

00528  
75



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**UTILIZACIÓN DE MÉTODOS QUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS  
PARA LA OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES  
PRESENTES EN UN RESIDUO INDUSTRIAL DE MANZANA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**MARÍA DEL CARMEN PINTOR PÉREZ**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO D.F.**

**2003**



2



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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Francisca Aída Iturbe Chinas
Vocal	Felipe de Jesús Rodríguez Palacios
Secretario	Arturo Navarro Ocaña
1er Suplente	Bertha Julieta Sandoval Guillen
2do Suplente	Enrique Martínez Manrique

sitio donde se desarrolló la tesis:

Departamento de Alimentos y Biotecnología  
Lab-321 y 322 Conjunto "E" Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México



Asesor

**Dr. Arturo Navarro Ocaña**



Sustentante

**María del Carmen Pintor Pérez**

B

## **Agradecimientos**

### **A la Universidad**

**Por haberme brindado la oportunidad  
de estudiar en la máxima casa de  
estudios.**

**A todas aquellas personas que con su  
ayuda y comentarios hicieron posible la  
realización de este trabajo.**

**Un sincero y especial agradecimiento a  
Lucia Cornejo, Julieta Sandoval, Yolanda Rojas y Víctor Ugalde  
Por brindarme su amistad, tiempo, consejos y apoyo para la  
realización de este proyecto.**

Agradecer a la Dirección General de Bibliotecas de  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso  
el contenido de mi trabajo (receptación)

**NOMBRE:** Yolanda Rojas

**FECHA:** 08 de enero de 2003

**FIRMA:** [Firma]

C

## **Dedicatorias**

### A mis Padres

*Hilaria y Cuauhtémoc*

*Por su apoyo, amor y paciencia, para  
que pudiera desarrollarme y llegar hasta  
el final.*

### A mis hermanos

*José Luis, Lilia, Cuauhtémoc,*

*Miguel y Ricardo*

*Por la motivación y el apoyo incondicional  
que me dieron para salir siempre  
adelante.*

### A mi tía Elizabeth

### A mis primas, cuñadas y sobrinos

*Por su cariño, confianza y por  
ofrecerme todo su apoyo.*

### A mis amigos

*Verónica, Mónica, Sergio, Daniel, Concepción, Miguel, Catalina, Rocío,  
Jaqueline, Norma, Víctor (VMUS), Paris, Karina, Leticia, Alfonso,  
Antonio, Lucia, Araceli, Julieta, Rosario, Lupita, Berenice y Tereflu.*

*Por su amistad, tolerancia y apoyo.*

## INDICE

*Página*

1	INTRODUCCIÓN .....	1
2	ANTECEDENTES .....	4
2.1	Efectos biológicos causados por radicales libres .....	4
2.2	Efectos causados por radicales libres en sistemas alimenticios .....	5
2.3	Control de los efectos causados por radicales libres en sistemas biológicos.....	7
2.4	Control de los efectos causados por radicales libres en sistemas alimenticios .....	8
2.5	Antioxidantes .....	10
2.6	Mecanismo de acción de los antioxidantes .....	11
2.7	Actividad antioxidante .....	13
2.8	Antioxidantes sintéticos .....	16
2.9	Antioxidantes naturales .....	18
2.9.1	Aminoácidos y proteínas .....	19
2.9.2	Tocoferoles .....	21
2.9.3	Carotenos .....	22
2.9.4	Ascorbatos .....	24
2.9.5	Compuestos fenólicos .....	25
2.9.5.1	Ácidos fenólicos .....	26

E

2.9.5.2	Flavonoides .....	29
2.9.5.2.1	Flavonoides que se encuentran en la manzana.....	31
2.10	Residuos industriales como fuente de antioxidantes .....	35
3	OBJETIVOS .....	44
4	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	45
4.1	Material y Equipo .....	48
4.1.1	Reactivos .....	48
4.1.2	Disolventes .....	49
4.1.3	Reveladores y disoluciones .....	50
4.1.4	Equipo .....	52
4.1.5	Condiciones para HPLC .....	52
4.2	Obtención de la muestra .....	53
4.3	Primera parte del desarrollo experimental .....	54
4.3.1	Preparación de la muestra .....	54
4.3.2	Extracción .....	55
4.3.3	Análisis del extracto etéreo .....	56
4.3.4	Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos.....	56
4.3.4.1	Evaluación cualitativa (cromatografía en capa fina) .....	57
4.3.4.2	Evaluación cuantitativa (análisis espectrofotométrico) ....	58
4.3.4.2.1	Evaluación de la actividad sequestrante del radical-DPPH .....	58

4.3.4.2.2	Evaluación de la actividad antioxidante mediante blanqueo con $\beta$ -caroteno .....	59
4.3.4.3	Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	61
4.3.4.4	Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	62
4.4	Segunda parte del desarrollo experimental .....	63
4.4.1	Hidrólisis química .....	63
4.4.2	Hidrólisis enzimática .....	64
4.4.2.1	Obtención de extractos con actividad enzimática.....	64
4.4.3	Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hidrolizado .....	65
5	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	66
5.1	Secado y obtención de extractos .....	66
5.2	Análisis del extracto etéreo .....	69
5.3	Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos .....	72
5.3.1	Evaluación cualitativa (cromatografía en capa fina) .....	72
5.3.2	Evaluación cuantitativa (análisis espectrofotométrico) .....	75
5.3.2.1	Actividad secuestrante del radical-DPPH.....	75
5.3.2.2	Actividad antioxidante con $\beta$ -caroteno .....	77
5.4	Fraccionamiento de los componentes por columna .....	80
5.5	Separación por HPLC e identificación .....	81
5.5.1	Compuestos glicosilados en el extracto obtenido con etanol.....	84

5.6	Segunda parte: aplicación de hidrólisis química y enzimática.....	98
5.7	Análisis por HPLC identificación y cuantificación .....	107
5.7.1	Cuantificación .....	116
6	CONCLUSIONES .....	118
7	BIBLIOGRAFÍA .....	120

H

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABTS	ácido 2,2-azilnobilis-(3-etil-benzoil-6-sulfónico)		
Ac	absorbancia de la solución de radical-DPPH en DMSO		
Ac <sub>2</sub>	absorbancia del control a los 120 min		
A <sub>r</sub>	absorbancia del extracto a los 120 min		
Ai	absorbancia del extracto mezclado con solución de radical-DPPH		
Aj	absorbancia del extracto en DMSO		
Ao	absorbancia del control al inicio de la reacción		
AH	aceptor de radicales libres		
BHA	butilhidroxianisol		
BHT	butilhidroxitolueno		
CCF	cromatografía en capa fina		
DMSO	dimetilsulfóxido		
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil		
FDA	administración de alimentos y medicamentos		
F.org.HE	fase orgánica de la hidrólisis enzimática		
F.org.HQ	fase orgánica de la hidrólisis química		
HE	hidrólisis enzimática		
HLPC	cromatografía de líquidos de alta resolución		
HQ	hidrólisis química		
H <sub>2</sub> O HE	fase acuosa de la hidrólisis enzimática		
H <sub>2</sub> O HQ	fase acuosa de la hidrólisis química		
nm	nanometros		
ppm	partes por millón		
PG	galato de propilo	ROOH	hidroperóxido
QL	quimiluminiscencia	Rf	tiempo de retención
R·	radical libre	TBHQ	terbutilhidroquinona
ROO·	radical peróxido	UV	ultra violeta

## **1 INTRODUCCIÓN**

Los antioxidantes son de suma importancia en los sistemas biológicos, ya que un exceso de radicales libres en el proceso de oxidación puede provocar daños en ADN y fosfolípidos principalmente, siendo necesario el equilibrio entre la oxidación y la protección en estos sistemas.

Del mismo modo los radicales libres pueden dañar componentes susceptibles del deterioro oxidativo, tales como lípidos, proteínas y carbohidratos en los alimentos, sobre todo durante su almacenamiento, siendo necesaria la adición de antioxidantes.

Los antioxidantes ayudan a retardar el ataque de la oxidación de los lípidos en los productos alimenticios, ya que una reacción en cadena de radicales libres causa cambios en las propiedades sensoriales (textura, color, olor y sabor principalmente), y pérdida de elementos nutricionales importantes constituidos por vitaminas y proteínas, por lo que los antioxidantes tienden a convertirse en un grupo de aditivos alimenticios indispensable.

Existen dos tipos de antioxidantes, los sintéticos como: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG), pero a estos se les ha asociado con posibles efectos tóxicos y una posible implicación con cáncer, por lo que existe una tendencia por el uso de antioxidantes naturales tales como aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, tocoferoles, carotenoides y flavonoides, los cuales se han aislado de vegetales y frutas.

Dentro de las frutas que contienen a los flavonoides como un componente importante, esta la manzana que es uno de los frutos más antiguos del mundo y que gracias a su enorme adaptabilidad, logró dispersarse a diversas regiones, de tal forma que hoy está, entre los frutos más comercializados (Schalkwijk, 1995).

La manzana como fruto ha sido ampliamente estudiada, considerada como una fuente importante de fibra, pectinas, colorantes y antioxidantes (debido a su contenido de flavonoides y a su gran disponibilidad), entre otros. Sin embargo, los residuos industriales de manzana no han sido aprovechados potencialmente y las cantidades de este residuo son dignas de considerarse, por ejemplo los residuos que se generan después de la elaboración de jugo o sidra, ya que los métodos tradicionales de procesamiento involucran prensado y molido de la fruta o de la pulpa, quedando el bagazo de manzana, el cual se usa principalmente como forraje.

En los países en desarrollo es de gran importancia obtener beneficios de los subproductos o residuos que generan las industrias alimentarias, los cuales pueden llegar a ser un verdadero problema causando contaminaciones (contenedores expuestos al aire libre), costos de transporte y dañando los ecosistemas (en zonas de descarga). En cambio, si estos residuos se aprovechan para la obtención de antioxidantes, se les puede proporcionar un valor agregado.

El presente trabajo pretende contribuir a difundir la importancia de fortalecer y mantener una visión de aprovechamiento integral de los recursos renovables, principalmente de aquellos que están relacionados con la producción primaria y el

procesamiento de alimentos. Así como las propiedades y alternativas de uso de los residuos o subproductos de la agroindustria, sobre todo aquella que procesa la manzana para la elaboración de sidra y jugos, proponiendo el aprovechamiento del bagazo como una fuente importante de antioxidantes naturales (los cuales se encuentran como flavonoides glicosilados), siendo necesario el uso de métodos químicos, enzimáticos y cromatográficos para llevar a cabo la separación, purificación e identificación, encontrando las condiciones apropiadas para su obtención.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Efectos biológicos causados por radicales libres**

Los radicales libres en los sistemas biológicos son generados a través del metabolismo genobiótico por drogas o químicos, irradiación, luz, metales de transición, oxidaciones catalizadas por minerales como hierro y cobre. Pueden provocar perturbaciones metabólicas y dañar la estructura de las membranas, generando modificaciones químicas indeseables que dañan macromoléculas orgánicas como: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Entre los efectos más graves esta el daño en ADN y fosfolípidos.

La presencia de radicales libres generados en el sistema y en la proximidad del ADN producirá un daño extenso a su estructura, el cual puede provocar cánceres y otras enfermedades como arteriosclerosis, malaria y artritis reumatoídea.

El transporte de productos oxidantes en la incorporación de las membranas celulares, induce cambios en la estructura y dañan la función de enzimas fosfolípicas dependientes. Las alteraciones en la membrana dan como resultado un aumento en la permeabilidad, causando desequilibrio en el transporte de sodio, potasio, calcio, magnesio y otros iones en los sistemas biológicos.

Los radicales libres también pueden ocasionar daños en los alimentos, los cuales tienen como principales componentes proteínas, lípidos y carbohidratos que están sujetos a cambios, sobre todo los lípidos (comunmente llamados grasas), que son susceptibles del deterioro oxidativo.

## **2.2 Efectos causados por radicales libres en sistemas alimenticios**

Los radicales libres son los causantes de la oxidación de los lípidos en los sistemas alimenticios, lo que representa de gran interés económico para la industria alimentaria, ya que este deterioro da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables, llamados en general enranciamiento en los aceites comestibles y en los alimentos con un alto contenido de grasas.

La oxidación generada por radicales tiene la característica de ser una reacción en cadena que consta básicamente de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

**Iniciación:** La etapa de iniciación tiene lugar por formación de radicales libres mediante factores que funcionan como catalizadores: trazas de metales (cobre y hierro), exposición a la luz y temperatura. Una vez que se forma un número suficiente de radicales libres y la reacción en cadena aumenta, se produce la adición de oxígeno, dando lugar a la producción de radicales peróxidos  $ROO\cdot$ .

En este período la oxidación toma lugar muy lentamente, y los productos secundarios se acumulan en una concentración que no puede ser detectada organolépticamente.



Propagación: Esta etapa toma lugar una vez que se forman, un número suficiente de radicales libres (R·), la reacción en cadena se propaga al captar átomos de hidrógeno en las posiciones  $\alpha$  de los dobles enlaces (R·), produciéndose posteriormente la adición de oxígeno para generar radicales peróxidos ROO·, que a su vez captan hidrógeno de los grupos  $\alpha$ -metilénicos RH de otras moléculas, para dar hidroperóxidos ROOH y grupos R·; estos a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose la secuencia de reacción (Fennema, 1992).



De forma paralela se lleva a cabo la descomposición de hidroperóxidos dando como resultado la formación de aldehídos, cetonas, alcoholes e hidrocarburos que imparten sabores y olores indeseables en los alimentos (Varela, 1988).

**Terminación:** En esta última etapa, se forman compuestos estables al reaccionar los radicales hidropéroxido entre sí y con otros radicales libres por medio de reacciones de condensación. La reacción termina cuando ya no hay radicales libres activos presentes que puedan reaccionar con otros compuestos insaturados (Fennema, 1992).



### **2.3 Control de los efectos causados por radicales libres en Sistemas Biológicos.**

El exceso de radicales libres reactivos formados durante el metabolismo celular son capaces de inducir una gama amplia de reacciones severas y perjudiciales, para evitar tal efecto los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos naturales de protección, manteniendo el equilibrio fisiológico por vía enzimática (catalasa, superóxidodismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa), pero si estos son superados por la formación de radicales libres, se hace necesario el uso de dietas ricas en antioxidantes, tales como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides, ácido úrico y aminoácidos como

metionina, histidina y triptofano. Los cuales protegen al sistema biológico del daño provocado por los radicales libres (Moure *et al*, 2001). Los antioxidantes deben tener varias características importantes para ser eficaces contra las perturbaciones celulares provocadas por los radicales.

Deben llegar al sitio correcto dentro de la célula del tejido en una concentración suficiente para permitir la competencia eficaz con las biomoléculas vecinas, y actuar recíprocamente con las especies perjudiciales del radical libre, actuar lo suficientemente rápido con las especies tóxicas, asegurar la competencia exitosa con los sitios biológicamente sensibles en la vecindad inmediata de producción de radicales libres, y tener propiedades biológicas aceptables, es decir, su toxicidad inherente debe ser baja.

#### **2.4 Control de los efectos causados por radicales libres en sistemas alimenticios.**

Puesto que la descomposición por oxidación tiene gran importancia tanto desde el punto de vista de la aceptabilidad (propiedades sensoriales tales como textura, color, olor y sabor principalmente) como de la calidad nutritiva (pérdida de vitaminas y daño a proteínas) en los productos alimenticios, es necesario controlar la formación de radicales libres en los alimentos con alto contenido de grasas.

La autooxidación de los lípidos insaturados puede evitarse mediante:

- Exclusión de oxígeno: mediante envasado o adición de glucosaoxidasa.

- Envasado en atmósferas inertes.
- Incorporación de agentes complejantes.
- Almacenamiento a bajas temperaturas en oscuridad: la velocidad de autooxidación desciende en aceites y grasas, pero sobre todo en frutas y verduras que contienen la enzima lipooxigenasa, pero la alteración sólo se puede evitar si la enzima se inactiva previamente por escaldado.
- Adición de antioxidantes: Una de las maneras más sencillas para inhibir las reacciones de oxidación en los sistemas alimenticios, es la adición de compuestos antioxidantes, estos también se pueden emplear en conjunto con otros aditivos que impidan que el oxígeno reaccione con los lípidos insaturados y así retardar la oxidación (Belitz y Grosch, 1992).

Los antioxidantes pueden añadirse directamente a los aceites vegetales o pueden fundirse con las grasas animales. Sin embargo en algunos casos se consiguen mejores resultados añadiendo el antioxidante en mezclas de monoacilglicerol-agua o en disolventes volátiles. También pueden añadirse en productos alimenticios pulverizados o sumergiéndolos en soluciones o suspensiones de antioxidantes, otra forma de proteger a los alimentos es empaquetarlos con películas que contengan a estos compuestos inhibidores. Pero finalmente la estabilidad dependerá de la eficacia de los antioxidantes empleados en los sistemas alimenticios (Fennema, 1992).

## **2.5 Antioxidantes**

En un principio, la palabra antioxidante, describía a todos aquellos agentes químicos que inhibían el ataque del oxígeno. Más recientemente, el término antioxidante alimentario se ha aplicado a aquellos compuestos que interrumpen la reacción en cadena de los radicales libres formados en la oxidación de los lípidos.

La FDA (Food and Drug Administration) define a los antioxidantes como aquellas sustancias que son usadas para conservar los alimentos retardando el deterioro, rancidez o decoloración debida a la oxidación.

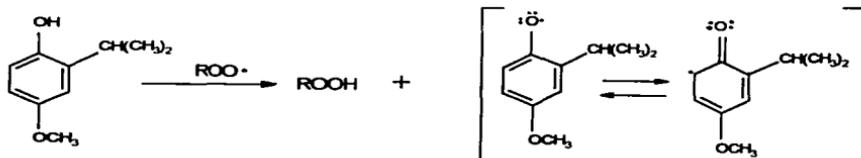
En México, la definición de antioxidante está dada por el Diario Oficial de la Federación, que en su publicación del 18 de Enero de 1988 título 9 artículo 672 define antioxidante como aquella sustancia ó sustancias destinadas a retardar o impedir la oxidación y enranciamiento de los alimentos.

La importancia de conservar los alimentos con alto contenido de ácidos grasos, es el motivo por el cual, los antioxidantes se han convertido en un grupo de aditivos indispensable, debido a sus propiedades de reforzar la vida de anaquel de los sistemas alimenticios, conservando sus propiedades sensoriales y cualidades nutritivas (Madhavi, 1996).

A menudo los antioxidantes muestran diferente grado de eficacia en la protección de un alimento, siendo las combinaciones entre ellos las que suelen proporcionar una protección más completa, pero la adición de estos es efectiva solo si se agrega antes de que la oxidación se presente, y pueda realizar su mecanismo de acción adecuadamente.

## 2.6 Mecanismo de acción de los antioxidantes

Como se mencionó en la sección 2.4 (control de los efectos en los sistemas alimenticios), los antioxidantes retardan las reacciones de oxidación cuando inhiben o interrumpen la formación y propagación de radicales libres en la etapa de iniciación, ya que tienen uno o más grupos hidroxilo, los cuales actúan como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres (figura 2.1).



**Figura 2.1** Ilustra la reacción típica de un antioxidante, su mecanismo de acción.

Bolland y Have postulan que los antioxidantes inhiben la reacción en cadena actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres.



Donde el aceptor de radicales libres AH, reacciona sobre todo con el radical peróxido  $\text{RO}_2\cdot$  y no con los radicales libres  $\text{R}\cdot$ . Y que dos de las cadenas de oxidación son terminadas por un inhibidor molecular, transcurriendo la reacción en dos etapas.



El radical antioxidante formado  $\text{AH}\cdot$  no es capaz de empezar una nueva reacción en cadena, ya que presenta impedimento estérico del grupo radical libre, el cual puede ser inactivado por reacciones de dimerización.

Los antioxidantes siguen una reacción típica como mecanismo de acción, pero a causa de las diferencias existentes en su estructura molecular, los distintos antioxidantes manifiestan diferencias sustanciales en su eficiencia cuando se utilizan con distintos tipos de aceites, o alimentos que contienen grasas, o en diferentes condiciones de procesado y manipulación. Por lo que en la elección adecuada del antioxidante también es importante determinar su actividad.

## **2.7 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante es una forma de determinar si el compuesto es útil para ser aplicado a un determinado alimento. La efectividad va relacionada con el tipo de sustrato en que se aplica, el tipo de proceso al cual es sometido el alimento y la estabilidad del antioxidante utilizado. También es posible determinar la actividad del compuesto en extractos obtenidos de vegetales y frutos.

El potencial de sustancias individuales o extractos puede ser analizado por varios métodos cromatográficos y analíticos tales como: el uso de quimiluminiscencia (QL), o una reacción con especies radicales estables como 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) o el ácido 2,2-azilnobs-(3-etil-benzoil-6-sulfónico) (ABTS), y blanqueo con  $\beta$ -caroteno, que son de los más utilizados (Bandoniene y Murkovic, 2002). La utilidad de estos ensayos se debe a que son rápidos, reproducibles, de fácil aplicación, requieren pequeñas cantidades de muestra, son compuestos cromóforos que pueden ser analizados espectrofotométricamente y por ser reactivos con los que se pueden realizar pruebas cualitativas en CCF.

Radical-DPPH.- La utilización del radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es aceptada para evaluar la actividad de cualquier compuesto, mediante el secuestro de radicales libres. El radical-DPPH en su forma oxidada es de color púrpura, cuando éste es reducido por un compuesto (oxígeno o antioxidante) con actividad secuestrante de radicales, toma una coloración amarilla.

Mediante el ensayo cualitativo realizado en cromatografía en capa fina, una disolución de radical-DPPH en metanol es asperjada sobre una muestra que contiene compuestos con actividad secuestrante los cuales reducen al radical, observándose manchas amarillas en contra de un fondo púrpura (Cavin *et al*, 1998).

El análisis cuantitativo consiste en hacer reaccionar una muestra que contiene compuestos con capacidad secuestrante, en una disolución de radical-DPPH en dimetilsulfoxido, y esta basado en la reducción del radical mediante la donación de un átomo de hidrogeno, formando un compuesto más estable, la reducción del radical-DPPH puede ser determinada espectrofotométricamente por medio del decremento de la absorbancia.

Xianjun Yan realizó un estudio con 27 especies de algas marinas, utilizando el ensayo cuantitativo con radical-DPPH en dimetilsulfoxido, la actividad de las diferentes especies de algas fue analizada espectrofotométricamente a 517 nm, midiendo la decoloración del radical-DPPH al ser reducido por los compuestos que se encuentran en las algas y que tienen capacidad de secuestrar este radical, los resultados que encontraron con este ensayo, mostraron que sólo 15 de las 27 especies en estudio tienen actividad secuestrante (Yan *et al*, 1998).

Blanqueo con  $\beta$ -caroteno.- El ensayo de blanqueo con  $\beta$ -caroteno confirma la actividad antioxidante de la muestra en estudio, esta basado en la capacidad del antioxidante para inhibir la oxidación del caroteno, evitando la ruptura de la

molécula y la formación de radicales libres, mediante la donación de átomos de hidrogeno estabilizando a la molécula y evitando su decoloración.

Para el ensayo cualitativo en cromatografía en capa fina, se asperja una disolución de  $\beta$ -caroteno y se hace incidir luz ultravioleta a la cromatoplaca, provocando la oxidación del  $\beta$ -caroteno con la consecuente pérdida de color. Los compuestos con actividad antioxidante que estan contenidos en la muestra, inhiben la oxidación del caroteno, observandose la aparición de manchas amarillas en contra de un fondo blanco (Yan-Hwa *et al*, 2000). Para el ensayo cuantitativo se hace reaccionar la muestra con una disolución de  $\beta$ -caroteno, con aplicación de temperatura, la decoloración del caroteno se puede leer espectrofotométricamente a 470 nm. Estos ensayos nos indican la actividad de los compuestos, pero además de la actividad y de la potencia de un antioxidante o de una mezcla de ellos, 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 de color u olores desagradables, la disponibilidad y el costo. También es importante tener en cuenta que existen dos tipos de antioxidantes, los sintéticos y los naturales.

Las características físicas de los antioxidantes sintéticos se encuentran reportadas en el Codex Alimentarius (Food Chemicals Codex), pero a continuación se especifican los antioxidantes sintéticos y naturales más relevantes.

## **2.8 Antioxidantes sintéticos**

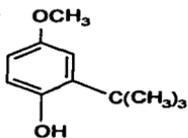
A causa de las diferencias existentes en su estructura molecular, los distintos antioxidantes manifiestan diferencias sustanciales en su eficacia cuando se utilizan con distintos tipos de aceites, o alimentos que contienen grasas, o inclusive en diferentes condiciones de procesado y manipulación (Fennema, 1992). La mayoría de los antioxidantes sintéticos usados en la industria alimentaria (figura 2.2), tienen en su estructura un anillo aromático y grupos hidroxilo que funcionan como donadores de electrones (Badui, 1992).

Butilhidroxianisol (BHA) por ser un compuesto lipófilico, se usa en una variedad amplia de productos como grasas, aceites esenciales, alimentos con alto contenido de grasas y alimentos empaquetados, es más eficaz en grasas animales que en aceites vegetales.

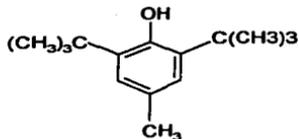
Hidroxitolueno butilado (BHT) es débil como estabilizante en aceites vegetales, por lo que se usa en alimentos con un contenido bajo en grasas, productos de pescado, materiales de empaque, parafina y aceites minerales.

Terbutilhidroquinona (TBHQ) por su buena solubilidad, es empleado básicamente en aceites para fritura de papa, aceites vegetales altamente insaturados y en grasas animales comestibles.

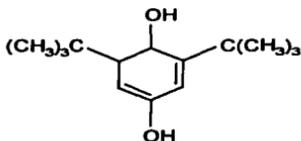
El ácido gálico y los galatos de alquilo por ser liposolubles, tienen aplicaciones en aceites vegetales hidrogenados, confitería, aceites esenciales y galletas.



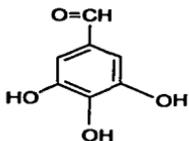
BHA (2-terc-butil-4-hidroxianisol)



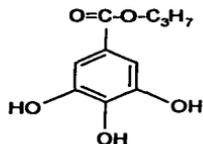
BHT (2,6-di-terc-butil-4-metifenol)



TBHQ (terbutilhidroquinona)



ácido gálico



Galato de propilo

**Figura 2.2** Principales antioxidantes sintéticos utilizados en alimentos

Todos estos compuestos sintéticos tienen un excelente efecto antioxidante, pero a estos se les ha asociado con posibles efectos tóxicos y una posible implicación con el cáncer, por lo que existe una tendencia por el uso de antioxidantes naturales.

## **2.9 Antioxidantes naturales**

Desde que el hombre se interesó por prolongar la utilidad de los alimentos, se han usado ingredientes o compuestos extraídos de los alimentos que actúan como antioxidantes naturales. También han sido utilizadas varias técnicas en el procesado de alimentos que aumentan la resistencia a la oxidación.

Existe una amplia gama de antioxidantes naturales que están contenidos tanto en frutas como en vegetales, y aunque estos compuestos pueden sintetizarse se les considera como pertenecientes a fuentes naturales.

Los datos toxicológicos sobre el uso de algunos antioxidantes sintéticos, aunado a la atención y obligación de fabricantes por producir alimentos saludables, dan como resultado una mayor promoción por el uso de compuestos naturales, algunos de los cuales son actualmente usados eficazmente para la protección de alimentos contra la degradación oxidativa (Burri *et al*, 1989).

Los grupos de compuestos naturales que presentan propiedades antioxidantes son:

- Aminoácidos
- Proteínas
- Tocoferoles

- Carotenos
- Ascórbatos
- Compuestos fenólicos.

### ***2.9.1 Aminoácidos y proteínas***

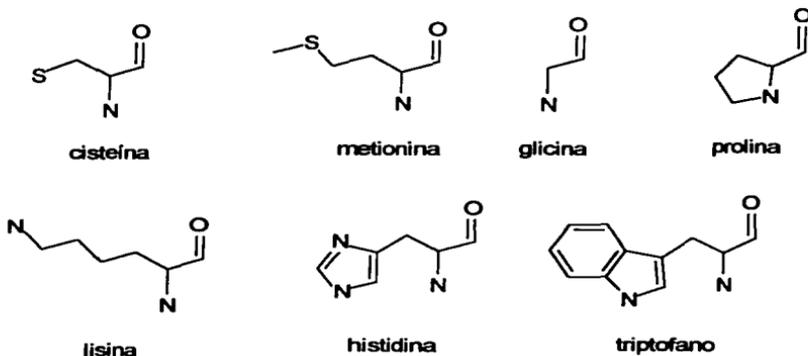
Los aminoácidos funcionan como antioxidantes primarios (figura 2.3), sinergistas, sus propiedades dependen de su concentración y el pH del medio. Son obtenidos de los hidrolizados protéicos procedentes de tejidos vegetales, generalmente los tioles son reconocidos como agentes que bloquean la propagación de radicales libres; sin embargo, se ha demostrado que todos los aminoácidos poseen cierta actividad en algún sistema (Kuri, 1988).

La glicina, metionina, triptofano, histidina, prolina y lisina son eficaces en las grasas y aceites. Combinaciones de triptofano y lisina son muy eficaces en la grasa de mantequilla, y la metionina se usa como sinergista en los productos lácteos.

Las posibilidades de aplicación de la cisteína son amplias, pero tiene la desventaja de que al descomponer los hidroperóxidos, forma compuestos carbonílicos que pueden conducir a un oscurecimiento no enzimático del alimento.

El polvo de leche desnatada en la margarina aumenta la actividad de los antioxidantes agregados.

Los aminoácidos también son eficaces en los productos de carne y en la prevención de las reacciones de oscurecimiento en la fruta (Madhavi 1996).



**Figura 2.3** Estructuras de aminoácidos con actividad antioxidante

En cuanto a la actividad antioxidante de las proteínas, se sabe que el hidrolizado de soya, las proteínas de levadura y de verdura, funcionan como sinergistas con los antioxidantes primarios. Por lo que las posibilidades de aplicación son amplias, ciertas proteínas e hidrolizados proteínicos inhiben la autooxidación de la vitamina

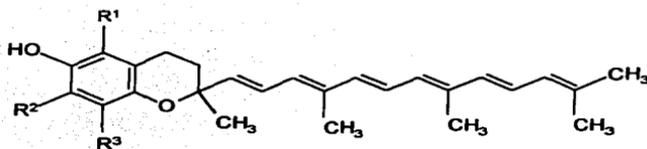
A, esta actividad ha sido atribuida a la presencia de grupos sulfhidrido libres (Taguchi *et al*, 1988).

El gluten, la albúmina de huevo y la caseína son eficaces en el aceite de sardina, las proteínas de soya actúan conservando el color de la carne desmenuzada.

### ***2.9.2 Tocoferoles***

Otro grupo importante de antioxidantes naturales es el de los tocoferoles (figura 2.4) son los antioxidantes distribuidos más ampliamente en la naturaleza, se encuentran en cantidades sustanciales en los alimentos de origen animal. Los cereales, aceite, semillas, nueces y verduras como los guisantes, los frijoles y zanahorias son fuentes ricas en tocoferoles y tocotrienoles. Sin embargo, la actividad relativa de estos compuestos se ve influida significativamente por la temperatura y la luz.

Los tocoferoles constituyen el principal antioxidante de los aceites vegetales y una proporción relativamente alta de estos, sobrevive las etapas de procesado y permanece en cantidad suficiente para proporcionar estabilidad frente a la oxidación que pueda tener el producto acabado (Hudson, 1990).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ	H	H	CH <sub>3</sub>
tocol	H	H	H

**Figura 2.4** Estructura de los tocoferoles de acuerdo a los sustituyentes de la tabla, siendo el orden de actividad antioxidante creciente

### 2.9.3 Carotenos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

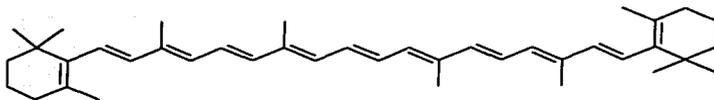
El nombre genérico deriva de la zanahoria (*Daucus carota*), ya que fue de esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez, pero los carotenoides están ampliamente distribuidos en las frutas, siendo determinantes del color en muchas de ellas (cítricos, melocotón, melón, plátano, jitomate, chiles, papas, duraznos, zanahoria, trigo, maíz, soya, flores y algunas algas, bacterias fotosintéticas,

hongos y levaduras). En la naturaleza se han identificado más de 420 y a pesar de que generalmente su color varía de amarillo a anaranjado y rojo, una gran proporción de ellos se encuentra en las hojas verdes y sólo hacen su aparición en el invierno cuando la clorofila desaparece, en la tabla 2.1 se muestran los carotenoides más conocidos.

**Tabla 2.1** Relación de algunos carotenoides existentes en las frutas.

CAROTENOIDES		
Fitoeno	<i><math>\beta</math></i> -criptoxantina	Violaxantina
Fitoflueno	<i><math>\beta</math></i> -caroteno-5,6-epóxido	Luteoxantina
$\zeta$ -caroteno	Mutacromo	Auroxantina
Licopeno	Luteína	Neoxantina
$\alpha$ -caroteno	Zeaxantina	Capsantina
<i><math>\beta</math></i> -caroteno	Criptoflavina	
<i><math>\beta</math></i> -zeacaroteno	Anteraxantina	
Licoxantina	Luteína-5,8-epóxido	
$\alpha$ -criptoxantina	Mutatoxantina	

El  *$\beta$* -caroteno (figura 2.5) es el carotenoide de mayor importancia en la tecnología de alimentos, es un agente activo contra los átomos de oxígeno que provocan la oxidación y la síntesis de radicales libres (Badui, 1992).



**Figura 2.5** Estructura del  $\beta$ -caroteno

El  $\beta$ -caroteno tiene aplicaciones como colorante en jugos, margarina, mayonesas, aderezo para ensaladas, quesos y helados, y como antioxidante puede ser adicionado en aceites vegetales.

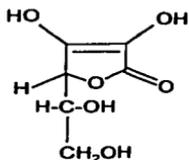
#### ***2.9.4 Ascórbatos***

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Dentro del grupo de los ascórbatos se encuentran: ascórbato de sodio y calcio, ascorbil palmitato y estereato, y ácido ascórbico, siendo este último el más importante.

El ácido L-ascórbico (figura 2.6) o vitamina C es una sustancia frecuente en la naturaleza, puede extraerse de fuentes naturales como vegetales y frutas (limón, naranja, tomate, patata y hojas de lirio entre otros), pero el extracto es de poca importancia ya que todo el ácido ascórbico de uso tecnológico en alimentos se sintetiza químicamente (Madhavi, 1996).

Como antioxidante tiene aplicación en la producción de alimentos tales como: sopas deshidratadas, salsas, bebidas carbonatadas, polvo para preparar bebidas, néctares de fruta, vinos, mayonesas y aderezos.



2,3-dienol-1-gulónico

**Figura 2.6** Estructura del ácido ascórbico

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### ***2.9.5 Compuestos fenólicos***

Otro grupo importante de antioxidantes naturales son los compuestos fenólicos, el cual revisaremos con mayor detenimiento, por ser el grupo de compuestos en los que está enfocado el proyecto y por considerar necesario, un mayor conocimiento sobre ellos.

Los compuestos fenólicos se encuentran en la mayor parte de las frutas y en muchos casos contribuyen al color y sabor de las mismas. Funcionan principalmente como donadores de hidrógeno y conservan sus propiedades durante la cocción o freído de productos preparados con las grasas y aceites en que ellos están presentes.

Dentro de los compuestos fenólicos, podemos encontrar a los grupos conformados por ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos, hidroxicumáricos e hidroxibenzoicos) y a los flavonoides (flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas).

#### ***2.9.5.1 Ácidos fenólicos***

Dentro de este grupo podemos encontrar a los ácidos hidroxicinámicos, hidroxicumáricos e hidroxibenzoicos. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en frutas y verduras (tabla 2.2).

Del grupo de los hidroxicumáricos, sólo la escopoletina ha sido encontrada hasta el momento en frutas como ciruela y albaricoque, pero en pequeñas cantidades.

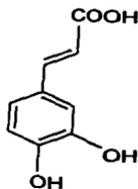
Los ácidos hidroxibenzoicos (ácido salicílico, genticónico, gálico, vainillínico y elálgico), se encuentran principalmente en frutas como fresa, uva, naranja, toronja y limón.

**Tabla 2.2** Ácidos fenólicos presentes en frutas y verduras

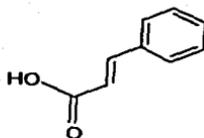
Compuesto	ácido cumarico	ácido ferúlico	ácido caféico	ácido clorogénico
Manzana	+	+	+	+
Pera	-	-	+	-
Durazno	+	+	+	+
Cereza	+	+	+	-
Ciruela	+	+	+	+
Melocoton	+	+	+	-
Albaricoque	+	+	+	+
Fresa	-	-	-	-
Zarzamora	+	+	+	-
Uva	+	+	+	-
Grosella	+	+	+	-
Arandonos	+	+	+	-
Espinacas	+	+	+	-
Col	-	+	+	-
Alfalfa	-	+	+	-
Espárragos	+	-	+	-

(+) compuesto presente (-) compuesto ausente

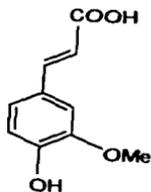
La actividad antioxidante de estos compuestos va a depender de la posición en la que se encuentran los grupos hidroxilos (figura 2.7), por ejemplo el ácido cinámico tiene un excelente poder antioxidante y se encuentra en las uvas, vino rojo y en las frutas cítricas. Los ácidos caféico y clorogénico también tienen una actividad antioxidante significativa, sin embargo estos compuestos no están usándose en la actualidad en productos alimenticios (Coulter y Bial, 1984).



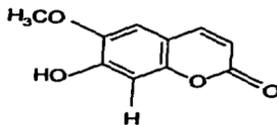
ácido caféico



ácido cinámico



ácido ferúlico



escopoletina

Figura 2.6 Estructuras de algunos ácidos fenólicos

### 2.9.5.2 Flavonoides

Otro grupo importante dentro de los compuestos fenólicos es el de los flavonoides, los cuales se encuentran en frutas, semillas, hojas y otras partes de la planta (tabla 2.3). Son compuestos de color amarillo pálido y rojos, se encuentran en una considerable proporción y en algunos casos contribuyen de manera importante al color de los alimentos (Wong, 1995).

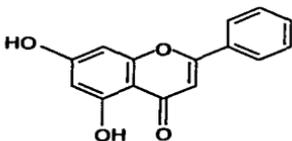
**Tabla 2.3** Flavonoides presentes en frutas, plantas aromáticas y semillas

	Flavonas	Flavononas	Flavonoles	Isoflavonas	Antocianidinas
Manzana	+	-	+	-	+
Pera	-	-	-	-	+
Ciruela	+	-	+	-	+
Melocoton	-	-	+	-	+
Uva	+	-	+	-	+
Naranja	-	+	-	-	-
Limón	-	+	-	-	-
Fresas	+	+	-	-	+
Perejil	+	-	-	-	-
Romero	+	-	-	-	-
Tomillo	+	-	-	-	-
Semillas	+	-	-	+	-

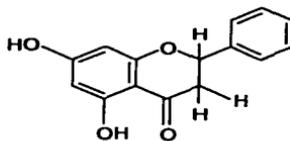
(+) compuesto presente, (-) compuesto ausente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

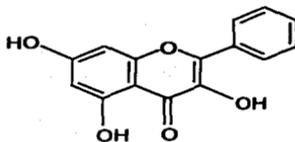
Dada su capacidad de capturar radicales libres y de crear complejos con los iones metálicos, los flavonoides funcionan como antioxidantes primarios y son glicósidos formados por una aglucona (figura 2.8).



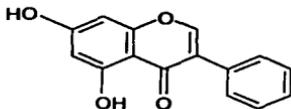
flavona



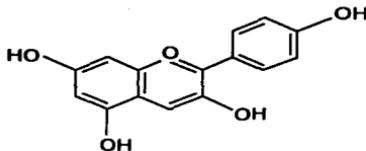
flavonona



flavonol



isoflavona



antocianidina

**Figura 2.8** Estructura de las agluconas de los flavonoides

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Siendo las principales: flavonas (luteolina, quisina y apigenina), flavononas (naringina y hesperetina), isoflavonas (genisteina, genistina y deidzina), flavonoles (quercetina, catequina y epicatequina) y antocianidinas (cianidina, delphinina y malvidina). Las agluconas son más activas que los glicósidos, la diferencia que existe entre ellas es debido al grado de aromaticidad y su actividad es determinada por la posición y grado de hidroxilación del anillo.

Dado que la manzana es una de las frutas que contiene flavonoides como un componente importante, a continuación mencionaremos algunos antecedentes de los antioxidantes que se han encontrado en este fruto.

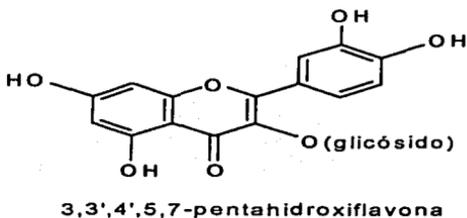
#### ***2.9.5.2.1 Flavonoides que se encuentran en la manzana***

En estudios realizados con anterioridad a este fruto, la comparación entre cultivos de manzanas verdes y rojas, en diferentes estaciones y años, muestra que ambos cultivos presentan una composición similar, en el análisis se identificaron glicósidos de quercetina y proantocianidina, también hay datos de la biosíntesis de glicósidos de cianidina durante la maduración.

La concentración de glicósidos de quercetina y proantocianidina son más altos en la cáscara de la manzana más joven y disminuyen durante la maduración de la fruta hasta en un 50 %. Los glicósidos de cianidina aumentan durante la maduración. El procedimiento de cromatografía de líquidos (HPLC) que se utilizó

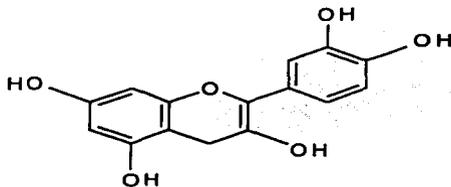
para estos estudios, permite la separación y cuantificación de: galactosido de cianidina, siete glicósidos de quercetina, catequina, epicatequina, galocatequina y proantocianidina B2 y B5. También se identifican dos isómeros de quercetina (3-arabinopiranosido y 3-arabinofuranosido).

Aunque ambos cultivos mantuvieron los mismos glicósidos de quercetina (figura 2.9), había diferencias entre las proporciones relativas del glicósido individual. En general los niveles de glicósidos de quercetina totales estaban entre 3 y 7 mg/g; proantocianidinas totales entre 1.5 y 5 mg/g y glicósidos de cianidina de 0 a 1.1 mg/g (Lister *et al*, 1994).



**Figura 2.9** Estructura de 3-glicósido de quercetina

Wieslaw y Chang lograron identificar cinco glicósidos de quercetina y dos de floridzina de la cáscara de manzana, por métodos químicos y espectrales, estos compuestos fueron identificados como: 3-O-galactósido, 3-O-glucósido, 3-O-xilósido, 3-O-arabinósido y 3-O-ramnósido de quercetina, glicósidos de floridzina y xiloglucósidos de floridzina, los glicósidos de floridzina también se encuentran en la pulpa de la manzana. Los métodos empleados para el análisis muestran separación de cuatro fragmentos fenólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC preparativo), mientras que el HPLC analítico de estos fragmentos mostró el contenido de catequina principalmente (figura 2.10) y epicatequina, sus dímeros y polímeros (Wieslaw *et al*, 1988).

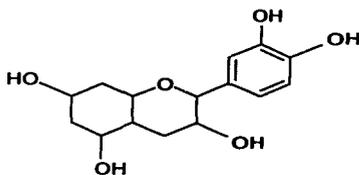


3,3',4',5,7-flavanpentol

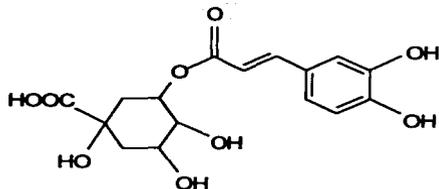
**Figura 2.10** Estructura de la catequina

Otros antioxidantes contenidos en la manzana son epicatequina y el ácido clorogénico (figura 2.11), que es un ácido alifático importante en los alimentos por su contribución a las reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático.

La principal protoantocianidina de las manzanas es un dímero formado por dos unidades de 1-epicatequina, unidas mediante enlace C4-C8. Este compuesto al ser hidrolizado produce cianidina y (-)epicatequina, los cuales se han encontrado en manzanas, peras, nuez de cola, semillas de cacao y otras frutas.



3,3',4-flavanepentol  
epicatequina



1,3,4,5-tetrahydroxyciclohexano  
ácido clorogénico

**Figura 2.11** Estructura de epicatequina y ácido clorogénico

La manzana como fruto ha sido ampliamente estudiada, considerada como una fuente importante de antioxidantes. Sin embargo, los residuos industriales que generan las industrias que la procesan no han sido aprovechados potencialmente, y las cantidades que se generan de este residuo son dignas de considerarse, para la extracción de antioxidantes naturales.

## **2.10 Residuos industriales como fuente de antioxidantes**

La cuestión del aprovechamiento de los residuos que genera la actividad humana y productiva, no es algo nuevo, esto se ha presentado ante necesidades crecientes, como puede ser el caso de proveerse de alimentos, los cuales son sujetos de algún tipo de procesamiento previo a su consumo. Tal circunstancia se materializa en una corriente enorme y variada de residuos que en el caso de la producción y procesado de alimentos, tienen un origen y características biológicas tales que, su existencia y disposición final, a menudo significan un problema. Muchas industrias de alimentos tienen un impacto medioambiental adverso, debido a la presencia de fenoles en sus residuos industriales o efluentes líquidos que desechan, ya que estos compuestos aumentan las demandas de oxígeno químico y bioquímico, con efectos perjudiciales en la flora y fauna que se encuentra en las zonas de descarga.

Los residuos sólidos para los fertilizantes orgánicos y los niveles relativamente altos de compuestos fenólicos son un problema debido a la inhibición de algunas propiedades de la germinación. Sin embargo, los polifenoles tienen muchos efectos favorables para la salud humana, como la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, ya que disminuyen el riesgo de enfermedades del corazón. Por otro lado, la actividad de estos compuestos como antioxidantes de alimentos es bien conocida, esto ha promovido estudios de varios extractos que los contienen. Así, puede considerarse que los residuos industriales que contienen compuestos fenólicos son derivados con un valor agregado, lo que justifica su recuperación (Bonilla *et al*, 1998).

Los residuos así como los recursos naturales son conceptos que están sujetos a un desarrollo tecnológico determinado. El carácter de residuo o de recurso para un mismo material, depende del lugar y del momento en que se considere, en términos de las necesidades y progreso técnico de un producto. De este modo las capacidades materiales y sociales para transformar un material en un bien útil con posibilidades mercantiles, aparece como el elemento primordial que le dará a los residuos su posibilidad como recursos.

La obtención de extractos con actividad antioxidante, de fuentes baratas o residuales de las industrias agrícolas, y la creciente preocupación de los consumidores con respecto a la seguridad del aditivo utilizado en alimentos, creó

la necesidad de identificar fuentes alternativas naturales y seguras, para la obtención de antioxidantes (Sherwin, 1990; Wanasundora y Shahidi, 1998).

Las industrias que generan bagazo de manzana como residuo, son la sidrera y la que se dedica a la elaboración de jugos y concentrados de fruta, la cual es una de las más importantes agroindustrias de México.

El bagazo de manzana es el subproducto que se obtiene del prensado directo de la fruta, desintegración del fruto en molinos o pulperos usando tamices muy finos, filtros o centrifugas de alta velocidad para la separación del jugo. La composición de este residuo esta constituida por: 74 % de humedad, 15 % de carbohidratos, 7 % de fibra cruda, 1.4 % de proteínas y 1.2 % de grasa. Su principal uso es para alimentación ganadera, se le conserva por fermentación (ensilado), a veces mezclándolo previamente con maíz, alfalfa u otros forrajes. Pero no se le ha dado la proyección adecuada a este residuo para la recuperación de algun subproducto, siendo que las grandes producciones de estas industrias, nos permite considerar a los residuos de manzana como un recurso y fuente importante para la obtención de antioxidantes.

Otros residuos agrícolas e industriales en los que se ha encontrado fuentes atractivas de antioxidantes naturales son:

***Residuos de cáscara de papa:*** el residuo que desecha la empresa Simplot División de Alimentos, fue analizado y los componentes de la cáscara de papa se obtuvieron con una mezcla de disolventes (metanol-agua), encontrando en este

extracto ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido galico y ácido cafeico), de los cuales se obtiene hasta 43 mg/100 g en la cuantificación por HPLC. Lo cual muestra que se pueden aislar ácidos fenólicos de los residuos de cáscara de papa, usando un procedimiento para obtener el extracto de manera simple y económica. (Rodríguez *et al*, 1994).

***Aguas residuales del molido de oliva verde:*** durante la producción de aceite de aceituna se generan volúmenes considerables de agua que generalmente son desechados. Las aceitunas contienen una variedad de componentes bioactivos (compuestos fenólicos) y algunos de ellos según su coeficiente de partición, terminan en la fase acuosa, después de los lavados continuos que se le hacen a la pasta de oliva verde con agua caliente, antes del procedimiento de separación del aceite. Estas aguas residuales tienen una considerable cantidad de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes.

Los compuestos identificados en estas aguas residuales son: hidroxitirasol, tirasol, ácido elenolico, 7-glucosido de luteolina, quercetina, derivados de ácido cinámico y polifenoles (Visioli *et al*, 1999).

***Té viejo:*** las hojas de té que han perdido algunas de sus características sensoriales y que son consideradas viejas, representan en la actualidad una pérdida agrícola importante, pero el té viejo contiene compuestos antioxidantes que se han extraído para ser utilizados en alimentos. Las hojas de té viejo son una

fuente rica de polifenoles, catequinas principalmente, los extractos obtenidos contienen epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina y galocatequina. Estos han sido probados en freído de hojuelas de papa, emulsiones de mayonesa, margarina, cereales precocidos, grasa de pollo, carne de cerdo y queso (Zandi y Gordon, 1999).

**Cáscara y semilla de uva:** la obtención de compuestos fenólicos de los residuos que se desperdician después de la elaboración del vino con uva roja, tienen como propósito ser utilizados como antioxidantes de alimentos y darle un uso a los residuos agroindustriales con la utilización de la cáscara y semilla de las uvas, en el análisis por HPLC se identificaron algunos compuestos antioxidantes (3-galactosido de quercetina, catequina, epicatequina y antocianidinas). Se determinó que es posible obtener compuestos fenólicos de los residuos industriales que se quedan de la elaboración de vino, para aprovecharlos como antioxidantes (Bonilla *et al*, 1998).

**Melazas de soya:** la soya se utiliza como alimento para animales, como fuente de proteína dietética y para la elaboración de otros productos. El uso creciente de soya para la elaboración de productos alimenticios ha generado la acumulación de subproductos y residuos durante el procesado de la soya. Uno de estos residuos es la porción soluble de la soya (melazas de soya), donde se aislaron e identificaron 7 isoflavonas (genisteína, daizeína, gliceteína, formononetina, genistina, daizina y

gliciteína), ácido ferúlico y dos glicósidos de saponina (soisaponina 1 y soisaponina A2). Los cuales tienen actividad antioxidante y pueden ser utilizados en productos alimenticios (Hosny y Rosazza, 1999).

***Cáscara y semilla de cítricos:*** son un residuo primario desechado por la industria de jugos. Las cáscaras son una fuente de melazas, pectina y aceites esenciales, pero suelen usarse como alimento para ganado junto con las pulpas secas.

Las semillas son ricas en ácidos grasos insaturados, pero el aceite no se extrae comercialmente.

Las cáscaras y las semillas son una fuente interesante de compuestos fenólicos que incluyen ácidos fenólicos y flavonoides, estos últimos se encuentran en las frutas cítricas son de dos clases muy peculiares: flavonas polimetoxiladas y flavononas glicosiladas, y dado que las cáscaras y semillas permanecen en su mayor parte sin ser utilizadas, se pretende valorizar de otra manera a estos residuos, dándoles un uso como antioxidantes de alimentos.

En la cáscara y semilla de naranja agria, están compuestos como: neoeriocitrina, luteolina glicosilada, narirutina, naringina, apigenina glicosilada, hesperidina, neohesperidina, diosimina glicosilada, ácido ferúlico y flavonas.

En el limón la semilla contiene eriocitrina y hesperidina principalmente y la cáscara es rica en neoeriocitrina y naringina.

En la semilla de mandarina se encuentra naringina al igual que en la semilla de naranja dulce, siendo que la cáscara de naranja dulce y toronja contienen cuatro ácidos fenólicos (ferúlico, sinápico, p-cumarico y cafeico).

En los extractos de semilla hay de 1 a 20 % de la actividad antioxidante y 83 % en la cáscara, aun cuando los efectos de sinergismo en la semilla existen entre flavononas y glicosilados, la actividad antioxidante es debida principalmente a otros compuestos, como tocoferoles, ácido ascórbico, limonoides y otras sustancias no identificadas.

Las cáscaras y semillas de cítricos tienen una actividad antioxidante interesante y sus extractos pueden ser utilizados para prevenir la oxidación de jugos de fruta y esencias de aceites (Bocco *et al*, 1998).

***Residuos de pulpa de zanahoria:*** una gran cantidad de la pulpa de zanahoria se desperdicia después de la extracción del jugo, esto provoca un problema de disposición a la industria de alimentos. Sin embargo, el residuo que se desperdicia todavía contiene una cantidad significativa de carotenos (12 carotenos identificados en el residuo de la pulpa de zanahoria). Los carotenos que se recuperan pueden ser utilizados como aditivo colorido en varios alimentos (Chen y Tang, 1998).

Otras fuentes naturales para la obtención de antioxidantes son las verduras que contienen varios compuestos con actividad antioxidante, y también se consideran varias plantas como origen de antioxidantes naturales, potencialmente seguros para la industria de alimentos (Hagerman *et al*, 1998).

Los estudios que se tienen hasta el momento para poder incorporar extractos crudos o material entero de verduras que puedan cumplir funciones antioxidantes en los alimentos son escasos, sin embargo ya se han hecho algunas aplicaciones encontrándose resultados favorables.

La utilización de arroz con cascarilla como antioxidante, particularmente después de la reducción de partículas y cocinado, da efectos antioxidantes beneficiosos (Wu *et al*, 1999).

El aceite contenido en el residuo de la producción de café instantáneo fue usado para obtener un producto antioxidante útil para la preservación de alimentos y para estabilizar el aroma (Bertholet *et al*, 1998).

Comercialmente las antocianinas de las uvas, los arándanos agrios y la col, están disponibles como extractos acuosos o polvos. Por otro lado los extractos de uva se están comercializando como antioxidantes debido a su estructura compleja, ya que en la piel se encuentran las antocianidinas, y procianidinas en las semillas (Shrikhande, 2000).

En un estudio sobre los factores que influyen en el rendimiento de fenoles durante el procesado de la sidra, los resultados muestran que pueden identificarse tres áreas principales de pérdida: 1) la oxidación durante el molido y antes del prensado, 2) la extracción incompleta del tejido de la manzana y 3) durante la clarificación; Lo cual se manifiesta por una pérdida de procianidina de hasta un 20 % (Lea y Colin, 1978), esto indica que gran parte de los compuestos fenólicos están en los residuos de manzana que quedan después de la extracción del jugo y que pueden ser aprovechados.

El presente trabajo pretende contribuir a difundir la importancia de fortalecer y mantener una visión de aprovechamiento integral de los recursos renovables, principalmente de aquellos que están relacionados con la producción primaria y el procesamiento de alimentos. Así como las propiedades y alternativas de uso de los residuos o subproductos de la agroindustria, sobre todo aquella que procesa la manzana para la elaboración de sidra y jugos, proponiendo el aprovechamiento del bagazo como una fuente importante para la obtención de antioxidantes naturales. Para lo cual nos hemos planteado los siguientes objetivos.

### **3 OBJETIVO**

#### **Objetivo general:**

Obtención de compuestos flavonoides mediante el aprovechamiento de residuos industriales, dando proyección al empleo de bagazo de manzana como fuente de antioxidantes naturales.

#### **Objetivos particulares:**

Establecer las mejores condiciones para el proceso de extracción de antioxidantes contenidos en el residuo de manzana.

Analizar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con disolventes de diferente polaridad, utilizando ensayos cualitativos y cuantitativos que nos permitan determinar y seleccionar al extracto que se encuentre enriquecido con compuestos con actividad antioxidante.

Llevar a cabo la separación y purificación de los flavonoides del extracto que presente mayor actividad, encontrando las condiciones apropiadas en la aplicación de métodos químicos y enzimáticos, para hidrolizar los compuestos que se encuentran glicosilados.

Realizar la identificación y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución de los compuestos que presenten actividad antioxidante.

#### 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

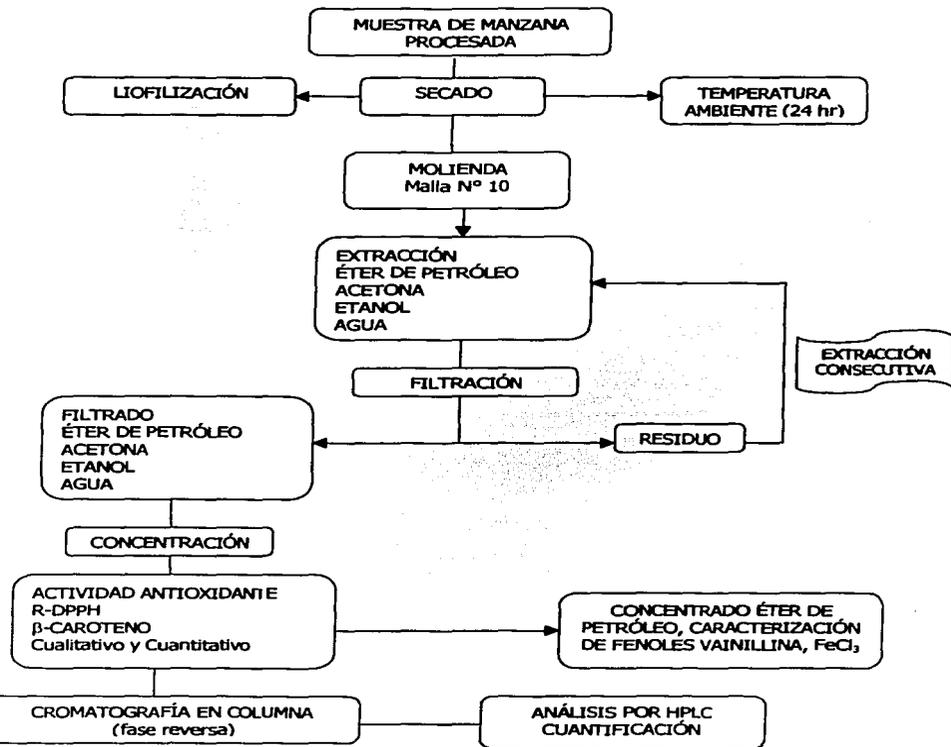
Considerando los objetivos planteados, la estrategia a seguir en este trabajo se divide en dos partes:

**Primera parte.**- preparación de la muestra, secado por liofilización y a temperatura ambiente, extracción con disolventes de diferente polaridad, evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de radical-DPPH y blanqueo con  $\beta$ -caroteno, fraccionamiento por columna y análisis por HPLC.

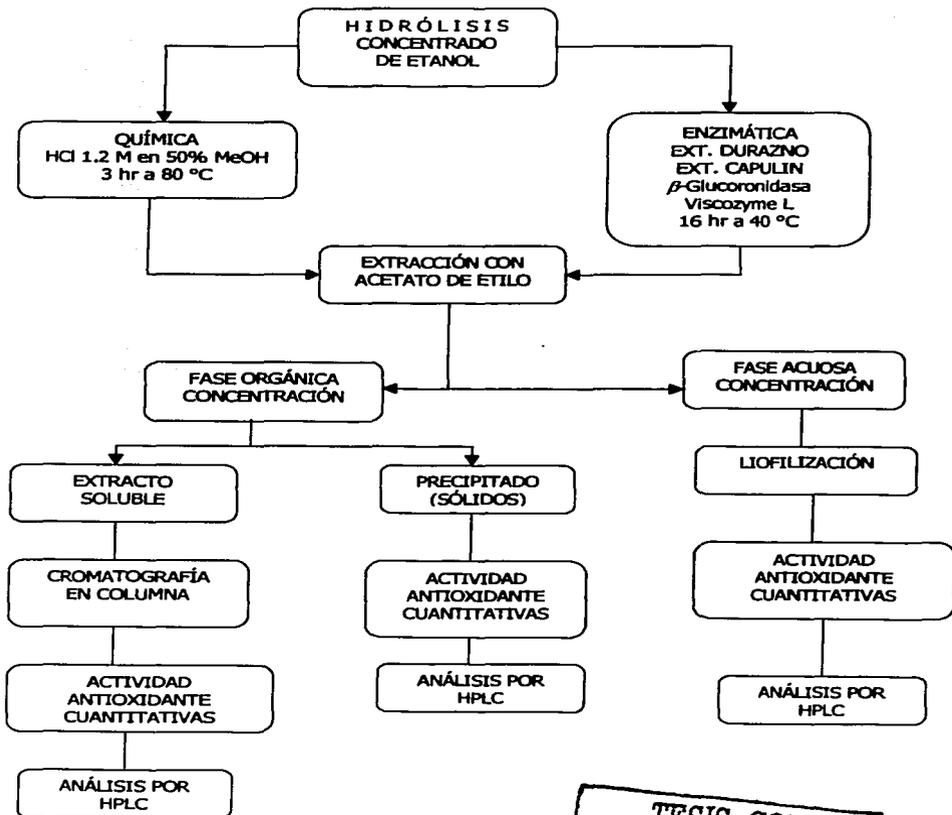
**Segunda parte.**- hidrólisis química y enzimática, fraccionamiento por columna, identificación y cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante mediante el análisis por HPLC.

A continuación se muestran los diagramas utilizados para la realización de este trabajo.

## DIAGRAMA DE EXPERIMENTACIÓN PRIMERA PARTE



**DIAGRAMA DE EXPERIMENTACIÓN  
SEGUNDA PARTE**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 4.1 MATERIAL Y EQUIPO

Para el desarrollo experimental de este trabajo, fue necesario la utilización de diferentes reactivos, material y equipo, los cuales se encuentran especificados a continuación.

### 4.1.1 Reactivos

- Placas de celulosa microcristalina, Macharey-Nagel  
Celulosa microcristalina con indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub>  
Polygram cel 400 UV
- Placas de sílica gel, Macharey-Nagel  
Sílica gel con indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub>
- Celulosa microcristalina, Macharey-Nagel L-815290
- Sílica gel, MN Kresagel 60 L-815380
- Radical-DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), 95%, Aldrich Chemistry
- $\beta$ -caroteno, 99%, Sigma Chemistry
- Sulfato cérico Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 99 %, Aldrich Chemistry
- Cloruro férrico FeCl<sub>3</sub>, 95 %, Mallinkrodt
- BHA (butihidroxianisol), 99 %, Sigma Chemistry
- TBHQ (diterbutilhidroquinona), 99 %, Sigma Chemistry
- Ácido ferúlico, 99 %, Sigma Chemistry

- Catequina, 99 %, Sigma Chemistry
- Quercetina, 99 %, Sigma Chemistry
- Ácido clorogénico, contenido en un extracto.
- Ácido sulfúrico  $H_2SO_4$ , concentrado, Reasol
- Fosfato de sodio monobásico  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , Reasol
- Fosfato de sodio dibásico  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , Merck
- Enzimas  $\beta$ -glucuronidasa, Roche
- Enzimas viscozyme L, Novo
- Gas Nitrógeno, ultra alta pureza, AGA.
- Gas Oxígeno, extra seco 99.5 % min. INFRA.

#### ***4.1.2 Disolventes***

- Acetato de etilo, grado reactivo.
- Acetona, grado reactivo.
- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Ácido acético, glacial.
- Ácido clorhídrico, concentrado.
- Cloroformo, grado reactivo.
- Diclorometano, grado reactivo.
- Dimetilsulfoxido, grado espectrofotométrico.
- Etanol, grado reactivo.

- Éter de petróleo, grado reactivo.
- Metanol, grado reactivo.
- Metanol, grado HPLC.

#### ***4.1.3 Reveladores y disoluciones***

**Para el análisis en cromatografía en capa fina (CCF).**

- Radical-DPPH

Solución al 0.2% en metanol: 0.2 g de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil en 100 mL de metanol.

- $\beta$ -Caroteno

Solución al 0.05% en acetona: 0.05g de  $\beta$ -Caroteno en 100 mL de acetona.

- Vainillina

Vainillina con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (80 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc + 20 mL EtOH + 0.5 g Vainillina),

- Cloruro férrico

FeCl<sub>3</sub> (1 a 5 % de FeCl<sub>3</sub> en HCl 0.5 N)

**Para el análisis espectrofotométrico**

- Radical-DPPH

Solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  $3 \times 10^{-5}$  M en Dimetilsulfóxido (DMSO).

- Agua saturada (agua destilada con burbujeo de oxígeno durante 30 min).
- $\beta$ -Caroteno  
2 mL de  $\beta$ -Caroteno al 20 % en acetona, diluidos en 25 mL de agua saturada con oxígeno.

#### **Para la hidrólisis**

- Disoluciones amortiguadoras de fosfatos 0.2 M, pH=5.0 a 25 °C

A: disolución 0.2 M de fosfato de sodio monobásico.

27.8 g de fosfato de sodio monobásico en 100 mL de agua destilada

B: Solución 0.2 M de fosfato de sodio dibásico.

71.7 g de fosfato de sodio dibásico en 100 mL de agua destilada

Se mezclan las disoluciones lentamente y con agitación hasta alcanzar un pH de 5.0

- Enzimas  $\beta$ -glucuronidasa, Roche

**Condiciones óptimas de actividad:**

Temperatura 37-45 °C, pH 5.0-5.5, 16 hr.

- Enzimas viscozyme L, Novo

**Condiciones óptimas de actividad:**

Temperatura 40-50 °C, pH 3.3-5.5, 18 hr.

#### **4.1.4 Equipo**

- Liofilizadora, Labconco freezezone 6
- Ultracongelador, temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Harris
- Rotavapor, Buchi.
- Cámara con lámpara UV con longitudes de onda de 254 y 366 nm, CAMAG.
- Espectrofotómetro Génesis 5, Milton Roy.
- Cromatógrafo de líquidos, Beckman Sistema Gold 166 con Detector UV.
- Columna Varian C-18,  $5\mu\text{m}$ ,  $4.6\text{ mm} \times 25\text{ cm}$ .

#### **4.1.5 Condiciones para HPLC**

Para la identificación y cuantificación de los compuestos y de las fracciones enriquecidas, el análisis se realizó bajo las siguientes condiciones:

Cromatógrafo de líquidos con sistema Gold 166 y detector UV, flujo inicial de 1 mL/min, bajo una composición de eluyentes (ácido acético al 10 % y acetonitrilo con gradiente de 0 a 20 %), durante un período de análisis de 40 min.

Programación del detector UV, para cambios de longitud de onda de 280 a 350 nm a los 7 min de iniciado el análisis (Lister *et al*, 1994).

### CONDICIONES DE LA BOMBA PARA EL ANÁLISIS POR HPLC

Tiempo min	Flujo mL/min	Composición	
		% A	% B
	1.00	0.0	100
0.00	1.00	20.0	80
20.00	1.00	0.0	100

A: acetonitrilo

B: ácido acético al 10 %

### CONDICIONES DEL DETECTOR PARA EL ANÁLISIS POR HPLC

Tiempo min	Longitud de onda nm	Auto cero	Detener datos	Apagado de lámpara	Alarma min
inicio	280	Sí	-	-	-
7.00	350	Sí			
40	350		Sí		1.00

#### 4.2 Obtención de la muestra

El residuo de manzana, fue proporcionado por una industria sidrera, la cual tiene sus instalaciones en Cholula, Puebla. La manzana que compone este residuo recibió un proceso de prensado (para la extracción del jugo), posteriormente fue depositada en un contenedor el cual se encuentra a la intemperie y en contacto con el piso, originalmente este residuo es utilizado como forraje.

Para fines prácticos la metodología se analiza en dos partes:

TECNOLOGÍA  
FALLA DE ORIGEN

### **4.3 Primera parte del desarrollo experimental**

Preparación de la muestra, secado por liofilización y a temperatura ambiente, extracción con disolventes de diferente polaridad, evaluación de la actividad antioxidante mediante ensayos de radical-DPPH y blanqueo con  $\beta$ -caroteno, fraccionamiento por columna y análisis por HPLC.

#### ***4.3.1 Preparación de la muestra***

En esta etapa de la investigación el secado se realizó de dos maneras diferentes (secado por liofilización y a temperatura ambiente), para hacer una comparación de la cantidad de extracto obtenido.

En el secado por liofilización, el residuo de manzana fue congelado en un ultracongelador, a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por un período de 6 hr posteriormente se realizó un proceso de liofilización, una vez seca la muestra se hizo una reducción de tamaño mediante una trituración manual pasándola por una malla del número 10, obteniendo finalmente un tamaño de partícula más uniforme. Para el secado a temperatura ambiente la muestra se colocó en una mesa, sobre papel absorbente, removiendo el bagazo cada dos horas y durante 1 día. Después del tiempo transcurrido se le realizó una extracción como a continuación se indica.

### **4.3.2 Extracción**

Con el fin de obtener un extracto enriquecido con compuestos que presentarán actividad antioxidante, se realizaron algunas variaciones a una técnica de extracción ya establecida, la cual fue aplicada a la muestra con diferentes tipos de secado. En la extracción se realizó una comparación entre dos métodos, a reflujo con agitación durante 3 hr y a temperatura ambiente en reposo durante 24 hr.

En ambos casos la extracción se realizó de forma consecutiva, utilizando 4 disolventes de diferente polaridad (éter de petróleo, acetona, etanol y agua), con el fin de separar la fracción lípida, pigmentos y obtener fracciones enriquecidas con compuestos que presenten actividad antioxidante, los extractos se obtuvieron de la siguiente manera:

Se pesaron 500 g de residuo de manzana de ambos métodos de secado, por separado se colocaron en un matraz bola de fondo plano, adicionando éter de petróleo hasta que el disolvente cubriera por completo la muestra (2 L), se llevó a cabo una maceración y se dejó la muestra en reposo por 24 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró a través de un embudo de tallo largo, el filtrado se separó para concentrarlo por evaporación y obtener el extracto etéreo. Los extractos de acetona, etanol y agua se obtuvieron de igual forma y éstos se llevaron a sequedad en un rotavapor con baño de agua a una temperatura de 60 °C. El extracto acuoso se liofilizó para eliminación del agua.

### **4.3.3 Análisis del extracto etéreo**

El extracto obtenido con éter de petróleo fue analizado por separado, se le realizaron pruebas cromatográficas en capa fina (placas de sílica gel), mezcla de cloroformo, acetato de etilo y ácido acético 50:50:1 (fase móvil), utilizando como reveladores Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>, las placas que contienen el extracto etéreo son impregnadas con estos reveladores por separado, se colocan en una parrilla a una temperatura de 110 a 120 °C durante un tiempo de 10-20 min. La coloración obtenida por el compuesto es comparada con resultados informados en la literatura, para la identificación de compuestos fenólicos (Yan *et al*, 1998).

### **4.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos**

Las evaluaciones siguientes, sólo se le aplicaron a los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua. Por considerar que la extracción con éter de petróleo, en principio fue realizada para eliminar la fracción lipídica contenida en la manzana, siendo que el análisis del extracto etéreo que se menciona en la sección anterior, es sólo para constatar la presencia de algunos compuestos, pero no con el fin de aislarlos.

#### **4.3.4.1 Evaluación cualitativa (cromatografía en capa fina)**

Se colocó una alícuota, por medio de un capilar, de cada uno de los extractos (acetónico, etanólico y acuoso), sobre una placa de celulosa microcristalina de 3.0 x 5.0 cm (fase estacionaria), procurando que la muestra quede con un  $R_f=0.5$  cm por arriba de la parte inferior de la placa y con una separación entre las muestras de 1 cm, como fase móvil se utilizó una mezcla de diclorometano-metanol en una proporción de 6:4, una vez eluida la placa se aplicaron las siguientes pruebas:

a) reducción de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) radical. Las cromatoplasmas son asperjadas con una disolución de radical-DPPH al 0.2 % en metanol.

La presencia de manchas amarillas en contra de un fondo púrpura, indican la presencia de compuestos con capacidad secuestrante.

b) blanqueo con  $\beta$ -caroteno. Las cromatoplasmas son asperjadas con una disolución de  $\beta$ -caroteno al 0.05 % en acetona, a las cuales se les hace incidir luz ultravioleta por 15 min.

La presencia de manchas amarillas en contra de un fondo blanco, confirman el contenido de compuestos con actividad antioxidante en los extractos analizados.

#### 4.3.4.2 Evaluación cuantitativa (análisis espectrofotométrico)

##### 4.3.4.2.1 Evaluación de la actividad secuestrante del radical-DPPH

Como ya se mencionó en la sección anterior, el radical-DPPH en su forma oxidada es de color púrpura, cuando éste es reducido toma una coloración amarilla, lo que permitió su análisis espectrofotométrico de la siguiente manera (tabla 4.1). En una serie de 4 tubos de ensayo se realizaron las siguientes reacciones: en el primer tubo (Ai) se colocó 1 mL de extracto del residuo de manzana (200 ppm en metanol), con 1 mL de solución de radical-DPPH  $3 \times 10^{-5}$  M en dimetilsulfóxido (DMSO). Al segundo tubo (Aj) se le adicionó 1 mL del mismo extracto con 1 mL de DMSO. Al tercer tubo (Ac) se le agregó 1 mL de la solución de DPPH y 1 mL de DMSO. Al cuarto tubo (blanco) se le adicionaron 2 mL de DMSO.

Tabla 4.1 Evaluación de la actividad secuestrante del radical-DPPH

Reactivo	Tubo 1 Ai	Tubo 2 Aj	Tubo 3 Ac	Tubo 4 blanco
Extracto (200 ppm)	1 mL	1 mL	—	—
DMSO	—	1 mL	1 mL	2 mL
r-DPPH ( $3 \times 10^{-5}$ M) en DMSO	1 mL	—	1 mL	—

Los tubos de la serie anterior fueron burbujeados con gas nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto y generar una atmósfera inerte, se dejaron en reposo durante un tiempo de reacción de 60 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 517 nm.

Se utilizaron como patrones de referencia antioxidantes comerciales sintéticos y naturales: BHA, TBHQ, catequina, quercetina, ácidos ferúlico y clorogénico, (las series se realizaron por triplicado).

De las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de actividad secuestrante del radical-DPPH de la siguiente manera (Yan *et al*, 1998).

$$\% \text{ actividad secuestrante del radical} = \left[ 1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100$$

Donde:

$A_i$  = Absorbancia del extracto mezclado con la solución de DPPH.

$A_j$  = Absorbancia del mismo extracto mezclado con DMSO.

$A_c$  = Absorbancia de la solución de radical-DPPH con DMSO.

#### **4.3.4.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante blanqueo con $\beta$ -caroteno**

El ensayo de blanqueo con  $\beta$ -caroteno confirma la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Se realizó mediante una serie de 3 tubos de ensayo donde se

llevaron a cabo las siguientes reacciones (tabla 4.2), en el primer tubo (muestra) se ponen 5 mL de solución de  $\beta$ -caroteno, se agregan 0.2 mL de extracto (200 ppm en metanol), en el segundo tubo (control) se ponen 5 mL de solución de  $\beta$ -caroteno y 0.2 mL de metanol, en el tercer tubo (blanco) se ponen 0.2 mL de metanol y 5 mL de agua saturada con oxígeno. Se determina la absorbancia al inicio de la reacción (absorbancia 0 min), los tubos son tapados y colocados en un baño de agua a una temperatura de 50 °C durante 120 minutos, ya que ha concluido el tiempo, se determina la absorbancia a 470 nm (Moure *et al.*, 2000).

Tabla 4.2 Ensayo de blanqueo con  $\beta$ -caroteno

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Solución $\beta$ -caroteno	5 mL	5 mL	—
Metanol	—	0.2 mL	0.2 mL
Extracto (200 ppm)	0.2 mL	—	—
Agua (burbujeada con oxígeno)	—	—	5 mL

La disolución de  $\beta$ -caroteno se preparó con 2 g de  $\beta$ -caroteno al 99 %, en 10 mL de cloroformo, haciendo una emulsión con ácido linoleico y Tween 80, con posterior eliminación del cloroformo y adición de agua saturada (agua destilada con burbujeo de oxígeno durante 30 min).

Se utilizaron como patrones de referencia antioxidantes comerciales sintéticos y

naturales: BHA, TBHQ, catequina, quercetina, ácidos ferúlico y clorogénico, (las series se realizaron por triplicado).

De las absorbancias obtenidas se calculó el por ciento de actividad antioxidante mediante blanqueo con  $\beta$ -caroteno de la siguiente manera.

$$\% \text{ de actividad antioxidante} = \left[ \frac{A_f - A_{c_2}}{A_o - A_{c_2}} \right] \times 100$$

Donde:

$A_f$  = absorbancia del extracto a los 120 minutos

$A_{c_2}$  = absorbancia del control a los 120 minutos

$A_o$  = absorbancia del control a los 0 minutos (inicio de la reacción)

#### ***4.3.4.3 Fraccionamiento por cromatografía en columna***

Al extracto que presento mayor actividad (extracto etanólico) de acuerdo a las pruebas de radical-DPPH y blanqueo con  $\beta$ -caroteno, se le realizó un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, empleando celulosa microcristalina como fase estacionaria, en una columna de 5 cm de diámetro y 25 cm de largo, la elución se realizó utilizando un gradiente de diclorometano-metanol como fase móvil.

Con una muestra inicial de 6.0376 g de extracto etanólico, se recolectaron 180 fracciones de 25 mL, las cuales fueron evaluadas por cromatografía en capa fina (placas de celulosa), empleando como reveladores radical-DPPH y sulfato cérico, para reunir las fracciones idénticas. Las fracciones con actividad antioxidante fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) posteriormente.

#### ***4.3.4.4 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)***

Basados en estudios informados en la literatura y con fin de identificar los compuestos y fracciones enriquecidas obtenidas de la separación por cromatografía en columna se realizó el análisis para la identificación y cuantificación de los compuestos y de las fracciones enriquecidas, que fueron llevadas a una concentración de 1 mg/mL y utilizando estándares comerciales (catequina, quercetina y un extracto que contenía ácido clorogénico), como patrones de referencia bajo las siguientes condiciones:

Cromatógrafo de líquidos con sistema Gold 166 y detector UV, flujo inicial de 1 mL/min, con una composición de eluyentes (ácido acético al 10 % y acetonitrilo con gradiente de 0 a 20 %), durante un período de análisis de 40 min.

Programación del detector UV, para cambios de longitud de onda de 280 a 350 nm a los 7 min de iniciado el análisis (Lister *et al*, 1994).

Dado que los compuestos de interés se encuentran como glicósidos y en la primera

etapa del desarrollo experimental, sólo fue posible obtener fracciones enriquecidas, se decidió hidrolizar el extracto etanólico para separar los aglicones de su estructura original.

#### **4.4 Segunda parte del desarrollo experimental**

Hidrólisis química y enzimática, fraccionamiento por columna, identificación y cuantificación de los compuestos con actividad antioxidante mediante el análisis por HPLC.

Si bien es cierto, que la hidrólisis química es una reacción que puede ocasionar la pérdida de los compuestos buscados, e inclusive provocar reacciones de Maillard, debido a la cantidad de carbohidratos que contiene la muestra y por la concentración del ácido clorhídrico utilizado, ésta fue realizada para comparar la calidad y cantidad del producto hidrolizado en ambos métodos.

##### ***4.4.1 Hidrólisis química***

Para la realización de este método, se disolvió 1 g de extracto etanólico en 10 mL de agua destilada se agregaron 10 mL de HCl 1.2 N (HCl en 50% de metanol), manteniéndose la reacción en un baño de agua a una temperatura de 80 °C por

un período de 3 hr. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se realizó una extracción líquido-líquido de la fase acuosa con acetato de etilo. La fase orgánica se concentró y llevó a sequedad para posterior análisis por HPLC.

#### ***4.4.2 Hidrólisis enzimática***

Esta hidrólisis se realizó con extractos naturales que presentan actividad de  $\beta$ -glucosidasa (semilla de capulín y durazno, cuya extracción se menciona en la sección 4.4.2.1) y con enzimas comerciales  $\beta$ -glucuronidasa y Viscozyme L, bajo las siguientes condiciones: se disolvió 1 g de extracto en 10 mL de disolución amortiguadora de fosfatos, pH =5.0, se agregaron 0.25 mL de enzima, manteniéndose en agitación la reacción en un baño de agua a una temperatura de 40 °C por un período de 16 hr, se realizó una extracción líquido-líquido de la fase acuosa con acetato de etilo. La fase orgánica se concentró y llevó a sequedad para posterior análisis por HPLC.

##### ***4.4.2.1 Obtención de extractos de capulín y durazno con actividad enzimática***

El extracto con actividad enzimática se obtuvo mediante una extracción consecutiva, donde 10 g de semilla (almendra) triturada se maceraron en 70 mL de éter de petróleo, dejándolos en reposo por 24 hr a temperatura ambiente, se

filtró y concentró, para la obtención del extracto etéreo, al residuo de semilla se le agregaron 70 mL de acetona bajo las mismas condiciones. El extracto acetónico obtenido fue utilizado para hidrolizar enzimáticamente al extracto etanólico de la muestra inicial de bagazo, bajo las condiciones que se mencionaron en la sección 4.4.2.

#### ***4.4.3 Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto hidrolizado***

Una vez determinadas las condiciones para la obtención del mejor hidrolizado, a la fase orgánica, se le realizó un fraccionamiento por medio de cromatografía en columna, con el fin de separar y purificar los compuestos con actividad antioxidante.

Para tal propósito se utilizó sílica gel (fase estacionaria), una columna de 3 cm de diámetro y 20 cm de largo, la elución se realizó utilizando un gradiente con acetato de etilo-metanol como fase móvil.

Con una muestra inicial de 3.0167 g de extracto hidrolizado, se recolectaron 129 fracciones de 25 mL, las cuales fueron evaluadas por cromatografía en capa fina (placas de sílica gel), empleando como reveladores radical-DPPH y sulfato cérico, para reunir las fracciones idénticas. Las fracciones con actividad antioxidante fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) posteriormente.

## **5 RESULTADOS Y ANÁLISIS**

En el presente trabajo de investigación, se utilizó bagazo de manzana proveniente de una industria sidrera, la cual para la extracción del jugo de este fruto, aplica un proceso de prensado quedando el residuo hasta con un 70 % de humedad, por lo que es necesario realizar un proceso de secado. Este se hizo de dos maneras; Para una adecuada manipulación de la muestra.

### **5.1 Secado y obtención de extractos**

En la primera etapa del desarrollo experimental, el secado del bagazo se realizó utilizando dos metodologías, basados en estudios previos realizados a la cáscara de manzana, donde se utiliza el secado por liofilización (Mayr *et al*, 1994) y extracción directa de los compuestos sin secado previo, sólo eliminación del exceso de agua en la muestra (Dick *et al*, 1987). En estos estudios no se informa de los rendimientos del extracto, por lo que se decidió probar ambos métodos y hacer una comparación entre estos, determinando si el tratamiento efectuado influye en la cantidad de extracto obtenido.

Dado que no hay un método general de extracción para la obtención de antioxidantes el método propuesto consistió en realizar extracciones consecutivas, utilizando disolventes de diferente polaridad (éter de petróleo, acetona, etanol y

agua), los cuales permitieron retener fracciones lípidicas, pigmentos y compuestos con actividad antioxidante.

En la tabla 5.1 se presentan los rendimientos obtenidos de la extracción efectuada a las muestras secadas por liofilización y a temperatura ambiente, donde se puede observar el secado que proporcionó mayor cantidad de extracto para los diferentes disolventes utilizados.

**Tabla 5.1** Rendimiento de los extractos a diferentes condiciones, con una muestra inicial de 500 g de bagazo de manzana

	<b>Secado por liofilización</b>	<b>Secado a temperatura ambiente</b>
Extracto obtenido con	gramos obtenidos	gramos obtenidos
Éter de petróleo	3.0270	5.9260
Acetona	32.2748	50.6780
Etanol	93.6511	160.8007
Agua	22.5687	26.1781

La muestra secada a temperatura ambiente (eliminación del exceso de agua) proporciona una mayor cantidad de extracto, posiblemente por que se conjugaron

los disolventes utilizados con el agua que aun contenía la muestra, aumentando la polaridad en la extracción y permitiendo la retención de una mayor cantidad de compuestos con actividad antioxidante. Por lo que se decidió utilizar este procedimiento para eliminar el exceso de agua en el residuo de manzana y realizar la extracción con los diferentes disolventes, considerándolo un método rápido y sencillo que no requiere de equipo sofisticado para su realización.

Dentro del proceso de extracción se realizó una prueba comparativa adicional, la cual consistió en hacer la extracción a temperatura ambiente, en reposo por 24 hr y una extracción a reflujo con agitación durante 3 hr, utilizando los mismos disolventes. Como no se encontraron diferencias considerables en cuanto a la cantidad de extracto obtenido, se decidió utilizar la extracción a temperatura ambiente en reposo por 24 hr para evitar un posible daño de los compuestos de interés, en la extracción a reflujo.

Una vez obtenidos los extractos, se procedió al análisis de estos. Cabe aclarar que en un principio la obtención del extracto etéreo era sólo para desengrasar la muestra, pero debido a que se encontró en la literatura estudios sobre el contenido ácido *p*-cumárico y algunos ésteres (*E-p*-cumarato y *Z-p*-cumarato) en esta fracción, los cuales fueron identificados por HPLC, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (Whitaker *et al*, 2001), por lo que se decidió analizar este extracto por separado.

Al extracto obtenido con éter de petróleo no se le efectuaron las pruebas realizadas por Whitaker para identificar a los ésteres del ácido mencionado, por que a pesar de que presentan actividad antioxidante, no son compuestos que se encuentren en mayor proporción en la manzana; por lo que sólo era de interés, el comprobar la presencia de este ácido, para lo cual se realizaron pruebas cualitativas en cromatografía en capa fina, que permitieron la comparación de los ensayos, basados en un estudio previo donde se informa de la caracterización de fenoles tales como ácido *p*-cumárico (Prakash *et al*, 1998).

## **5.2 Análisis del extracto etéreo**

El extracto etéreo fue analizado independientemente de los extractos de acetona, etanol y agua.

Al extracto obtenido con éter de petróleo se le realizaron pruebas cromatográficas en capa fina, utilizando como reveladores vainillina-ácido sulfúrico y cloruro férrico. Los resultados de las cromatoplasmas (figura 5.1) obtenidas utilizando estos reveladores, fueron comparados con datos informados en la literatura, donde se detectaron compuestos fenólicos mediante estas pruebas.

La muestra del extracto etéreo contenida en las cromatoplasmas, adquirió una coloración bien definida, en la reacción con vainillina-ácido sulfúrico (púrpura claro), y en la prueba con cloruro férrico (naranja).

FeCl<sub>3</sub>

Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



**Figura 5.1** Cromatografía en capa fina del extracto etéreo para detectar compuestos fenólicos

Los resultados son comparados con los datos de la tabla 5.2, donde se informa de la coloración que adquirieron algunos compuestos fenólicos analizados con las mismas pruebas (Prakash *et al.*, 1998), lo cual permitió comparar ambos resultados. Tomando los datos de esta tabla como referencia, las pruebas de vainillina-ácido sulfúrico y cloruro férrico son positivas para el ácido *p*-cumárico y considerando los estudios previos realizados al extracto etéreo, donde se identificaron por cromatografía de líquidos, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, ácido *p*-cumárico y dos ésteres pertenecientes a este ácido (Whitaker *et al.*, 2001). Se confirma que este compuesto se encuentra en el extracto obtenido con éter de petróleo.

A esta fracción sólo se le realizaron las pruebas cualitativas en cromatografía en capa fina mencionadas, y los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua fueron analizados mediante otros ensayos.

**Tabla 5.2** Compuestos fenólicos simples detectados mediante la coloración que se produce con las pruebas de cloruro férrico y vainillina-ácido sulfúrico (Prakash *et al*, 1998) Utilizada como referencia para el análisis del extracto etéreo.

Compuesto	Detección	
	Cloruro Férrico	Vainillina-ácido sulfúrico
Ácido gálico	Púrpura	Púrpura claro*
Galato de metilo	Púrpura	Púrpura claro*
Pirogalol	Verde azulado	Rosa
Floroglucinol	Magenta	Naranja
Catecol	Azul	Púrpura
Resorcinol	Magenta	Rosa
Hidroquinona	Magenta	Amarillo claro*
Catequina	Verde azulado	Naranja
Epicatequina	Verde azulado	Naranja
Ácido p-cumárico	Naranja	Púrpura claro*
Ácido cinámico	Amarillo	No determinado

\*aplicación de temperatura para que se lleve a cabo la reacción 110-120 °C por 10-20 min

### **5.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos**

A los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua, se les realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas mediante ensayos con:

Radical-DPPH, el cual esta basado en la capacidad secuestrante del radical, donde el reactivo es reducido por la muestra en estudio, observándose una decoloración de púrpura a amarillo.

Blanqueo con  $\beta$ -caroteno, basado en la actividad antioxidante de la muestra (en este caso los extractos), protegiendo al caroteno de ser oxidado al ser expuesto a la luz ultravioleta, observándose en este ensayo la inhibición del color amarillo.

Después de la realización de los ensayos se llevó a cabo una comparación de la actividad que presentaron los extractos entre sí y con antioxidantes comerciales, con el fin de seleccionar el extracto que presentó mayor actividad secuestrante y antioxidante, para proceder a su purificación.

#### ***5.3.1 Evaluación cualitativa (cromatografía en capa fina)***

Los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua, se evaluaron cualitativamente, empleando los ensayos de radical-DPPH y blanqueo con  $\beta$ -caroteno como reveladores, aplicados a cromatografía en capa fina (CCF), se realizaron pruebas con silica gel y celulosa microcristalina, observándose una mejor resolución de los

compuestos en la evaluación con esta última, por lo que se decidió trabajar con placas de celulosa microcristalina como fase estacionaria, para la elección de la fase móvil se realizaron varias pruebas con sistemas de elución diferentes, seleccionando finalmente una mezcla de diclorometano-metanol en una proporción de 6:4, con la que se obtuvo una mejor resolución de los componentes contenidos en los extractos (figura 5.2 y 5.3).



Figura 5.2

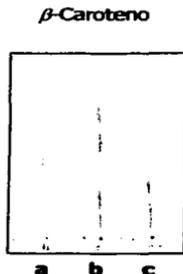


Figura 5.3

Donde:

- a = Extracción con acetona
- b = Extracción con etanol
- c = Extracción con agua

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La figura 5.2 muestra la cromatoplaaca donde se encuentran los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua, a la cua! se le realizó el ensayo de reducción de radical-DPPH. Las manchas de color amarillo en contra de un fondo púrpura, nos indican la presencia de compuestos con capacidad secuestrante, debido a que el radical-DPPH ha sido reducido. En la cromatoplaaca se observa que los extractos obtenidos con acetona (a) y etanol (b), presentan una mayor actividad debido a que estos disolventes retuvieron una mayor cantidad de antioxidantes polares, esto fue reflejado en la intensidad de las manchas amarillas de la cromatoplaaca.

La figura 5.3 pertenece al ensayo de blanqueo con  $\beta$ -caroteno, el cual confirma la actividad antioxidante de la muestra en estudio. En esta cromatoplaaca podemos observar manchas de color amarillo en contra de un fondo blanco, lo que nos indica que él  $\beta$ -caroteno se oxida y pierde su coloración, mientras que los compuestos con actividad contenidos en los extractos inhiben la oxidación del caroteno, manteniéndose las manchas amarillas.

Las pruebas cualitativas realizadas mostraron que los tres extractos contienen compuestos con actividad secuestrante y antioxidante, ya que dieron positivos los ensayos practicados, extrayéndose antioxidantes más polares con acetona y etanol, lo que se vio reflejado en las diferentes zonas de elución que presentaron las cromatoplacas que contenían a los extractos (observándose varios compuestos con actividad). Pero para determinar con precisión en cual de los extractos se encuentra la mayor cantidad de compuestos con actividad fue necesario realizar pruebas cuantitativas.

### **5.3.2 Evaluación cuantitativa (análisis espectrofotométrico)**

Los reactivos de radical-DPPH y  $\beta$ -caroteno tienen la ventaja de ser compuestos cromóforos, lo que permitió su análisis espectrofotométrico.

#### ***5.3.2.1 Evaluación de la actividad secuestrante con radical-DPPH***

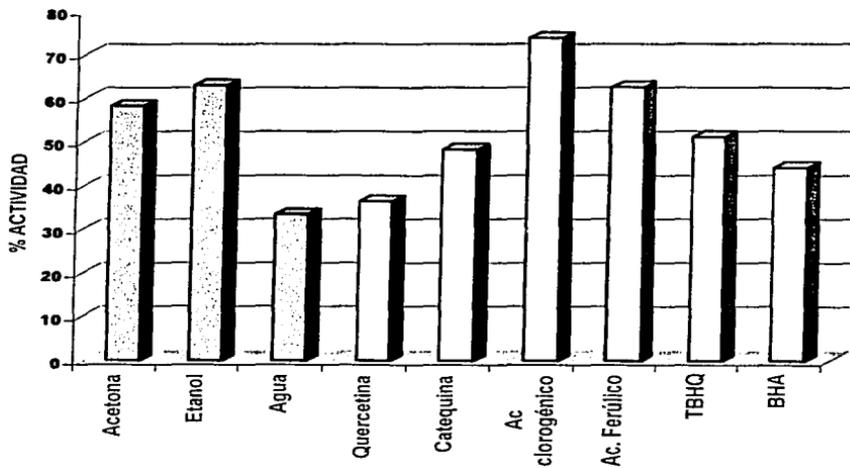
El radical-DPPH en su forma oxidada es de color púrpura, cuando este es reducido por un compuesto o extracto con capacidad secuestrante, adquiere una coloración amarilla.

La evaluación cuantitativa de los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua, se llevó a cabo en una serie de cuatro tubos de ensayo, donde se realizaron reacciones con los diferentes extractos del residuo de manzana y algunos antioxidantes comerciales (200 ppm), con una disolución de radical-DPPH en dimetilsulfóxido, como se indica en la sección 4.3.4.2.1.

Se calculó el porcentaje de actividad secuestrante, de los extractos de acetona (58.2 %), etanol (62.9 %) y agua (33.4%), así como de los antioxidantes comerciales utilizados, quercetina (36.4 %), catequina (48.2%), TBHQ (51.1 %), BHA (44.1 %), ácidos clorogénico (73.7 %) y ferúlico (62.5 %), los cuales son representados en el gráfico 5.1.

Todas las muestras analizadas se llevaron a una concentración de 200 ppm, de acuerdo con los niveles máximos permitidos por la FDA (Food and Drug Administration) y por la Secretaría de Salud, para antioxidantes en alimentos.

Estos antioxidantes fueron seleccionados, para hacer una comparación entre los extractos, compuestos naturales y sintéticos, y por el hecho de que antioxidantes como quercetina, catequina y ácido clorogénico se encuentran en mayor proporción en la manzana (Wieslaw *et al*, 1988).



**Gráfico 5.1** Comparación de la actividad secuestrante del radical-DPPH en los extractos y algunos antioxidantes comerciales, a una concentración de 200 ppm

De acuerdo al gráfico 5.1, los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras mediante el ensayo del radical-DPPH, muestran que el extracto obtenido con etanol retuvo una mayor cantidad de antioxidantes, esto se vio reflejado al obtener una mayor actividad secuestrante con este extracto, en comparación con los extractos obtenidos con acetona y agua, en cuanto a los antioxidantes comerciales utilizados los ácidos clorogénico y ferúlico son los que presentaron mayor actividad secuestrante.

#### ***5.3.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante blanqueo con $\beta$ -caroteno***

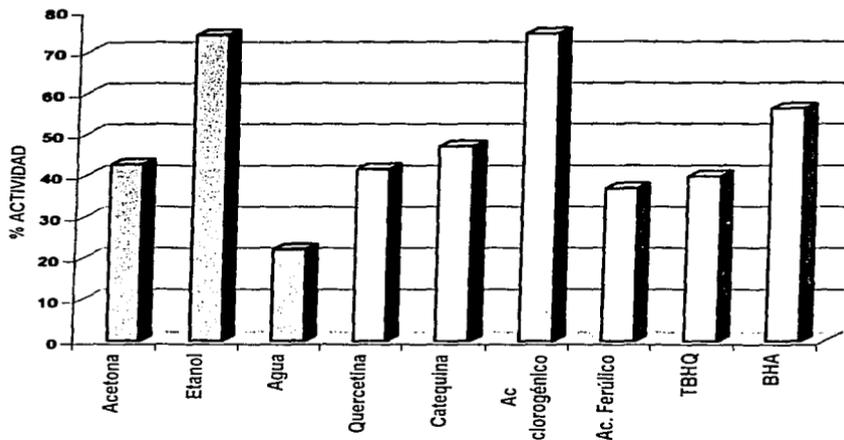
La evaluación cuantitativa que se realizó con  $\beta$ -caroteno, confirma la actividad antioxidante de los extractos.

La evaluación cuantitativa de los extractos obtenidos con acetona, etanol y agua, se llevó a cabo en una serie de tres tubos de ensayo, donde se realizaron reacciones con los diferentes extractos del residuo de manzana y algunos antioxidantes comerciales, con una disolución de  $\beta$ -caroteno, como se indica en la sección 4.3.4.2.2.

Los resultados de la evaluación de actividad antioxidante para este ensayo, fueron los siguientes: extracto obtenido con acetona (42.7 %), etanol (74 %), agua (22.1 %), y para los antioxidantes comerciales como quercetina (41.5 %), catequina (47 %), ácido clorogénico (74.3 %), ácido ferúlico (36.8%), TBHQ (39.77 %) y BHA

(56.1 %), los cuales son representados en el gráfico 5.2.

También para este ensayo todas las muestras analizadas se llevaron a una concentración de 200 ppm, de acuerdo con los niveles máximos permitidos por la FDA (Food and Drug Administration) y por la Secretaría de Salud, para antioxidantes en alimentos.



**Gráfico 5.2** Comparación de la actividad antioxidante mediante blanqueo con  $\beta$ -caroteno de los extractos y algunos antioxidantes comerciales, a una concentración de 200 ppm.

De acuerdo al gráfico, los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antioxidante mediante blanqueo con  $\beta$ -caroteno, confirman que el extracto obtenido con etanol presentó una mayor actividad, en comparación con los extractos de acetona y agua, en cuanto a los antioxidantes comerciales utilizados, el ácido clorogénico presentó mayor actividad.

Los gráficos 5.1 y 5.2 muestran el resultado de las pruebas cuantitativas, donde se pudo constatar que para los ensayos con radical-DPPH y blanqueo con  $\beta$ -caroteno, el extracto obtenido con etanol contiene antioxidantes más activos, presentando un mayor porcentaje de actividad sequestrante y antioxidante en comparación con los extractos obtenidos con acetona y agua, siendo también mayor su actividad que la que presentaron la mayoría de los antioxidantes comerciales utilizados (catequina, quercetina, ácido ferúlico, TBHQ y BHA).

Cabe mencionar que los extractos crudos pudieron presentar mayor actividad, debido al efecto sinérgico de los compuestos antioxidantes que se encuentran en estas fracciones.

Basados en estos resultados se decidió trabajar con el extracto etanólico, para la separación y purificación de los compuestos que presentan actividad antioxidante.

#### **5.4 Fraccionamiento de los componentes por columna**

Una vez determinado y seleccionado el extracto con mayor actividad (extracto obtenido con etanol), se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, con el fin de separar y purificar los compuestos antioxidantes que se encontraran en mayor proporción.

El fraccionamiento se realizó utilizando una columna de 5 cm de diámetro y 20 cm de largo, celulosa microcristalina como fase estacionaria (observándose una mejor resolución en cromatografía en capa fina), como fase móvil se utilizó un gradiente de elución con diclorometano-metanol, obteniéndose 180 fracciones de 25 mL cada una, las cuales fueron evaluadas en cromatografía en capa fina utilizando radical-DPPH y sulfato cérico como reveladores, para comparar los tiempos de retención de los compuestos y reunir las fracciones idénticas, quedando con XIV fracciones (tabla 5.3), de las cuales sólo cuatro (III, VII, X y XII) presentan actividad antioxidante de acuerdo a la evaluación con radical-DPPH.

Las fracciones que presentaron actividad antioxidante fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con el fin de identificar los compuestos contenidos en estas fracciones (Lister *et al*, 1994).

**Tabla 5.3** Fracciones de la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol

Fracciones eluidas	Fracciones finales	Fracciones con actividad
1-10	I	—
11-16	II	—
17-18	III	*
19-22	IV	—
23-44	V	—
45-50	VI	—
51-56	VII	*
57-68	VIII	—
69-77	IX	—
78-92	X	*
93-132	XI	—
133-150	XII	*
151-159	XIII	—
160-180	XIV	—

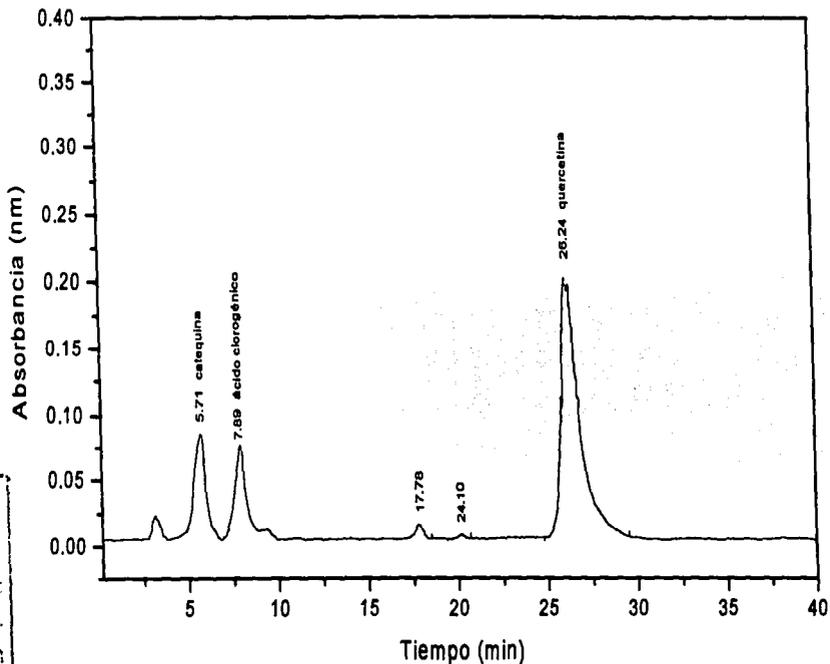
(\*) fracciones con actividad antioxidante  
 (—) fracciones que no presentan actividad

### 5.5 Separación e identificación por HPLC

Para poder hacer el análisis de las fracciones que presentaron actividad obtenidas en la cromatografía en columna, se utilizaron estándares comerciales de quercetina, catequina y un extracto que contiene ácido clorogénico, por ser compuestos con actividad antioxidante que se encuentran en mayor proporción en la manzana (Wieslaw *et al*, 1988).

Las muestras comerciales fueron utilizadas como patrones de referencia en el análisis de las fracciones eluidas.

## Análisis por HPLC de la mezcla de antioxidantes comerciales



**Gráfico 5.3** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene una mezcla de estándares comerciales (catequina ácido clorogénico y quercetina) utilizados como patrones de referencia

CON  
FALTA DE ORIGEN

**Tabla 5.4** Registros de las señales obtenidas en el cromatograma perteneciente a la mezcla de estándares.

<b>Estándar</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>	<b>Concentración mg/mL</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
catequina	5.71	1	280
ácido clorogénico	7.89	1	280
quercetina	26.24	1	350

Los tiempos de retención que registran las señales obtenidas en el cromatograma, fueron utilizados como patrón de referencia, para la identificación de los compuestos contenidos en las fracciones que sé eluyeron en la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol y que presentaron actividad antioxidante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **5.5.1 Compuestos glicosilados presentes en el extracto obtenido con etanol**

Como ya se mencionó en los antecedentes, algunos de los compuestos de la manzana, que presentan actividad antioxidante son flavonoides, y estos se encuentran como glicósidos, también sabemos que estos no se comercializan como tales, sino como aglicones, por lo que no es posible identificar las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna, con el registro de la mezcla de estándares (ácido clorogénico, catequina y quercetina), siendo necesario recurrir a otro patrón de referencia.

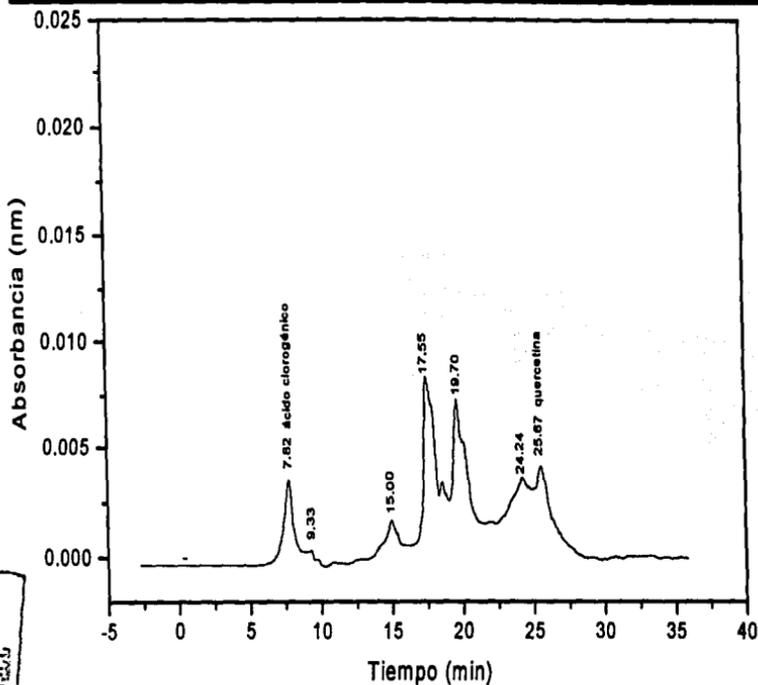
Se decidió considerar un estudio informado en la literatura (Lister *et al*, 1994), en el cual el análisis efectuado, muestra la caracterización de los compuestos glicosilados de la manzana, del mismo modo se presentan los tiempos de retención obtenidos en el análisis por HPLC (tabla 5.5). Estos datos fueron usados como patrón de referencia, considerando que el análisis efectuado a las fracciones de la cromatografía en columna, se realizó bajo las mismas condiciones.

**Tabla 5.5** Tiempos de retención obtenidos de la literatura (Lister *et al*, 1994) Utilizados como referencia para identificación de los compuestos glicosilados

Antocianidinas, glicósidos de quercetina y proantocianidina contenidos en la fruta de la manzana		
Flavonoide	Tiempo de retención (min)	$\lambda$ max (nm)
Catequina	5.9	280
Procianidina B <sub>2</sub>	6.6	280
Acido clorogénico	8.8	280
Epicatequina	11.9	280
Galocatequina	13.9	280
Dihidroquercetina	17.6	280
Proantocianidina B <sub>5</sub>	19.6	280
3-galactosido de cianidina	19.9	530
3-galactosido de quercetina	22.2	350
3-ramnoglucosido de quercetina	22.5	350
3-glucosido de quercetina	22.8	350
3-xilosido de quercetina	23.6	350
3-arabinopiranosido de quercetina	24.3	350
3-arabinosido de quercetina	24.6	350
3-ramnosido de quercetina	25.4	350
Flordizina	27.1	280

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis efectuado al extracto crudo y a las fracciones de la cromatografía en columna que presentaron actividad antioxidante.

## Análisis por HPLC del extracto crudo obtenido con etanol



**Gráfico 5.4** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene el extracto crudo del bagazo de manzana obtenido con etanol

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Tabla 5.6** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del extracto crudo obtenido con etanol.

Extracto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
ácido clorogénico	7.82	28.68	280
---	17.55	---	350
---	15.00	---	350
---	19.70	---	350
quercetina	25.67	2.41	350

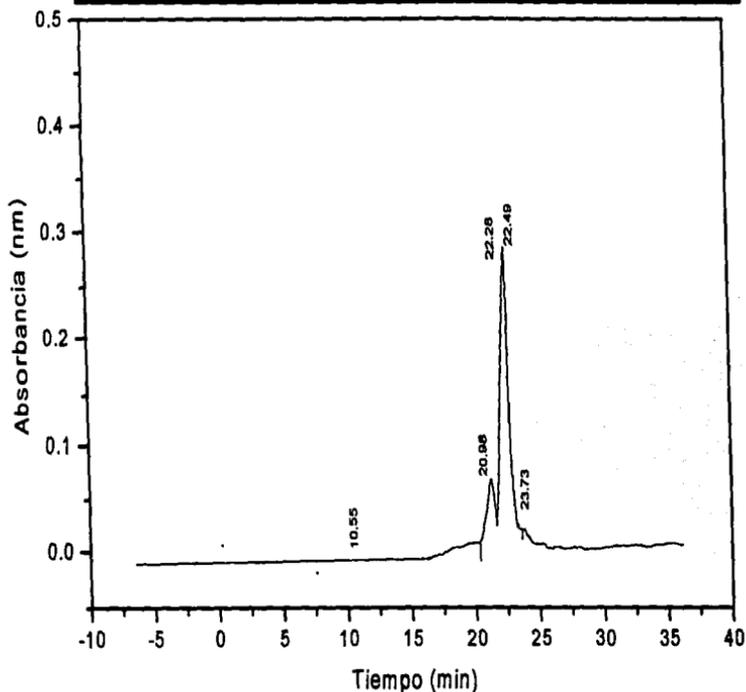
El extracto obtenido con etanol de la muestra de bagazo de manzana, fue analizado después de su concentración y sin aplicarle ningún proceso de purificación. Este análisis se realizó para determinar los compuestos en el extracto crudo (gráfico 5.4), observándose en el cromatograma señales identificadas de acuerdo a los registros obtenidos para los estándares utilizados, a los compuestos pertenecientes a ácido clorogénico y quercetina. Esto concuerda con los datos informados en la literatura, donde se identificaron glicósidos de quercetina y ácido clorogénico, pero no así con otros compuestos como catequina (no presenta señal en 5.7 min), epicatequina y proantocianidina que también fueron identificados en

FAJAS CON  
**FALLA DE ORIGEN**

estudios previos (Wieslaw *et al*, 1988 y Lister *et al*, 1994), realizados al extracto con metanol obtenido de la cáscara de manzana, y que no se detectaron en el extracto obtenido con etanol. Posiblemente por que estos compuestos no fueron retenidos en este disolvente, o por que las concentraciones de estos componentes fueron bajas y no se alcanzan a detectar.

En el gráfico 5.4 se observa que para la cuantificación de la quercetina, se presentó interferencia de la señal de 24.24 min, además de observarse señales con poca resolución debido a la naturaleza de la muestra analizada (extracto crudo).

## Análisis por HPLC (fracción III con actividad antioxidante)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Gráfico 5.5** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene la fracción III (eluciones 17-18 de la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol)

**Tabla 5.7** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción III) del extracto obtenido con etanol.

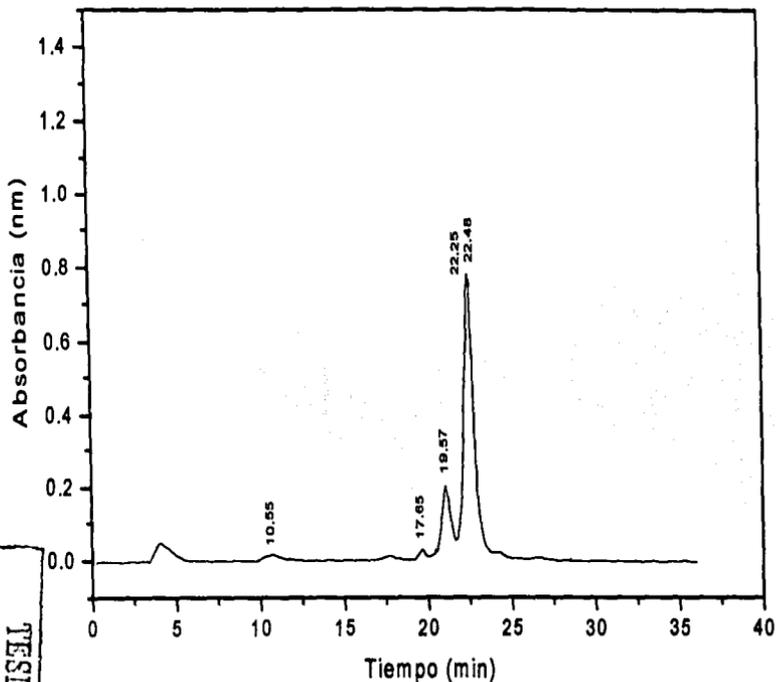
Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
---	20.98	---	350
---	22.28	---	350
---	22.49	---	350
---	23.73	---	350

Como se puede observar en el gráfico 5.5, las señales que presenta el cromatograma pertenecientes a los tiempos de retención de:

22.28 min corresponde al compuesto 3-galactosido de quercetina, con tiempo de retención de 22.2 min de acuerdo a los datos que se presentan en la tabla 5.5. Este compuesto se encuentra en una concentración de 243.59 mg/g, en la literatura se han informado concentraciones de 160-840 mg/g de muestra, las cuales son dependientes del grado de maduración del fruto (Lister *et al*, 1994).

La señal en 22.49 min puede corresponder al compuesto identificado como 3-ramnoglucosido de quercetina, el cual presenta un tiempo de retención de 22.5 min de acuerdo con la tabla mencionada, una concentración de 510.53 mg/g contenida en esta fracción, mientras que para este compuesto se tienen datos de concentraciones de 50-300 mg/g (Wieslaw *et al*, 1988 y Lister *et al*, 1994).

## Análisis por HPLC (fracción VII con actividad antioxidante)



**Gráfico 5.6** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene la fracción VII (eluciones 51-56 de la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5.8** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción VII) del extracto obtenido con etanol.

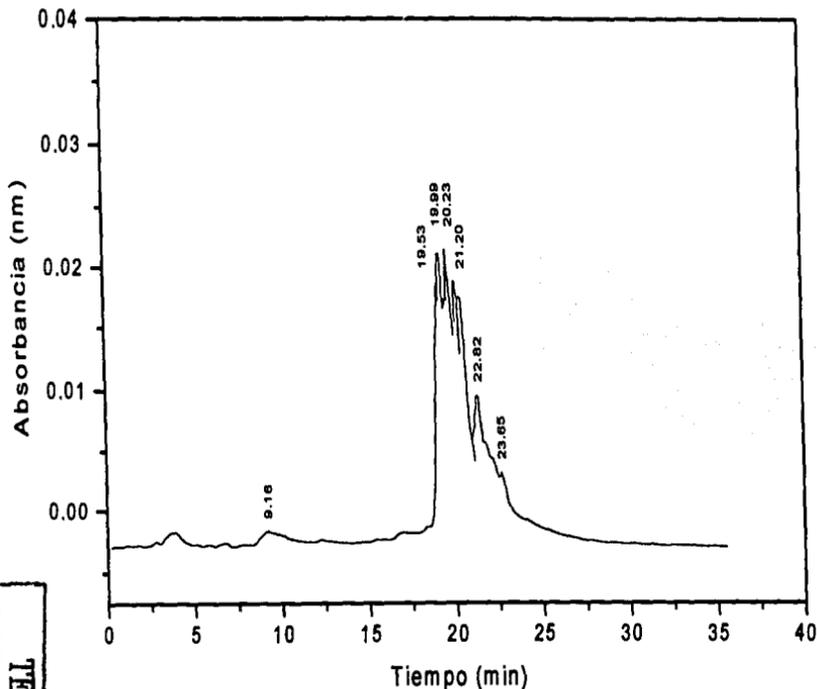
Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
—	10.51	—	350
—	17.65	42.87	350
—	19.57	—	350
—	21.04	—	350
—	22.25	468.86	350
—	22.48	—	350

Las señales correspondientes al cromatograma con tiempos de retención:

17.65 min corresponde, de acuerdo con la tabla 5.8, al compuesto identificado como dihidroquercetina con tiempo de retención de 17.6 min, con una concentración de 42.87 mg/g contenidos en esta fracción, no hay datos informados de la cantidad en la que se encuentra este compuesto en la manzana.

La señal registrada en 22.25 min es relacionada con 3-galactosido de quercetina con tiempo de retención de 22.2 min, el cual se encuentra en una concentración de 464.86 mg/g, que corresponde sólo al 55 % de acuerdo con los datos en la literatura que indican que se han encontrado concentraciones hasta de 840 mg/g de muestra (Lister *et al.*, 1994).

## Análisis por HPLC (fracción X con actividad antioxidante)



**Gráfico 5.7** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene la fracción X (eluciones 78-92 de la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol)

**Tabla 5.9** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción X) del extracto obtenido con etanol.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
---	9.16	---	350
---	19.53	---	350
---	19.89	---	350
---	20.23	---	350
---	21.20	---	350
---	22.82	94.88	350
---	23.65	70.63	350

Como se puede observar en el gráfico 5.7, la fracción analizada tiene compuestos con tiempos de retención cercanos por lo que no se puede obtener una adecuada resolución con el sistema empleado, pero las señales obtenidas en el cromatograma son relacionadas con los datos de la tabla 5.5.

La señal registrada con tiempo de 19.89 min, puede pertenecer al compuesto identificado como 3-galactosido de cianidina, la concentración no fue posible calcularla debido a que no se utilizó un estándar de cianidina, pero la

concentración informada para este compuesto es de 10-20 mg/g de muestra.

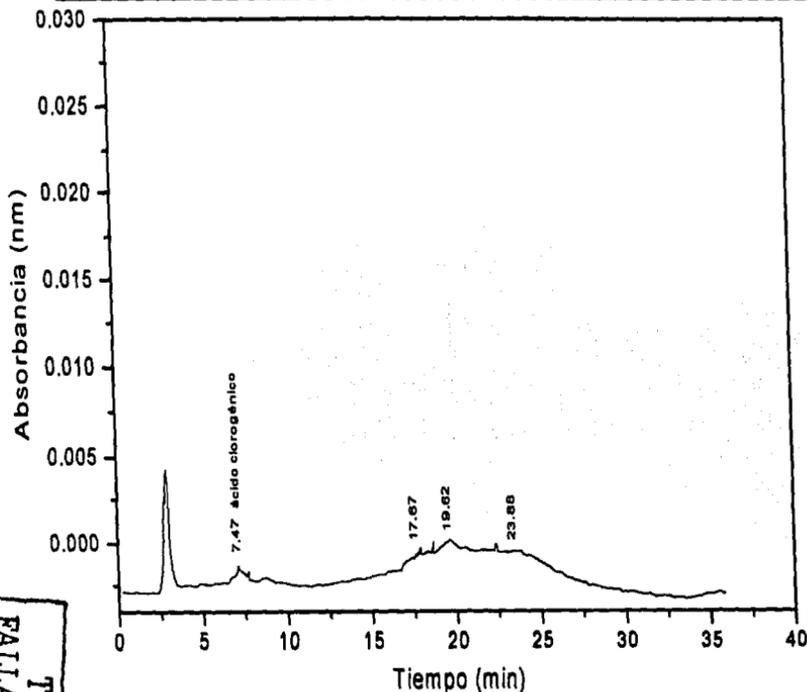
El registro en 22.82 min corresponde de acuerdo a la tabla 5.5, al compuesto identificado como 3-glucosido de quercetina, del cual se tiene una concentración de 94.88 mg/g, en la literatura informan que se han encontrado hasta 100 mg/g de muestra en la cáscara de la manzana.

Para la señal en 23.65 min se consideró que pertenece al compuesto identificado como 3-xilosido de quercetina, con tiempo de retención de 23.6 min, de acuerdo a los datos de la tabla 5.5.

Este compuesto tiene una concentración de 70.63 mg/g, mientras que en otros estudios se han encontrado concentraciones de 90-120 mg/g de muestra (Wieslaw *et al*, 1988 y Lister *et al*, 1994).

Las concentraciones de los compuestos con actividad antioxidante en la cáscara y en el bagazo de manzana, son dependientes del grado de maduración del fruto, por lo que se encuentran diferencias significativas en las concentraciones de los diferentes flavonoides identificados. Por otro lado la mayoría de los trabajos existentes se han enfocado al estudio del fruto verde y no al seguimiento de la maduración, sólo algunos de los intervalos de concentraciones informados, están basados en el análisis del fruto verde y rojo; lo que justifica la diferencia de concentraciones que presentaron los compuestos al ser comparados con el bagazo de manzana.

## Análisis por HPLC (fracción XII con actividad antioxidante)



**Gráfico 5.8** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene la fracción XII (eluciones 133-150 de la cromatografía en columna del extracto obtenido con etanol)

**Tabla 5.10** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción XII) del extracto obtenido con etanol

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
ácido clorogénico	7.47	0.10	280
----	17.67	----	350
----	19.62	----	350
----	23.88	----	350

El gráfico 5.8 muestra la señal correspondiente a un tiempo de retención de 7.47 min, la cual fue identificada como ácido clorogénico con los registros obtenidos para los estándares presentados en el gráfico 5.3, el cual se encuentra en una concentración de 0.52 mg/g, mientras que en estudios previos se informa que se han encontrado concentraciones de 21 mg/g de muestra de este compuesto en la cáscara de manzana (Wieslaw *et al*, 1988), la disminución en la concentración de este compuesto puede ser debida al grado de fermentación que se presenta en el bagazo de manzana.

Otra señal que se observa en el cromatograma es la perteneciente a 19.62 min, que corresponde de acuerdo con la tabla 5.5, al compuesto identificado como protoantocianidina B5 con un tiempo de retención de 19.6 min. La concentración que presenta esta señal no fue posible calcularla, por no contar con datos suficientes.

RECIBIDO CON  
FALLA DE ORIGEN

**Nota:** Todas las señales que se registraron, en los cromatogramas presentados y que no fueron relacionadas con los tiempos de retención publicados en la tabla 5.8 o con los registros de los estándares comerciales, no se les realizaron otras pruebas de identificación por considerar que no es de interés para fines de este trabajo, el llegar a identificarlas por ser relacionadas con compuestos que no presentan actividad antioxidante.

## **5.6 Segunda parte: Aplicación de hidrólisis química y enzimática**

Debido a que no fue posible aislar los compuestos glicosilados del extracto obtenido con etanol mediante las metodologías utilizadas, y por considerar que los aglicones tienen mayor actividad antioxidante, se procedió a realizar la hidrólisis por métodos químicos y enzimáticos de los compuestos que se encuentran glicosilados, para obtener los aglicones, realizar la separación y purificación para de esta manera ser comparados con mayor precisión, con los registros obtenidos en el gráfico 5.3 de los estándares comerciales utilizados.

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática se decidió hacer pruebas con extractos de semilla de capulín y de durazno, para ser utilizados como material enzimático, ya que estas semillas presentan actividad de  $\beta$ -glucosidasa.

Para tal efecto se realizaron extracciones consecutivas a las semillas, utilizando disolventes de diferente polaridad (éter de petróleo y acetona), siendo el extracto obtenido con acetona donde se presenta la actividad enzimática (Ahyllon, 1995).

En la tabla 5.11 se muestra la cantidad de los extractos obtenidos de estas semillas, los cuales se obtienen como oleorresinas.

**Tabla 5.11** Rendimiento de extractos con actividad de  $\beta$ -glucosidasa (Obtención de oleorresina a partir de 10 g de semilla).

	<b>Capulín (g)</b>	<b>Durazno (g)</b>
Extracto etéreo	2.2560	1.9011
Extracto con acetona	2.5513	1.7735

En la tabla 5.11 muestra el rendimiento de la extracción realizada a las semillas, donde se obtuvo una mayor cantidad de oleorresina en la semilla de capulín, en comparación con la obtenida del durazno, de acuerdo con el proceso de extracción empleado (sección 4.4.2.1).

Una vez obtenidas las oleorresinas, estas se utilizaron al igual que las enzimas comerciales  $\beta$ -glucuronidasa y viscossyme L, para llevar a cabo la hidrólisis enzimática (tabla 5.12), la cual se realizó con 3 g de extracto obtenido con etanol disuelto en 10 mL de disolución amortiguadora de fosfatos, pH =5.0, agregando 0.25 mL de material enzimático y manteniendo en agitación la reacción en un baño de agua a una temperatura de 40 °C por un período de 16 hr, la extracción de los aglicones se llevó a cabo con acetato de etilo, para obtener la fase orgánica (en esta fase se presentó un precipitado, el cual fue separado para su análisis posterior), la cual se concentró y llevó a sequedad.

**Tabla 5.12** Comparación entre los productos hidrolizados enzimáticamente partiendo de 3 g de muestra (extracto obtenido con etanol).

	Rendimiento (g)	
	Fase Orgánica	Sólidos
Extracto de capulín	0.582	0.4891
Extracto de durazno	0.9124	0.3315
$\beta$ -glucuronidasa	1.0238	0.2291
Viscosyme L	1.5080	1.3916

La hidrólisis realizada con los extractos de semilla y con las enzimas comerciales, presentó un rendimiento favorable del producto hidrolizado con viscosyme L, como se puede observar en la tabla 5.12.

De acuerdo a los rendimientos obtenidos en la prueba anterior, se decidió trabajar con esta enzima para hacer la comparación, ahora con la hidrólisis química, por que como ya se mencionó la separación de los aglicones contenidos en el extracto obtenido con etanol, se realizó mediante la comparación de dos métodos (químico y enzimático), determinando la calidad y cantidad del producto hidrolizado que se obtiene.

Las condiciones para la hidrólisis química fueron basadas en un estudio previo (Hertog *et al*, 1992), donde se evaluaron dos ácidos a diferentes concentraciones y tiempos de reacción, determinándose en cual de ellas resultan menos afectados compuestos como quercetina y catequina.

Por lo que la hidrólisis química se llevó a cabo con 3 g de extracto etanólico solubilizado en 10 mL H<sub>2</sub>O destilada se le agregó 10 mL de HCl 1.2 N (HCl en 50 % de metanol), manteniendo la reacción en un baño de agua a una temperatura de 80 °C por un período de 3 hr, una vez transcurrido el tiempo de reacción, la extracción de los aglicones se llevó a cabo con una extracción líquido-líquido de la fase acuosa utilizando acetato de etilo, para obtener la fase orgánica (también hay formación de precipitado, el cual es separado para posterior análisis), la cual se concentró y llevó a sequedad.

**Tabla 5.13** Comparación entre el rendimiento del producto hidrolizado en la hidrólisis química y enzimática utilizando 3 g de muestra.

Rendimiento (g)		
	Hidrólisis química	Hidrólisis Enzimática
Fase Orgánica	1.8178	1.5080
Sólidos	1.0749	1.3916

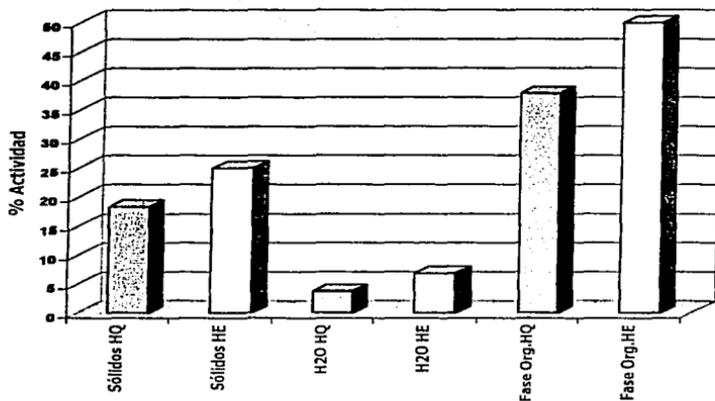
En la tabla 5.13 se presentan los rendimientos de las hidrólisis realizadas, como se puede observar la cantidad de producto hidrolizado fue mayor en el tratamiento químico, sin embargo, las características físicas (oscurecimiento) que se

FALLA DE ORIGEN

presentaron en este, nos indican una posible degradación de los compuestos de interés, debido a las condiciones ácidas de la reacción que tiene el método empleado, por lo que se decidió realizar pruebas cuantitativas de actividad antioxidante, con los ensayos de radical-DPPH y  $\beta$ -caroteno, para poder determinar en cual de los métodos (químico ó enzimático), se obtiene el producto hidrolizado con mayor actividad.

Las pruebas cuantitativas se realizaron a la fase orgánica (producto hidrolizado), al precipitado (sólidos) que se formó en esta fase antes de ser concentrada y a la fase acuosa, la cual fue llevada a sequedad por liofilización, para poder realizar el análisis de las muestras a la misma concentración.

Estas pruebas se efectuaron bajo las condiciones mencionadas en la sección 4.3.4.2 y a continuación se representan en gráficos los resultados obtenidos con estos ensayos.

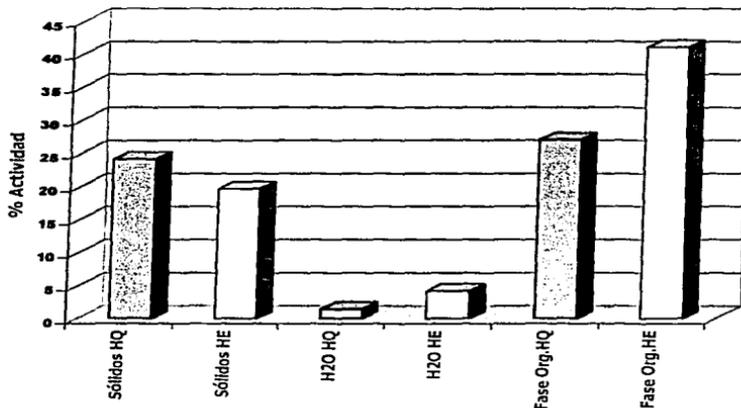


**Gráfico 5.9** Análisis cuantitativo, comparación de la actividad secuestrante del radical-DPPH en los Productos de la hidrólisis química y enzimática

El gráfico muestra el ensayo realizado con radical-DPPH, obteniéndose 18.23 % para los sólidos de la hidrólisis química (HQ), 24.9 % para sólidos de hidrólisis enzimática (HE), 3.7 % en la fase acuosa de la hidrólisis química (H<sub>2</sub>O HQ), 6.8 % en la fase acuosa de la hidrólisis enzimática (H<sub>2</sub>O HE), 37.7 % en la fase orgánica de la hidrólisis química (producto hidrolizado) y 49.8 % para fase orgánica de la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

hidrólisis enzimática. Donde se observo para esta prueba, que tanto los sólidos formados en la fase orgánica como el producto hidrolizado pertenecientes al tratamiento enzimático, tienen una mayor actividad antioxidante en comparación con los productos de la hidrólisis química.



**Gráfico 5.10** Comparación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de blanqueo con  $\beta$ -caroteno en los Productos de la hidrólisis química y enzimática

Para el ensayo con  $\beta$ -caroteno representado en el gráfico 5.10, obtenemos en la evaluación 24.06 % para los sólidos de la hidrólisis química (HQ), 19.6 % para

sólidos de hidrólisis enzimática (HE), 1.36 % en la fase acuosa de la hidrólisis química ( $H_2O$  HQ), 4.1 % en la fase acuosa de la hidrólisis enzimática ( $H_2O$  HE), 27 % en la fase orgánica de la hidrólisis química (producto hidrolizado) y 41 % para fase orgánica de la hidrólisis enzimática. Siendo que los sólidos formados en la fase orgánica de la hidrólisis química, presentan mayor actividad, pero no así el producto hidrolizado, debido a que algunos de los compuestos pudieron ser degradados por la acidez de la reacción empleada, confirmando con esta prueba que en la hidrólisis enzimática se presentó mayor actividad secuestrante y antioxidante, esto debido a que el método enzimático permitió una mayor selectividad de los compuestos hidrolizados, sin afectar los componentes de interés, por lo que se decidió trabajar con estos productos para proceder a una purificación en columna.

Una vez determinado y seleccionado el producto hidrolizado con mayor actividad (hidrólisis enzimática), se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, con el fin de purificar y aislar los compuestos antioxidantes que se encontraron en mayor proporción.

El fraccionamiento se realizó con una muestra inicial de 3.0167 g de producto hidrolizado, en una columna de 3 cm de diámetro y 20 cm de largo, utilizando sílica gel como fase estacionaria, dado que después de la hidrólisis se obtuvo una mejor resolución de los compuestos, en comparación con la prueba realizada en celulosa microcristalina, como fase móvil después de varias pruebas se seleccionó

un gradiente de elución con acetato de etilo-metanol, obteniéndose 129 fracciones de 25 mL cada una, las cuales fueron evaluadas en cromatografía en capa fina utilizando radical-DPPH y sulfato cérico como reveladores, para reunir las fracciones idénticas, quedando finalmente con XI fracciones (tabla 5.14), de las cuales sólo tres (II HE, III HE y VII HE) presentan actividad antioxidante.

**Tabla 5.14** Fracciones de la cromatografía en columna del producto hidrolizado enzimáticamente

<b>Fracciones eluidas</b>	<b>Fracciones finales</b>	<b>Fracciones con actividad</b>
1-10	I HE	---
11-16	II HE	*
17-20	III HE	*
21-26	IV HE	---
27-36	VI HE	---
37-47	VI HE	---
48-59	VII HE	*
60-80	VIII HE	---
81-92	IX HE	---
93-110	X HE	---
111-129	XI HE	---

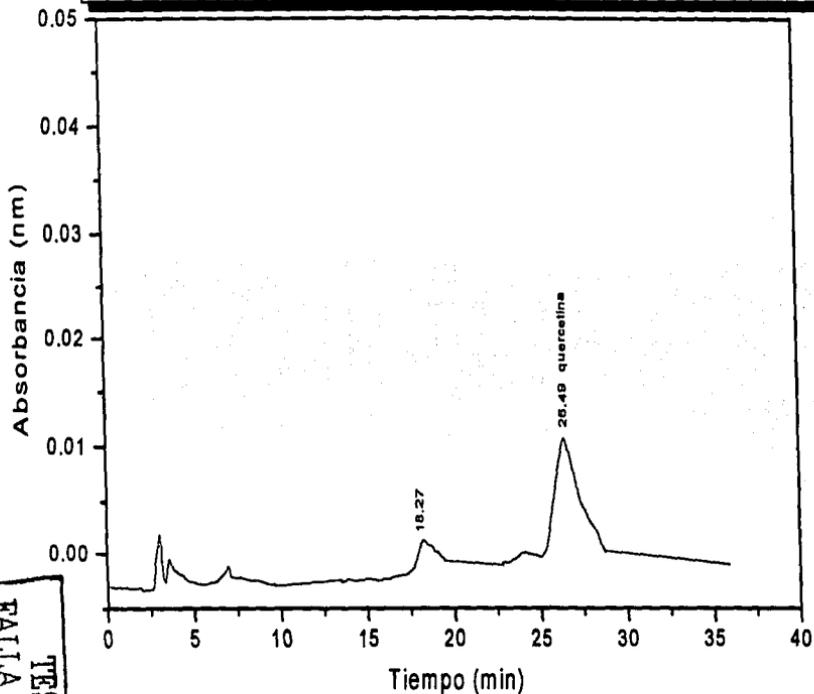
(\*) fracciones con actividad antioxidante  
 (---) fracciones que no presentan actividad

Las fracciones que presentaron actividad antioxidante, fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando como patrones de referencia los registros de los estándares comerciales (ácido clorogénico, catequina y quercetina), presentados en el gráfico 5.3.

### **5.7 Análisis por HPLC identificación y cuantificación**

Las condiciones utilizadas para este análisis, ya fueron mencionadas en secciones pasadas y de igual manera se realizaron para el producto hidrolizado, por lo que a continuación sólo se presentaran los resultados obtenidos en este.

## Análisis por HPLC (precipitado de la hidrólisis química)



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Gráfico 5.11** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene el precipitado que se formo en la fase orgánica extraída de la hidrólisis química.

**Tabla 5.15** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del precipitado (sólidos) formado en la hidrólisis química

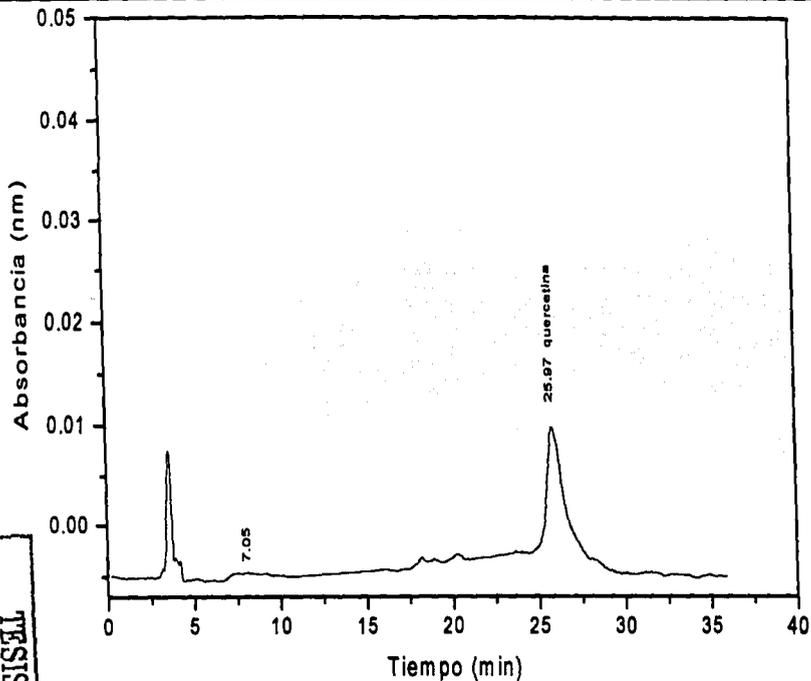
<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>	<b>Concentración mg/g</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
-----	18.27	-----	350
quercetina	26.49	15.70	350

Como se puede observar en el gráfico 5.11, de las señales que presenta el cromatograma, con tiempo de retención 18.27 y 26.49 min, sólo una de ellas pudo ser identificada como antioxidante, y que de acuerdo con los registros obtenidos para los estándares comerciales, esta señal corresponde con el mismo tiempo de retención que el compuesto identificado como quercetina.

Si bien es cierto que ya se había decidido analizar sólo los productos de la hidrólisis enzimática, se efectuó también el análisis por HPLC del precipitado (sólidos) de la hidrólisis química debido a que, en primer lugar no se esperaba que se presentara una precipitación en la fase orgánica, y en segundo lugar por que estos sólidos presentaron características similares a los formados en la hidrólisis enzimática, y ambos a su vez eran diferentes del producto hidrolizado.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## Análisis por HPLC (precipitado de la hidrólisis enzimática)



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Gráfico 5.12** Cromatograma del análisis por HPLC de la muestra que contiene el precipitado que se formó en la fase orgánica extraída de la hidrólisis enzimática.

**Tabla 5.16** Tiempos de retención pertenecientes a la separación por HPLC del precipitado (sólidos) formado en la hidrólisis enzimática

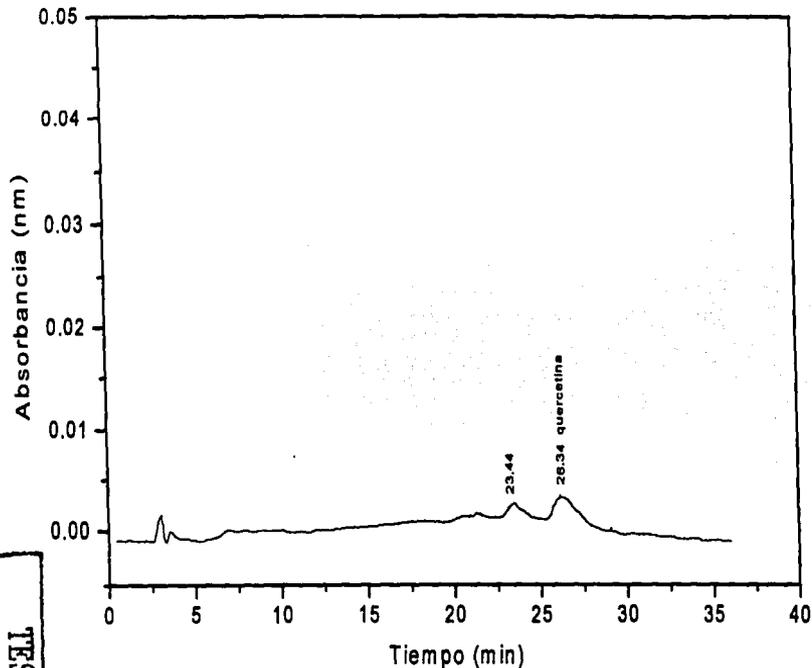
<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>	<b>Concentración mg/g</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
-----	7.05	-----	350
quercetina	25.97	0.49	350

En el gráfico 5.12 se puede observar claramente, que la señal registrada en el tiempo de retención de 25.97 min, corresponde con el mismo tiempo de retención que el compuesto identificado como quercetina, de acuerdo con los registros obtenidos para los antioxidantes comerciales, mientras que la señal registrada en el cromatograma en 7.05 min, no fue posible identificarla con el patrón de referencia utilizado, ya que no coincide con los tiempos de retención de los estándares analizados.

Por otro lado consideramos que la concentración que presenta el compuesto perteneciente a esa señal, no es tan considerable como para justificar su identificación por otros métodos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Análisis por HPLC (fracción II HE con actividad antioxidante)



TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

**Gráfico 5.13** Cromatograma del análisis por HPLC de la fracción #2 (elución 11-16 de la cromatografía en columna del producto hidrolizado enzimáticamente), identificada como II HE

**Tabla 5.17** Tiempos de retención pertenecientes al análisis por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción II HE) del producto obtenido en la hidrólisis enzimática

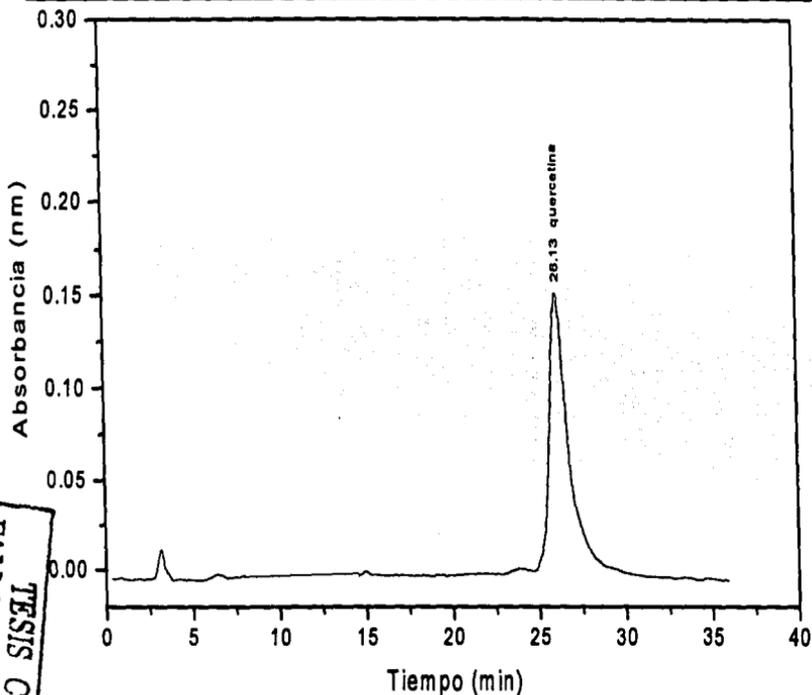
<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>	<b>Concentración mg/g</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>
-----	23.44	-----	350
quercetina	26.34	3.27	350

En el cromatograma perteneciente al gráfico 5.13, se observa la señal del compuesto identificado como quercetina con un tiempo de retención de 26.13 min, el cual fue comparado e identificado, de acuerdo con los registros obtenidos para los estándares comerciales.

También se registra otra señal en 23.44 min, la cual no pudo ser identificada al compararla con el patrón de referencia utilizado, por lo que consideramos que se trataba de algún compuesto que se detecta esa longitud de onda, pero que no presenta actividad antioxidante.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## Análisis por HPLC (fracción III HE con actividad antioxidante)



**Gráfico 5.14** Cromatograma del análisis por HPLC de la fracción #3 (elución 17-20 de la cromatografía en columna del producto hidrolizado enzimáticamente), identificada como III HE

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Tabla 5.18** Tiempos de retención pertenecientes al análisis por HPLC del fraccionamiento en columna (fracción III HE) del producto obtenido en la hidrólisis enzimática

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Concentración mg/g	Longitud de onda (nm)
quercetina	26.13	743.03	350

El gráfico 5.14 perteneciente al cromatograma de la fracción # 3, eluida en la cromatografía en columna realizada al producto hidrolizado enzimáticamente, la cual para control fue nombrada III HE, muestra una señal registrada en 26.13 min y que de acuerdo con los datos obtenidos para los estándares comerciales utilizados como patrón de referencia, fue identificada como quercetina.

También se puede considerar que siendo esta señal la única registrada en el cromatograma, que la quercetina ha sido aislada y purificada, por no registrarse alguna otra señal en el intervalo de longitudes de onda establecido, lo cual fue corroborado comparando algunas características físicas del compuesto relacionado:

**Tabla 5.19** Comparación de algunas características físicas del estándar comercial de quercetina y el compuesto perteneciente a la fracción III HE de la cromatografía en columna

Compuesto	Punto de fusión (°C)	Tiempo de retención (R <sub>t</sub> )	Color
quercetina	192-194	26.2	amarillo claro
III HE	193-197	26.13	amarillo claro

### 5.7.1 Cuantificación

Una vez realizado el análisis por HPLC se procedió a la cuantificación de los compuestos identificados para obtener el rendimiento real de la purificación.

**Tabla 5.20** Cuantificación de los compuestos identificados en el análisis por HPLC de acuerdo a los estándares de catequina, ácido clorogénico y quercetina.

	<b>catequina</b> mg / g muestra	<b>ácido clorogénico</b> mg / g muestra	<b>quercetina</b> mg / g muestra
Extracto con etanol	—	28.67	2.41
Fracción XII	—	0.10	—
Sólidos hidrólisis química	—	—	15.70
Sólidos hidrólisis enzimática	—	—	0.49
Fracción II HE	—	—	3.27
Fracción III HE	—	—	743.03

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La tabla muestra claramente que la quercetina siendo el compuesto con actividad antioxidante mayoritario contenido en la manzana, fue identificado en casi todas las muestras, donde se puede observar que las fracciones analizadas presentan variaciones en la cantidad de quercetina, debido al grado de pureza de las mismas, no así del ácido clorogénico, del cual se encontró una menor cantidad.

Mientras que la catequina, que de acuerdo con datos publicados (Wieslaw *et al*, 1988), es uno de los compuestos con actividad antioxidante que se encuentra en mayor proporción, no se encontró en ninguna de las muestras analizadas, dado que no hay en los cromatogramas registro de alguna señal que pueda ser relacionada con la catequina, debido a que posiblemente este compuesto no fue retenido en el extracto obtenido con etanol ó por el grado de fermentación del bagazo de manzana analizado, ya que la concentración de flavonoides es dependiente del grado de maduración de este fruto, lo que explicaría que en el análisis del extracto crudo tampoco se encontrara este compuesto.

En cuanto al ácido clorogénico se observó que después de los tratamientos de hidrólisis su cuantificación no fue posible, debido a una probable retención de este compuesto en las columnas de trabajo.

## 6 CONCLUSIONES

- ❖ El procedimiento empleado en la presente investigación constituye una alternativa para obtener antioxidantes ó fracciones enriquecidas de los residuos industriales, que representan una fuente importante y de bajo costo.
- ❖ Con los métodos empleados para hidrolizar el extracto obtenido con etanol, se logra aislar una cantidad aceptable del compuesto identificado como quercetina, que es uno de los principales compuestos antioxidantes presentes en la manzana.
- ❖ En el bagazo de manzana los disolventes de polaridad media utilizados, permitieron obtener extractos con una mayor actividad antioxidante que los disolventes más polares.
- ❖ Mediante los ensayos utilizados se establece que la mayoría de los compuestos presentes en la muestra de manzana que ha sufrido un proceso industrial, pueden ser potenciales antioxidantes.
- ❖ Se demostró mediante cromatografía en capa fina, la presencia de ácido *p*-cumárico en el extracto etéreo.

- ❖ Se demostró cuantitativamente que el extracto obtenido con etanol, retiene antioxidantes más polares, esto se ve reflejado al obtener mayor actividad antioxidante y secuestrante que la que presentaron algunas muestras comerciales como: quercetina, catequina, ácido ferúlico, TBHQ y BHA.
- ❖ El fraccionamiento realizado por cromatografía en columna al extracto crudo obtenido con etanol, sólo permitió la obtención de fracciones enriquecidas con actividad antioxidante.
- ❖ Las condiciones establecidas para el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), permitió relacionar los compuestos glicosilados dentro de las fracciones enriquecidas, con datos informados en la literatura.
- ❖ Se demostró que el bagazo de manzana, es una fuente importante de antioxidantes naturales y que sus componentes pueden ser aislados ó utilizados como fracciones enriquecidas.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahyllon F. **1995**. Obtención de un extracto enzimático con actividad de  $\beta$ -glucosidasa a partir de semilla de capulín. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 102 pp.
- Badui D. S. **1992**. Química de los Alimentos. Editorial Alambra. 380-387 pp.
- Bandoniene D. y Murkovic M. **2002**. On-line HPLC DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging phenols Extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 2484-2487.
- Belitz, D. H. y Grosch W. **1992**. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza España. pp. 878-891.
- Bertholet, R. Kusy A., Rivier V. Colarow L. **1998**. Antioxidant Composition and Process for the Preparation there of. US Patent US 5714094.
- Bocco A., Cuvalier M., Hunbert R. y Berset C. **1998**. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2123-2129.
- Bonilla, M. Mayen, J. Merida, M. Medina. **1998**. Extraction of Phenolic Compounds from Red Grape marc for use as Food lipid Antioxidants. *Food Chem.* 66, 209-215.
- Burri J., M. Graf, P. Lambelet y Loliger. **1989**. Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. *J. Sci. Food Agric.* 41, 110-153.
- Cavin A., Hostettmann K., Diatmyko W. Y Potterat O. **1998**. Antioxidant Lipophilic Constituents of *Tinospora Crispa*. *Planta Med.* 64, 393-396.
- Chen B. H. y Tang Y. C. **1998**. Processing and Stability of Carotenoid Powder from Carrot Pulp Waste. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2312-2318.
- Coultlate T.P., Bial M.I. **1984**. Alimentos Química de sus Componentes. Editorial Acribia, Zaragoza España. pp. 115-122.

- Dick J. Arthur, Redden R. Peter, DeMarco C. Alphonse, Lidster D. Perry y Grindley T. Bruce. **1987**. Flavonoid Glycosides of Spartan Apple Peel. *J. Agric. Food Chem.* 35, 529-531.
- Fennema. O.R. **1992**. Química de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Hagerman, A. E. Riedl, K. M. Jones, G. A. Sovik, K. N. Ritcherd, N. T. Hartzfeld, P. W. Riechel T. L. **1998**. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1887-1892.
- Hertog G.L., Hollman C.H. y Venema P.D. Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1992**. 40,1591-1598.
- Hosny M. y Rosazza J. P. N. **1999**. Novel Isoflavone cinnamic acid, and Triperpenoid Glycosides in Soybean Molasses. *J. Nat. Prod.* 62, 853-858.
- Hudson B. J. F. **1990**. Food Antioxidants. Elsevier Applied Science Londres y Nueva York.
- Kuri Brena Romero de Terreros P. **1998**. Obtención de Antioxidantes Naturales a Partir de Romero y su Aplicación en Alimentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 92 pp.
- Lea Andrew G. H. y Colin F. Timberlake. **1978**. The Phenolics of Ciders: Effect of Processing Conditions. *J. Sci. Food Agric.* 29, 484-492.
- Lister C. E., Lancaster J. E., Sutton K. H. **1994**. Developmental Changes in the Concentration and Composition of Flavonoids in Skin of a Red and a Green Apple Cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 64, 155-161.
- Madhaví D. L. **1996**. Source and Methods of Evaluation Food Antioxidant. Marcel Deccker inc. Nueva York.
- Mayr U., Treutter D., Santos-Buelga C., Bauer H. y Feucht W. **1994**. Developmental Changes in the Phenol Concentrations of 'Golden Delicious' Apple Fruit and Leaves. *Phytochemistry.* 38, 1151-1155.

- o Moure A., Franco D., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. y Lema J. M. **2000**. Evaluation of Extracts from Gevuina Avellana Hulls as Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3890-3897.
- o Moure A., Franco D., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. J., Domínguez M., Parajó C. **2001**. Natural Antioxidants from Residual Sources. *Food Chem.* 72, 145-171.
- o Prakash S. O., Krishan B., Bhupinder S. **1998**. Thin-Layer Chromatography of Gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catequin, epicatechin, dinamic acid, p-cumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. of Chromatogr.* 822, 167-171.
- o Rodriguez S. D., Hadley M. Y Holm E. T. **1994**. Phenolics Aqueous Patato Peel Extract. Extraction, Identification and Degradation. *J. Food Sci.* 59, (2) 649-651.
- o Schalkwijk Bob. **1995**. Producción Mundial de Manzana. *Claridades Agropecuarias*. Noviembre (27) pp. 3-16.
- o Sherwin E. R. **1990**. Antioxidant In A. L. Branen P. M. Davidson y S. Salminen. Food Antioxidants. Nueva York. Marcel Dekker Inc.
- o Shrikhande A. J. **2000**. Wine by-products with Health Benefits. *Food Research International*. 33, 469-474.
- o Taguchi K., Iwami K., Kawabata M. Y Ibuki F. **1988**. Proteins Peptides and Maillard Reaction Products. *Agric. Biol. Chem.* 52, 539-543.
- o Varela sanchez M. I. **1978**. Empleo de Antioxidantes en la Industria Alimentaria en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 80 pp.
- o Visioli F., Romoni A., Mulinacci N., Zarini S., Cente D., Vincieri F. Y Galli C. **1999**. Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Waste Waters. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3397-3401.
- o Wanasundara, U. N. Y Shahidi F. **1998**. Antioxidant and Pro-oxidant Activity of Green Tea Extracts in Marine Oils. *Food Chem.* 63, 335-342.

- Whitaker D. Bruce, Schmidt F. Walter, Kirk C. Marion y Barnes Stephen. **2001**. Novel Fatty Acid Esters of p-Coumaroyl Alcohol in Epicuticular Wax of Apple Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3787-3792.
- Wieslaw O., Chang Y. L., Jaworski A. W. Y Price K. R. **1988**. Identification of Some Phenolic Compounds in Apples. *J. Agric. Food Chem.* 36, 430-432.
- Wong W.S. D. **1995**. Química de los Alimentos Mecanismos y Teoría. Editorial Acribia, Zaragoza España. pp. 394-396.
- Wu K., Zhang W., Addis P. B., Epley R. J., Salih A. M., y Lehrfeld J. **1999**. Antioxidant Properties of Wild Rice. *J. Agric. Food Chem.* 42, 34-37.
- Yan-Hwa C., Choo-Lin C. Y Hsia-Fen H. **2000**. Flavonoid Content of Several Vegetables and Their Antioxidant Activity. *J. Sci. Food Agric.* 80, 561-566.
- Yan X., Nagata T. y Fan X. **1998**. Antioxidative Activities in Some Common Seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition.* 52, 253-262.
- Zandi P. y Gordon M. H. **1999**. Antioxidant Activity of Extracts from Old Tea Leaves. *Food Chem.* 64, 285-288.