuestrante que presentaron las diferentes fracciones obtenidas de la extracción selectiva comparadas con el extracto crudo de la cáscara de uva del cual se partió (etanol-agua), los resultados obtenidos para esta prueba fueron que al fraccionar al extracto crudo en moléculas más pequeñas (polímeros 64.59% y monómeros 33.69%) su actividad secuestrante disminuye en diferentes proporciones, esto es lo que se esperaba ya que cuando el extracto se divide en moléculas menos complejas, los grupos hidroxilos (-OH) disminuyen de la misma forma en su estructura molecular, pero no así para el caso del extracto crudo ya que como sabemos en el se encuentran toda la mezcla de monómeros, oligómeros y polímeros, lo cual repercute en una alta actividad secuestrante.

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

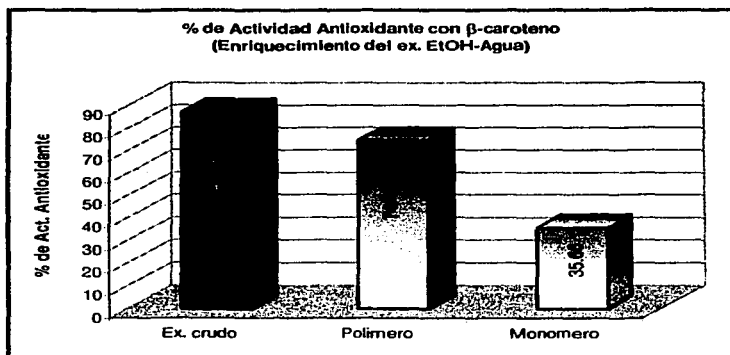


4.4.3.2 Actividad Antioxidante (Blanqueo con β -caroteno).

Para obtener el % de actividad antioxidante se aplica la prueba de blanqueo con β -caroteno que se basa principalmente en medir la capacidad que tienen los compuestos con actividad antioxidante presentes en el extracto para minimizar o inhibir la oxidación del β -caroteno en la solución, provocada por diversos factores (luz, H_2O_2 , temperatura), evitándose así la ruptura de la molécula y la formación de radicales libres, estabilizando a la molécula mediante la donación de hidrógenos o el secuestro de radicales.

Esta prueba se mide espectrofotométricamente a 470 nm, donde se observa la decoloración que sufre el β -caroteno pasando de amarillo a incoloro, en el transcurso del tiempo en que se lleva a cabo la reacción.

Esta prueba de actividad antioxidante, determinada con β -caroteno, de la misma forma que la técnica anterior, las muestras se estandarizaron a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) en metanol para que de esta forma la prueba sea reproducible y obtener una media de los datos. En la *gráfica 5* se presentan los resultados obtenidos en esta prueba.



Gráfica 5. Porcentajes de actividad antioxidante con blanqueo con β -caroteno del extracto crudo etanólico y dos fracciones obtenidas de la extracción selectiva.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En la **gráfica 5** se observa el % de actividad antioxidante que presentaron las fracciones obtenidas de la extracción selectiva comparadas con el extracto crudo del cual se partió (etanol-agua), de la misma manera que en el caso anterior los resultados obtenidos para esta prueba fueron que al dividir al extracto crudo en moléculas más pequeñas (polímeros 74.41% y monómeros 35.66%) su actividad antioxidante también disminuye, esto es porque ya el monómero como tal no tiene suficientes grupos -OH disponibles que puedan atrapar a los radicales libres formados por el β -caroteno, que trae como consecuencia una disminución en su actividad.

En general los polifenoles poliméricos son antioxidantes más potentes que los fenoles monoméricos, ello se ha demostrado en diferentes pruebas, donde los polímeros actúan más eficazmente sobre los radicales libres, que los monómeros, un estudio demostró que entre mayor es el grado de polimerización de los flavonoides, es más alta la actividad secuestrante y antioxidante, aunque también depende del número y posición de los grupos hidroxilo y metilos, que se encuentran en el anillo bencénico y la posibilidad de deslocalización del electrón en las dobles ligaduras ⁽⁵⁾.

4.4.3.3 Fenoles Totales (Método de Davis)

Tomando como referencia a la curva patrón mencionada ya anteriormente (página 77) se determina la proporción de grupos fenólicos de catequina presentes en cada fracción obtenida de la extracción selectiva, de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra (200 ppm)	ppm catequina
etanol-C	192
etanol-P	128
etanol-M	85.71

La tendencia de estos datos es que entre más grande es la molécula (extracto crudo>polímeros>monómeros), la cantidad de fenoles totales será en proporción del tamaño de la



fracción, esto es que la cantidad de grupos hidroxilo (-OH) disponibles disminuyen, trayendo como consecuencia un menor porcentaje en sus actividades (secuestrante y antioxidante).

Se logra demostrar que realmente como lo cita la literatura la fracción polimérica es la que presenta un mejor comportamiento en actividad frente a las demás fracciones obtenidas, pero una de sus principales limitaciones es que sus propiedades de astringencia son mayores.

Con respecto a la segunda hipótesis esta no se confirmó puesto que en los dos sistemas propuestos (cromatografía en columna de celulosa y sephadex LH-20) la complejidad del extracto no permitió un adecuado fraccionamiento (baja resolución en la placa cromatográfica), pero no fue lo mismo al aplicar la técnica de extracción selectiva, en la cual se pudieron obtener fracciones enriquecidas (oligómero y monómero) y con mejor resolución en placa cromatográfica.

La finalidad de este trabajo fue aprovechar un subproducto derivado de la industria de los vinos de alto valor agregado con el propósito de obtener un producto de origen natural como son los antioxidantes de la cáscara de orujo de uva (variedad *Barbera*). Lo cual nos llevan a las siguientes conclusiones:



5 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados que aportaron las pruebas cuantitativas con radical-DPPH y blanqueo con β -caroteno el extracto que presentó mayor actividad en ambas pruebas fue el obtenido con etanol-agua, mismo que se corroboró por el método de fenoles totales, por lo cual se eligió a este extracto como el ideal para la purificación.
- Se demostró que mediante una técnica alternativa de purificación rápida y sencilla (enriquecimiento de polímeros, oligómeros y monómeros) se obtiene una mejor separación de los compuestos presentes en los extractos, esto en comparación con los métodos cromatográficos en columna.
- Mediante las pruebas cualitativas en capa fina con radical-DPPH y β -caroteno realizadas a los monómeros enriquecidos, así como al extracto etanol-agua, estas indican que posiblemente el antioxidante presente sea catequina o epicatequina.
- Por último se concluye que dadas las aportaciones del estudio realizado a la cáscara de uva (antioxidantes) proveniente de un residuo industrial, ésta puede ser considerada una fuente potencial, abundante y barata de antioxidantes, además de una alternativa dentro de los ingredientes o materias primas de origen natural.



RECOMENDACIONES

- I. Partir de una mayor cantidad de materia prima (cáscara) y obtener un mayor rendimiento en las fracciones enriquecidas para que posteriormente éstas puedan ser evaluadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y de esta manera asegurarnos si realmente nuestro compuesto es catequina.
- II. Aprovechar las diferentes fracciones (extracto crudo, polímeros, oligómeros y monómeros) obtenidas para su aplicación en los alimentos o bien para la obtención de estándar de catequina.
- III. Emplear un método de separación alternativo, esto es si en la fracción monomérica durante el análisis de HPLC se obtiene como resultado dos o más compuestos.
- IV. Realizar un escalamiento de todo el proceso, para evaluar costos y parámetros.

Indudablemente los antioxidantes naturales de origen residual representan un papel importante e innovador, pero en cualquier caso el consumidor debe tener la prioridad encima de los intereses económicos, por lo que se requiere se les realicen ciertas pruebas o requisitos para considerarlos como aditivos para los alimentos, llevándose a cabo estudios científicamente legítimos y fiables.

**ANEXO I****Preparación de soluciones reveladoras.**

Solución de radical-DPPH al 0.2% en metanol: se pesan 0.2 g de radical-DPPH y se disuelven en metanol, hasta llegar a un volumen de 100 ml en un matraz aforado.

Solución de β -caroteno al 0.05% en acetona: se pesan 0.05 g de β -caroteno y se disuelve en acetona, hasta llegar a un volumen de 100 ml en un matraz aforado.

Solución de vainillina-ácido sulfúrico se disuelven 0.5 g de vainillina en 100 ml de ácido sulfúrico-etanol en una relación de 40:10.

Preparación de soluciones para pruebas cuantitativas.

Solución de radical-DPPH 3×10^{-5} M en DMSO: se pesan 1.182×10^{-3} g de radical-DPPH (PM=394.32 g/mol) y se disuelven en 100 ml de DMSO en un matraz aforado.

Solución de β -caroteno: 20 mg de β -caroteno se disuelven en 100 mL de acetona hasta su aforo.

Solución de dietilenglicol (DEG) al 90% en agua: se miden 9 ml de dietilenglicol en 1 ml de agua destilada y esto se realiza por cada corrida realizada para la prueba de fenoles totales.

Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 4 N: se pesan 16 g de Na OH y se disuelven con 100 ml de agua destilada.



BIBLIOGRAFÍA

1. Rubilar M. Pirelo M. Franco Daniel. Caracterización de Sustancias con poder antioxidante extraídas de diferentes residuos. Depto. De Ingeniería Bioquímica. Santiago de Compostela.1999
2. Huisenga Marck. El negocio Inteligente, uso eficiente de subproductos Agrícolas. Research Biopolymers and Aroms. France. 1998
3. Schieber. A. Stintaing F.C. and R. Carle. By-products of Plant food processing as a source of functional compounds. Trends in Food Science & Technology. 12. 2001. 401-413.
4. Nuutila A.M., Kammiovirta K. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. Food Chemistry 76. 2002. 519-525.
5. Moure Andres, M. Cruz José, Franco Daniel. Natural Antioxidant from residual source. Food Chemistry 72. 2001. 145-171
6. Wollgast Jan. Anklaw Eike. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. Food Research International 33. 2000. 449-459.
7. Yinrong Lu. L. Yeap Antioxidant and Radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry. 68. 2000. 81-85.
8. Aspanos George y Ronald E. Phenolics of Apple, Pear, and white Grape Juices and Their Changes with Processing and storage. J.Agric.Food Chemistry 40. 1992. 1476-1487
9. Ting. Citrus fruit and their products analysis. Technology. New York. USA 1986. 108-113.
10. Núñez Selles, Alberto J.; Herman T. Vélez Castro. Juan Agüero-Agüero. Isolation and Quantitative análisis of phenolic Antioxidants, Free sugars, and polyols from Mango (manífera indica, L) Stem Bark Aqueous Decoction Used in Cuba as a Nutritional Supplement. J.Agric. Food Chem. 50. 2002. 762-766.
11. Yinrong Lu. L. Yeap Foo. The polyphenol constituents of grape pomace. Food Chemistry 65.1999. 1-8.
12. Anil J. Shrikhande Wine by-products with health benefits. Food Research International. Vol. 33 2000. 469-474.
13. V. Cheynier. Tannins in Grape and Grape Products. Research Biopolymers and Aroms. France. 100-104.
14. Valiente. C. Arrigoni. E. Esteban. R. M. and Amado. R. Grape pomace as a potential food fiber. Journal of Food Science. 1995. Vol. 60. No. 4. 818-820.
15. Souquet Jean Marc. Benoit Labarbe. Phenolic composition of grape stems. J. Agric. Food Chemistry 2000. 48. 1076-1080.
16. Leighton Federico. Polifenoles del vino y salud humana. Antioxidantes y calidad de vida. No.27. marzo 2000. 1-21.
17. Kanner Joseph. Fankel Edwin. Granit Rina. Natural Antioxidant in grapes and wines. J. Agric. Food Chemistry 42. 1994. 62-69.



18. Larrauri, José A. Rupérez Pilar, Saura Calisto Fulgencio. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. J. Agric. Food Chemistry 1997,45, (1390-1393).
19. Pekic, B. Kuvac, V. Alonso E. and Revilla E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. Food Chemistry, 1998, 61, No. 1/2, 201-206.
20. Jayaprakasha G.K. Antioxidant activity of grape seed (vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chemistry 73 (2001) 285-290
21. Souquet, J. M; Cheyner, Veronique; Brossaid. Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. Phytochemistry, Vol. 43, No. 2, 1996, 509-512.
22. Pierre- Louis Teissedre, Nicolas Landrault. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. Food Research International 33 (2000) 461-467.
23. Torres, J.L. and Bobet R. New flavanol Derivatives from Grape (vitis vinifera) By products. Antioxidant Aminoethylthio-flavan-3-ol. Conjugates from a Polymeric wastw fraction used a source of Flavonols. J. Agric. Food Chemistry 2001,49, (4627-4634).
24. Frangi, Enrico; Bertani; Marco. United States Patent Frangi, et al. 5.484.594 January 16, 1996. Process for preparing grape seed extracts enriched in procyanidol oligomers.
25. Katalinic Visnja. Grape Catechins-Natural Antioxidants. Journal of Wine Research. 1999, Vol. 10, No.1, 15-23.
26. Prieur,C.; Rigaud, J.; Cheyner,V.; Mountounet, M. Oligomeric and Polymeric procyanidins from grape seeds. Phytochemistry, 1994, 36, 781-784.
27. Ricardo da Silva, J. M.; Rigaud, J. Cheyner, V. Cheminat, A. T.; Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. Phytochemistry, 1991,30,1259-1264.
28. Ruiz Hernández Manuel. La crianza del vino tinto, desde la perspectiva vitícola. Ed. Mundi-Prensa. 1a. Edición. 1999. Madrid España.
29. Saint-Crieq Nathalie de Gaulejac. Comparative study of polyphenol scavening activities assessed by different methods. J. Agric. Food. Chemistry 1999, 47, 425-431.
30. Cavin A., Hostettmann K., Diatmyko W. Y Potterat O.. Antioxidant Lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. Planta Medica, 52, 1998,253-262.
31. Marino B. Arnao. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Food Science and Technology, 11, 2000, 419-421
32. Spingin V. G. and Kushnerova N.f. A method for evaluation and standardization of oligomeric proanthocyanidin complexes isolated from various raw plant materials. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2002, 36, 3, 139-143.
33. Hidalgo, L. Tratado de viticultura general. Edición Mundi-Prensa. Madrid España 1993, 63-64, 150-160, 790-798.
34. Kikuzaki H. Y Nakatani N.. Antioxidant effects of some ginger constituents. Journal of Food and Science, 1993, 58:1407-1410.
35. Pérez Camacho F. La uva de mesa. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 1981, 42-45.



36. Weaver J.Robert. Cultivo de la Uva. Editorial Continental, 1981, 33-35.
37. Primo Yufera Eduardo, Química de los alimentos Tecnología Bioquímica de los alimentos. Editorial síntesis, capítulo 5 y 7.
38. Valle Pedro. Toxicología de alimentos. 2a. Edición. México. 1998
39. Badui Salvador, Química de los Alimentos. Alhambra Mexicana, 1995, 185-196, 482-483.
40. Belitz, Grosch, Química de los Alimentos. 2ª. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 1997. 237-241
41. Fennema, Owen, R. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España 1993. 223-230. 725-726.
42. Madrid A., I.Cenzano J.M. Vicente. Nuevo manual de industrias alimentarias. Nueva edición ampliada. AMV Ediciones Mundi-prensa. 1993. 227-231.
43. Madhavi D.L y Deshpande S.S. Technological, toxicological and Healt Perspectives. Food Antioxidants. Capítulo 2, 3, 4, 5 . Marcel Dekker, Inc. New York.1996.
44. Harbone Mabry. The flavonoids. Parte 1. Academic Press, USA, 1975, 1-44.
45. Gross Jeana. Pigments in Fruits. Food Science and technology A series of monocarps. Academics Press 1987, Oxford, Great Britain. 59-85.
46. Hertog G.L Michael, Peter C.H. Content of potentially Anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands J.Agric.Food Chem 40, 1992, 2379-2383.
47. Hong Wang, Guohua Cao, and Ronald L Total antioxidant capacity of fruits. J.Agric.Food.Chem. Vol. 44, 1996, 701-705.
48. Jayaprakasha G.K., Tamil selui. Antibacterial and antioxidant activities of grape (vitis vinifera) seed extracts. Food Research International. 12 April 2002.
49. Palma M., L.T. Taylor. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. Journal of Chromatography A, 849, 1999, 117-124.
50. Ni Hong, Varoujan A. Microwave- Assisted extraction of phenolic compounds from grape seed . Natural product Letter vol 15(3), 2001, 197-204.
51. Dealaunay Jean-Claude and Chantal Castagnino. Preparative isolation of polyphenolic compounds from Vitis vinifera by centrifugal partition chromatography. Journal of Chromatography 2002. 1-6.
52. Domínguez, Javier A. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México 1979. 81-90.
53. Prakash Sharma Om, tej Krisan Bhat, Bhupinder Singh. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallato, pyrogallol, phologlucinol, catecol, resorcinol, hidroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. J.Chromatography A 822, 1998, 167-171.
54. Hyang-sook Choi, Hee Sun Sony. Radical-Scavenging Activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J. Agric. Food Chem 48, 2000, 4156-4161.
55. P. Kahkorem Marja, Hopia Anu J. Vuorelaiheikki. Antioxidant Activity of plant Extracts Containing Phenolic Compounds. J. Agric. Food Chem. 1999. 47. 3954-3962.



56. Xiaojun Y, Tadahiro N, y Xiao F: Antioxidative activities in some common seaweeds. Plants Foods for human Nutrition, 1998, 52: 253- 262.
57. Moure Andrés, Franco Daniel, Sireiro Jorge. Evaluation of extracts from Genuine Avellana Hulls as Antioxidants. J. Agric. Food Chemistry 2000, 48, 3890-3897.
58. Montes, A. L. Bromatología. Tomo 3. Editorial Universitaria de Buenos Aires Argentina 1981. 329-331.
59. Milo OHR Linda. Nutraceuticals and Functional foods: Circular Heart-Smart. IFT. Food Technology, June 2002. 1-7.
60. Fuhrman Bianca, Nina Volkova, Amram Juraski White wine with red wine-like properties increased Extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. J. Agric. Food Chemistry 49. 2001, 3164-3168.
61. Santamaría Jiménez Sair. Aprovechamiento de la semilla de uva como fuente de aceite y antioxidantes naturales. TESIS. Facultad de Química, UNAM. México. 2002. 72.
62. Fumio Yamaguchi, Yoshiro Yoshimura, Hiroyuki Nakazawa,). Free Radical Scavenging Activity of Grape Seed Extract and Antioxidants by Electron Spin Resonance Spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO Systems. J.Agric.Food Chemistry 47. 1999, 2544-2548