

63



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

APROVECHAMIENTO DE LA SEMILLA DE UVA COMO
FUENTE DE ACEITE Y ANTIOXIDANTES NATURALES.

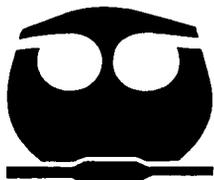
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

SAIR SANTAMARIA JIMENEZ



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D.F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Saiz Santamaria

Jiménez

FECHA: 4/11/2002

FIRMA: [Signature]

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ALTA DE TESIS
EX-100-01-1111

JURADO ASIGNADO.

Presidente MARÍA DE LOS ANGELES VALDIVIA LÓPEZ

Vocal ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA

Secretario ARTURO NAVARRO OCAÑA

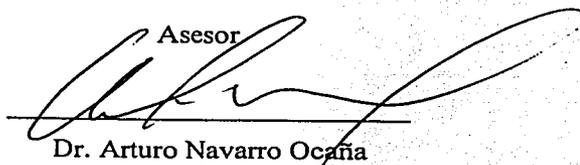
1er Suplente BERTA JULIETA SANDOVAL GUILLÉN

2do Suplente MARÍA TERESA PLATA JIMÉNEZ

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

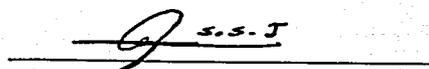
Laboratorio 321, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor



Dr. Arturo Navarro Ocaña

Sustentante



Sair Santamaría Jiménez

****AGRADECIMIENTOS****

A mi Tutor: Dr. Arturo Navarro Ocaña.

A usted le doy las gracias por apoyarme desde un principio en la elaboración de esta tesis, y por darme un mejor panorama de lo que debía hacer; sin su ayuda no sería posible haber terminado.

A mis sinodales: Maria de los Angeles Valdivia, Alfonso Sebastián Lira, Berta Julieta Sandoval y Maria Teresa Plata, por sus valiosas aportaciones y comentarios.

A la Licenciada Bárbara Byer Clark le agradezco la oportunidad y confianza que me brindo, para presentar mi examen de Ingles de comprensión de lectura (CGL).
MUCHAS GRACIAS.

A los compañeros y compañeras del laboratorio 321, 322 y 323 gracias por su ayuda.

A todos mis amigos y amigas de la facultad de química por su gran amistad y apoyo ante cualquier adversidad.

A toda mi familia en general (familia Flores, Jiménez, Pérez y Santamaria) abuelos (as), tios (as), primos (as), sobrinos (as). Mil gracias por todo el apoyo que me brindaron, a pesar de que **siempre existen problemas.**

**** DEDICATORIAS ****

A mis padres:

Miguel Santamaría Jiménez y Dolores Jiménez Moreno, por enseñarme a luchar hacia adelante, por su gran corazón y capacidad de entrega, por creer en mí ciegamente, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta. Los quiero mucho.

A mis Hermanos:

Israel y Michelle Santamaría Jiménez gracias por su cariño y apoyo, por estar siempre unidos y por salir adelante día con día.

A mis Abuelitos:

A ustedes José Jiménez y Luisa Moreno, les dedico este trabajo como reconocimiento en su labor de padres y abuelos que son. Gracias por apoyarme en todo momento.

A mis Tíos:

Juan Pérez y Martha Jiménez, mil gracias por su sincero apoyo y amistad que siempre me otorgaron, por soportarme durante mi carrera.

A todas aquellas personas que me hacen falta nombrar pero que significan mucho para mí.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México (FACULTAD DE QUIMICA), por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesionista.

GRACIAS..... SAIR SANTAMARIA JIMENEZ.



INDICE

	Páginas
CAPITULO I : INTRODUCCIÓN	
1.4. Justificación.....	1
1.5. Objetivos.....	3
1.6. Hipótesis.....	4
CAPITULO II : ANTECEDENTES	
2.1. Utilización y Aplicación de subproductos industriales.....	5
2.2. Composición e importancia del orujo	10
2.3. El vino	14
2.3.1. Las Zonas vitivinícolas Mexicanas	19
2.3.2. Principales variedades de vid que se cultivan en México.....	20
2.4. Características y composición de la uva	22
2.5. Aceite.....	25
2.5.1. Propiedades físicas y químicas de los ácidos grasos.....	26
2.5.2. Clasificación de los aceites.....	29
2.6. Aceites vegetales.....	30
2.6.1. Métodos de refinamiento.....	30
2.6.2. Importancia del Ácido linoleico.....	33
2.6.3. Fuentes, Aplicación y Evaluación de los principales aceites vegetales.....	35
2.7. Aditivos	41
2.8. Antioxidantes	43
2.8.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes	44
2.8.2. Clasificación de los antioxidantes.....	46



2.9. Importancia de los polifenoles.....	48
2.9.1. Fuentes de Antioxidantes (flavonoides).....	50
2.9.2. Métodos de obtención y Evaluación de Antioxidantes.....	51

CAPITULO III : DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Material y Reactivos	57
3.2. Equipo.....	58
3.3. Metodología	59
3.4. Esquema General	65

CAPITULO IV : RESULTADOS.

- Aceite (Evaluación Cualitativa y Cuantitativa del Perfil de ácidos grasos del aceite por cromatografía en gases.....	67
- Antioxidantes (Evaluación Cualitativa y Cuantitativa).....	72
- Extracción selectiva (Patente USA-5484594).	81

CAPITULO V : CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Conclusiones.....	88
Recomendaciones.....	89

Anexo I.....	90
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	91
---------------------------	-----------



JUSTIFICACIÓN

Los antioxidantes, son aditivos que están presentes en un producto alimenticio como resultado de su adición premeditada con el fin de controlar la oxidación de los lípidos y consecuentemente conservar sus propiedades sensoriales y nutricionales durante un mayor periodo de tiempo. A nivel fisiológico en el ser humano atrapan los radicales libres resultado de los procesos metabólicos, previniendo de esta forma la aparición de enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, tumores o cáncer, etc.

Dada la tendencia hacia lo natural, hay que destacar las características de los antioxidantes naturales como una opción adicional para su aplicación en los alimentos. Estos antioxidantes se pueden obtener de diversas fuentes como: soya, cáscara de cítricos, olivos, hojas de té verde, corteza del pino, romero, salvia, especias como clavo, canela, jengibre, nuez moscada, orégano, pimienta negra, tomillo y cúrcuma.

Además de estas fuentes existen las que provienen de las industrias dedicadas a la elaboración de vinos, las cuales generan una gran cantidad de residuos (9 millones de toneladas por año a nivel mundial) conocidos comúnmente como orujo de uva (semilla y cáscara), estos representan el 20 % del peso total de las uvas procesadas. Su composición varía considerablemente, dependiendo de la variedad de la uva y de la tecnología en la fabricación de vino, estos residuos pueden ser procesados para obtener otros subproductos de interés (entre los que se pueden mencionar los antioxidantes de semilla de uva), actividad no desarrollada en México, en posibilidad de ser complementarios o sustitutos de los ya existentes en el mercado o mejores que ellos.

Otro punto que cabe destacar en la alimentación actual, es el consumo excesivo de grasas saturadas, causada por la ingesta de alimentos y condimentos de origen animal, que ha provocado un impresionante aumento de las enfermedades degenerativas, por la acumulación de grasas y colesterol en las paredes de



los vasos sanguíneos. Por eso es necesario recurrir preferentemente a los aceites vegetales (que son ricos en ácidos grasos insaturados), lo cual ha desencadenado una continua búsqueda de más variedades de aceites con estas mismas características, entre los cuales se puede considerar al aceite derivado de la semilla de orujo de uva (rico en ácido linoleico).

En la actualidad, en países como Francia, Canadá, Inglaterra y España existen aproximadamente 22 productos comerciales derivados de las semillas de la uva empleados por las industrias alimentaria y farmacéutica tales como colorantes, extractos crudos como suplemento alimenticio, cremas, barnices, etc.

De esta forma, el objetivo general de este proyecto es aprovechar a la semilla de uva (variedad *Barbera*) proveniente de residuos industriales (vinos Casa Pedro DOMECQ), como una fuente alterna a la obtención de aceite y antioxidantes y su posterior aplicación en la industria alimentaria de nuestro país.



OBJETIVOS.

GENERAL:

- ❖ Aprovechar la semilla del orujo de uva como fuente de aceite y antioxidantes para su aplicación en la industria alimentaria.

PARTICULARES:

- ❖ Evaluar cualitativa y cuantitativamente el perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de la semilla de uva (variedad *Barbera*) por cromatografía de gases (CG).
- ❖ Obtención de antioxidantes presentes en la semilla, 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 semilla de uva.
- ❖ Comparación cuantitativa de la actividad secuestrante, antioxidante y contenido de fenoles totales de los extractos (acetona-agua, etanol-agua y metanol-agua) obtenidos de la semilla de uva.
- ❖ Establecer un esquema de extracción selectiva (enriquecimiento de polímeros, oligómeros y monómeros) como una alternativa para separar los diferentes componentes del extracto crudo.



HIPOTESIS.

- ❖ En previos estudios sobre la semilla de uva de diferentes variedades se ha determinado que su aceite presenta un alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente linoleico, oleico y palmítico, por lo cual se presume que el aceite a obtener de la semilla de uva (variedad Barbera) tenga un perfil de ácidos grasos similar.
- ❖ Considerando que la mayoría de los antioxidantes de origen natural tienen características de solubilidad polares, el disolvente a emplear para extraer los antioxidantes presentes en las semilla de uva, debe tener características similares, lo que redundará en un mayor rendimiento, mismo que se comprobará mediante su evaluación cualitativa y cuantitativa.
- ❖ Estudios realizados anteriormente han demostrado que la extracción selectiva puede ser una alternativa dentro de los métodos de separación, por lo tanto al aplicar esta técnica al extracto crudo se obtendrá un fraccionamiento de los diferentes componentes que lo integran (monómeros, oligómeros y polímeros) con el fin de disminuir la astringencia en el producto final.



2.1. UTILIZACIÓN Y APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS INDUSTRIALES.

Hay un creciente desarrollo en la literatura concerniente al papel de los metabolitos secundarios de las plantas y sus efectos potenciales en la salud humana. Además aumentan los consumidores que están conscientes de que la dieta esta relacionada con los problemas de salud. Los derivados de las plantas procesadoras de alimentos representan un problema mayor en la disposición para la industria involucrada, pero ellos también son fuentes prometedoras de compuestos funcionales que pueden usarse debido a sus propiedades tecnológicas o nutritivas favorables ⁽¹⁾.

Los efectos benéficos de las frutas y verduras se les atribuyen a los micronutrientes orgánicos contenidos en la fibra como son los carotenoides, polifenoles, tocoferoles, vitamina C, y otros. Desde que los aditivos sintéticos son rechazados cada vez más por los consumidores, los ingredientes funcionales se deben originar preferentemente de las fuentes naturales. Esto es particularmente válido para los compuestos polifenolicos, que en contraste con la mayoría de los carotenoides y vitaminas, no se sintetizan químicamente, sino que necesitan ser extraídos del material de la planta y de esta forma poder consumirlos como suplementos dietéticos y en alimentos fortificados ⁽¹⁾.

Estudios epidemiológicos han señalado que el consumo de frutas y verduras imparten beneficios a la salud, por ejemplo reduce el riesgo de enfermedades del corazón, así como ciertos tipos de cáncer.

Derivados de verdura.

Jitomate. El aceite de semilla de jitomate ha atraído el interés puesto que es rico en ácidos grasos insaturados, sobre todo en ácido linoleico. Recientemente, se ha informado que la optimización de desgomado, blanqueando y desodorización, en la evaluación sensorial de productos que se cocinaron con aceite de tomate y el aceite del girasol no reveló ninguna diferencia significativa. Licopeno es el principal carotenoide que causa el color rojo característico de tomates, donde los extractos de la piel son especialmente ricos en licopeno; encontrándose claramente que una cantidad grande de carotenoides se pierde como desecho en el proceso del jitomate. Usando fluidos supercríticos con CO₂ se ha extraído Licopeno y β-caroteno en residuos de pasta de jitomate ⁽¹⁾.



Zanahoria. Varios esfuerzos se han hecho en utilizar el pomace 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, especialmente dado que la calidad sensorial puede afectarse adversamente ⁽¹⁾.

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 ⁽¹⁾.

Aceituna. La cáscara puede reutilizarse para la recuperación de aceite de oliva, o extraer con un solvente orgánico para mejorar el rendimiento del aceite de la cáscara. La cáscara seca se utiliza como combustible o para alimento de ganado. El fragmento sólido restante, que representa 98 % de la carga orgánica, podría mezclarse con la cáscara y podría usarse como combustible. Las aguas desechadas del aceite de oliva son ricas en compuestos antioxidantes ⁽¹⁾.

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. El alto volumen de ácido fólico que suma es de 15.8 μ g / g en materia seca, es una de las 10 vitaminas esenciales en la dieta humana ⁽¹⁾.

Papa. Las cáscaras es el residuo que se obtiene en mayores cantidades de los procesos de la papa. Las residuos de cáscara se encuentran en un rango de 15 a 40 %, la cantidad depende del procedimiento que se aplique, es decir el vapor, abrasión o pelado con solución de sosa. Se ha mostrado que los extractos acuosos de la cáscara son una fuente de ácidos fenólicos ⁽¹⁾.

Por otro lado los jugos de fruta y los productos derivados como los néctares y bebidas han experimentado la popularidad creciente dentro de los últimos años. Las uvas y manzanas son las frutas más importantes en la zona templada, mientras las naranjas, piñas, sandías y mangos son las frutas predominantes de áreas tropicales y subtropicales ⁽¹⁾.



Las frutas de la zona templada normalmente están constituidas por una porción comestible grande y en cantidades moderadas de material de desecho como las cáscaras, semillas y huesos. Debido a la creciente producción, la disposición de este material 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. Por otro lado, costos de secado y almacenamiento de los subproductos está limitados por factores económicos. Por consiguiente, a menudo los residuos agro-industriales son empleados como alimento para ganado o como fertilizantes. La utilización de estos materiales se le esta dando mayor interés debido a que son baratos, abundantes y no representan problema al medio ambiente ⁽¹⁾.

Subproductos derivados de frutas

Manzana. La alta variabilidad en la composición del pomace (cáscara) de manzana y las posibles estrategias de utilización han sido revisadas recientemente aunque el uso ideal no se ha encontrado todavía. 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, comparado con las pectinas de los cítricos, las pectinas del pomace de la manzana están caracterizadas por tener propiedades superiores de gelificación. El pomace de la manzana ha mostrado ser una buena fuente de polifenoles, que se localizan predominantemente en las cáscaras y se extrae en el jugo a una magnitud menor. La explotación comercial de pomace de la manzana para la recuperación de estos compuestos parece prometedor. Los efectos de los polifenoles de la manzana inhiben la caries por estreptococos, por lo que podrían aplicarse en cremas dentales ⁽¹⁾.



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. Las cáscaras de los cítricos se ha encontrado que tienen alta actividad antioxidante (limonoides y flavonoides) ⁽¹⁾.

Mango. El hueso del mango es una fuente prometedora de aceite comestible y ha llamado la atención porque su perfil de ácidos grasos es similar a la de la mantequilla de cacao. Por consiguiente, la legislación ha permitido usar recientemente este aceite como un equivalente a la mantequilla de cacao ⁽¹⁾. Además los huesos del mango también pueden usarse como una fuente de antioxidantes naturales (polifenoles).

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 deterioro enzimático que producen las manzanas frescas se inhibe con el jugo de la piña, ya que se ha demostrado que este tiene propiedades antioxidantes ⁽¹⁾.

Papaya. De la papaya se obtiene una enzima proteolítica (Papaina), usada como ablandador de carne y como agente estabilizante en la industria de bebidas, se recupera del látex de la papaya. De las semillas de la papaya se obtiene un aceite que es rico en ácido linoleico (65 %) ⁽¹⁾.

Uva. Esta fruta produce más de 60 millones de toneladas anuales a nivel mundial. Aproximadamente se usan 80 % de la cosecha total en vino, y el pomace (cáscara y semilla) representa 20 % del peso de uvas procesados. De estos datos puede calcularse que el pomace de la uva suma más de 9 millones de toneladas por año. Cinco a siete millones de toneladas son informadas por otros autores. Su composición varía considerablemente, dependiendo de la variedad de la uva y de la tecnología en la fabricación de vino.



El secado de pomace a altas temperaturas puede causar una reducción significativa de polifenoles en el extracto y afectar la actividad antioxidante y secuestrante. Recientemente se ha encontrado que las semillas de la uva son fuentes ricas de polifenoles, sobre todo de procianidinas ya que estas poseen un alto poder antioxidante ⁽¹⁾.

Tendencias Futuras

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 ⁽¹⁾.

Conociendo sobre los usos y beneficios que los subproductos generados en la industria de alimentos y bebidas pueden aportar, surge la idea de enfocar el presente proyecto al aprovechamiento de la semilla del orujo o pomace de uva (variedad *Barbera*) proveniente de residuos industriales (vinos casa Pedro Domecq) como una alternativa para la obtención de aceite y antioxidantes naturales (estándares), ya que los antioxidantes comerciales que actualmente se emplean (catequina, epicatequina y algunos galatos) son de alto valor económico y son extraídos principalmente del té verde ⁽¹⁾.



2.2. COMPOSICIÓN E IMPORTANCIA DEL ORUJO DE UVA.

La elaboración de vino produce de 20 a 30 % de orujo como residuo, esta constituido por el hollejo o piel de la uva y la semilla, esta ultima puede ser una fuente importante de subproductos de interés industrial: alcohol, antocianinas (colorante), fibra, aceite y procianidinas como suplementos alimenticios antioxidantes. Sin embargo, en nuestro país el aprovechamiento tradicional del orujo de uva, cuando ha tenido lugar, ha sido como forraje a pesar de no presentar un alto valor nutritivo, como fertilizante de suelos o solo se emplea como combustible ⁽²⁾.

Las semillas lejos de ser un residuo industrial, tienen una composición muy interesante. De hecho contiene celulosa (30-33 %), aceite (14-20 %), agua (7-9 %), sustancias nitradas (9-10 %), pentosas (9-12 %), taninos (4-4.5 %) y sales minerales (2.5-4 %) ^(3, 4). Se ha encontrado que el aceite de semilla de uva variedad Sweet Emperador sin procesar (vinificación) es rico en ácidos grasos insaturados (Palmitico 7.4 %, Estearico 3.9 %, Oleico 15.6 %, Linoleico 72.2 %, perfil que se evaluó por cromatografía de gases) siendo el ácido linoleico el más abundante e importante ⁽²⁾. Por otro lado se ha demostrado que las semillas de uva (variedad *Cabernet Sauvignon* y *Merlot*) son ricas fuentes de compuestos fenólicos entre los que se encuentran los flavonoides, compuestos como (+)-catequinas, (-)-epicatequinas, procianidinas (B1, B2, B3, B4), así como galatos de epicatequina y en menores cantidades galatos de catequinas ^(5, 6). 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), por lo que a continuación se hace un análisis de la ventajas y desventajas de este tipo de métodos ya utilizados en semillas de uva, comino, olivo y girasol, cáscara de naranja y limón, hojas de menta ^(7, 8, 9, 10).

Fluido supercrítico: Se entiende como tal a una sustancia llevada, mediante operaciones mecánicas, a unas condiciones operativas de presión y temperatura por encima de su punto crítico.



Como características de un fluido supercrítico se encuentran: Gran poder disolvente junto con una enorme capacidad de penetración en sólidos, lo que permite el agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles ⁽⁶⁾.

Pueden separarse totalmente de forma sencilla de los extractos, simplemente modificando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario, de que el fluido pase al estado gaseoso. Fluidos usados para la extracción con fluidos supercríticos (EFS): Dioxido de carbono (CO_2), Agua (H_2O), Etano (C_2H_6), Eteno (C_2H_4), Propano (C_3H_8), Xenon (Xe), Oxido nitroso (N_2O) ⁽⁶⁾.

Ventajas de la EFS.

Extractos con mayor frescura y aroma natural, uso de temperaturas moderadas, lo cual permite evitar la degradación térmica del extracto, no hay presencia del solvente en el extracto, mayor presencia de agentes activos, extractos libres de contaminantes biológicos: mayor tiempo de vida, proceso no contaminante del ambiente, flexibilidad en la preparación del solvente, flexibilidad de las variables del proceso, equipos automatizados ⁽⁶⁾.

Limitaciones de la EFS.

Al igual que los procesos de extracción convencional, es necesario disponer de datos de equilibrio para conocer cómo se distribuye el componente de interés en las distintas fases y determinar la composición del producto extraído para cualquier composición de la mezcla inicial. Este es el mayor problema de la EFS, ya que apenas se disponen de datos experimentales para realizar los cálculos imprescindibles, los altos costos de los equipos y su relación inversa con el volumen de extracto obtenido por corrida, los extractos obtenidos pueden poseer características diferentes a las conseguidas a través de otros procesos de extracción. Esto influye en la predilección del mercado por un determinado producto en vez del obtenido por la nueva tecnología, los equipos son móviles, pero necesitan una infraestructura segura, limpia y apropiada para las condiciones de operación. Los ambientes húmedos, muy fríos o congestionados no son



recomendables. Por ello, instalaciones pre-diseñadas que cumplan normas internacionales de seguridad e higiene son necesarias ⁽⁶⁾.

Métodos de extracción convencionales: Pros y Contras.

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. Con lleva 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 ⁽¹¹⁾. Se han empleado mezclas de etanol, metanol y acetona en proporciones 80:20 con agua, principalmente han sido utilizados para extraer los componentes presentes en el orujo de uva (cáscara y semilla *variedad Cabernet Sauvignon y Merlot*) ^(5,9).

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 ^(8, 10).

Para conocer como esta constituido el extracto obtenido (semilla de uva, *variedad Cabernet Sauvignon y Merlot*) se usan técnicas que permiten identificar y separar (Cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía en columna, HPLC, Resonancia Magnética Nuclear, etc). Últimamente se ha recurrido a una técnica que vale la pena destacar y que esta indicada en la patente USA-5 484 594 ^(12, 13), ya que permite obtener fracciones enriquecidas y menos complejas, además de que es sencilla, y no se requieren de reactivos de alto costo. Se emplea acetato de etilo con el fin de fraccionar y obtener los monómeros, oligómeros y dejar atrás a los polímeros. El acetato de etilo se evapora y posteriormente se



adiciona cloruro de metileno para precipitar a los oligómeros; el cloruro de metileno se evapora y se adiciona agua destilada con el fin de solubilizar a los fenoles presentes (monómeros) ^(12, 13).

Después de obtener los compuestos en forma individual (monómeros, oligómeros y polímeros) se realizan pruebas de β -caroteno, radical DPPH y ABTS⁺, para saber que tan efectivos son estos en cuanto a su capacidad secuestrante y antioxidante. La conclusión es que las procianidinas (polímeros) son más eficaces que los monómeros ^(12, 14).

Otros usos que se les pueden dar a los subproductos de la semilla de uva (aceite, extractos crudos y antioxidantes) ⁽³⁾, son: 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); en el caso del extracto crudo puede ser utilizado como colorante para bebidas que ya esta aprobado por la FDA en los E.U, en galletas, en golosinas como paletas, pulpas, caramelos, como suplemento alimenticio, o bien aplicar estos antioxidantes en el aceite contenido en la misma ⁽¹¹⁾.

Debido a que el orujo de uva es obtenido de la elaboración del vino, es necesario conocer como se lleva a cabo este proceso, ya que de este depende el contenido de compuestos que se encuentren en el orujo.



2.3. EL VINO

La enología se define como el conjunto de conocimientos sobre los vinos y su elaboración. El nombre proviene del griego oinos (vino) y logos (tratado).

El vino tinto se prepara a partir del grano de uva completo; es decir a partir de la pulpa, la piel y las semillas, mientras que el vino blanco se hace solo con el jugo de la uva ya que al inicio del proceso, es decir antes de la fermentación, se separan la piel y las semillas.

Por fortuna el vino es una bebida natural, que no acepta alteración en su contenido de alcohol, de ácidos y el de taninos. Así es que las técnicas enológicas tienen como objeto asegurar la conservación del vino, esto no significa agregar o quitar elementos a los aportados por la viña; sin embargo, la técnica refuerza ciertos elementos, o bien neutraliza algunos otros que no favorecen al sabor del vino ⁽¹⁵⁾.

El vino ha sido parte de la cultura humana desde hace unos 6,000 años y los antecedentes históricos relacionan al vino con la salud y la longevidad, sobre todo en la cultura mediterránea. Efectivamente en Francia y los otros países del área mediterránea (España, Portugal, Italia, Grecia y Yugoslavia) el vino está integrado al comportamiento habitual de los pueblos, que lo consumen con las comidas y en las celebraciones ^(13, 15).

El consumo de vino, especialmente tinto, se ha asociado a la disminución de la mortalidad debida a enfermedades coronarias, en un efecto denominado paradoja francesa. Los compuestos fenólicos que se encuentran en uvas y vinos han resultado ser responsables de esta actividad. Pueden retrasar los procesos de trombosis por inhibición de la agregación plaquetaria, la peroxidación de lípidos ó la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También se han encontrado compuestos antimutagénicos y anticancerígenos ⁽¹³⁾.



La composición del vino es compleja (*Tabla 1*), su elemento dominante es el agua. Los vinos ligeros contienen de 8 a 10 % de alcohol, los fuertes de 11 a 13 %, los muy fuertes de 13 a 15 %, los de postre de 15 a 18 %. Los vinos de mesa de clase inferior tienen menos del 7 % de alcohol. El número de compuestos identificados en el vino se ha incrementado enormemente gracias al desarrollo de nuevas tecnologías analíticas. En el vino existen aproximadamente 500 compuestos conocidos, de los cuales 160 son ésteres. La mayoría de sus componentes provienen de la uva y del proceso fermentativo. Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las semillas⁽¹⁵⁾. Su concentración es baja en la pulpa (*Tabla 2*).

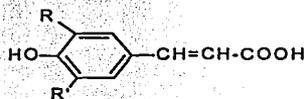
Tabla 1. Estimación general de los componentes del vino de mesa (% peso).

Componente	Vino Blanco	Vino Tinto
Agua	87	87
Etanol	10	10
Otros volátiles	0.04	0.04
Extracto	2.6	2.7
Azúcares	0.05	0.05
Pectinas	0.3	0.03
Glicerol	1.1	1.1
Ácidos	0.7	0.7
Ceniza	0.2	0.2
Fenoles	0.01	0.2
Aminoácidos	0.25	0.25
Grasas, Terpenoides	0.01	0.02
Vitaminas, etc	0.01	0.01
Total	100	100

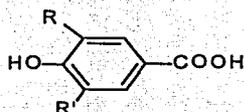
Tabla 2. Proporción de fenoles presentes en las diferentes partes de la uva ⁽¹³⁾.

Partes de la uva	Fenoles (%)
Tallos	1-4
Baya	-
Cáscara	1-2
Pulpa	-
Semilla	5-8

La concentración y variedad de polifenoles en el vino depende de numerosos factores : variedad de la vid, del clima, maduración de la uva, el terreno y de las practicas de cultivo, así como el tipo de vino ⁽¹⁶⁾. Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son: derivados de ácidos fenólicos (ácidos cinámicos C₆-C₃, ácidos benzoicos C₆-C₁), flavonoides (catequinas, epicatequina, quercetina), estilbenos (trans-resveratrol) y procianidinas (B1, B2, B3, B4) ^(15, 17, 18).

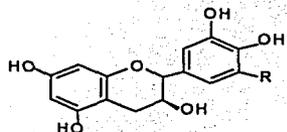
 Cinámicos ^(17, 19)


ácido p-cumarico (R=R'=H)
 ácido cafeico (R=OH, R'=H)
 ácido ferulico (R=OCH₃, R'=H)

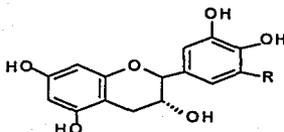
 Benzoicos ^(17,19)


ácido p-Hidroxibenzoico (R=R'=H)
 ácido vanillico (R=OCH₃, R'=H)
 ácido galico (R= R'=OH)

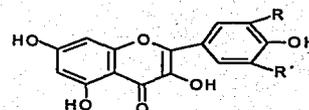
FLAVONOIDES ^(17,19)



(+)-catequina (R=H)
 (+)-gallatequina (R=OH)



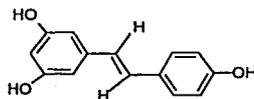
(-)-epicatequina (R=H)
 (-)-epigalico (R=OH)



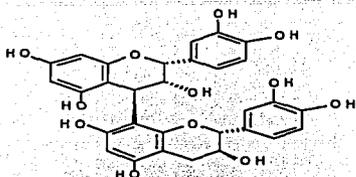
kaemferol (R=R'=H)
 quercetina (R=OH, R'=H)



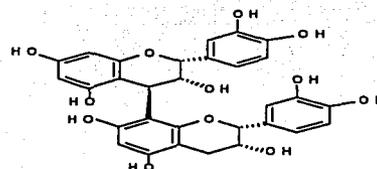
Estilbeno (trans-resveratrol)



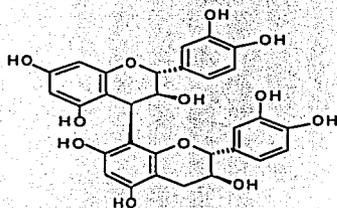
PROCIANIDINAS ⁽²⁰⁾



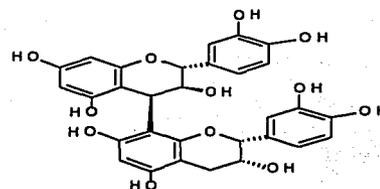
B1 (-)-epicatequina-(+)-catequina



B2 (-)-epicatequina-(-)-epicatequina



B3 (+)-catequina-(+)-catequina



B4 (+)-catequina-(-)-epicatequina

La catequina es el compuesto fenólico monomérico más abundante, seguido por el ácido gálico. El ácido gálico proviene principalmente de la hidrólisis de los esteres de flavonoides, presentes en la piel y en las semillas de las uvas. Los niveles de epicatequina (vino tinto 82 mg/l, vino blanco 21 mg/l) son menores que los de catequina (vino tinto 191 mg/l, vino blanco 35 mg/l) en la mayoría de los vinos ^(16, 21).

Las concentraciones de ácido cafeico son relativamente bajas tanto para vino tinto como blanco (7.1 mg/l y 2.8 mg/l). El ácido cafeico es producto de la hidrólisis del ácido caftarico, siendo la hidrólisis dependiente de la exposición al sol ⁽²²⁾.



La concentración de resveratrol, uno de los polifenoles del vino, puede variar entre 1.5 mg/l en vino tinto y 0.003 mg/l para vino blanco, aunque su presencia y niveles pueden ser muy variables según las variedades; principalmente el resveratrol se encuentra en las hojas y en la piel del fruto, presenta propiedades antifúngicas que protegen a las partes de las plantas más expuestas a infecciones ⁽¹⁵⁾.

Las procianidinas están presentes en cantidades relativamente altas en el vino tinto 0-90 mg/L y en menor cantidad en el vino blanco entre 0-7 mg/L. Son las principales responsables de su color y sabor, además existen mezclas de procianidinas (B1-B4). Las moléculas de este tipo son causantes de proporcionar astringencia a los vinos, estos compuestos poliméricos están presentes en el orujo de uva (semilla y cáscara), por esto uno de los propósitos de este trabajo es separar los diferentes componentes que estén en los extractos de la semilla de uva (variedad *Barbera*) con poder antioxidante, para eliminar gradualmente esta astringencia y por lo tanto obtener moléculas menos complejas como monómeros, dímeros o trímeros ^(22, 23).

Según reportes de investigaciones anteriores los compuestos presentes en el vino (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y procianidinas), se han extraído por centrifugación por partición, con fluidos supercríticos usando CO₂, y el método convencional de maceración con disolventes. Los dos primeros métodos son efectivos y se realizan en poco tiempo, el único inconveniente es que sus equipos y materiales son muy caros ⁽²³⁾; además se evaluaron cualitativa y cuantitativamente de actividad secuestrante y antioxidante (radical-DPPH, ABTS+, Blanqueo con β-caroteno y cantidad de fenoles totales por Folin-Ciocalteu). Finalmente, determinando sus compuestos (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y procianidinas) por técnicas como HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución), RMN (resonancia magnética nuclear) ⁽²⁴⁾, CG-EM (cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas); las principales variedades de uva de estudio fueron: *Thompson Seedles*, *Flame Seedles*, *Petit sirah*, *Caberner Sauvignon*, y *Málaga*. Estas mismas determinaciones se le han realizado al subproducto de los vinos (orujo de uva), con el fin de comparar los compuestos que en el se encuentran con los compuestos presentes en el vino ^(9, 25, 26).



Siendo el motivo de este trabajo el aprovechar lo que en nuestro país se obtiene como subproducto de los vinos, es importante conocer como se encuentran distribuidas las principales zonas vitivinícolas, así como las principales variedades de uva que se cultivan en estas zonas, además de conocer de manera detallada las características y composición de la uva.

2.3. 1. Las Zonas Vitivinícolas Mexicanas

Aunque la vid sea una planta muy noble, que tolera prácticamente cualquier tipo de clima, es indudable que cuando se le cultiva con fines de elaborar vino, le convienen más aquellos de cuatro estaciones anuales bien definidas. Por ello, en el caso de México, se ha descartado la idea de establecer viñedos más al sur del estado de Querétaro, ya que casi toda la parte meridional del país es de clima tropical. La razón de preferir los climas no tropicales radica, fundamentalmente, en la conveniencia de siempre cosechar la uva en la misma época del año. En algunos viñedos experimentales del estado de Morelos, por ejemplo, se pudo observar que las plantas fructificaban en fechas irregulares, lo que originaría serios problemas para la vendimia. Por otro lado, cuando la vid se desarrolla en el clima llamado mediterráneo, dispone de un invierno frío durante el cual la planta descansa ya que en casos extremos incluso deja de circular la sabia. Todo ello explica que nuestra más importante viticultura se ubique en los estados del Centro y el Norte del país ^(26, 27).

Aproximadamente unas 3 mil 500 hectáreas sembradas de uva para vino se encuentran repartidas en diez estados de la República que son: Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, los cuales producen 27 mil toneladas de uva por ciclo agrícola ⁽²⁶⁾.



2.3.2. Principales variedades de uva en México.

A consecuencia de la existencia en el país de especies de vid llamadas americanas y de la llegada posterior de la vid europea, denominada *Vitis vinifera*, en la actualidad se cuenta con viñedos de todas esas especies, además de las plantas resultantes de cruzamientos entre ellas, a las que se conoce con el nombre de híbridos.

Desde hace algunos años, se han ido cambiando las plantas de muchos viñedos, por variedades que han demostrado dar origen a mejores vinos. Citaremos, en orden alfabético, las principales variedades destinadas a vinos de mesa (blancos y tintos) ⁽²⁶⁾:

Barbera: Variedad tinta, del norte de Italia. Da vinos robustos, de tono sombrío.

Burger: Variedad usual en Alemania. Da vinos blancos afrutados y fragantes.

Cabernet Sauvignon: La mejor variedad tinta del *Medoc*, en Burdeos. Carácter especiado, tánico y con aroma de cassis.

Cariñane: Variedad tinta que origina vinos de calidad mediana. Muy abundante en Francia y en España.

Chenin Blanc: Famosa variedad blanca de la *Touraine*, en Francia, de notable acidez, que da larga vida a los vinos.

French Colombard: En Francia se le llama simplemente *Colombard*, y es una variedad blanca afrutada y agradablemente penetrante.

Grenache: Variedad tinta, que da un vino fuerte, afrutado y algo pálido.

Málaga: Variedad blanca muy famosa en España para elaborar vinos licorosos.

Malbec: Variedad tinta de segundo nivel en Burdeos, pero que produce vinos densos y tánicos, que pueden tener buena calidad, especialmente en mezcla.



Merlot: Variedad tinta de gran calidad, que da el olor aciruelado a los vinos de Pomerol y St. Emilion.

Misión: Variedad antigua de México, que es sembraba en las misiones de California. Tintos ligeros. Fue llevada a Argentina para iniciar su viticultura, con el nombre de Criolla.

Moscatel: El mejor es el blanco, de uvas pequeñas, excelente para producir vinos dulces muy aromáticos.

Nebiolo: Es una de las mejores variedades tintas de Italia. Da vinos intensos, afrutados y aromáticos.

Palomino: Variedad blanca típica de España, para elaborar los mejores jereces. Para vinos de mesa es de poca calidad.

Petate Sirah: Excelente variedad tinta del Valle del Ródano. Da un vino púrpura, con olor a pimienta.

Pinot Chardonnay: Excelente variedad tinta del Valle del Ródano. Da un vino púrpura, con olor a pimienta.

Pinot Noir: Excelente variedad tinta para los mejores vinos tintos de Borgoña, y además se vinifica en blanco, en la región de Champaña.

Rubí Cabernet: Variedad tinta, de buena calidad, creada en California americana, por cruzamiento de Cabernet Sauvignon y Cariñane.

Riesling: La mejor variedad blanca de Alemania. Produce vinos afrutados y florales a la vez.

Salvador: Especie americana, que da vinos tintos de fuerte color, algo violáceos y de calidad mediana.

Sauvignon blanc: Variedad blanca, que da vinos con aroma vegetal, muy característico, a veces con olores de grosella.

Semillon: Variedad blanca excelente para vinos dulces como el Sauternes.

Sylvaner: Típica variedad blanca alemana de muy gratas características.

Ugni Blanc: variedad tinta que también se vinifica en blanco y en rosado pálido; es afrutado, con sabor de zarzamora y frambuesa ⁽²⁶⁾.



2.4. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN DE LA UVA.

La vid es un arbusto, sarmentoso y trepador, que se fija a tutores naturales o artificiales, mediante órganos de que va provista.

Frutos

Una vez fecundado el ovario se forma el grano de uva que transporta los jugos para hidratar y nutrir el globo fructífero, además de sostenerlos. El grano de uva se compone de tres partes:

a) la piel, película u hollejo; es el elemento envolvente, elástico e impermeable. Sus aportaciones a los vinos tintos son el tanino, los colorantes, así como los compuestos aromáticos. Algunas uvas tienen la materia colorante soluble en agua, por su facultad de colorear desde el momento del estruje son llamadas tintóreas. Por otra parte, la piel confiere al vino su bouquet particular.

b) la pulpa, es la parte más importante de la uva, es jugosa e incolora, si no pertenece a las cepas llamadas tintóreas. Está compuesta por azúcares y ácidos. El sabor de la uva puede modificarse por factores como el clima y el suelo.

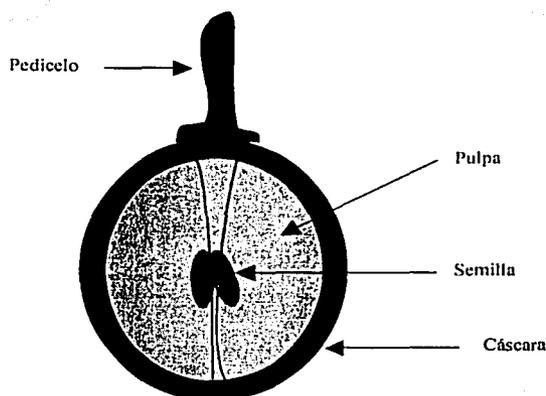
c) las pepitas o semillas se encuentran al centro de la pulpa, generalmente hay dos en cada grano, excepcionalmente cuatro; sin embargo existe el caso de uvas apirenas, sin semillas, conocidas como uvas castradas. Su forma es bastante variada y en ellas se basa la determinación de diversas especies; son compactas, lo cual resulta sumamente positivo al momento del estrujado, ya que no se quiebran y no contaminan el mosto de grasas y resinas, lo cual beneficia el sabor del vino ^(27,28).

La producción mundial de semilla puede estimarse en un 4-5 % del peso de la uva destinada a vinificación ⁽⁴⁾.



El soporte y la vía de unión de los granos con los sarmientos es precisamente el escobajo, al que también se le conoce como palillo, por donde se nutren y mantienen los granos. El grano de uva se compone de 88 % de pulpa, 8 % de hollejo y 4 % de pepitas.

Corte longitudinal de una baya de uva



En la baya de *Vitis vinifera* los azúcares son principalmente glucosa y fructosa; el 99 % o más de los hidratos de carbono en el mosto y entre el 12 y 27 % del peso de la baya madura corresponden a los azúcares mencionados anteriormente ⁽¹⁵⁾.

En lo que se refiere a los ácidos los principales encontrados en la uva son D, L tartarico y L-málico que constituyen el 90 % o más de la acidez total. El siguiente ácido en importancia que se encuentre en la uva es el cítrico, pero su contenido no supera el 0.03 % en el fruto maduro. Las cantidades de ácido tartárico y málico libres decrecen con la maduración ⁽²⁷⁾.

En la *tabla 3*, se muestra la composición de las uvas (Rangos en porcentajes de las más importantes componentes del zumo fresco, en volumen).

**Tabla 3.** Composición de la uva.

Componentes	Porcentaje
Agua	70-80
Hidratos de carbono	15-25
Glucosa	8-13
Fructosa	7-12
Otros (inositol, pentosa)	0.04-0.23
Ácidos orgánicos	0.3-1.5
Tartarico	0.2-1.0
Malico	0.1-0.8
Cítrico	0.01-0.05
Taninos	0.01-0.10
Compuestos nitrogenados	0.03-0.17
Compuestos minerales	0.3-0.6
Aluminio	T-0.003
Boro	T-0.007
Calcio	0.004-0.025
Cloro	0.001-0.010
Cobre	T-0.0003
Hierro	T-0.003
Magnesio	0.01-0.025
Manganeso	T-0.0051
Potasio	0.015-0.025
Fosfatos	0.02-0.05
Rubidio	T-0.001
Acido salicílico	0.0002-0.005
Sodio	T-0.02
Sulfatos	0.03-0.035

T=trazas ⁽²⁷⁾

En general las semillas de uva son fuentes ricas de aceite y de compuestos con capacidad antioxidante, por lo que pueden ser tecnológicamente aplicados en alimentos con posibles beneficios nutricionales.



2.5. ACEITE

La palabra "aceite" tiene poco significado específico, ya que es aplicada a una amplia gama de sustancias que son completamente diferentes en su naturaleza química. La mayoría de los triglicéridos saturados son <<grasas>>, porque son sólidos a temperatura ambiente. Gran parte de los triglicéridos con varias insaturaciones son <<aceites>>, porque son líquidos a temperatura ambiente ⁽²⁹⁾.

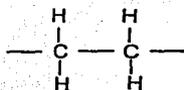
La grasa y aceites son predominantemente triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triglicéridos. Son insolubles en agua y solubles en la mayoría de los solventes orgánicos.

Los triglicéridos representan normalmente más del 95 % en peso de la mayoría de las grasas y aceites alimentarios. Entre los constituyentes minoritarios se encuentran monoglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfatidos, esteroides, alcoholes grasos, vitaminas liposolubles y otras sustancias ⁽³⁰⁾.

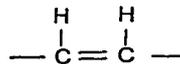
Los ácidos grasos presentes en los aceites y grasas comestibles se clasifican por su grado de saturación en:

1.- Ácidos grasos saturados. Contienen solamente enlaces carbono-carbono simples, que se denominan <<saturados>>; y son los menos reactivos químicamente.

2.- Ácidos grasos insaturados.- Si un ácido graso contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono se le denomina <<insaturado>>. Los enlaces saturados e insaturados se representan a continuación:



enlace saturado



enlace insaturado

Cuando un ácido graso presenta un único doble enlace se le denomina <<monoinsaturado>>. Si contiene más de uno se le llama <<poliinsaturado>> ⁽³¹⁾.

**2.5.1. Propiedades físicas y químicas de los ácidos grasos.**

Entre los componentes saturados de la serie de los ácidos grasos se presenta un incremento en el punto de fusión a medida que aumenta la longitud de la cadena; los compuestos insaturados no tienen ésta característica y su punto de fusión disminuye a medida que aumentan las insaturaciones; como se puede apreciar en la *tabla 4* los ácidos grasos saturados tienen un punto de fusión mayor que los insaturados de la misma longitud de cadena ^(32, 33, 34).

Tabla 4. Ácidos grasos más comunes.

Saturados.				
Símbolo	estructura	Nombre sistemático	Nombre común	P.f (°C)
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	n-Dodecanoico	laurico	44.2
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	n-Tetradecanoico	mirístico	53.4
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	n-Hexadecanoico	palmitico	63.1
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	n-Octadecanoico	esteárico	69.6
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	n-Eicosanoico	araquidónico	76.5
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	n-Tetracosanoico	lignocérico	86.0
Insaturados				
16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-	palmitoleico	-0.5
18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-	oleico	13.5
18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-	linoleico	-5.0
18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-	linolénico	-11.0
20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-	araquidónico	-49.5

Las grasas y los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo del alimento, y además producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables.

En términos generales, la palabra "deterioro" en grasas y en aceites va asociada con la aparición de aromas indeseables desde el punto de vista sensorial y que traen como consecuencia el rechazo del producto por parte del consumidor; las principales reacciones responsables son la rancidez hidrolítica y la rancidez oxidativa. La primera se debe básicamente a la acción de las lipasas que liberan ácidos grasos de los triacil-glicéridos, mientras que la segunda se refiere a la acción del oxígeno y de las lipooxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos ^(33, 34).



RANCIDEZ HIDROLITICA O LIPOLISIS

Ésta se debe a la acción de las lipasas sobre los enlaces éster de los triacil-glicéridos de las grasas y es muy notable en productos lácteos o en cualquier otro alimento que contenga altas concentraciones de ácidos volátiles de cadena corta (C_4-C_{12}). Los ácidos grasos libres, que van desde el butírico hasta el láurico, contribuyen al desarrollo de olores y sabores rancios en las grasas.

El problema de rancidez hidrolítica no es muy grave ya que la mayoría de las grasas y los aceites en la industria alimentaria contienen ácidos de cadena larga ^(32, 34).

RANCIDEZ OXIDATIVA

Las reacciones de oxidación de los lípidos tienen diversos orígenes; el principal es la acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados, con la subsecuente producción de hidroperóxidos. Otro mecanismo es la acción enzimática de la lipooxigenasa.

Autooxidación (acción directa del oxígeno). Se presenta comúnmente en lípidos con un alto contenido de ácidos grasos insaturados y es el deterioro más común de las grasas utilizadas en la industria alimentaria.

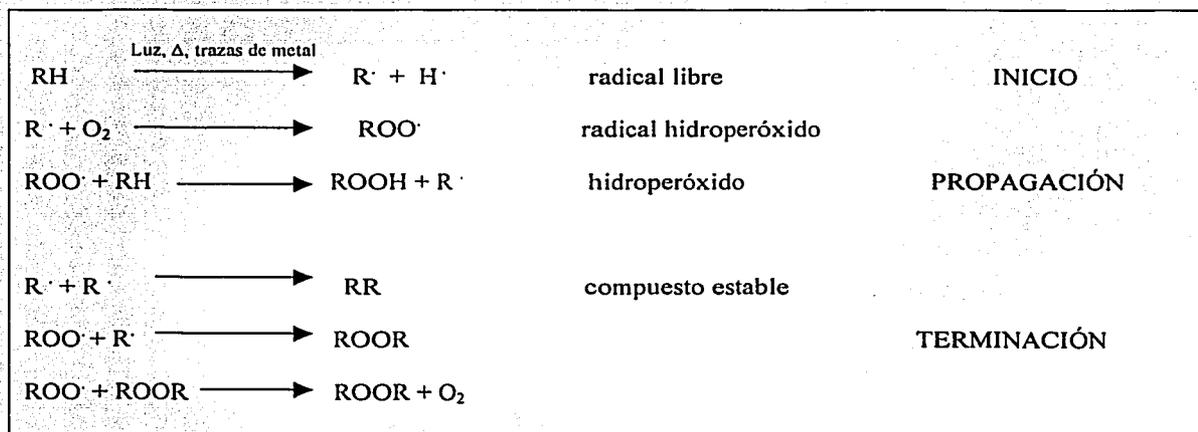
El deterioro oxidativo de los alimentos que contienen lípidos involucran una primera etapa de reacciones autooxidativas, acompañadas por varias secundarias de carácter oxidativo y no oxidativo; se dice que es de autooxidación porque se considera que los productos obtenidos de la reacción tienen un poder catalítico sobre la misma. Desde el punto de vista de la oxidación de alimentos, los ácidos grasos más susceptibles son los poliinsaturados, incrementándose la velocidad de la oxidación a medida que el número de insaturaciones aumenta.

Se ha comprobado que la reacción de oxidación de lípidos puros ocurre a través de un mecanismo en cadena por radicales libres y consta de 3 pasos principales: iniciación, propagación y período de terminación, que se ilustran en el *cuadro 1*.



Las características principales de este modelo son: a) la primera reacción es la formación de radicales libres, la cual es catalizada principalmente por la luz o por la presencia de trazas de metales, b) la etapa de propagación es debida a la reacción de los radicales con el oxígeno ambiental o con la molécula orgánica; c) el paso final es la reacción entre radicales libres ^(32, 34).

Cuadro 1. Reacciones de oxidación de los lípidos.



Oxidación por lipooxigenasas (enzimática). La enzima efectúa una oxigenación en lugar de una oxidación y sus sustratos específicos son ácidos grasos insaturados que contienen como mínimo una unidad de cis-cis-1, 4-pentadieno (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). Los ácidos grasos indispensables linoleico, linolénico, y araquidónico contienen una o más unidades de pentadieno, por lo que son fácilmente atacados por la lipooxigenasa, mientras que el ácido oleico carece de dicha unidad y no sirve como sustrato para estas enzimas. La lipooxigenasa actúa adicionando dos átomos de oxígeno a cada molécula de ácido graso, con lo cual se forman hidroperóxidos cis-trans ópticamente activos, estas lipooxigenasas son sensibles al calor y a pH ácido y alcalino, por lo que es relativamente fácil inactivarlas manipulando estas dos variables.



La presencia de antioxidantes reduce la disponibilidad de oxígeno requerido para estas enzimas, lo que permite también controlar su acción ^(32, 34).

Independientemente del tipo de deterioro que sufran los aceites estos se clasifican dependiendo de la fuente de la cual son extraídos y del uso que se les asigne.

2.5.2. Clasificación de los aceites

I. Mineral (petróleo): Es una mezcla clara no fluorescente de hidrocarburos líquidos obtenidos del petróleo, estos cubren aprox. un 90 por ciento de la demanda de aceites lubricantes.

II. Animal: Se obtienen hirviendo el tejido graso animal en agua y dejándolo enfriar. Estos se obtienen principalmente de animales como el bovino, ovino y caprino (sebo, manteca). Su principal aplicación es en la fabricación de velas y mantequilla. Contienen principalmente ácidos grasos saturados.

III. Esencial: Los aceites esenciales provienen de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales. Son líquidos volátiles en su mayoría insolubles en agua pero fácilmente solubles en alcohol. Por lo general son terpenos (unidades de isopreno, ejemplo: α -pineno, mirceno, etc). Se utilizan para dar sabor y aroma al café, el té, los vinos y las bebidas alcohólicas. Son los ingredientes básicos en la industria de los perfumes y se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares ⁽⁴⁾.

Además de estos aceites mencionados anteriormente se encuentra los aceites de origen vegetal, que a continuación se describen más detalladamente, puesto que la primera etapa de este trabajo se basa en la obtención de un aceite de tipo vegetal a partir de la semilla del orujo de uva.



2.6. ACEITES VEGETALES

IV. Aceite vegetal comestible: Se obtiene normalmente por extracción con solventes, por presión mecánica o por cualquier otro procedimiento, y en cuya composición predominan triglicéridos.

Estos aceites provienen principalmente de las semillas o frutos de cualquiera de las siguientes plantas oleaginosas: cártamo, ajonjolí, girasol, cacahuate, algodón, soya, maíz, canola, colza ó nabo, aceituna, palma, coco, entre otras. Los parámetros de procesamiento para los distintos tipos de semillas oleaginosas pueden variar ligeramente, pero en general el proceso que reciben los aceites es muy similar. La diferencia se encuentra en el tipo o fuente de semilla, pero el objetivo final es obtener un producto estable y limpio y que sea un triglicérido puro en un 96 por ciento o más. Las grasas y los aceites obtenidos directamente por derretimiento, prensado o extracción son denominados aceites crudos. Estos aceites crudos contienen niveles variados de sustancias no triglicéridas, la mayoría de las cuales pueden ser consideradas como impurezas en muchos de los aceites producidos. Esto no siempre significa que sea de baja calidad. Los aceites más caros son aquellos obtenidos del primer prensado. También existen procesadores que comercializan solamente aceites especiales los cuales son obtenidos únicamente a través del prensado mecánico. Sin embargo, la gran mayoría de los aceites vendidos a los procesadores de alimentos y a nivel de consumidores son totalmente refinados, esto significa que han sido procesados para remover la mayoría de las impurezas o materiales no triglicéridos ^(4, 29).

2.6.1. Métodos de Refinamiento del aceite crudo.

Desgomado.- El primer paso en el proceso del refinamiento de muchos aceites es el desgomado. Los aceites son desgomados mezclándolos con agua para hidratar a los fosfátidos, los que luego son removidos por centrifugación. El desgomado se puede mejorar agregando ácido cítrico o fosfórico o gel de sílice. El desgomado remueve sustancias emulsionantes muy valiosas tales como la lecitina. Los aceites de semilla de algodón no son desgomados, pero este proceso es necesario para aceites como los de canola y soja ⁽³⁵⁾.



Refinación Alcalina.- El aceite desgomado es luego tratado con un álcali para remover los ácidos grasos libres, glicerol, carbohidratos, resinas, metales y proteína animal. El aceite y el álcali son mezclados, permitiendo que los ácidos grasos libres y el álcali formen un jabón. Más tarde el jabón acumulado es removido a través de un centrifugado. Los jabones residuales son removidos por medio de lavados con agua caliente. El aceite de algodón también puede ser refinado mediante un proceso denominado refinamiento por micela. Este proceso permite que el aceite sea refinado en el estado de micela en la planta de extracción por solvente, previo a la remoción del solvente. El aceite producido utilizando este método rinde más y algunos expertos consideran que tiene un color más claro, más deseable ⁽³⁵⁾.

Blanqueo.- Durante el proceso de blanqueo, trazas de metales, partículas coloridas tales como la clorofila, jabones y productos de la oxidación son removidos utilizando arcillas decolorantes, las que adsorben las impurezas. Los aceites decolorados casi no tienen color y tienen un valor de peróxido cercano a cero ⁽³⁵⁾.

Dependiendo del tipo de producto deseado, los aceites son sometidos a un tratamiento u otro.

Winterización.- Los aceites destinados a ser utilizados en las ensaladas, o los que van a ser almacenados en lugares fríos son sometidos a un proceso denominado "winterization", de manera que no se tornen turbios cuando son enfriados. Los aceites refinados y desodorizados son enfriados con una agitación muy suave que causa la precipitación de las partículas que son más fáciles de derretirse. La fracción que es separada se denomina estearina. El aceite de soja no requiere este tratamiento pero los aceites de canola, maíz, girasol, cártamo, aceite de algodón y maní sí deben ser winterizados para mantenerlos claros a bajas temperaturas ⁽³⁵⁾.

Hidrogenación.- Cuando se hace el tratamiento de grasas y aceites utilizando el gas hidrógeno en presencia de un catalizador se obtiene como resultado la adición de hidrógeno a los dobles enlaces carbono-carbono. La hidrogenación produce aceites con sensación bucal, estabilidad, punto de



derretimiento y cualidades de lubricación necesarias para satisfacer las necesidades de muchos fabricantes. Es importante, sin embargo, hacer notar que la hidrogenación es un proceso selectivo que puede ser controlado de tal manera que se produzcan diferentes niveles de endurecimiento, que varían desde los más líquidos hasta los casi sólidos ⁽³⁵⁾.

Desodorización.- La desodorización es un proceso de destilación a vapor que se lleva a cabo al vacío y permite remover las sustancias volátiles que se encuentran en el aceite. Este proceso se puede realizar de manera continua o por lotes. El resultado final es un aceite suave con un nivel bajo de ácidos grasos libres y un valor de peróxido cero. Este paso también remueve las trazas de pesticida o de metabolitos que pudieran estar presentes, los cuales son más volátiles que los triglicéridos presentes en el aceite. Algunos fabricantes prefieren trabajar con aceite de algodón ya que éste puede ser desodorizado a temperaturas más bajas, lo que resulta en la retención de una mayor cantidad de tocoferoles (antioxidantes naturales). La desodorización produce uno de los productos alimenticios más puros que pueden ser ofrecidos a los consumidores. Pocos productos son tan limpios como el aceite refinado, blanqueado y desodorizado ⁽³⁵⁾.

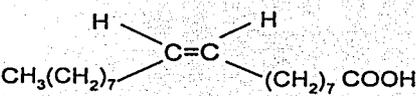
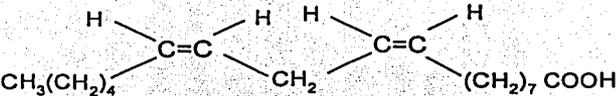
Interesterificación.- Este proceso permite que los ácidos grasos sean reacomodados o redistribuidos en la estructura del glicerol. Este proceso generalmente se logra por medio del uso de métodos catalíticos realizados a bajas temperaturas. El aceite es calentado, agitado y mezclado con el catalizador a una temperatura de 90 °C. También existen métodos enzimáticos que pueden ser utilizados para realizar esta interesterificación. Este proceso no cambia el grado de saturación o el estado isomérico de los ácidos grasos, pero puede mejorar las propiedades funcionales del aceite ⁽³⁵⁾.

La mayoría de los aceites vegetales son ricos en ácidos grasos mono o poliinsaturados, y por ello son considerados ingredientes deseables en la dieta en sustitución de las grasas animales (res, mantequilla y cerdo) que son ricas en ácidos grasos saturados ⁽⁴⁾.



A continuación se muestran en el *cuadro 2*, algunos ejemplos del tipo de ácidos grasos presentes en aceites vegetales y grasas animales.

Cuadro 2. Ácidos grasos presentes en aceites vegetales y grasas.

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ácido esteárico	grasas animales
	Ácido oleico	aceite de maíz
	Ácido linoleico	aceites vegetales

De los ejemplos mencionados anteriormente los más importantes son el ácido oleico y linoleico (ambos C 18) estos son los más abundantes entre los insaturados, ya que estos son esenciales para el ser humano, debido a que el cuerpo no los puede sintetizar; de ahí que deben ser aportados por la dieta. Los lactantes experimentan desarrollo deficiente y lesiones cutáneas si reciben leche desgrasada por periodos prolongados (bajo contenido de ácidos grasos insaturados) ^(36, 37, 38).

2.6.2. Importancia del ácido linoleico

Algunas de sus funciones específicas son: proporcionar energía para la formación de las membranas celulares, para la transferencia del oxígeno del aire a la sangre, para la síntesis de hemoglobina, para la función de las prostaglandinas. La carencia de este ácido graso produce sequedad en la piel, déficit inmunitario, retardo del crecimiento y esterilidad ^(36, 39).



La cantidad necesaria es de 9 a 18 g al día de ácido linoleico. Las grasas juegan un papel fundamental en las funciones de cada célula del organismo, desempeñan un papel esencial y beneficioso; las grasas saturadas e hidrogenadas aumentan el riesgo de enfermedades degenerativas como arteroesclerosis, cáncer y diabetes. Las membranas celulares pueden incorporar grasas saturadas o insaturadas; los fosfolípidos de membrana, ricos en grasas saturadas, son menos fluidos que los que incorporan ácidos grasos insaturados. Esta falta de fluidez daña las funciones celulares, y aumenta la susceptibilidad a las lesiones y a la muerte celular. Los ácidos grasos esenciales (linoleico) participan en la síntesis de las prostaglandinas, las cuales juegan un papel fundamental en numerosas funciones del organismo: la síntesis de las hormonas, la inmunidad, la constricción vascular, la regularización del dolor y de las inflamaciones ^(36, 40).

Beneficios de consumir ácido linoleico.

- ***Reduce las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL):*** Normalmente éstas se encargan de transportar el colesterol sintetizado por el hígado hacia los tejidos del cuerpo, incluyendo las arterias coronarias.
- ***Reduce las grasas séricas (de la sangre):*** Disminuye marcadamente los triglicéridos y previene la elevación de éstos luego de haber ingerido carbohidratos simples. Además, reduce el colesterol en la sangre y evita la elevación del colesterol, esto implica que: 1) ayudará a prevenir la arteriosclerosis. En animales se ha encontrado que reduce la arteriosclerosis coronaria y 2) en pacientes que han sufrido cirugía de puente aorto-coronaria ("bypass") utilizando la vena femoral, se halló una disminución en los cambios arterioscleróticos.
- ***Reduce la presión arterial en individuos normotensos e hipertensos.***
- Disminuye la acción que tienen ciertas hormonas (Ej: epinefrina) en aumentar la presión arterial.
- ***Reduce la viscosidad total sanguínea y el aumento en la deformidad de los glóbulos rojos:*** Esto es de beneficio en pacientes con enfermedades microvasculares (diabéticos, hipertensos, etc).



- Inhibe la agregación de plaquetas: Puesto que los coágulos sanguíneos son los causantes principales en las oclusiones de arterias coronarias arterioscleróticas, la reducción en la agregación de plaquetas previene la incidencia de trombosis coronaria (una de las causas para un ataque al corazón) ^(36, 41).

Debido a los beneficios que el ácido linoleico le proporciona al ser humano, se han buscado nuevas alternativas para incrementar el contenido de este ácido graso, presente en los aceites vegetales comestibles, recurriendo a la técnica de cristalización con urea (canales selectivos de ácidos grasos insaturados) ^(41, 42), donde el incremento es de un 40-50 % de su contenido inicial. Lo cual lo hace más atractivo a este tipo de aceites, puesto que estos ya se comercializan como suplemento alimenticio en forma de cápsulas o grageas ^(43, 44).

2.6.3. Fuentes, aplicación y evaluación de los principales aceites vegetales.

Las principales fuentes son: coco, cacahuete, girasol, soya, maíz, semilla de algodón, semilla de palma (palmiste) y semilla de melón (*Citrullus vulgaris*), su perfil de ácidos grasos de estas fuentes se muestra en la *tabla 5* ⁽⁴⁾.

Estos aceites son empleados principalmente en la elaboración de frituras, aderezos para ensaladas, helados, como constituyentes de mayonesas y sobre todo en margarinas o bien se utilizan en la industria panificadora en la estructura de los productos horneados, contribuyendo a factores tan importantes como flexibilidad, levantado, hojaldrado, solidez y aireado del producto durante su fabricación, así como también contribuyen a la frescura luego de su manufactura ^(34, 45).

Las últimas aplicaciones que se les han dado a los aceites vegetales es en la industria cosmética (cremas, maquillajes y labiales). Entre los aceites que ya se han ocupado en este tipo de industria son: el aceite de almendra, obtenido a partir de las variedades *dulcis* y *amara* de la especie *Prunus dulcis*, empleado en la fabricación de productos cosméticos y dermatológicos para irritaciones cutáneas; el aceite de cacahuete,



obtenido a partir de las semillas descortizadas de *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) empleado como excipiente en la preparación de formas farmacéuticas parenterales; el aceite de oliva, *Olea europaea* L. (Oleaceae) que posee propiedades ligeramente laxantes y por vía tópica suavizantes y emolientes, se utiliza también refinado como excipiente para preparaciones inyectables; el aceite de ricino que se obtiene a partir de las semillas de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) con propiedades laxo-purgantes y empleado en Farmacia, ligeramente modificado, como vehículo de preparaciones inyectables y como materia prima para la obtención de numerosos productos industriales (barnices, resinas, aceites lubricantes, ceras, etc.); el aceite de sésamo que se obtiene a partir de las semillas maduras de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) y posee una actividad laxante suave, empleándose como disolvente de medicamentos y como antioxidante; y el aceite de soja que se obtiene a partir de las semillas de *soja* Sieb y se utiliza en clínica como energizante en alimentación parenteral^(4, 34, 45).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de los principales aceites vegetales.

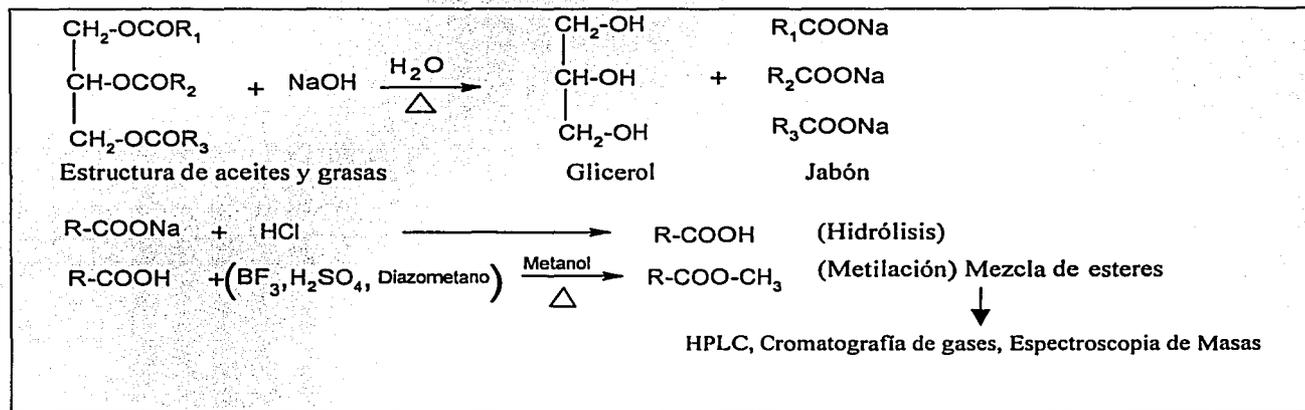
Acido graso	Coco	Cacahuete	Girasol	Soya	Maíz	Semilla de algodón	Semilla de palma	Semilla de melón
Mirístico	18	-	-	-	-	2	-	0.55
Palmitico	10	10	7	11	12	23	8	12.2
Palmitoleico	-	-	-	-	1	2	-	0.13
Estearico	3	3	5	4	3	5	4	11.2
Oleico	7	58	22	23	24	19	15	11.1
Linoleico	2	23	65	53	57	52	3	64.7
Linolenico	-	-	1	8	1	-	-	0.18
Total saturados	35	18	10	14	14	27	80	23.9
Total insaturados	65	82	90	86	86	73	20	76.1

Existen diversas técnicas para determinar el perfil de ácidos grasos de un aceite, entre las cuales se pueden destacar las siguientes: HPLC, Cromatografía de gases, Espectroscopia de Masas, o bien técnicas acopladas entre ellas, donde las dos primeras técnicas consisten en realizar una separación física de una muestra de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, fase estacionaria y fase móvil ya que sus principales beneficios son: técnicas sensibles, específicas,



resultados exactos y precisos, tiempo de análisis corto (45 minutos) y cantidad de muestra pequeña (mg), mientras que la Espectroscopia de Masas convierte moléculas en iones, y que separa estos iones en función de su proporción de masa y carga, se utilizan para identificar átomos e isótopos, y determinar la composición química de una muestra, además de que cuentan con cuatro características comunes: (1) un sistema para introducir la sustancia que se desea analizar en el instrumento, (2) un sistema para ionizar la sustancia, (3) un acelerador que dirige los iones hacia el instrumento de medida y (4) un sistema para separar los distintos iones analizados y para registrar el espectro de masas de la sustancia. Alguna de estas técnicas requieren de un tratamiento previo de la muestra la cual consiste en una metilación de los ácidos grasos libres presentes en el aceite (Ácido sulfúrico H_2SO_4 , Trifloruro de Boro BF_3 y Diazometano). Para ejemplificar lo anterior se muestra en el cuadro 3, la reacción general que sufre un aceite o grasa para poder ser evaluado ^(41, 46, 47).

Cuadro 3. Análisis global de ácidos grasos



Hay un gran número de pruebas que sirven para evaluar la calidad del aceite. Estas incluyen las pruebas físicas, químicas y sensoriales. También existen varias pruebas rápidas que pueden ser utilizadas como herramientas de calidad. La calidad de las grasas y aceites utilizada en el proceso de manufactura afecta



directamente la calidad del producto terminado. En los E.U.A. los estándares de calidad son definidos por la Sociedad Americana de Química del Aceite (AOCS, American Oil Chemist Society)^(48, 49).

Pruebas químicas.

Método del oxígeno activo (AOM, AOCS). Mide la estabilidad de oxidación. Se hace burbujear aire a través del aceite o grasa que se encuentra a una temperatura de 97.8 °F. Se extraen muestras de aceite a intervalos regulares y se determina el valor del peróxido (VP). El AOM es expresado en horas y es el período de tiempo que necesita el VP para alcanzar cierto nivel. El AOM es utilizado como una característica específica de las grasas y los aceites^(35, 48).

Las horas del AOM tienden a aumentar juntamente con el grado de saturación o endurecimiento de la muestra. Aunque es un método popular, está siendo reemplazado por el Índice de Estabilidad del Aceite.

Valor de la anisidina (AOCS). Los aldehídos son productos de la descomposición de los ácidos grasos peroxidados. Este valor mide los niveles de aldehídos utilizándolos como un indicador que determina la cantidad de material peroxidado que ha sido desdoblado. Juntamente con los niveles de peróxido presentes, el perfil de la degradación pasada y futura de un aceite puede ser esquematizado especialmente en aceites procesados por segunda vez para reducir el nivel de los ácidos grasos libres y en los aceites recalentados que son utilizados para freír^(35, 48).

Ácidos grasos libres (FFA, AOCS). Usando un procedimiento de titulación, el método del FFA es una medida de la cantidad de cadenas de ácido graso que han sido hidrolizadas desde la estructura básica del triglicérido. Aunque este método puede ser un buen indicador de la cantidad de aceite degradado en la superficie de un alimento frito, es considerado por muchos como un indicador deficiente de la calidad de fritura del aceite. Los resultados son reportados como porcentajes de FFA, calculado como ácido oleico^{(35,}

48)



Valor del Yodo (AOCS). Esta metodología mide el valor de insaturación de las grasas y es utilizada en el aceite fresco como una característica específica del producto final. El elemento yodo es agregado a los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados y luego es medido. Los resultados son expresados como gramos de yodo que han sido absorbidos por cada 100 gramos de grasa ^(35, 48).

Índice de estabilidad del aceite (OSI, AOCS). Esta prueba automática mide el grado en el que un aceite se oxida cuando se hace burbujear aire a través de él. El producto de desdoblamiento, que es el ácido fórmico, es conducido hacia el agua destilada que se encuentra en una celda.

El instrumento monitorea en forma continua la conductividad eléctrica del agua. En el momento en que la conductividad aumenta agudamente indica en forma inmediata el momento final de la prueba ^(35, 48).

Valor del peróxido (PV, AOCS). Éste es el método clásico para medir la oxidación del aceite fresco, pero tiene poco valor para el aceite de fritura ya que esta prueba es altamente sensible a las temperaturas. Los peróxidos son radicales inestables formados a partir de los triglicéridos. Los procesadores extraen el aceite del alimento para medir el PV; un PV mayor a 2 es un indicador de que el producto tiene un gran potencial de rancidez y que puede fallar cuando se encuentre en el anaquel ^(35, 48).

Ácido tiobarbutírico (TBA, AOCS). Esta prueba es un indicador excelente de los productos de oxidación de los ácidos grasos y detecta el inicio de las reacciones de rancidez. La adición de TBA da como resultado la aparición de pigmentos coloreados cuando reaccionan con un aldehído y otros productos de la degradación oxidativa. La absorción se mide a los 450 nm para los pigmentos amarillos y a 530 nm para los rojos ^(35, 48).



Pruebas físicas

Color del aceite. (Lovibond, AOCS). El color es utilizado como un indicador de calidad para la fritura y sirve también como una especificación para los aceites ya terminados. El rango de colores varía, pero si el color del aceite de una refinación es más oscuro de lo esperado puede ser un indicativo de que la refinación no fue la más apropiada ⁽⁴⁸⁾.

Humo, chispa, puntos de ignición (AOCS). Al calentar el aceite en un recipiente con una luz intensa, se puede observar la temperatura a la cual el aceite empieza a hacer humo. Con un calentamiento continuo y el uso de una pequeña llama, se pueden determinar también los puntos en que aparecen las chispas y el de ignición. Estos puntos son críticos cuando los aceites son utilizados para la fritura profunda o sumergida y para cocinar en el sartén ⁽⁴⁸⁾.

Pruebas sensoriales

Análisis sensorial (AOCS). Este método es una evaluación del sabor del aceite vegetal. Los aceites son colocados en vasos de vidrio cubiertos, los cuales son luego colocados en un bloque de aluminio. El bloque es calentado en la oscuridad. El hecho de cubrir los vasos permite que los compuestos volátiles se acumulen, de manera de poder evaluar las muestras de acuerdo al sabor y al olor ^(35, 48).

En general los fabricantes pueden añadir a las grasas y aceites pequeñas cantidades de aditivos alimentarios aprobados para proteger su calidad durante el procesado, almacenamiento, manipulación y comercialización. Esto asegura el mantenimiento de su calidad desde el momento de producción hasta su consumo ^(33, 50).



2.7. ADITIVOS

Los aditivos son sustancias añadidas intencionalmente a los alimentos para mejorar la estabilidad o sus propiedades organolépticas o nutritivas ^(4, 33), estos se clasifican básicamente por su función en:

EDULCORANTES

A veces llamados edulcorantes artificiales o no nutritivos son compuestos sintéticos mucho más dulces que la sacarosa y, por lo tanto, se usan sólo en cantidades muy pequeñas, como edulcorantes de mesa para ciertas bebidas como el café, y en la fabricación de refrescos bajos en calorías y otros alimentos (Acelsulfame, Sacarina, Aspartame) ⁽⁴⁾.

COLORANTES

Hay toda una variedad de compuestos orgánicos, algunas sustancias químicas sintéticas y pigmentos naturales de plantas (incluida la clorofila), carotenoides y antocianinas, que se pueden añadir a los alimentos para mejorar su color. También se emplean como colorantes algunas sales minerales; las sales de calcio y hierro pueden mejorar el valor nutricional de un alimento así como su color ⁽⁴⁾.

CONSERVADORES

Los conservadores se utilizan para proteger los alimentos contra la proliferación de microorganismos que pueden deteriorarlos o envenenarlos, con lo cual se aumenta el periodo de vida del producto. Tales compuestos incluyen los ácidos sórbico y benzoico y sus sales, dióxido de sulfuro y sus sales, así como nitritos y nitratos utilizados en salmueras ⁽⁴⁾.

REGULADORES DE ACIDEZ

Los álcalis (incluidos los hidróxidos de magnesio, calcio, potasio y sodio) se pueden utilizar para neutralizar el exceso de acidez en los alimentos. Los ácidos y sus sales se usan para dar sabor y también para controlar el pH de los alimentos. Otros, como el ácido ascórbico (vitamina C), los ácidos cítrico, tartárico, fosfórico, clorhídrico y sulfúrico y sus sales, así como el dióxido de carbono y los carbonatos o bicarbonatos, se pueden utilizar como disoluciones tampones o para propósitos especiales ⁽⁴⁾.



EMULGENTES Y ESTABILIZANTES

Los aditivos de este grupo se emplean para que los aceites y grasas se puedan mezclar con agua y formar así emulsiones suaves (como la margarina y la mayonesa), para dar una textura cremosa y suave a los alimentos y para aumentar el periodo de duración de los productos horneados. Muchos de ellos se utilizan también para hacer jaleas. Hay una extensa gama de gomas vegetales (incluidos los alginatos, el agar-agar y la goma de algarrobo) que contribuyen de manera muy útil al consumo de polisacáridos diferentes del almidón (fibra dietética), como también lo hacen las pectinas y los diversos derivados de celulosa, muy usados. Como emulgentes se pueden citar también la lecitina y varias sales y ésteres de ácidos grasos ⁽⁴⁾.

ANTIAPELMAZANTES

Estos agentes se usan para que algunos productos en polvo como la sal o la harina no sean compactos. Entre los antiapelmazantes se incluyen la harina de huesos (que se emplea también para enriquecer la harina con calcio), los polifosfatos, silicatos, estearatos y gluconatos ⁽⁴⁾.

POTENCIADORES DEL SABOR

En este grupo están los dulcificantes, algunos de los ácidos antes mencionados, extractos naturales de frutas e hierbas, y compuestos sintéticos que imitan los sabores naturales.

Aparte de éstos, hay otros compuestos que se emplean para mejorar el sabor de los alimentos sin aportar su propio sabor, como el ácido glutámico y sus sales (sobre todo el glutamato monosódico) y los derivados del ácido nucleico ⁽⁴⁾.

Por último se encuentra el grupo de los antioxidantes, los cuales se describen a continuación de manera más detallada, puesto que la segunda etapa de este trabajo se basa en la obtención de antioxidantes provenientes de la semilla del orujo de uva.



Para poder entender 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 en esta se derivan (radicales libres).

Un radical libre es un fragmento molecular con un electrón no apareado en su orbital exterior, que provoca una oxidación muy alta, es inestable y reacciona instantáneamente con otras sustancias que estén cercanas.

La vida biológica media del radical libre es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a las moléculas y a las membranas celulares.

Tales reacciones pueden producir una cascada de radicales libres con los efectos multiplicados, una auténtica reacción en cadena ^(51, 52, 53).

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos (enfermedades, envejecimiento celular, etc). Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos ^(51, 52, 54).

2.8 ANTIOXIDANTES.

Un antioxidante es una sustancia o mezclas de sustancias que tienen la propiedad de retardar o impedir la oxidación que por ende provoca el enranciamiento de los alimentos.

En general, son compuestos polifenólicos más o menos liposolubles, que no deben de ser tóxicos ni comunicar sabores extraños a los alimentos ⁽⁴⁾.

Los antioxidantes pueden añadirse directamente a los aceites vegetales o pueden mezclarse con las grasas animales fundidas una vez extraídas. Sin embargo en algunos casos se consiguen mejores resultados



añadiendo el antioxidante en un diluyente. También pueden pulverizarse con ellos los productos alimentarios, o sumergirlos en soluciones o suspensiones de antioxidantes, o empaquetarlos con películas que contengan antioxidantes ⁽⁵⁰⁾.

Los antioxidantes además de prolongar la vida de anaquel de un alimento, también tienen un efecto benéfico en el ser humano estos previenen enfermedades cardiovasculares, cáncer, arterosclerosis, cerebrales (retención de la memoria), ya que estos atrapan a los radicales libres presentes en el organismo productos del metabolismo celular ⁽⁵⁵⁾.

2.8.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes.

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, deben 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. 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 los antioxidantes añadidos actúan en presencia de prooxidantes y de otros antioxidantes existentes en el alimento o producidos a lo largo del procesado ⁽⁵⁰⁾.

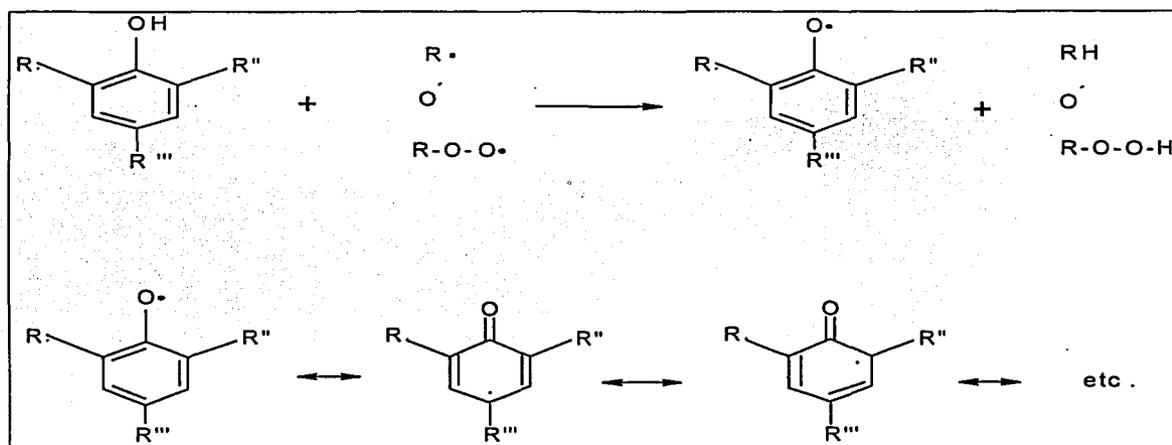
En general existen dos mecanismos fundamentales que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos: los donadores de electrones y los secuestradores o quelantes ⁽³²⁾.



Mecanismo de donación de electrones o de hidrogeno.

Los antioxidantes (fenólicos) actúan interrumpiendo la reacción en cadena productora de peróxidos, por inactivación de los radicales libres iniciales o formadores de la cadena, estos ocupan una situación privilegiada (son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno) y además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia, rompiendo así la propagación de la cadena (*cuadro 4*)⁽⁵⁰⁾.

Cuadro 4. Mecanismo de acción de los antioxidantes (fenolicos)⁽⁴⁾.

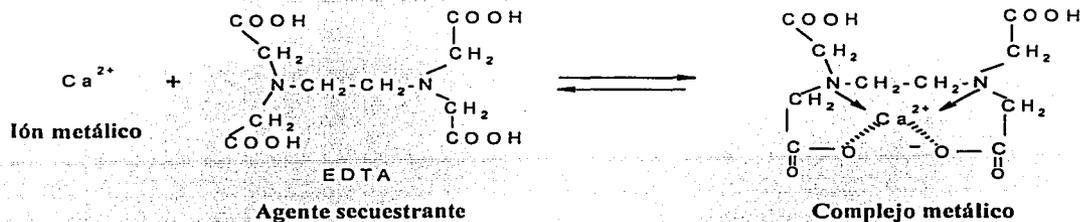


Mecanismo de acción de los secuestradores o quelantes.

Las sustancias quelantes no son antioxidantes en el sentido de que impidan la oxidación porque actúen de consumidores de oxígeno. Sin embargo se comportan como valiosos antioxidantes sinérgicos porque eliminan los iones metálicos que catalizan el proceso de oxidación formando complejos alterando las propiedades de los iones metálicos y sus efectos sobre los alimentos. Muchos de los agentes quelantes empleados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (cítrico, málico, tartárico, oxálico y succínico), ácidos polifosfóricos (trifosfato de adenosina y pirofosfato) y macromoléculas (porfirinas y proteínas). Por lo regular agentes quelantes como el EDTA suelen emplearse también en alimentos como, los aderezos para ensaladas y postres congelados.



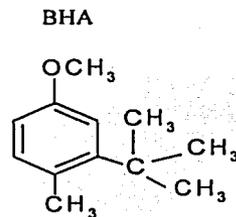
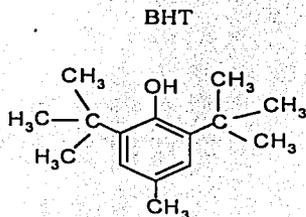
Representación esquemática del complejo EDTA-Calcio ⁽³²⁾.



Dependiendo del mecanismo de acción y del origen de los antioxidantes estos se clasifican en tres grandes grupos (sintéticos, sinergistas y naturales).

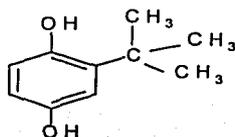
2.8.2. Clasificación de los antioxidantes.

Sintéticos.- Tienen que poseer las siguientes propiedades, deben ser inocuos, muy activos a concentraciones bajas (0.01-0.02 %) y liposolubles para acumularse en la fase lipídica. En el caso de las emulsiones aceite / agua son por ello especialmente adecuados los antioxidantes lipofílicos como lo son el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), tocoferoles y galato de dodecilo. Por el contrario los antioxidantes fuertemente polares, como el terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y el galato de propilo, son especialmente activos en grasas y aceites porque se acumulan en la interfase grasa/aire ⁽⁵³⁾.

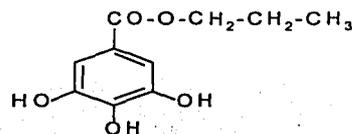




TBHQ

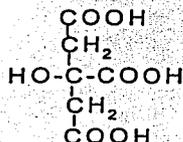


Galato de propilo

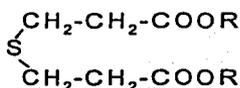


Sinergistas.- Este fenómeno se produce cuando una mezcla de antioxidantes tiene una actividad más pronunciada que la suma de las actividades de los antioxidantes individuales utilizados separadamente. Como ejemplos tenemos al ácido cítrico y sus ésteres isopropílicos, ácido tiodipropiónico y sus ésteres, ácido tartárico, lecitina⁽⁵⁰⁾.

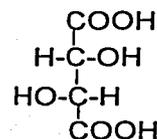
Ácido cítrico y sus ésteres isopropílicos



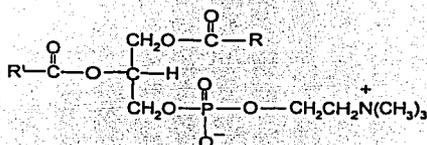
Ésteres del ácido tiodipropiónico



Ácido tartárico



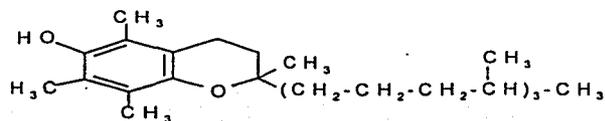
Lecitina



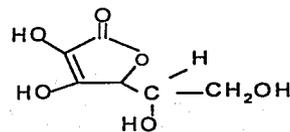
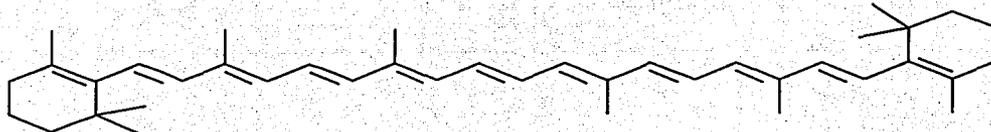
Naturales.- Estos provienen en general de vegetales, cereales, frutos y semillas, por ejemplo, manzanas, cebollas, pera, y en bebidas como té y vino; que contienen sustancias como el ácido ascórbico es un antioxidante que se encuentra en muchas hortalizas (brócoli, pimiento) y frutas (principalmente de la naranja, limón, frutilla, kiwi y otros), los tocoferoles (alfa-tocoferol, proviene principalmente de los aceites vegetales, de las nueces, cereales y vegetales grasos mani, aceitunas), los carotenoides (pigmentos amarillos o rojos que se encuentran distribuidos en las plantas), ácidos cinámicos (ácido cafeico), estilbenos (resveratrol) y polifenoles (flavonoides)^(17,35).



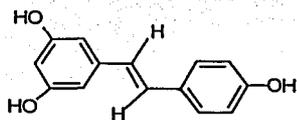
Alfa-tocoferol



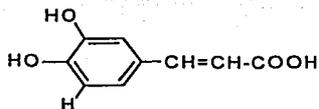
Ácido ascórbico

 β -caroteno

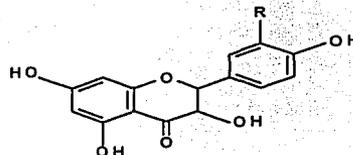
Resveratrol



Ácido cafeico



Flavonoide (estructura general).



2.9. IMPORTANCIA DE LOS POLIFENOLES.

Los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza (frutas y vegetales) que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. El grupo de los fenoles incluye a los flavonoides ($C_6-C_3-C_6$) y sus subgrupos las procianidinas, las catequinas, los ácidos gálicos y las isoflavonas, estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química (donador de H^+ o electrones) necesarios para el funcionamiento de las células vegetales. La ingesta diaria de polifenoles en individuos que sigue una dieta rica en estos alimentos es aproximadamente de 1g/día^(56, 57).



En los últimos años han cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Así, es bien conocido que algunos polifenoles presentan actividad antimicrobiana, siendo el principal responsable la presencia de ácido gálico. Este ácido es un mecanismo natural de defensa en muchos frutos frente al desarrollo de enfermedades microbianas. Además, se ha señalado que tienen actividad antimutagénica, algo que ha sido comprobado por diversos ensayos, como los que demuestran su capacidad de inhibir la aparición de mutaciones en bacterias como *Salmonella typhimurium*. Se ha comprobado también su capacidad para actuar de donadores de hidrógenos o quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias e inhiben la agregación plaquetaria.

Debe tenerse en cuenta que si bien algunos polifenoles (como los aislados del té) inhiben la oxidación de las grasas LDL "in vitro", los efectos "in vivo" son pequeños. Poseen actividad anticarcinogénica, actuando como inhibidores en procesos cancerígenos por ejemplo en cáncer de pecho y de ovario. Tienen también actividad anti-VIH: los sulfatos de ácido tánico, de rutina y de ácido gálico inhiben la infección de las células.⁽⁵⁴⁾ Además se ha estudiado el efecto de la catequina en membranas eritrocitarias y en microsomas de hígado de rata observándose una inhibición en la peroxidación lipídica, así como se ha descrito también que protegen al DNA del daño oxidativo. Diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante en combinación que de forma aislada. Los polifenoles aislados como el galato de epigallocatequina y la quercetina, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica inducida en la retina bovina y porcina. En cambio la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector^(51, 56).



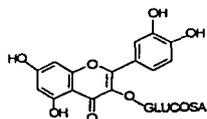
2. 9.1 Fuentes de Antioxidantes (flavonoides).

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, platanos, 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-glucosa y kaemferol) ^(1, 58).

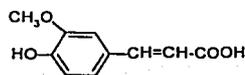
En la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales para prevenir las reacciones de oxidación en los alimentos o de productos como medicamentos o plásticos, se ha recurrido a emplear fuentes baratas y abundantes como son los residuos agroindustriales.

Residuos Agroindustriales

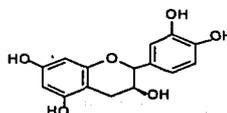
Además de estas fuentes mencionadas se encuentran los residuos provenientes de la industria productora de sidra (cáscara de manzana ^(17, 59, 60), ácido clorogenico, ácido ferúlico, (-)-epicatequina, procianidina B2, quercetina-3-glucosa), industria de jugos y néctares (mango ⁽⁵⁹⁾, ácido galico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, naranja ⁽¹⁸⁾, naringina y rutina, semilla de limón ⁽¹⁸⁾, ácido cafeico, ferúlico, naringina, diosmina, semilla de duraznos ⁽¹⁾, quercetina, kaemferol y mirecitina), alimentos congelados (la cáscara de papa ^(1, 18), ácido clorogenico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina y kaemferol), industria harinera (salvado de trigo ⁽¹⁸⁾, ácidos cafeico, vanillico, cumarico, clorogenico, galico y ferúlico, cáscara de arroz ⁽¹⁸⁾, ácido ferúlico), industria azucarera (medula de caña ⁽¹⁾, ácidos ferulico, clorogenico), industria del chocolate (cacao ⁽⁶¹⁾, (+)-catequina, (-)-epicatequina y dimeros de procianidinas) y de las industrias vitivinícolas (orujo de uva) ^(13, 17, 18), en los cuales se han encontrado principalmente compuestos como quercetina-3-glucosa, ácido ferúlico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina y procianidinas, las cuales han sido evaluadas 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) ^(58, 60).

Quercetina-3-glucosa ⁽⁵⁷⁾

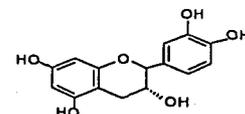
Ácido ferúlico



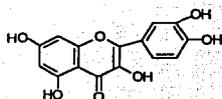
(+) -Catequina



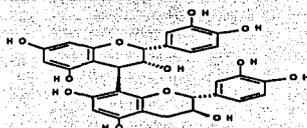
(-)-Epicatequina



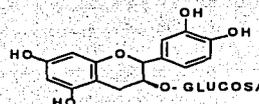
Quercetina



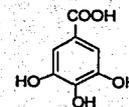
Procianidinas (B1)



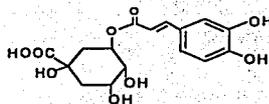
(+) -Catequina-3-glucosa



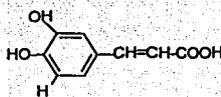
Ácido galico



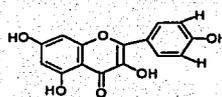
Ácido clorogénico



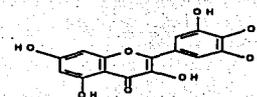
Ácido cafeico



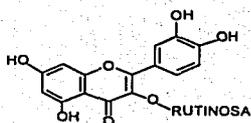
Kaemferol



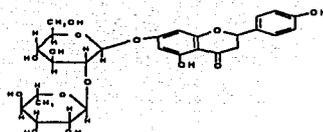
Miricitina



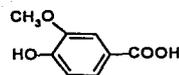
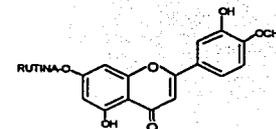
Rutina



Naringina



Ácido vanillico

Diosmina ⁽⁵⁷⁾

2. 9.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

Los flavonoides como fenoles, esto es en sus formas de aglicón, glicosilados y procianidinas, tienen un comportamiento polar, además de que presentan una alta actividad antioxidante, en diferentes estudios se ha encontrado que los disolventes que presentan una mejor afinidad o bien una mejor extracción de estos compuestos son metanol, etanol, acetona y agua o combinaciones entre ellas. Para identificar los compuestos que se encuentran en estos extractos se realizan pruebas cualitativas, en cromatografía de capa fina en gel sílice, celulosa y papel, empleando diferentes mezclas de eluyentes como es cloroformo-



metanol 9:1, cloroformo-ácido acético 9:1, cloroformo-ácido acético-agua 4:5:1, acetato de etilo-metanol-acetona-agua 50:3:1:10. ^(9, 62) Así como reveladores como vainillina, sulfato cerico y cloruro ferrico, estos actúan oxidando al extracto y produciendo una coloración característica del antioxidante y a una determinada distancia (Rf), dependiendo de esto se identifica de que tipo de compuesto(s) se trata. 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 determina la actividad antioxidante de los compuestos presentes en el extracto, observándose en las placas una coloración café parda. En referencia a la segunda solución esta se usa para determinar la actividad secuestrante, presentándose en las placas una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así dicha actividad. ^(57, 63)

En el caso de las 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 las que aportan aquellos basados en medidas biológicas o metabólicas que determinan o evalúan capacidades antioxidantes específicas. ⁽⁵¹⁾ 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. ^(64, 65)

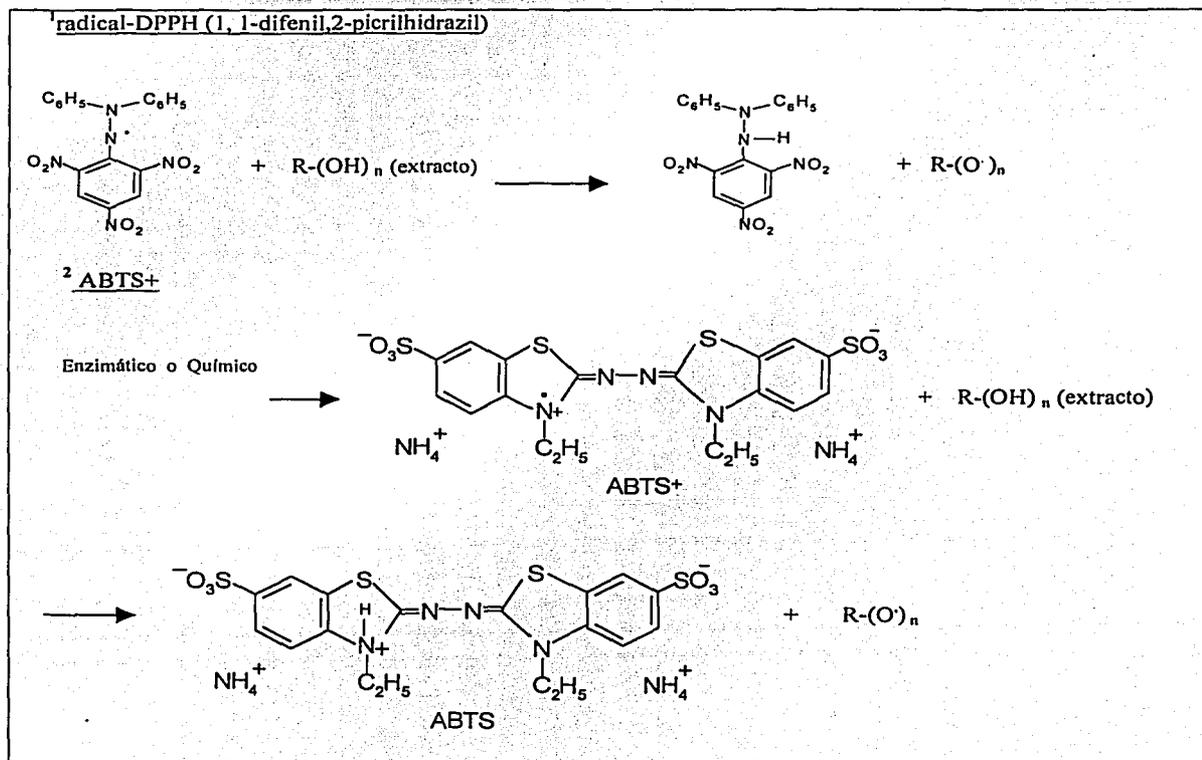
En el caso de alimentos debe tenerse en cuenta que la actividad antioxidante es dependiente de una gran diversidad de factores, incluidas las propiedades coloidales de los substratos, las condiciones y etapas de oxidación, así como la posible localización de los antioxidantes y substratos en las distintas fases presentes en el alimento. ⁽⁵¹⁾



Los métodos más comúnmente empleados son el del radical-DPPH (1,1-difenil,2-picrilhidrazil), ABTS+ [2, 2-azino-bis (3-etilbenzotiazoline)-6 sulfonato], β -caroteno, Fenoles Totales por el Método de Davis.

¹radical-DPPH y ²ABTS+

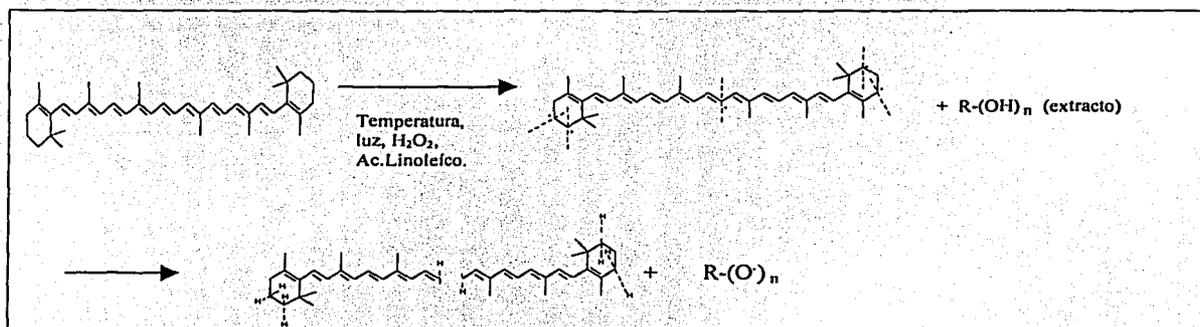
Estos ensayos consisten en medir la capacidad del extracto o compuestos que lo integran de secuestrar al radical, donde el mecanismo de reacción es el siguiente:





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). Su mecanismo se muestra a continuación en donde se observa que el β -caroteno sufre un fraccionamiento debido a la temperatura, luz, H_2O_2 y ácido linoleico formando radicales inestables que posteriormente son estabilizados por el extracto.



La técnica consiste en medir el blanqueo del β -caroteno que es el resultado de la oxidación por el producto de degradación del ácido linoleico.

Prueba de fenoles totales.

Método de Davis: esta prueba se basa en cuantificar la cantidad de grupos hidroxilos totales disponibles que tiene la muestra. Se prepara una curva estándar de Catequina, se disuelven 100 mg de Catequina en 10 ml de metanol, esta solución stock se diluye para obtener concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 ppm, y se determina la absorbancia de las soluciones de la misma forma que las muestras. ⁽⁶⁸⁾



Ventajas y desventajas de los métodos DPPH, ABTS y β -caroteno.

Estos métodos para determinar actividad secuestrante (radical DPPH y ABTS⁺), son rápidos, sensibles, repetitivos, fáciles, la única inconveniente es que en el método del ABTS su radical no esta formado debe generarse por medio enzimático o químico, sin en cambio el radical-DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazil) es un radical libre que es directamente adquirido sin la preparación (listo para disolver), otra desventaja importante es que el ABTS 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 DPPH solo puede disolverse en medio orgánicos sobre todo alcoholes, no en medios acuosos que son una limitación importante al interpretar el papel de antioxidantes hidrofílicos^(67, 68).

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, H₂O₂, ác. linoleico, temperatura), además de que los radicales libres formados son similares a los que se presentan en un alimento^(67, 68).

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⁽⁶⁷⁾.

Dentro de las pruebas de evaluación de actividad antioxidante o de fenoles totales, se han empleado las pruebas como la del ácido tiobarbiturico, N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD útil para medios no lipídicos)⁽⁵¹⁾, captura del anión superóxido, Folin-Ciocalteu^(60, 64), estas pruebas se han aplicado a los extractos como tales, no en forma individual de los compuestos que los integran⁽⁶⁸⁾.



Como se sabe la complejidad de los extractos comprende 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 (resinas de intercambio iónico, celulosa, poliamida, alumina, magnesol, gel de sílice, y sephadex LH-20)⁽⁵⁷⁾. 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 cualitativamente y cuantitativamente (HPLC, Espectroscopia de masas, Cromatografía de gases, etc). Todas estas técnicas de evaluación mencionadas anteriormente han sido aplicadas principalmente a extractos de fuentes naturales, entre los que se puede mencionar las cerezas, cebolla, uva, así como subproductos derivados de estos^(20, 69, 70).

Para llevar a cabo este proyecto se presentan a continuación los diferentes materiales y reactivos, así como la metodología asignada para obtener, evaluar y cuantificar el aceite y los antioxidantes presentes en la semilla del orujo de uva.



3.1 MATERIAL Y REACTIVOS

Materia Prima: Orujo de uva (variedad *Barbera*), proporcionado por Casa Pedro DOMEQ (Baja California, México) y extracto comercial de semilla de uva (Biovital, Salud Natural).

Primera Etapa

Extracción, caracterización y cuantificación del aceite: Éter de petróleo (Reactivo analítico REASOL), para el perfil de ácidos grasos del aceite se emplea hidrógeno como gas acarreador, mientras que para la esterificación de los ácidos grasos se usa Tolueno, Hexano, BF_3 (Grado HPLC), KOH (J.T BAKER), HCl (Reactivos Analíticos REASOL).

Segunda Etapa.

Extracción de antioxidantes: Se emplea Alcohol Metílico 99.5 %, Alcohol Etilico 99.5 %, Acetona, (Reactivos Analíticos REASOL), en proporciones 80:20 con agua destilada.

Tercera Etapa.

Evaluaciones cualitativas a los extractos crudos obtenidos: Se usan placas de Silica G /UV 254 Alugram para TLC (20x20 cm) Macherey-Nagel, el eluyente es una mezcla de Ácido acético 99.7 %, Cloroformo 99.9 % (Reactivos analíticos REASOL) y agua destilada. Para la preparación de los reveladores se usa Radical-DPPH (1,1-difenil, 2-picrilhidrazil) 95 % en metanol, β -caroteno 95 % en acetona, vainillina en ácido sulfúrico (reactivos SIGMA-CHEM).

Pruebas cuantitativas con radical-DPPH y β -caroteno: Se emplean estándares de uso comercial como Ácido ferúlico, 98 %, Catequina, Quercetina, BHT, TBHQ, BHA, Ácido Ascórbico (SIGMA-CHEM) y extractos de semilla de uva comerciales, para estas pruebas se utilizo 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 requiere de DEG (dietilenglicol) 99 % (Grado espectrofotométrico, Merck-Schuchardt) y de NaOH perlas (J.T BAKER), así como el estándar de catequina.

Cuarta Etapa.

Extracción selectiva se empleo Acetato de Etilo, Cloruro de Metileno (Reactivos Analíticos REASOL) y agua, para verificar el fraccionamiento del extracto se realizaron cromatografías de capa fina en placas descritas anteriormente, con el eluyente respectivo.

3.2. EQUIPO

Cromatógrafo de gases HP 5890 Series II, detector FID, integrador: HP 3365 Analyzer Crom.Gases, utilizando una columna Omega Wax, con un largo de 30 mts x 0.0320 mm.

Rotavapor BUCHI R-205, adaptado a una bomba de alto Vacío., Modelo WP-25 (OAKTON).

Liofilizadora Freezone 6 Labconco, Lámpara de UV. (Camaq), además de un baño de Agua (OAKTON) y un espectrofotómetro Genesis 5, Milton Roy.

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



3.3 METODOLOGIA.

Primera Etapa.

Se parte de una materia prima (orujo de uva. 3 Kg) que esta constituido de cáscara y semilla, donde se lleva a cabo una separación manual, para obtener solamente la semilla, la cual se somete a una operación de molienda.

NOTA: El proceso de secado se omite debido a que el contenido de humedad presente en la semilla es adecuado para la extracción del aceite y antioxidantes.

MOLIENDA.

Consiste en reducir a un tamaño de partícula homogénea permitiendo así una mayor superficie de contacto para facilitar la extracción del aceite con el disolvente.

EXTRACCIÓN DEL ACEITE.

Se realiza la extracción por maceración de 1Kg de semilla molida con 3.5 L de éter de petróleo durante 24 horas en un matraz de 4 L; transcurrido el tiempo de extracción se procede a filtrar el aceite obtenido, esto con la finalidad de quitar cualquier traza de semilla en el aceite. Posteriormente se elimina el disolvente del aceite crudo mediante un rotavapor; para continuar con la determinación del perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de uva.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.

Para la caracterización y cuantificación se emplea la cromatografía de gases (CG) .

Esta determinación indica el perfil de ácidos grasos del aceite obtenido, el cual se compara con estándares de los diferentes ácidos grasos presentes en los aceites vegetales.

Para obtener el perfil del aceite de la semilla de uva se requiere de una esterificación y saponificación de los esteres metílicos, la cual consiste en tomar una muestra de 20 mg del aceite y aforar a 5 ml con una solución de tolueno-hexano (80:20) posteriormente se toman 500 μ l y se adicionan 2 ml del estándar interno (C= 0.02313 mg/ml) se evapora con Nitrógeno y al concentrado restante se saponifica (2 ml de



KOH en metanol al 5 %), durante 1 hr a 80 °C , se enfría y se lleva a cabo la metilación (2 ml de HCl en metanol al 10 % + 100 µl de BF₃ durante 1 hr a 80 °C) , se realiza una extracción (4 ml de agua + 3 ml de tolueno-hexano, se agita por 1 min y se centrifuga 10 min), se retira el sobrenadante y se coloca en un matraz aforado de 10 ml , al líquido restante se le realizan tres extracciones consecutivas (3, 3, 2 ml mezcla de tolueno-hexano) retirando los respectivos sobrenadantes para así colectarlos en el matraz aforado de 10 ml, por último se toma 1 µl y se inyecta por triplicado al cromatógrafo de gases.

Las condiciones para efectuar la separación cromatografica son las siguientes:

TEMPERATURA DEL INYECTOR

RAMPA: 1 Minuto a 40 °C, Aumenta 10 °C / min hasta 280 °C, 280 °C / 7 min.

CORRIDA: 32 minutos.

DETECTOR: 280 °C.

PRESIÓN: Rampa, Flujo: 1.95 ml/min.

Inicial 5 psi, Aumenta 10 psi / min hasta 40 psi

Split: 1.0

El residuo obtenido después del filtrado del aceite, que en sí es la semilla que se tenía inicialmente, se somete a una operación de secado durante 24 horas a temperatura ambiente y durante tres horas a vacío, para continuar con la realización de la segunda etapa.

Segunda Etapa

EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

La semilla es fraccionada en tres lotes con un peso de 333.33g cada uno, los cuales se colocan en tres matraces diferentes de 4 L los cuales contienen 2 L de una mezcla de disolventes: ₁ acetona-agua (80:20), ₂ etanol-agua (80:20) y ₃ metanol-agua (80:20). Se realiza una extracción por maceración, por un tiempo determinado (24 hr). Estos disolventes se emplean para facilitar la extracción de los antioxidantes presentes en la semilla de uva, además de que no interfieren en las siguientes evaluaciones.



CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Esto se lleva a cabo con el fin de eliminar la mayor cantidad de disolvente presente en los extractos en rotavapor a temperatura de 60 °C. Posteriormente se congelan y liofilizan esto se realiza para eliminar el agua retenida en los extractos.

Obtenidos los extractos crudos se procede a realizar las evaluaciones cualitativas y cuantitativas de actividad secuestrante y antioxidante, así como la prueba de fenoles totales.

Tercera Etapa.

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Los tres extractos, así como el producto comercial de semilla de uva (Biovital) se les realizan determinaciones por cromatografía en capa fina (CCF).

La placa que se emplea es de gel de sílice, los extractos se eluyen en cloroformo- ácido acético-agua (0.4:0.5:0.1) los reveladores que se emplean para esta evaluación son:

radical-DPPH (ANEXO I) este revelador nos permite evaluar la actividad secuestrante de los extractos, visualizándose una mancha color amarilla en fondo púrpura.

Blanqueo con β -caroteno (ANEXO I) las placas se colocaron bajo luz U.V por un periodo de 60 minutos, de esta forma se evalúa la actividad antioxidante de los extractos observándose una mancha café en fondo blanco.

vainillina-ácido sulfúrico (ANEXO I) las placas se colocan en una parrilla que se encuentra a una temperatura de 120 °C por 20 minutos. Lo cual nos permite observar la oxidación de los compuestos presentes en la muestra.

Las soluciones reveladoras se aplicaron mediante aspersion sobre las placas cromatográficas.



EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Actividad secuestrante determinada con radical-DPPH: En una serie de 4 tubos de ensayo se realizan las siguientes reacciones. En el primer tubo se agrega 1 mL del extracto crudo (200 ppm) obtenido con etanol-agua disuelto en metanol con 1 mL de solución de radical-DPPH en DMSO (ANEXO I). Al segundo tubo se le adiciona 1 mL del mismo extracto y 1 mL del DMSO. Al tercer tubo se le agrega 1 mL de la solución de DPPH y 1 mL de DMSO. Al cuarto tubo (blanco) se le adicionan 2 ml de DMSO.

Posteriormente se burbujea nitrógeno y se dejan en reposo durante 60 min. Transcurrido el tiempo de reacción, se registra 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 por ciento 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.

Esta metodología se aplica a los otros dos extractos crudos obtenidos (acetona-agua y metanol-agua) y al extracto de la semilla de uva comercial.

Actividad antioxidante determinada por el blanqueo con β -caroteno (a este ensayo se le realizó una ligera modificación del mencionado en los antecedentes): se satura agua destilada desionizada con oxígeno por 30 min. Se prepara 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 adicionan 5 mL de la mezcla anterior la cual contiene 0.2 mL del extracto etanol-agua en metanol, inmediatamente se registra la absorbancia a 470 nm (tiempo cero), se mantiene en baño maría a 50 °C durante 60 minutos y se vuelve a registrar (tiempo final).



Paralelamente se prepara un ensayo control adicionando 0.2 mL de metanol con la solución de β - caroteno-agua oxigenada, y se registra como en el caso anterior. Como blanco se utiliza 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 = $\text{Ln}(a/b)/t$, donde Ln = log natural, a = absorbancia inicial, b = absorbancia final y t = tiempo (min).

La actividad antioxidante se expresa como por ciento de actividad relativa usando la siguiente ecuación: $AA = [(\text{velocidad de degradación del control} - \text{velocidad de degradación de la muestra}) / \text{velocidad de degradación del control}] \times 100$.

Esta metodología se aplica a los otros dos extractos crudos obtenidos (acetona-agua y metanol-agua) y al extracto comercial de semilla de uva.

Fenoles Totales (Método de Davis): Se prepara una solución de dietilenglicol (DEG) y una solución de hidróxido de sodio (ANEXO I), posteriormente se realiza 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 colocan 0.2 ml de la muestra en un tubo de ensayo, se adicionan 10 ml de la solución de DEG y 0.2 ml de NaOH 4 N, se agita vigorosamente y se coloca una alícuota en una celda espectrofotométrica y se registra 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 realiza 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 selecciona 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 extracción selectiva.

Cuarta Etapa.

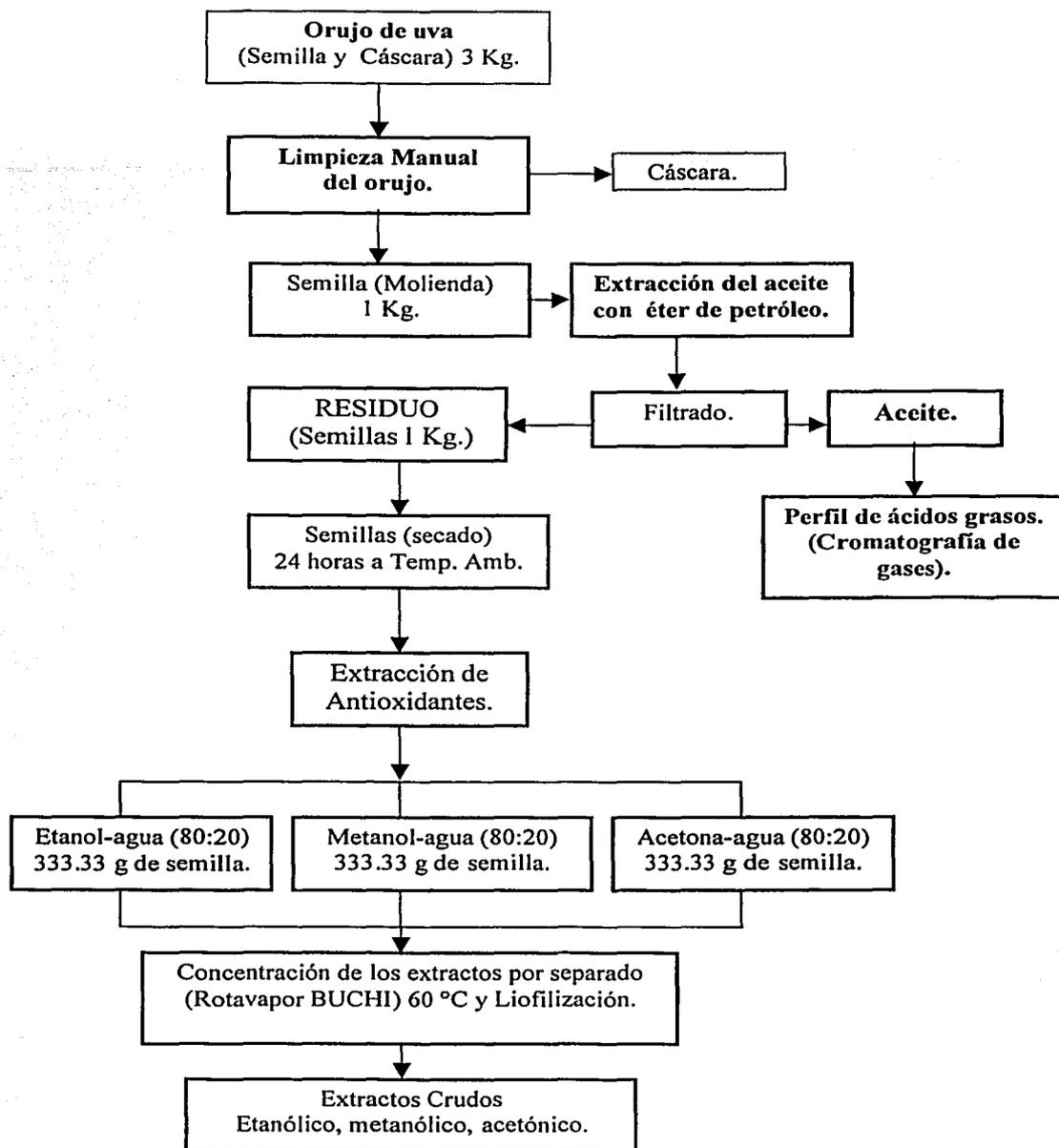
EXTRACCIÓN SELECTIVA

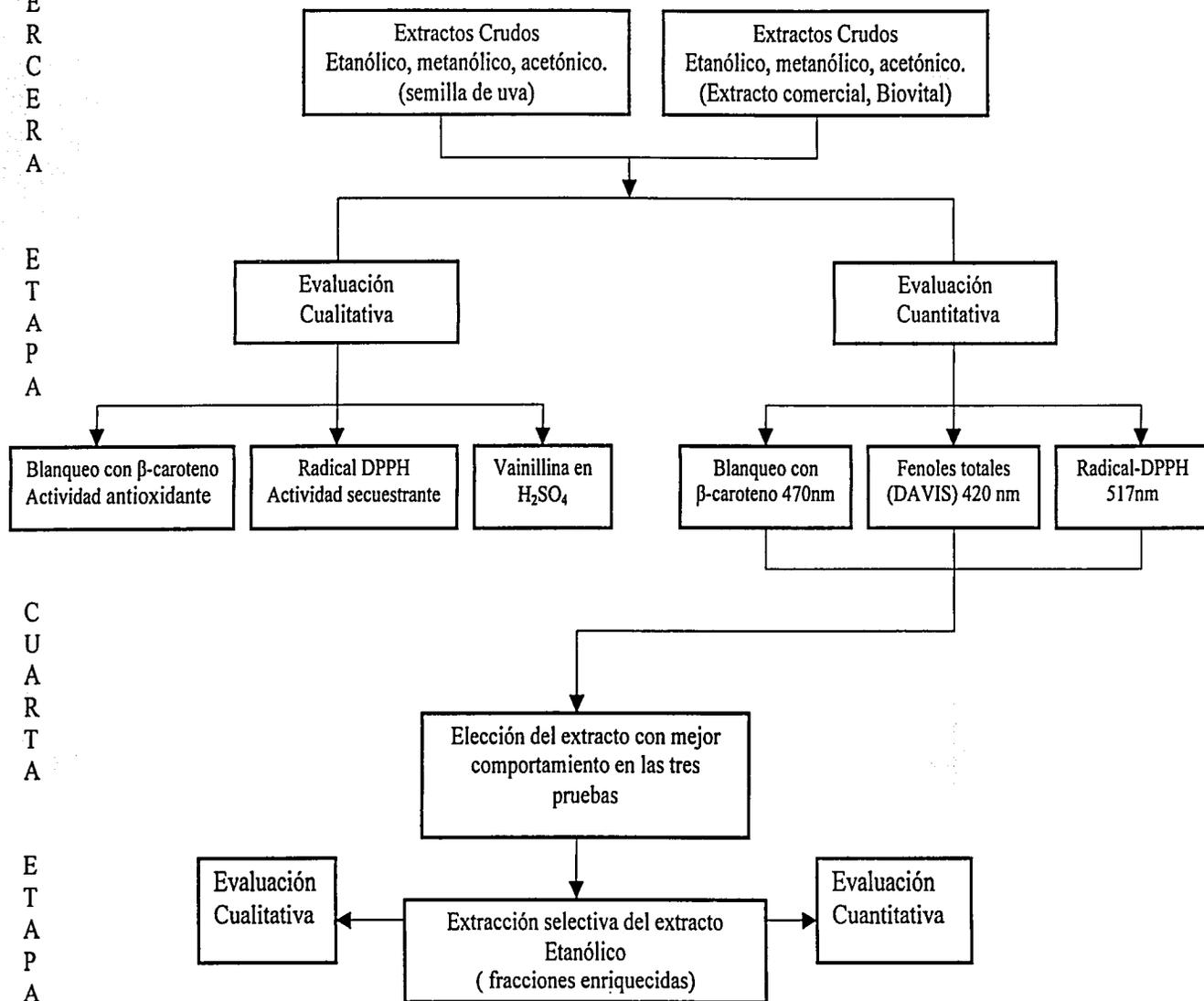
A 5 g del extracto correspondiente (etanol-agua), se le adicionan 70 ml de acetato de etilo con el fin de fraccionar y obtener los monómeros, oligómeros y precipitar a los polímeros. El acetato de etilo se evapora y al residuo se le agregan 40 ml de cloruro de metileno para precipitar a los oligómeros. El cloruro de metileno se evapora y al residuo se le adicionan 20 ml de agua destilada con el fin de solubilizar a los fenoles presentes (monómeros). Finalmente, la solución obtenida se congela y liofiliza para así obtener una muestra más manejable. A las tres fracciones obtenidas se les realiza una cromatografía en capa fina para verificar si hubo una adecuada separación de los compuestos (se uso como revelador radical-DPPH y blanqueo con β -caroteno). A si como pruebas cuantitativas de actividad secuestrante, antioxidante y fenoles totales.

En el siguiente esquema se muestran de forma general las cuatro etapas que conforman la parte experimental de este proyecto.



ESQUEMA GENERAL

P
R
I
M
E
R
AE
T
A
P
AS
E
G
U
N
D
AE
T
A
P
A



NOTA: Al extracto comercial (Biovital salud natural) no se realizó la prueba de fenoles totales.



Siguiendo la metodología y el esquema general citado para la obtención del aceite y antioxidantes provenientes del orujo de semilla de uva se llegaron a los siguientes resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Primera Etapa.

Para poder llevar a cabo la primera etapa se realizó una separación manual del orujo para tener solamente la semilla del orujo de uva (variedad *Barbera*) que presentaba una humedad de 9.7 %. Esta semilla se molió y se extrajo el aceite por maceración con éter de petróleo obteniéndose 160 ml de aceite de 1Kg de semilla a partir de 3 Kg de orujo (cáscara y semilla), teniendo una relación del 16 % de aceite extraído de 1kg de semilla de uva. Para verificar si había sido extraído todo el aceite de la semilla de uva, se realizó una extracción alterna por el método de Goldfish en la cual se determinó que la semilla contenía 17.3 % de grasa. Estos resultados fueron favorables ya que se partió de una cantidad de muestra relativamente pequeña, pero a nivel industrial la cantidad es 1000 o 10 000 veces mayor, por lo tanto se puede implementar a nivel planta piloto este proceso. Con el fin de saber el contenido de ácidos grasos presentes en el aceite se realizó un perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE.

Para conocer el perfil de ácidos grasos contenidos en el aceite de la semilla se inyectó la muestra por triplicado en el cromatógrafo de gases, obteniendo con esto una media tanto de los tiempos de retención como de las áreas totales de cada ácido graso presente en la muestra. Realizando así el análisis cualitativo y cuantitativo. Los resultados que aportaron estos análisis se describen a continuación.

**Análisis cualitativo.**

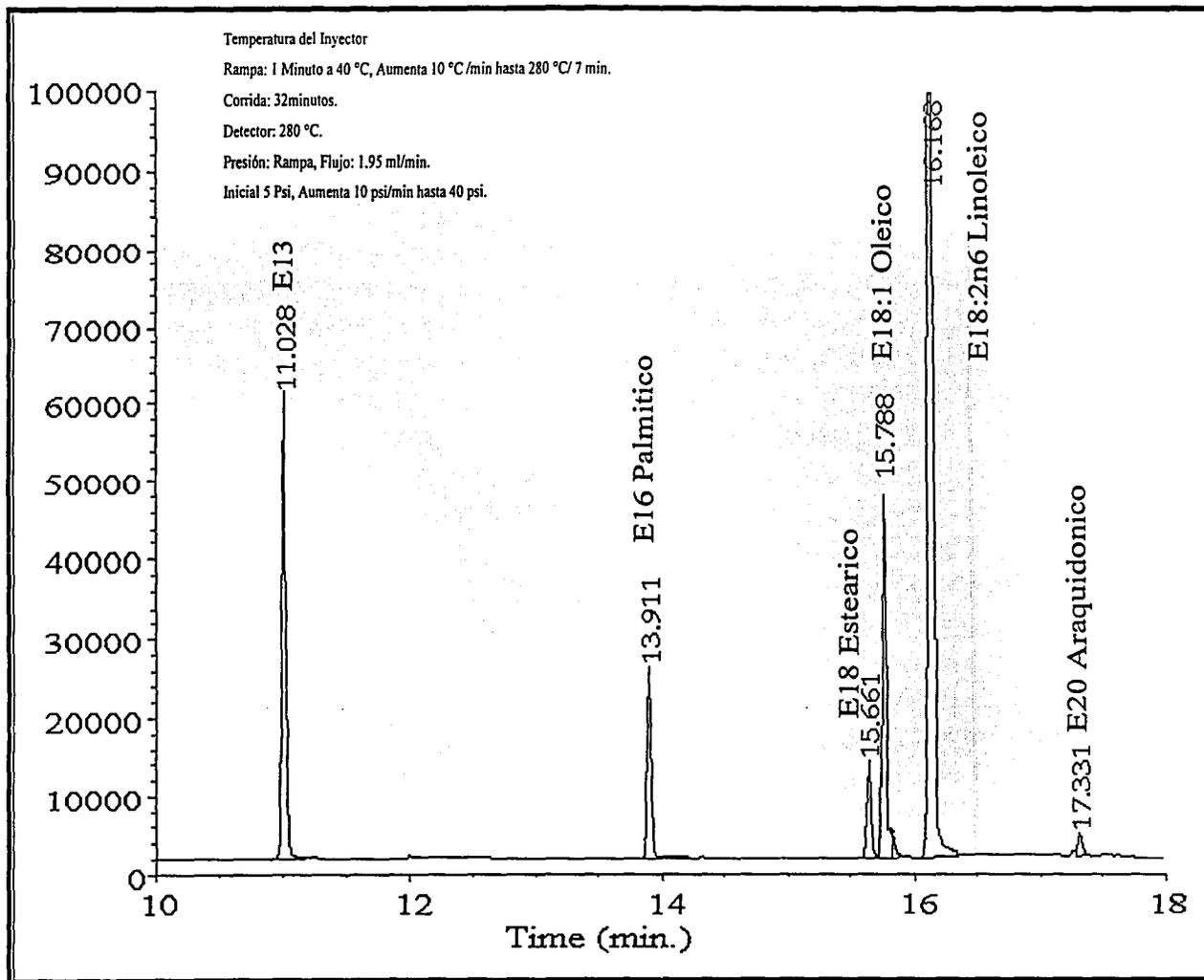
En este análisis se obtuvieron tres cromatogramas, de los cuales se eligió el que presenta una mejor resolución (*figura 1*) de los principales ácidos grasos contenidos en el aceite de la semilla de uva, comparándolo con ácidos grasos de otros aceites de origen vegetal.

De acuerdo a los datos que se presentan en la *tabla 6*, los tiempos de retención relativos de la muestra (aceite) con respecto a los tiempos de retención relativos de los estándares se encontró que los ácidos grasos en el aceite de semilla de uva son: Palmítico, Esteárico, Oleico, Linoleico y Araquidonico.

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de la semilla de uva.

Ácido graso	TIEMPO DE RETENCION RELATIVO DE LOS ESTANDARES = T_r/T_rE_i (E13)	TIEMPO DE RETENCION RELATIVO DE LA MUESTRA = T_r/T_rE_i (E13)
E16 Palmítico	1.2618	1.2614
E18 Esteárico	1.42	1.4201
E18:1 Oleico	1.4308	1.4316
E18:2 Linoleico	1.4845	1.4660
E20 Araquidonico	1.5729	1.5715

FIGURA 1. CROMATOGRAMA DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA





En el perfil de ácidos grasos obtenido del aceite de semilla se encontró que es un aceite rico en ácidos grasos insaturados (linoleico 70.34 %, oleico 14.05 %), con respecto a aceites vegetales comestibles como es el caso del aceite de semilla de girasol (linoleico 65 %, oleico 22 %), y maíz (linoleico 57 %, Oleico 24 %.), además en la *tabla 8* se observa, que el perfil de este aceite (semilla de orujo de uva variedad *Barbera*) es similar al obtenido de una semilla sin procesar (variedad *Sweet emperador*), con esto se puede decir que no afecta en nada el proceso que se le da a la uva (vinificación), por lo que es mejor obtener el aceite del residuo industrial, porque el fruto es aprovechado en su totalidad, minimizando costos y reduciendo en gran parte la contaminación ambiental, además de que se puede utilizar el aceite para pruebas de actividad antioxidante, como aceite vegetal comestible (requiere de un proceso de refinación) o bien para aumentar el contenido de ácido linoleico mediante aductos de urea y así obtener un aceite más enriquecido con este ácido graso (incrementándose un 40-50 % de su contenido inicial), ya que se sabe que el ácido linoleico es vital para un normal crecimiento y salud, ya que el cuerpo no lo puede sintetizar, de ahí que debe ser aportado por la dieta.

Tabla 8. Comparación del perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de uva variedad *Barbera* y *Sweet Emperador*.

Acido graso	Semilla de orujo de uva (variedad Barbera)	Semilla de uva sin procesar (variedad Sweet Emperador)
Palmitico	6.63	7.4
Estearico	3.82	3.9
Oleico	14.05	15.6
Linoleico	70.34	72.2
Total saturados	11.17	11.3
Total insaturados	84.39	87.8



Segunda Etapa.

La segunda etapa de este estudio consistió en extraer los antioxidantes presentes en la semilla del orujo de uva (variedad Barbera) hasta agotamiento, para lo cual se dividió la semilla (1 Kg.) en tres lotes de 333.33 g cada uno, utilizando tres diferentes disolventes uno por cada lote (acetona, etanol y metanol en proporciones 80:20 en 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).

Como resultado de las extracciones de cada lote de semilla de uva. se tienen las siguientes cantidades.

Lote 1 Acetona-agua: 1.8558 g de extracto crudo/ 100 g de semilla.

Lote 2 Etanol-agua: 1. 6195 g de extracto crudo/ 100 g de semilla.

Lote 3 Metanol-agua: 1.5805 g de extracto crudo / 100 g de semilla.

Tercera Etapa.

Esta etapa consistió en la realización de las pruebas cualitativas, esto con el fin de identificar los diferentes componentes presentes en los tres extractos, para lo cual se buscó el eluyente y la placa ideal basándonos en las referencias bibliográficas sobre estudios realizados a flavonoides, en las cuales se emplearon eluyentes como: cloroformo-metanol (9:1, 1:1, 6:4,8:2, 2:8, 4:6, 1:9), acetato de etilo-metanol-acetona-agua (50:3:1:10), cloroformo-ácido acético-agua (4:5:1, 5:45:0.5, 35:55:1) en placas de gel de sílice, celulosa y papel. Se seleccionó el sistema de elusión es cloroformo-ácido acético-agua (4:5:1) en placas de gel de sílice. Por lo cual se procedió a evaluar cualitativamente la actividad de los tres extractos crudos, así como del producto comercial de semilla de uva (Biovitral salud natural) mediante el uso de tres diferentes reveladores, presentándose el siguiente comportamiento frente a cada uno de ellos (*cuadro 6 y 7*).



Placas de gel de sílice
Eluyente Cloroformo-AAcético-Agua (4:5:1)

Muestras:

Q (quercetina)

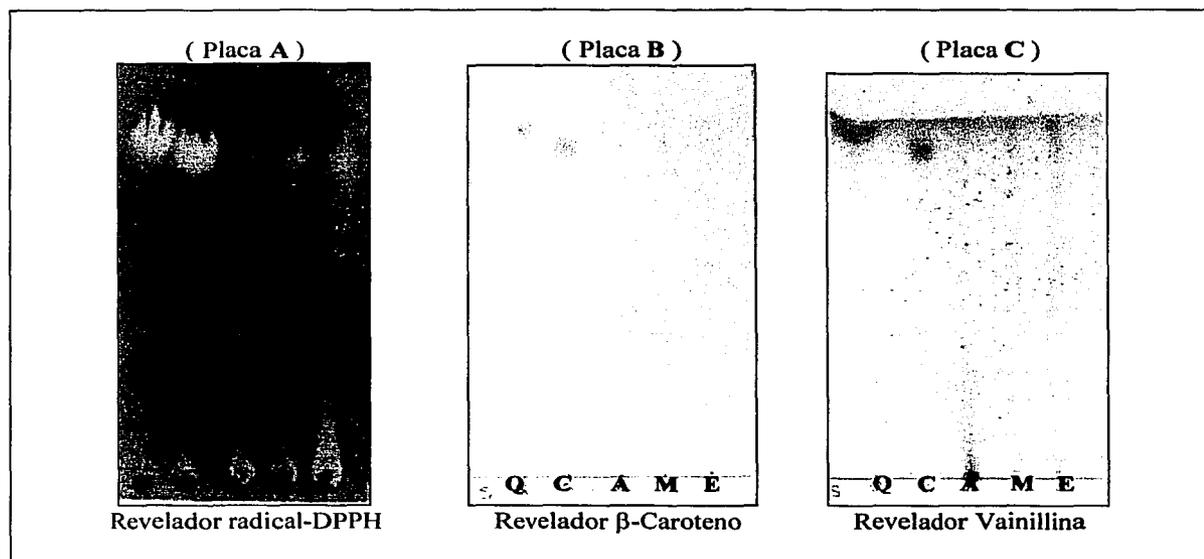
C (catequina)

A (Extracto Acetona-agua)

M (Extracto Metanol-agua)

E (Extracto Etanol-agua)

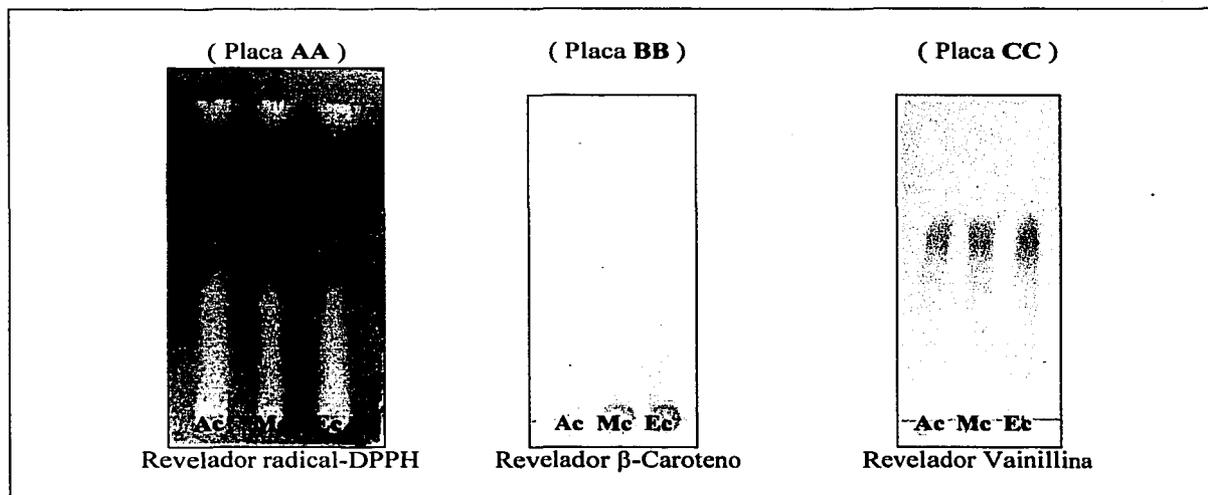
Cuadro 6. Comportamiento de los extractos crudos de la semilla de uva (variedad Barbera) y dos estándares de referencia.





Placas de gel de sílice
Eluyente Cloroformo-AAcético-Agua (4:5:1)
Muestras:
Ac (Extracto comercial Acetona-agua)
Mc (Extracto comercial Metanol-agua)
Ec (Extracto comercial Etanol-agua).

Cuadro 7. Comportamiento del extracto comercial de semilla de uva (Biovital).



En las cromatoplasmas del *cuadro 6* (placas A, B y C) se muestran los tres extractos crudos obtenidos de la semilla de uva con dos estándares de antioxidantes naturales, esto con la finalidad de comparar si alguno de los compuestos que están en los extractos emigran a la misma distancia que las referencias. Por otro lado, en el *cuadro 7* (placas AA, BB y CC) se presentan las placas donde se encuentran los extractos comerciales de la semilla de uva (BIOVITAL), esto con el fin de observar si presentan actividad secuestrante y antioxidante.



En las placas A y AA reveladas con radical-DPPH se observa una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así que todos los extractos y estándares presentan actividad secuestrante; es decir que estos tienen la capacidad de reducir al radical-DPPH.

Placas B y BB el revelador usado se blanqueo con β -caroteno en la cual se observan unas manchas cafés en fondo blanco, debido a que las placas se exponen 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 así que todos los extractos y estándares actúan previniendo esta oxidación poniendo de manifiesto la actividad antioxidante.

Placas C y CC el revelador usado es vainillina en H_2SO_4 en la placa se observa un barrido de los extractos, esto es debido a que no hay una separación adecuada, puesto que la complejidad de la muestra no lo permite. La finalidad del revelador es que al hacer contacto el ácido con los componentes de la muestra, y calentarse ($100\text{ }^\circ\text{C}$) se produce una oxidación y como consecuencia habrá una aparición de colores característicos y diferentes de cada compuesto(s) presentes.

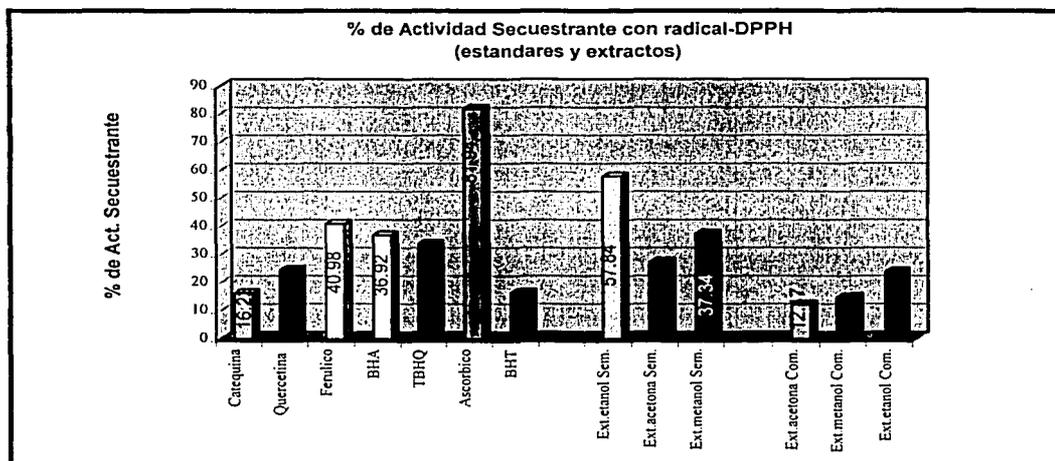
Por último en las tres primeras cromatoplasas (A, B, C) reveladas tanto con radical-DPPH, blanqueo con β -caroteno y vainillina se observan que uno de los componentes de los tres extractos se encuentran a la misma distancia que el estándar Catequina lo que aparentemente hace suponer que este compuesto pueda estar en los extractos crudos de la semilla del orujo de uva, lo cual concuerda con investigaciones anteriores que empleando técnicas como HPLC se ha encontrado que dentro de los compuestos más abundantes en la semilla de uva se encuentra la (+)-Catequina^(58, 60, 70).



El siguiente paso de esta etapa fue realizar las pruebas cuantitativas para determinar y comparar cual de los tres extractos presenta mayor actividad secuestrante y antioxidante, en comparación con estándares existentes en el mercado y con un producto comercial (suplemento alimenticio) de extracto de semilla de uva sin procesar (Biovital.Salud natural), donde se llegaron a los siguientes resultados.

ACTIVIDAD SECUESTRANTE (radical-DPPH).

Esta prueba del radical-DPPH a 517 nm se realizó por triplicado, las muestras (extractos crudos, extractos comerciales y del producto comercial biovital) se estandarizaron a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) en metanol y así tener una media de los datos con la siguiente formula: % 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. En el grafica 1, se muestran los resultados de la actividad secuestrante con radical DPPH.



Grafica 1. Porcentajes de Actividad Secuestrante con radical-DPPH (extractos crudos de semilla d uva, extracto comercial de semilla de uva y estándares comerciales).

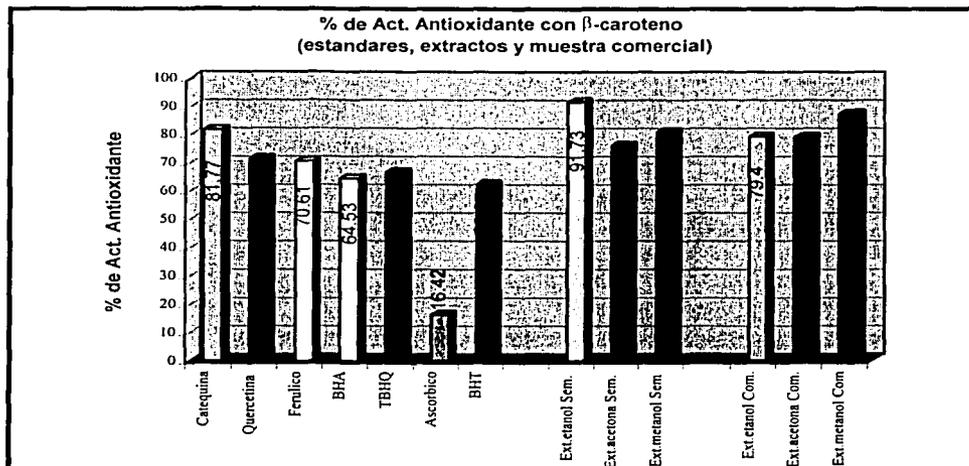


En la grafica 1, se observa que el extracto de etanol-agua de la semilla de uva ($\bar{x}=57.84 \% \pm SD 0.7643$) presentó una mayor actividad secuestrante con respecto al Ácido Ferúlico ($\bar{x}=40.98 \% \pm SD 1.7661$), BHA ($\bar{x}=36.92 \% \pm SD 0.0618$), TBHQ ($\bar{x}=33.83 \% \pm SD 0.8747$), Quercetina ($\bar{x}=24.64 \% \pm SD 0.6156$), BHT ($\bar{x}=16.33 \% \pm SD 0.1200$), Catequina ($\bar{x}=16.22 \% \pm SD 0.7596$), extracto acetona-agua Sem. ($\bar{x}=27.38 \% \pm SD 0.4450$), extracto metanol-agua Sem. ($\bar{x}=37.34 \% \pm SD 0.2788$), extracto comercial acetona-agua ($\bar{x}=12.17 \% \pm SD 0.8431$), extracto metanol-agua Com. ($\bar{x}=14.80 \% \pm SD 1.0388$) y el extracto etanol-agua Com. ($\bar{x}=23.87 \% \pm SD 0.7802$).

Sin embargo, la actividad del extracto etanolico no fue mayor a la del ácido ascórbico ($\bar{x}=81.94 \% \pm SD 0.4589$), esto se puede deber a que la vitamina C es más eficiente para atrapar al radical-DPPH, estabilizándolo más rápidamente, repercutiendo en una alta actividad secuestrante.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (blanqueo con β -caroteno).

En lo que respecta a la prueba de actividad antioxidante, determinada con blanqueo con β -caroteno a 470 nm, de igual forma que la técnica anterior, las muestras (extractos crudos, extractos comerciales y del producto comercial biovital) 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 con la siguiente formula: velocidad de degradación de la muestra = $\text{Ln}(a/b)/t$, donde Ln = log natural, a= absorbancia inicial, b = absorbancia final y t= tiempo (min). Donde finalmente la actividad antioxidante = [(velocidad de degradación del control – velocidad de degradación de la muestra) / velocidad de degradación del control] x 100. En la *gráfica 2* se presentan los resultados obtenidos en esta prueba.



Grafica 2. Porcentajes de actividad antioxidante con β -caroteno (extractos crudos de semilla de uva extracto comercial de semilla de uva y estándares comerciales).

La **gráfica 2** muestra 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, así como el producto comercial, donde el extracto etanol-agua de semilla de uva ($\bar{x}=91.73\% \pm SD 0.1484$) presenta un valor mayor que los antioxidantes comerciales utilizados como Catequina ($\bar{x}=81.77\% \pm SD 0.1779$), Quercetina ($\bar{x}=71.52\% \pm SD 1.3823$), Ácido Ferúlico ($\bar{x}=70.61\% \pm SD 0.8647$), BHA ($\bar{x}=74.53\% \pm SD 0.9224$), TBHQ ($\bar{x}=66.81\% \pm SD 0.2345$), BHT ($\bar{x}=62.57\% \pm SD 1.9149$), extracto acetona-agua Sem. ($\bar{x}=76.27\% \pm SD 1.2365$), extracto metanol-agua Sem. ($\bar{x}=81.01\% \pm SD 0.4907$) Ácido ascórbico ($\bar{x}=16.42\% \pm SD 1.6167$), así como el extracto comercial de acetona-agua ($\bar{x}=79.3\% \pm SD 0.1081$), extracto metanol-agua Com. ($\bar{x}=87.52\% \pm SD 1.3473$) y extracto etanol-agua Com. ($\bar{x}=79.4\% \pm SD 1.0405$).



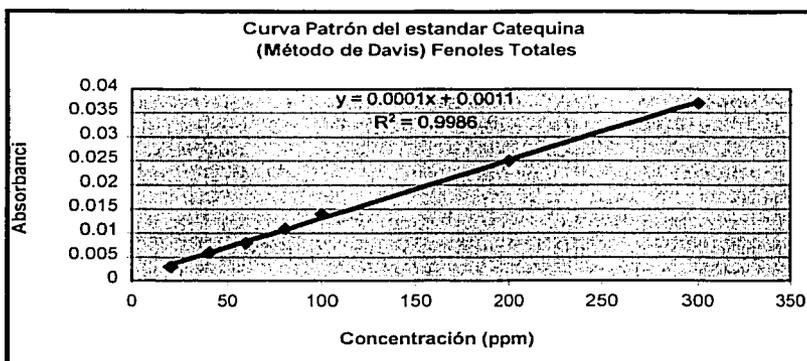
Para explicar el comportamiento elevado de actividad secuestrante ($\bar{x}=57.84 \% \pm SD 0.7643$) y antioxidante ($\bar{x}=91.73 \% \pm SD 0.1484$) que presentó el extracto etanólico de semilla de uva, comparado con el resto de los demás extractos, así como los antioxidantes comerciales, es posible que se deba a la cantidad de compuestos que lo integran (polímeros, oligómeros y monómeros), los cuales actúan de manera más rápida y eficaz, debido a los grupos hidroxilos (-OH) que contienen, estabilizando los radicales libres presentes (radical-DPPH) y los formados (oxidación del β -caroteno), evitando así que siga oxidándose y por consiguiente decolorándose.

Estos mismos compuestos (oligómeros, monómeros y polímeros) pueden estar presentes en los otros extractos pero en menor proporción de grupos -OH, esto se refleja en una menor actividad.

Dados los resultados que aportaron estas dos pruebas (radical-DPPH y β -caroteno) el extracto que presenta relativamente mayor actividad en ambas pruebas es el de etanol-agua, por lo que se aplicó una prueba adicional (fenoles totales) para correlacionar de manera global estas pruebas y así determinar si realmente el extracto etanólico es al cual se le realizará una extracción selectiva, es decir, se fraccionara en sus diferentes componentes.

FENOLES TOTALES (Método de Davis)

Para esta prueba se realizó una curva patrón (*gráfica 3*) obtenida con el estándar Catequina a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 ppm) y que se empleo para poder cuantificar la cantidad de fenoles totales de Catequina, presentes en cada extracto crudo a una concentración de 200 ppm (20 mg/ml). De manera general esta prueba consiste en cuantificar los grupos hidroxilos (-OH) presentes en el extracto, mediante la ruptura del anillo aromático (solución de NaOH y Dietilenglicol) y así poder formar un grupo cromóforo de color amarillo que es registrado a 420 nm.



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

Cuadro 8. Cantidad de Fenoles Totales de Catequina presentes en los extractos crudos de semilla de uva.

Muestra (200 ppm)	ppm catequina
acetona-Crudo	33.33
etanol-Crudo	168
metanol-Crudo	65.45

Los resultados que aporta esta prueba de fenoles Totales (*cuadro 8*) muestran que una vez más el extracto etanólico presentó mayor contenido de grupos hidroxilos ($-OH$) de Catequina en comparación con los otros dos extractos (acetona-agua y metanol-agua).

Las tres pruebas cuantitativas realizadas a los extractos crudos de la semilla del orujo de uva (radical-DPPH, β -caroteno y fenoles totales), se efectuaron con la finalidad de conocer la eficiencia de nuestros extractos para secuestrar y estabilizar a radicales libres de diferente origen, mediante los grupos hidroxilos ($-OH$) presentes en cada muestra, comprobando que pueden ser mejores o iguales que los antioxidantes ya existentes en el mercado.

De esta forma el extracto crudo como tal puede ser empleado en la industria o bien este puede ser fraccionado para obtener monómeros y así poder ser utilizados como estándares en forma individual.



Cuarta Etapa.

Esta etapa se realizó una extracción selectiva (enriquecimiento de monómeros, oligómeros y polímeros) al extracto etanólico, con el fin de obtener diferentes fracciones enriquecidas y así disminuir el grado de Astringencia, ya que estudios realizados anteriormente han mostrado que las semillas contienen procianidinas del tipo B1-B4 que le confieren esta característica. Para lograr lo anterior, del extracto etanólico (3.33 g), se obtuvo la fracción polimérica con acetato de etilo, de esta fracción se hacen precipitar la fracción oligomérica con cloruro de metileno y posteriormente se solubilizaron en agua los monómeros. Obteniendo así las siguientes relaciones.

Fracción polimérica (n-unidades): 2.586 g (77.65 %).

Fracción oligomérica (de 2-7 unidades): 15 mg (0.45 %).

Fracción monomérica (1unidad): 39.3 mg (1.18 %).

Posteriormente a estas fracciones se les realizaron las pruebas cualitativas con radical DPPH , β -caroteno y vainillina (*Cuadro 9*) para verificar si se llevó a cabo una adecuada separación de los componentes del extracto crudo y así también observar si estas presentan actividad secuestrante y antioxidante.



Evaluación Cualitativa

Placas de gel de sílice

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

Muestras:

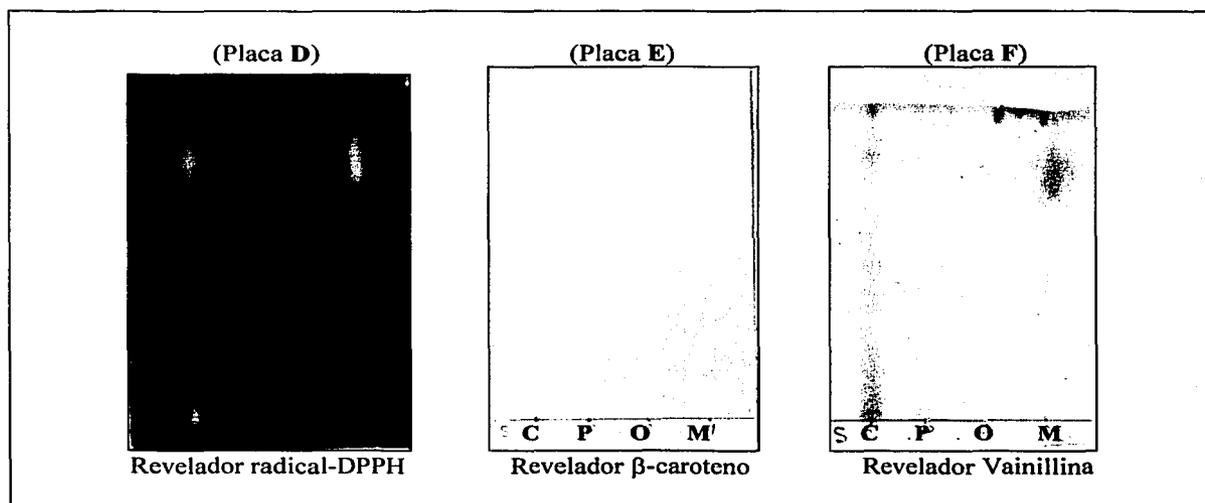
C (Extracto Crudo Etanol-Agua)

P (Extracto Polimérico)

O (oligómero del extracto de Etanol-Agua)

M (Monómero del extracto de Etanol-Agua)

Cuadro 9. Comportamiento de las fracciones enriquecidas obtenidas de la extracción selectiva.



En estas cromatoplasas se muestran las fracciones obtenidas del enriquecimiento.

Placa D revelado con radical-DPPH se observa una coloración amarilla en fondo púrpura indicando así que las fracciones presentan actividad secuestrante; es decir que estos tienen la capacidad de reducir al radical-DPPH.

Placa E el revelador usado es blanqueo con β -caroteno en la cual se observan unas manchas cafés 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 así que las fracciones actúan previniendo esta oxidación poniendo de manifiesto la actividad antioxidante.

Figura F el revelador usado es vainillina en H_2SO_4 en la placa se observa un barrido 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 mancha con una adecuada resolución.

En general en las tres cromatoplasmas reveladas tanto con radical-DPPH, blanqueo con β -caroteno y vainillina se observan que la fracción monomérica es la que presenta una mejor resolución en comparación con las otras muestras (extracto crudo, polímero y oligómero).

Así mismo se realizaron dos placas (*Cuadro 10*) en donde se colocaron dos estándares naturales con la fracción monomérica, con la finalidad de observar si en esta fracción se encuentra alguno de estos antioxidantes, ya que anteriormente en los extractos crudos aparentemente tenía un comportamiento similar a la catequina.

Placas de sílica

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

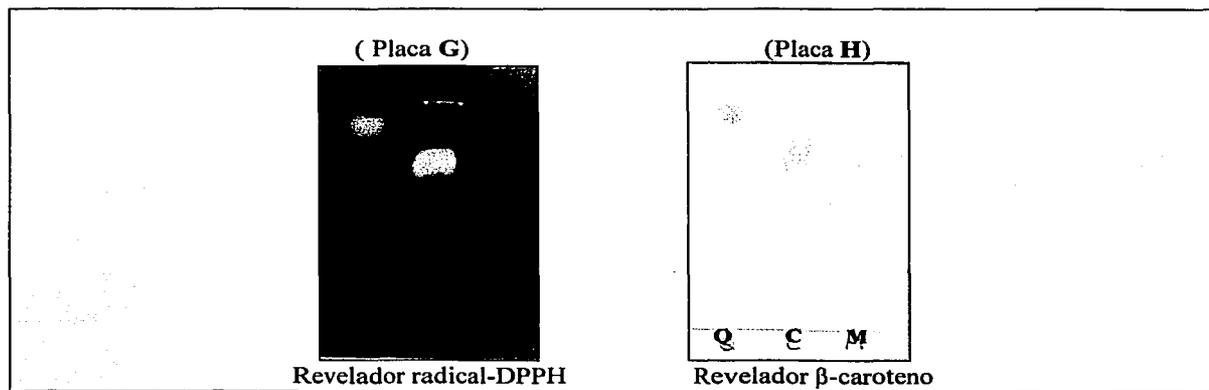
Muestras:

Q (quercetina)

C (catequina)

M (Monómero del extracto de Etanol-Agua)

Cuadro 10. Comportamiento de la fracción monomérica con los estándares Quercetina y Catequina



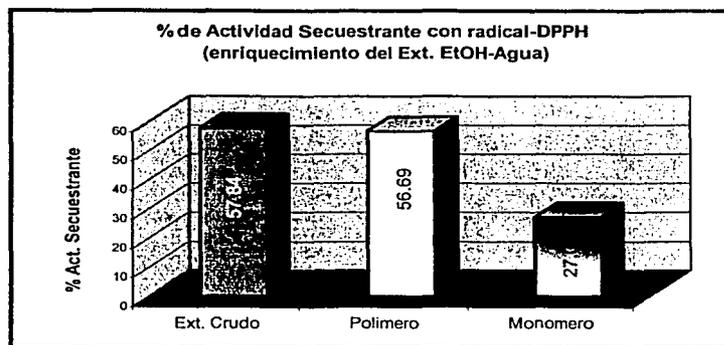


Obteniendo como resultado que tanto en la placa revelada con radical-DPPH y blanqueo con β -caroteno (Placas G y H), las manchas de la fracción monomérica se encuentra a la misma distancia que el estándar **Catequina**, además de que todas las fracciones presentan actividad secuestrante y antioxidante.

Por ultimo a estas fracciones (polimericas y monomericas) se les determinó cuantitativamente la actividad antioxidante, secuestrante, así como de fenoles totales en comparación con el extracto crudo obtenido inicialmente (etanol-agua), esto con el fin de observar si guardan relación con los datos obtenidos inicialmente del extracto crudo etanolico.

Evaluación Cuantitativa Actividad secuestrante: (radical DPPH)

Esta prueba del radical-DPPH a 517 nm se realizó por triplicado, las muestras (extractos enriquecidos y extractos crudos) se estandarizaron a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) en metanol para que de esta forma la prueba sea reproducible y poder así tener una media de los datos con la siguiente formula:
% 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. En la *grafica 4* se muestran los resultados de la actividad secuestrante con radical-DPPH.



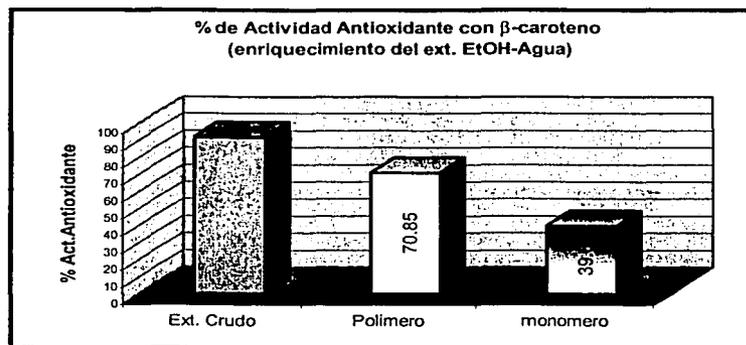
Gráfica 4. Porcentajes de actividad secuestrante con radical-DPPH del extracto crudo etanólico y dos fracciones obtenidas de la extracción selectiva.



En la **gráfica 4** se observa el % de actividad secuestrante que presentaron las fracciones obtenidas de la extracción selectiva, comparadas con el extracto crudo de la semilla 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 $\bar{x}=56.59\% \pm SD 1.0$ y monómeros $\bar{x}=27.06\% \pm SD 1.0$) su actividad secuestrante disminuye en diferentes proporciones, esto es debido a que el extracto como tal, sin ningún tratamiento de fraccionamiento este tiene tanto polímeros, oligómeros y monómeros en mezcla, por lo cual la actividad se ve favorecida, pero sin en cambio al tener por separado estos compuestos sus grupos hidroxilos (-OH) disminuyen en cada fracción y como consecuencia su actividad disminuye.

Actividad antioxidante (blanqueo con β -caroteno).

Con lo que se refiere a la prueba de actividad antioxidante determinada con blanqueo con β -caroteno a 470 nm, de igual forma que la técnica anterior, las muestras (extractos crudos, extractos comerciales y del producto comercial biovital) se estandarizaron a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) en metanol para que de esta forma la prueba sea reproducible y poder así tener una media de los datos con la siguiente fórmula: velocidad de degradación de la muestra = $\ln(a/b)/t$, donde \ln = log natural, a = absorbancia inicial, b = absorbancia final y t = tiempo (min). Donde finalmente la Actividad antioxidante = [(velocidad de degradación del control - velocidad de degradación de la muestra) / velocidad de degradación del control] x 100. En la *gráfica 5* se presentan los resultados de la actividad antioxidante con β -caroteno.



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

En la **gráfica 5** se observa el % de actividad antioxidante que presentaron las fracciones obtenidas de la extracción selectiva, comparadas con el extracto crudo de la semilla de uva del cual se partió (etanol-agua), de la misma manera que en el caso anterior los resultados obtenidos para esta prueba fueron que al fraccionar al extracto crudo en moléculas más pequeñas (polímeros $\bar{X}=70.85\% \pm SD 0.9914$ y monómeros $\bar{X}=36.64\% \pm SD 1.1557$) su actividad antioxidante disminuye gradualmente en diferentes proporciones (menor cantidad de grupos $-OH$), esto es lo que se esperaría ya que diferentes estudios han demostrado que las mezclas globales de polímeros, oligómeros y monómeros, han presentado una mejor actividad antioxidante en comparación con monómeros.

FENOLES TOTALES (Método de Davis)

Tomando como referencia a la curva patrón mencionada ya anteriormente (pagina 80) se determina la proporción de grupos hidroxilo de catequina presentes en cada fracción obtenida de la extracción selectiva, de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados (*Cuadro 11*):



Cuadro 11. Cantidad de Fenoles Totales de Catequina presentes en el extracto crudo etanólico y dos fracciones obtenidas de la extracción selectiva.

Muestra (200 ppm)	ppm catequina
etanol-Crudo	168
etanol-Polímero	100
etanol-Monómero	80

La tendencia de estos datos es que de acuerdo al tamaño de la molécula (extracto crudo>polímeros>monómeros), la cantidad de fenoles totales (cantidad de hidroxilos) de cada fracción disminuye gradualmente, y por consecuencia la actividad secuestrante y antioxidante decae.

Con esto 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.

De manera general las hipótesis planteadas inicialmente son aceptadas ya que queda demostrado que el aceite de semilla de orujo de uva (variedad *Barbera*) fue similar o mejor en cuanto a su perfil de ácidos grasos, en comparación con los reportados en la literatura.

El disolvente (polar) que presentó un mejor comportamiento para extraer los antioxidantes presentes en la semilla de orujo de uva fue una mezcla de etanol-agua 80:20, además de que fue el que presentó una mayor actividad secuestrante, antioxidante, así como de fenoles totales.

Por último, se demostró que al aplicar la técnica de extracción selectiva se obtiene una adecuada separación y resolución de los componentes que integran a la muestra.



La finalidad de este trabajo fue aprovechar, caracterizar y cuantificar una materia prima considerada aquí en México un residuo industrial, con el propósito de desarrollar dos productos de origen natural como es el aceite y antioxidantes de la semilla del orujo de uva (variedad *Barbera*). Lo cual los resultados que se obtuvieron nos llevan a las siguientes conclusiones.

CONCLUSIONES.

La metodología empleada para la caracterización y cuantificación del aceite de la semilla de uva (variedad *Barbera*) resulto ser eficaz, rápida y sencilla (Cromatografía de gases), además de que este aceite puede ser considerado una opción más dentro de los aceites vegetales de uso comestible, puesto que es rico en ácidos grasos insaturados como es el ácido linoleico, ya que este previene enfermedades cardiovasculares.

Debido al resultado que aportaron las pruebas cuantitativas con radical-DPPH y blanqueo con β -caroteno el extracto que presento mayor actividad en ambas pruebas fue el de etanol-agua, mismo que se comprobó por el método de fenoles totales, por lo cual se eligió a este extracto como el ideal para la extracción selectiva .

Se demostró que mediante una técnica de extracción selectiva (enriquecimientos de monómeros, oligómeros y polímeros) se obtiene una adecuada separación y resolución de los compuestos presentes en el extracto.

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.



Finalmente dada las aportaciones del estudio realizado a la semilla de uva esta puede ser considerada como una fuente potencial de aceite y antioxidantes , además de que pueden ser una alternativa más dentro de los ingredientes o materias primas de origen natural, por lo que hace ver la necesidad de dar una valor agregado a dicho producto de origen residual que además es de bajo costo y que no existiría ninguna restricción para su aplicación en la industria alimentaria

RECOMENDACIONES.

Para evitar el deterioro u oxidación del aceite de la semilla de uva, sustituir el uso de antioxidantes sintéticos por los antioxidantes obtenidos de esta misma semilla y así mismo evaluar la estabilidad y calidad del aceite (índice de peróxidos, iodo, acidez, oxidatividad, entre otros).

Emplear una mayor cantidad de materia prima (semilla) y obtener así un mayor rendimiento en las fracciones enriquecidas para que posteriormente están puedan ser evaluadas cualitativa y cuantitativamente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y de esta manera verificar si realmente nuestro compuesto se trata de catequina.

Aprovechar las diferentes fracciones (extracto crudo, polímeros, oligómeros y monómeros) obtenidas para su aplicación en la industria de los alimentos o bien para la obtención de estándar de catequina.



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 1ml 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. 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.
2. Peraza Campos Ana Lilia, Separación del orujo de uva y deshidratación de la semilla en un secador de lecho fluidizado, Facultad de Química, México, 1983.
3. Basil S. Kamel, H. Dawson, Characteristics of melon and Grape seed oils an cakes. JAOCS, vol. 62, 5, Mayo 1985. 881-883.
4. Primo Yufera Eduardo, Química de los alimentos Tecnología Bioquímica de los alimentos. Editorial síntesis, capítulo 5 y 7.
5. Pekic B., V.Kovac, E. Alonso Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. Food chemistry, Vol.61. No.12, 201-206, 1998.
6. Mukhopadhyay, M. Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide. CRC Press, 2000, 1-10.
7. Murga Ruth, Ruiz Rocio, Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by using super critical Mixtures of carbon dioxide and alcohol J. Agric.Food Chem 48, 2000, 3408-3412.
8. Ni Hong, Varoujan A. Microwave- Assisted extraction of phenolic compounds from grape seed . Natural product Letter vol 15(3), 2001, 197-204.
9. 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.
10. Revilla I., S. Pérez-Magariño. M.L. Gonzalez- San José. Identification of antocyanidin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 847, 1999, 83-90.
11. Makoto Saito, Hiroshi Hosoyama Antiulcer Activity of grape seed extract and procyanidins J.Agric.Food Chem 46, 1998, 1460-1464.
12. 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.
13. Anil J. Shrikhande Wine by-products with health benefits. Food Research International. Vol 33 2000, 469-474.
14. Heijnen C.G.M. Haenen G.R.M.M. Flavonoids as peroxynitrite scavenger: the role of the hydroxyl groups. Toxicology in vitro 15, 2001, 3-6.
15. Leighton Federico. Polifenoles del vino y salud humana, Antioxidantes y calidad de vida, No.27, marzo 2000, 1-21.
16. Allen Malcolm. Red wines have a rich and complex flavour unrivalled by white wines .Chemistry in Britain 5,1996, 35-37.
17. Aspanos George y Ronald E, Phenolics of Apple, Pear, and white Grape Juices and Their Changes with Processing and storage. J.Agric.Food Chem 40, 1992, 1476-1487.



18. Moure Andres, M. Cruz Jose, Franco Daniel , Natural Antioxidant from residual source. Food Chemistry 72, 2001, 145-171.
19. Kikuzaki H. Y Nakatani N., Antioxidant effects of some ginger constituents. Journal of Food and Science, 58, 1993:1407-1410.
20. Baoshan Sun, G. Pedro Belchior. Isolation and Purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. Journal of Chromatography A 841, 1999, 115-121.
21. 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 Chem. 49, 2001, 3164-3168.
22. Souquet Jean Marc, Benoit Labarbe. Phenolic composition of grape stems. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1076-1080.
23. Dealalaunay Jean-Claude and Chantal Castagnino. Preparative isolation of polyphenolic compounds from Vitis vinifera by centrifugal partition chromatography. Journal of Chromatography 2002. 1-6.
24. 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 chem 47, 1999, 2544-2548.
25. Nutila 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.
26. Hidalgo, L. Tratado de viticultura general. Edición Mundi-Prensa, Madrid España 1993, 790-798.
27. Pérez Camacho F. La uva de mesa. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España, 1981, 42-45.
28. Madrid A., I.Cenzano J.M. Vicente. Nuevo manual de industrias alimentarias. Nueva edición ampliada. AMV Ediciones Mundi-prensa. 227-231.
29. Ziller, Steve, Grasas y aceites Alimentarios, Editorial Acribia, Zaragoza España 1996. 1-51.
30. Pine M. Stanley. Química Orgánica. 4a. Edición Mc-GrawHill.1984.
31. Wade, L.G., J.R. Química Orgánica. 2ª. Edición, Prentice may-Hispanoamericana.1993.1220-1223.
32. Badui Salvador, Química de los Alimentos, Alhambra Mexicana, 1995, 185-196, 482-483.
33. Perdomo Reyes C., Comparación de la eficiencia de los diferentes antioxidantes mediante la determinación del grado de oxidación en aceite de soya. Tesis licenciatura, UNAM, México D.F, 1998, 1-34.
34. Vargas de la Rosa Ignacio, Tecnología de grasas y Aceites, Facultad de Química, México,1985.
35. Madrid A, I.Cenzano J.M. Vicente. Manual de Aceites y Grasas Comestibles. AMV Ediciones Mundi-prensa. 69-109.
36. Nurkan Turgut Dunford. Health Benefits and Processing of Lipid-Based Nutritionals, Food Technology, vol. 55, no 11, November 2001, 39-44.



37. Liangli Yu. Free radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids, J. Agric Food Chem. 49, 2001, 3452-3456.
38. Mathaus B. Antioxidant Activity of extracts obtained from residues of Different oilseeds. J. Agric and Food. Chem. 50, 2002, 344-3452.
39. Anderson, Pamela A y Howard W, Sprecher. "Omega-3-fatty acids in nutrition and health. Dietetic currents. Vol 14, 2, 1987, 7-11.
40. Tarek A. El-adawy, Khaled M. Taha. Characteristics and composition of different seed oils and flours. Food Chemistry 74 , 2001, 47-54.
41. Sook J. Park, Cheryl W. Park. Methylation Methods for the Quantitative Analysis of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers in Various Lipid Samples. J.Agric Food Chem. 50, 2002, 989-996.
42. Aurousseau B. And D. Bau chart. Compared Fractional Crystallization with urea or from acetona solutions of Palmitoleic, Heptadecenoic, and Oleic Acids, JAOCS March 1980. 125-128.
43. Douglas G.Hayes, Ylva C. Urea Complexation for the Rapid, Ecologically, Responsible Fractionation of Fatty Acids from seed oil. JAOCS, vol. 75, 10, 1998, 1403-1408.
44. Tor-Chern and Yi-Hau Ju. An Improved Fractional Crystallization Method for the Enrichment of sigma-linoleic Acid in Borage Oil Fatty Acid. Ind. Eng. Chem .Res. 40, 2001, 3781-3784.
45. Smolin and Grosvenor, Sounder College Publishing, 1997; Science and Applications, Second Edition. Food Labeling Guide. 1- 15.
46. Mantle David, John G. Anderton. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to análisis of medicinal plant essential oils. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 121, 1998, 385-391.
47. Samir A. Ross. Hala N. Elsonly, Elsayeda A. Elkashoury. Fatty Acids of Cannabis Seeds, Phytochemical Analysis. 4, 1996, 279-283.
48. Matissek, Schnepel, Steiner. Análisis de Alimentos. Fundamentos, Métodos, Aplicaciones. Editorial Acribia, S.A 31-87, 297-302.
49. Bernardini .Tecnología de aceites y grasas. Editorial Alhambra . 69-71, 120-172, 226-228, 239.
50. Fennema, Owen, R. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España 1993. 223-230. 725-726.
51. González San José, Muñiz Rodríguez. Actividad antioxidante de la cerveza: Estudios in vitro e in vivo. Octubre 2001, 1-57.
52. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc Soc Exp Biol Med. 222 (3): December 1999, 283-292.
53. Belitz, Grosch, Química de los Alimentos. 2ª. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1997. 237-241.
54. Debais Bagchi, Manashi Bagchi. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology 148, 2000, 187-197.



55. Hong Wang, Guohua Cao, and Ronald L. Total antioxidant capacity of fruits. J.Agric.Food.Chem. Vol. 44, 1996, 701-705.
56. Wollgast Jan, Anklaw Eike. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. Food Research International 33, 2000, 449-459.
57. Harbone Mabry. The flavonoids. Parte I. Academic Press, USA, 1975, 1-44.
58. 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.
59. Nuñez Selles, Alberto J.; Herman T. Velez Castro, Juan Agüero-Agüero. Isolation and Quantitative análisis of phenolic Antioxidants, Free sugars, and polyols from Mango (mangifera indica. L) stem Bark Aqueous Decoction Used in Cuba as a Nutritional Supplement. J.Agric. Food Chem. 50, 2002, 762-766.
60. Yinrong Lu, L. Yeap Foo. The polyphenol constituents of grape pomace. Food Chemistry 65,1999, 1-8.
61. Yinrong Lu, L. Yeap. Antioxidant and Radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry. 68, 2000, 81-85.
62. Domínguez, Javier A. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México 1979, 81-90.
63. Prakash Sharma Om, tej Krisan Bhat, Bhupinder Singh. Thin-layer chromatography of gallic acid, metyl 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.
64. Esam H. Mansour, Ali H. Khalil. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground bee patties. Food Chemistry, 69,2000, 135-141.
65. 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.
66. Cavin A., Hostettmann K., Diatmyko W. Y Potterat O., Antioxidant Lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. Planta Medica, 52, 1998,253-262.
67. Marino B. Armao. Some methological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Food Science and Technology. 11. 2000, 419-421.
68. Madhavi D.L y Deshpande S.S. Technological, toxicological and Healt Perspectives. Food Antioxidants. Capitulo 3.
69. De Freitas A.P.Victor Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins form grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. Phytochemistry , Vol 49, No.5, 1998,1435-1441.
70. Kanner Joseph, Fankel Edwin, Granit Rina. Natural Antioxidant in grapes and wines J. Agric. Food Chem. 42, 1994, 62-69.