

00528  
55



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA COMPOSICION Y VALOR  
NUTRICIO DE LOS RESIDUOS DE UVA  
(*Vitis vinifera*) Y SU POSIBLE USO EN  
ALIMENTACION ANIMAL.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
LOPEZ VELASCO GABRIELA



MEXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003



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.** Prof. Angela Sotelo López  
**Vocal.** Prof. Bernardo Lucas Florentino  
**Secretario.** Prof. Lucía Cornejo Barrera  
**1er. Suplente.** Prof. Leticia Gil Vieyra  
**2do. Suplente.** Prof. Inés Miranda Martínez

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Química

Conjunto E. Laboratorio 111.  
Departamento de Farmacia.

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Angela Sotelo López  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Rosa María Argote Espinosa  
Asesor Técnico

  
\_\_\_\_\_  
Gabriela López Velasco  
Sustentante

## **AGRADECIMIENTOS**

- *A Pedro Domeq por brindarnos la muestra necesaria para la elaboración de este proyecto.*
- *Al Dr. Javier Miranda por su apoyo y participación en la determinación de minerales y metales pesados.*
- *A la Profra. Julieta Sandoval Guillén por su asesoría en las técnicas empleadas para la determinación de hidratos de carbono.*
- *Al Prof. Bernardo Lucas Florentino por su asesoría en las técnicas empleadas para la determinación de ácidos grasos.*
- *A Carlos de Jesús Romero Guzmán por su apoyo y participación en la determinación de aminoácidos.*
- *A Adriana Rodríguez y Agustín Reyó por su asesoría en la determinación de oligosacáridos.*
- *A PROBETEL por el apoyo económico brindado para la realización de la tesis*

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❑ *Maestra Angela Sotelo López, por brindarme la oportunidad, la confianza y el apoyo para trabajar con usted, por su ejemplo de dedicación y cariño con todos nosotros, muchas gracias, la quiero mucho.*
- ❑ *A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de ser una profesionista y por las experiencias que dentro de esta Universidad pude vivir.*
- ❑ *Maestro Bernado Lucas Florentino, por su apoyo y orientación y por su ejemplo de constante trabajo, muchas gracias.*
- ❑ *A Rosita Argote y Lety Gil por todo su apoyo durante la realización de esta tesis, por su cariño, tantas pláticas divertidas y por su amistad, las quiero mucho.*
- ❑ *A todos mis profesores por ser parte de mi formación a lo largo de mi carrera especialmente a Lucy Cornejo y Juan Guzmán.*
- ❑ *Sra. Vicky, por todo su cariño y sus atenciones pero sobre todo por su incondicional amistad.*
- ❑ *Toñito, Ili, Argelia, Helga, Noriko, Verito, Sandra, Semei, Celina, Vanesa, Anita, Carlitos, Ponchito, Nancy, Millet, Héctor, Fernanda, Chela, Chio porque han sido mis compañeros a lo largo de este trabajo y por el equipo que todos formamos. Gracias a todos.*

*A*

## **DEDICATORIAS**

- *A Alma, no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has dado, te dedico esta tesis simplemente por ser la mujer que eres, por ser mi madre y siempre haber estado con migo sin importar nada, por darme una familia y sobre todo por todo tu amor. Yo no sería lo que soy si tu no fueras como eres, porque tu me enseñaste que sólo luchando y creyendo en mi misma conseguiría las cosas. Te amo con todo mi corazón.*
- *A mi gordito, por todo tu cariño y por ser el hermano que eres. Te quiero mucho.*
- *A Carlos, sin ti simplemente no lo hubiera logrado, gracias por todo tu cariño y sobre todo por la amistad que esta vida nos ha dado. Por el apoyo constante durante toda la carrera, tus pláticas, tus consejos, tus regaños y por siempre estar ahí, diciéndome que si podía. Te quiero mucho. Gracias*
- *Al Abuelo Gonzalo, por darme la familia y el ejemplo de dedicación que siempre me diste, porque has sido como un padre para mi, Te quiero.*
- *A Jorge, porque aún en tu ausencia, siempre has estado presente en mi vida, te quiero mucho.*
- *A mi Yaya, mi Yayo y mi Yeya, porque aunque ya no estén conmigo, siempre están en mi corazón, les agradezco todo su amor. Los quiero.*
- *A Sandriux, Yuyis, Poncho, Carlos, Noriko, Panda, Fernando, Ñañis, Peloncito y Fidelito han sido y serán siempre una parte muy importante de mi vida, porque han sido los mejores amigos que la vida me ha dado, por todo su apoyo, sus consejos, sus pláticas, sus atenciones y todo lo demás que no puedo escribir en mi tesis. Los amo a todos. Gracias por estar siempre ahí.*
- *A las familias de los anteriormente mencionados, por darme la oportunidad de tener los amigos que tengo, por aguantarnos tantas veces, por sus atenciones y por los hijos que tienen. Gracias.*
- *Toño, Celina, Pau, Noemí, Ale, Joanna, George los quiero mucho y siempre los tendré presentes, gracias por su amistad y su cariño durante la carrera.*
- *A mi familia Mamá Maca y Mamá Guyu, Paty, Glen, Mary, Paty y a sus niños, (Bebetiki, Bimbos, Marisela, Celia, Gaby, Sandra, Miguel, Rodrigo, Gerardo, Miguel, Carmelita) , Familia Kawakami, Doña Mary, por su amor, su cariño y apoyo, por la familia que me han dado. Los quiero mucho.*
- *A Queta, Carlos, Rosy y los enanos, por haber sido como una verdadera familia para mi, por su amistad y su cariño. Gracias.*
- *A mi hermana Miri, por siempre estar conmigo y por todo tu apoyo a lo largo de mi vida, te quiero mucho.*

- *Alberto, Toto, Xila, Sara, Angélica y Giselita, por todo lo que hemos vivido y superado juntos, gracias. Siempre están presentes. Los amo.*
  
- *A Dios por darme la oportunidad de vivir, por darme todo lo que me das día con día. Gracias.*

*Mírame, mírame siempre,  
Como tu miras, así; dulcemente  
Que tus miradas sean para mi vida  
Pauta infinita de luz y alegría  
Mírame, mírame, siempre  
Acaricia, mi alma, así tiernamente  
Y que sea tu dulce mirada  
Mi plácida aurora, mi nueva morada  
Mírame, mírame siempre,  
Sin dudas, así, intensamente  
Que vea en tu mirada reflejado,  
Todo ese dulce amor, que tanto he soñado.*

J.L

*tacncn.*

# ÍNDICE GENERAL

<b>TEMA</b>	<b>Página</b>
Introducción	14
Objetivos	
Objetivo General	16
Objetivos específicos	16
Antecedentes	
1. La vid	17
2. El vino	20
3. Producción vitivinícola	23
4. Los residuos de uva como desechos industriales	26
5. Alimentación animal y su importancia en la nutrición humana	28
6. Alimentación de monogástricos y rumiantes	
6.1 Generalidades de alimentación de rumiantes	31
6.2 Alimentación de rumiantes	32
6.3 Digestión ruminal	33
6.4 Características del rumen	34
6.5 Monogástricos	36
6.6 Generalidades sobre alimentación de cerdos (monogástricos)	36
6.7 Características de digestión de cerdos	37
6.8 Generalidades sobre alimentación de aves	39
6.9 Características de digestión de aves	39
7. Composición química de los alimentos y su importancia	
7.1 Agua	41
7.2 Hidratos de carbono	42
7.3 Fibra	43
7.4 Grasas	45
7.5 Proteínas	46
7.6 Minerales	48



8. Digestibilidad	50
9. Factores Toxicos y antinutricionales	52
9.1 Hemagglutininas	53
9.2 Inhibidores de proteasas	54
9.3 Glucósidos cianogénicos	54
9.4 Taninos	55
9.5 Ácido fítico	56
9.6 Metales pesados	56
<b>Metodología</b>	
1. Información acerca de la muestra	58
2. Conservación de la muestra	60
3. Diagrama general	61
4. Descripción de la metodología	
Análisis proximal	62
Determinación de humedad analítica	62
Determinación de cenizas	64
Determinación de grasa	65
Determinación de fibra cruda	67
Determinación de proteína cruda	70
Determinación de hidratos de carbono (reductores directos y totales)	73
Extracción de hidratos de carbono	74
Cuantificación de hidratos de carbono por el método DNS	75
Determinación de hidratos de carbono después de la hidrólisis	77
Determinación de minerales y metales pesados	79
Identificación y cuantificación de factores tóxicos y antinutricionales	82
Taninos	82
Inhibidores de tripsina	85
Hemagglutininas	88
Oligosacáridos (rafínosa y estaquiosa)	92

Ácido fólico	96
Glucósidos cianogénicos	100
Determinaciones empleadas para la evaluación nutricional del residuo de vid	
Digestibilidad <i>in vitro</i> para monogástricos	105
Digestibilidad <i>in vitro</i> para rumiantes	107
Perfil de ácidos grasos	111
Perfil de aminoácidos	114
Determinación de triptofano	124
Resultados y discusión	
1. Composición proximal	127
2. Contenido de minerales y metales pesados	131
3. Factores tóxicos y antinutricionales	135
4. Contenidos de hidratos de carbono (reductores directos y totales)	140
5. Perfil de ácidos grasos	142
6. Perfil de aminoácidos	144
7. Pruebas de digestibilidad	152
Conclusiones y recomendaciones	155
Bibliografía	157
Anexo	164

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Composición de la uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	19
2	Producción anual de uvas	24
3	Producción anual de vinos	25
4	Requerimientos nutricionales para animales en etapa de desarrollo	40
5	Requerimientos de aminoácidos esenciales para la producción animal	48
6	Digestibilidad de productos de desecho, obtenidos a partir del procesamiento de uva	51
7	Análisis proximal del residuo de uva	127
8	Concentraciones elementales promedio para los minerales determinados en el residuo de vid	131
9	Concentraciones elementales de los metales pesados determinados en el residuo de vid	133
10	Concentraciones de otros elementos obtenidos durante el análisis elemental del residuo de vid	134
11	Contenido de factores tóxicos y antinutricionales	135
12	Contenido de oligosacáridos	137
13	Contenido de hidratos de carbono presentes en el residuo de vid	140
14	Contenido de ácidos grasos presentes en el extracto etéreo	142
15	Contenido de aminoácidos presentes en la proteína	145
16	Calificación química de la proteína contenida en el residuo de vid.	146
17	Contenido de aminoácidos y calificación química de la mezcla propuesta (50%:50%) maíz:residuo de vid al 10% de proteína	149
18	Contenido de aminoácidos y calificación química de la mezcla propuesta (50%:50%) sorgo:residuo de vid al 10% de proteína	150

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>19</b>	Cantidad de maíz, sorgo y residuo de vid necesarios para preparar una mezcla 50:50 (maíz:residuo y sorgo:residuo) al 10% de proteína	<b>151</b>
<b>20</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> para monogástricos y rumiantes del residuo de vid	<b>152</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Diagrama de la vid	18
2	Cromatograma de rafinosa y estaquiosa contenido en el residuo de vid	138
3	Cromatograma del perfil de ácidos grasos obtenido en la muestra de vid	143
4	Cromatograma del perfil de aminoácidos en el residuo de vid	144
5	Curva patrón de glucosa y ecuación de regresión para la determinación de hidratos de carbono. (reductores directos)	164
6	Curva patrón de azúcar invertido y ecuación de regresión para la determinación del contenido de hidratos de carbono antes de la inversión.	164
7	Curva patrón de azúcar invertido y ecuación de regresión para la determinación de hidratos de carbono después de la inversión	165
8	Curva patrón de ácido tánico y ecuación de regresión para la determinación del contenido de taninos	165
9	Curva patrón de rafinosa y ecuación de regresión para la determinación del contenido de rafinosa	166
10	Curva patrón de estaquiosa y ecuación de regresión para la determinación de estaquiosa	166
11	Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de ácido fítico	167
12	Curva patrón de HCN y ecuación de regresión para la determinación de glucósidos cianogénicos	167
13	Cromatograma del estándar de rafinosa y estaquiosa (concentración 0.015M)	168

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>14</b>	Cromatograma del estándar de ácidos grasos para la obtención del perfil de ácidos grasos.	<b>169</b>
<b>15</b>	Cromatograma del estándar de ácido linoléico para la obtención del perfil de ácidos grasos	<b>170</b>
<b>16</b>	Cromatograma del estándar de aminoácidos para la obtención del perfil de aminoácidos (concentración 0.2mM)	<b>171</b>
<b>17</b>	Vial de reacción empleado para la preparación de muestras e hidrólisis en la determinación del perfil de aminoácidos	<b>172</b>
<b>18</b>	Estación de trabajo Pico-Tag, empleada en la determinación del perfil de aminoácidos	<b>172</b>
<b>19</b>	Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de triptofano en el residuo de vid	<b>173</b>

## **INTRODUCCIÓN**

La vid es una planta dicotiledónea de la familia de las vitáceas, originaria de las regiones cercanas a los mares Negro y Caspio en Asia Menor. La especie *Vitis vinifera*, comprende varios miles de variedades resultado de cruzamientos naturales, y que en la actualidad son las que se explotan en todo el mundo. El fruto de esta planta es la uva; la cual es materia prima para elaborar vino y otras bebidas alcohólicas. El vino es pues, el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva, el cual se compone de pulpa, escobajo, semilla y hollejo o cascarilla, dicho mosto es fermentado por acción de las levaduras presentes en el hollejo y escobajo, el producto fermentado es separado por prensado con el fin de eliminar el orujo que es todo el material sólido del cual se ha agotado ya la porción fermentable. Comúnmente la pulpa gastada, semillas y hollejo son desechados por la industria vinífera, este material podría ser utilizado como complemento en la elaboración de alimento para animales. Los animales contribuyen grandemente como proveedores de alimento para el hombre mediante la transformación de productos con escaso o nulo valor alimentario en productos muy nutritivos para el hombre; la dieta de mayor éxito para el hombre, en términos de una nutrición óptima, es aquella que contiene productos de origen animal, es por ello que se justifica la necesidad de aumentar la producción animal en donde la generación de alimentos para éste sector representa una fracción de importancia. La producción mundial de vinos y licores ocupa un lugar importante dentro de la economía, por lo tanto la generación de desechos es elevada y entonces se hace necesaria la generación de tecnologías eficientes para su correcta eliminación, como sería su utilización como complemento de alimentación animal, logrando así el adecuado tratamiento de este residuo industrial y la disminución en el consumo de alimentos básicos, en la dieta humana, que se emplean comúnmente en la formulación de dietas para animales. El presente trabajo tuvo como objetivo conocer la

composición química, el valor nutritivo y la presencia de compuestos tóxicos y factores antinutricionales en los residuos de la uva utilizada para la obtención de vinos y licores, con el fin de valorar su posible uso como complemento en la elaboración de alimentos para animales monogástricos y / o rumiantes.



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la composición química, el valor nutritivo y la presencia de compuestos tóxicos y factores antinutricionales en los residuos de la uva utilizada para la obtención de vino y licores, con el fin de valorar su posible uso como complemento en la elaboración de alimentos para animales monogástricos y / o rumiantes.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar el análisis proximal de los residuos para conocer el contenido de grasa, proteína, cenizas, fibra e hidratos de carbono.
- Conocer el contenido de azúcares reductores y totales.
- Evaluar la composición de aminoácidos de la proteína presente.
- Determinar el contenido de minerales presentes en el residuo.
- Evaluar el perfil de ácidos grasos del aceite contenido en el residuo.
- Cuantificar los siguientes factores antinutricionales: Inhibidores de tripsina, lectinas, taninos, ácido fítico, oligosacáridos y glucósidos cianogénicos.
- Averiguar la presencia y cantidad de metales pesados contenidos en el residuo.
- Realizar las pruebas de digestibilidad *in vitro*; para monogástricos y rumiantes.
- Proponer mezclas del residuo con otros alimentos para su aplicación en alimentación animal.

## ANTECEDENTES

### 1. LA VID

La vid pertenece a la familia de las vitáceas y es una planta dicotiledónea perteneciendo al género *Vitis*. La especie *Vitis vinifera* es la vid de mayor antigüedad, la cual está constituida por:

- La **raíz**; la cual profundiza en el suelo para alimentar a la vid,
- El **tallo y sarmientos**; que son las partes aéreas de la vid que poseen la resistencia para aguantar el conjunto de ramas que en la vid se conocen como sarmientos,
- El **limbo**; que es la hoja propiamente dicha, de color verde y
- Los **zarcillos**; que son órganos de sustentación que permiten a los sarmientos apoyarse a las estacas o alambres.

En la figura 1 se presenta el detalle de algunas partes de la vid.

El **fruto o grano**, el cual está compuesto de 88% pulpa, 8% de hollejo y 4% de pepitas, transporta los jugos para hidratar y nutrir el globo fructífero además de sostenerlo, se constituye por: la **piel, película u hollejo**; que es el elemento envolvente que le confiere al vino su bouquet particular, la **pulpa**; que es jugosa e incolora, compuesta por **azúcares y ácidos**, las **pepitas o semillas** en el centro de la pulpa que generalmente son dos y finalmente los **racimos**; constituidos por el **escobajo o raspón** y los **granos**.



**Figura 1.** Diagrama del sarmiento de vid. <sup>4</sup>

El soporte y vía de unión de los granos con los sarmientos es el escobajo, por donde se nutren y mantienen los granos<sup>1</sup>. Ver figura 1.

La especie *Vitis vinifera* presenta excelentes cualidades y calidad para la producción de vino, de uvas para el consumo en fresco (de mesa) y de uvas para la elaboración de pasas.<sup>2</sup>

Las cepas son las variedades de la vid de la especie *Vitis vinifera*, cada uno de estos cultivares tienen características o aptitudes particulares para la elaboración de vino en general se utilizan cepas nobles que permiten elaborar vinos de buena calidad tales como: Cabernet Sauvignon, Ruby Cabernet, Merlot, Cabernet, Franc, Zinfandel y Pinot Noir en el caso de vinos tintos y Chenin Blanc, Chardonnay, Gewürztraminer, Riesling y Semillón en el caso de vinos blancos.<sup>2</sup>

La tabla 1 muestra la composición general de la uva utilizada en la elaboración de vinos.

**Tabla 1.** Composición de la uva (*Vitis vinifera*)<sup>3</sup>

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Energía (Kcal/100g)	68
agua (g/100g)	81.6
Proteína total (g/100g)	0.6
Grasa total (g/100g)	0.7
Hidratos de carbono total (g/100g)	16.7
Ceniza (g/100g)	0.4
Calcio (mg/100g)	12
Hierro (mg/100g)	0.9

## 2. EL VINO

El vino es el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva. A continuación se describe brevemente el proceso de elaboración del mismo con el fin de mostrar como se da origen al residuo que será efecto de estudio en este trabajo.

Las uvas al llegar a los locales donde se llevará a cabo la vinificación pueden someterse a dos tratamientos distintos:

- Si se elabora vino tinto, las uvas se machacan y prensan para quebrar su envoltura; enseguida se ponen en cubas, en las que se mezcla el jugo, la cáscara y el escobajo. En este caso el pigmento presente en el hollejo se conserva y es responsable de la intensidad del color del vino. Al contacto de las partes sólidas con el jugo debe comenzar el proceso de fermentación, ya que es en éstas donde se encuentran las levaduras que dan origen al proceso. Así el primer paso es desgarrar el hollejo, operación realizada con estrujadoras de rodillos; que son dos cilindros rotativos entre los que pasan las uvas. Más tarde, unas bandas transportan las uvas estrujadas a unas cubas donde sufrirán su fermentación.
  
- Si su destino es vino blanco, se separa lo más pronto posible las cáscaras coloreadas del jugo blanco. En este caso es necesario mantener sólo el jugo incoloro en las cubas para que sufra su fermentación. Esta operación se lleva a cabo con algunas variantes, generalmente se usan uvas blancas, los racimos son pisados como para los vinos tintos pero deben escurrirse inmediatamente dejando fluir el jugo blanco para que se separe de la piel y del escobajo, se puede dejar

escurrir la cuba, a la salida de estos, los hollejos y los escobajos pasan a la prensa para extraerles todo el jugo; el líquido es recolectado en las cubas de fermentación<sup>1</sup>.

El líquido en el cual se lleva al cabo la fermentación y obtención del vino se le conoce como mosto, que en el caso del vino tinto está compuesto por el jugo de la pulpa, el hollejo y escobajo y en el vino blanco está compuesto solamente por el jugo de la uva<sup>4</sup>.

El siguiente paso, es la fermentación del mosto, que es el momento crucial para el nacimiento del vino y como se sabe, el proceso de transformación del líquido azucarado a alcohólico se efectúa gracias a la acción de levaduras del género *Saccharomyces*, especies *cerevisiae* y *oviformis* que son generadoras de ácido carbónico.

Cuando por el oído deja de ser detectable el desprendimiento de dióxido de Carbono, viene el descube; el vino es separado del orujo fermentado, este descube se logra al dejar escurrir el vino o bien sacarlo por medio de bombas. El vino nuevo se pone en barriles limpios, donde se lleva a cabo la fermentación lenta<sup>1</sup>.

Una vez efectuado el descube se procede a prensar el orujo para extraerle el vino que embebe. Del peso del orujo se calcula un 40 a 50% de vino<sup>5</sup>. Este prensado comprende el orujo gastado, en donde están involucrados los hollejos, pulpa prensada, escobajos y semillas, siendo este material el que se someterá a estudio para evaluar su composición así como otras características mencionadas anteriormente.

### Antecedentes

Finalmente los vinos destinados al consumo rápido son filtrados y embotellados después de un corto periodo de reposo. Los otros son llevados hacia las bodegas de almacenamiento o de envejecimiento. Éstos permanecerán en cubas o barricas por un tiempo determinado. Durante este periodo una transformación interna se desarrolla lentamente, afirmando el carácter y el aroma del vino.

Después de la filtración y embotellado, el vino continuará su evolución lentamente antes de alcanzar su pleno desarrollo.<sup>2</sup>

### **3. PRODUCCIÓN VITIVINÍCOLA**

La industria vitivinícola juega un papel importante en la economía mundial, encontrándose a México con una participación significativa, principalmente en lo que a calidad de vinos respecta.

La superficie global de producción de vid se mantiene estable desde hace 20 años en 10, 107, 000 ha.<sup>6</sup> Las estadísticas que a continuación se presentan (Tablas 2 y 3) no especifican variedades de vid, sólo se consideran los países productores más importantes. Y se muestra la producción de uva y vino en el mundo.

La participación de México parece no ser muy grande (su producción es menor al 1% y el consumo per cápita es <1L), pues intervienen muchos factores culturales así como económicos que hacen que su consumo y producción no puedan ser mayores, sin embargo la industria vitivinícola en México hasta hoy se considera exitosa siendo su producción de excelente calidad.<sup>2,4</sup>



**Tabla 2. Producción anual de uvas. <sup>7</sup>**

<b>País</b>	<b>Producción mundial Ha (x1000)</b>	<b>Producción mundial %</b>
España	1180	15.1
Francia	914	11.7
Italia	899	11.5
Turquía	602	7.7
Estados Unidos	364	4.7
Irán	270	3.4
Portugal	260	3.3
Rumanía	253	3.2
Argentina	210	2.7
China	194	2.5
<b>Total</b>	<b>5746</b>	<b>65.9</b>
<b>Resto del mundo</b>	<b>2053</b>	<b>34.1</b>

Datos reportados hasta 1999.

Tabla 3. Producción anual de vino. <sup>7</sup>

<b>Pais</b>	<b>Volumen (millones de L)</b>	<b>Producción mundial %</b>
Francia	52,671	20.5
Italia	54,188	21.1
España	30,320	11.8
E.U.A	20,450	8.0
Argentina	12,673	4.9
Sudáfrica	8,156	3.2
Alemania	10,834	4.2
Rumania	5,002	1.9
Australia	7,415	2.9
Chile	5,475	2.1
<b>Total</b>	<b>207,184</b>	<b>80.6</b>
<b>Resto del mundo</b>	<b>49,592</b>	<b>19.4</b>

Datos reportados hasta 1999.

#### **4. LOS RESIDUOS DE UVA COMO DESECHOS INDUSTRIALES**

En general todos los residuos generados en procesos de alimentos contienen principalmente materia orgánica biodegradable, que ocasiona serios problemas ambientales.<sup>8</sup> Estos pueden ser importante fuente de nutrientes para los animales, pero a menudo son quemados o se degradan de manera natural por factores ambientales.<sup>9</sup>

Afortunadamente existen muchas oportunidades de convertir éstos en valiosos bioproductos.

Los productores de vino recogen los orujos en sacos de plástico, en los cuales efectivamente se conservan suficientemente bien durante varios días, dado el ambiente formado por la presencia de levaduras: rico en CO<sub>2</sub> y empobrecido en oxígeno. Estos orujos tienen como fin la incineración o bien el uso como fertilizantes agrícolas.<sup>5</sup>

La viticultura es una importante actividad en el Noroeste de México, donde 33,500 hectáreas son cultivadas con diversas variedades de vid para la producción de vino.

Como resultado de esta actividad aproximadamente 270, 000 toneladas de residuos agroindustriales son producidas cada año <sup>10</sup>, lo que sin duda representa un problema ambiental y justifica la necesidad de buscar un tratamiento adecuado a este residuo.

Este residuo es usualmente quemado en el campo para prevenir la proliferación de fitopatógenos, causando un severo daño ambiental así como problemas ecológicos y riesgos a la salud humana.

La lignina, que forma parte de este residuo, es uno de los mayores responsables del carbono agroindustrial desechado, produciendo compuestos hidrocarbonados policíclicos aromáticos como el benzopireno, catecol, hidroquinonas, fenantreno y naftaleno, cuando este residuo es degradado por de calor. Todos estos compuestos, pueden inhibir la síntesis de DNA e inducir a tumores cancerígenos, en hígado, laringe, pulmón y cérvix tanto en animales como en humanos.<sup>10</sup>

Además, la incineración representa un consumo elevado de energía pues se requieren temperaturas en el rango de 900-1000 °K para convertir todo a material inerte.<sup>8</sup> Este gasto de energía podría ser disminuido, o bien, eliminado totalmente con la participación de la industria vitivinícola si se lograra el aprovechamiento adecuado de este desecho orgánico.

Otro desecho producido por la viticultura es el orujo gastado, este bioproducto es generalmente desechado en áreas abiertas, y puede ser usado en alimentación animal, especialmente en estaciones secas cuando las pasturas suelen escasear. Este sin embargo, es usado limitadamente (solamente un 30%) debido a su muy bajo valor nutricional así como la presencia factores antinutricionales tales como compuestos polifenólicos que inhiben la flora ruminal presente en rumiantes.<sup>10</sup>

## **5. ALIMENTACIÓN ANIMAL Y SU IMPORTANCIA EN LA NUTRICIÓN HUMANA**

El objetivo fundamental de la producción animal consiste en proporcionar alimentos de **alta calidad** para el consumo de la especie humana. La necesidad de encontrar soluciones alimentarias para la producción animal que a su vez no compitan con los alimentos para el hombre ha conducido a la búsqueda de fuentes potenciales para la alimentación animal, entre las que se encuentran los subproductos agroindustriales, leguminosas no convencionales y residuos orgánicos, entre otros. Desde el punto de vista económico del 60 al 80% de los costos totales de la producción animal se deben al concepto de alimentación, por tanto lograr una reducción en el mismo, es la meta de todos los productores y nutriólogos.<sup>11</sup>

Existe un incremento en la necesidad de fuentes de proteína y grasa, ambas para el crecimiento de la población humana y la alimentación animal. En países donde hay pobreza y alta tasa de natalidad, las plantas son consideradas como la mayor fuente de proteína dietética. Si se lograra incrementar la producción animal, esto podría traducirse en una fuente de proteína animal más accesible para la población en donde la escasez de alimentos de origen animal es alta.<sup>12</sup>

La eficiencia de los animales como fabricantes de alimentos varía ampliamente pues depende de sus habilidades genéticas, de la nutrición apropiada y del manejo, entre otros factores.

**Los animales contribuyen como proveedores de alimentos para el hombre, mediante la transformación de productos con escaso o nulo valor alimentario en productos muy nutritivos para el hombre.**

Los animales producen carne y leche en lugares que son muy secos o pobres para poder ser cultivados. Existe entonces una indudable justificación, para la existencia de una industria animal.

Los rumiantes domésticos aprovechan mucho de las pasturas y praderas y algo de bosques para producir carne y leche. En muchos países los animales también proveen fuerza locomotriz para producir y transportar cosechas.<sup>9</sup>

Existe la preocupación internacional de que la población del próximo decenio, rebasará la capacidad mundial de producir alimentos, debido a las limitaciones de tierra, agua y energía, sin embargo, se cree que la creciente demanda puede ser satisfecha mejorando la tecnología, a través de un incremento coordinado de cosechas y de la producción animal y de un empleo más completo de las tierras marginales y materiales de desecho.

La mayoría de la leche y carne producida en el mundo por el ganado, búfalos, ovejas y cabras se derivan de pastorear en sitios no aprovechables, así como del empleo de subproductos de desecho y residuos de cosechas. Por lo tanto, ellos sí contribuyen a proveer alimentos para el hombre.<sup>9</sup>

Los países en desarrollo, donde la desnutrición ocurre con mayor frecuencia, tienen 70% de todo el ganado bovino y búfalos o bisontes, 63% de los ovinos y caprinos y 60% de los porcinos, sin embargo producen sólo 34% de la carne de vacuno, 21% de la leche, 50%

### Antecedentes

de la carne de oveja y cabra y 37% de la de cerdo. Es evidente que uno de los caminos para incrementar el aprovisionamiento de proteína es mejorar las condiciones alimentarias y de manejo de los animales domésticos de esas naciones. Dichas condiciones en donde los animales son explotados en forma controlada y donde comen residuos con suplementos limitados, no ingerirán productos comestibles para el ser humano; por lo que mejorarán su rendimiento, en comparación con la baja productividad prevalente en áreas subdesarrolladas,<sup>9</sup> en donde parte de su alimentación está constituida por alimentos convencionales para el humano; es decir, una cantidad considerable de alimentos suministrados a los animales, en algunos países entra en competencia directa para el consumo humano. Se calcula que los alimentos suministrados en los Estados Unidos a los animales domésticos, podría alimentar aproximadamente a 40 millones de personas,<sup>13</sup> por lo que si es posible sustituir al menos en parte éstos alimentos, disminuiría dicha competencia.

## **6. ALIMENTACIÓN DE MONOGÁSTRICOS Y RUMIANTES**

A continuación se presentan algunos aspectos generales sobre la alimentación de las especies más importantes que forman parte de la producción animal en México, considerándose como posibles vías de aprovechamiento del residuo estudiado en este trabajo.

### **6.1 Generalidades de alimentación de rumiantes**

La industria del ganado se ha convertido en una parte altamente especializada del campo agropecuario. Los animales rumiantes necesitan un tiempo para adaptarse a los alimentos; principalmente, debido a que los microorganismos del rumen, que predigieren el alimento, se desarrollan en poblaciones que reflejan la composición del alimento. Los problemas, con respecto a la nutrición, se relacionan con el modo de adaptar al ganado, en forma demasiado rápida, a las dietas.

Además es frecuente la utilización de subproductos o alimentos de desecho, de los cuales **no se tiene buena información en cuanto a su valor nutritivo**. La necesidad de obtener una conversión alimentaria eficiente para minimizar los costos de alimentación, ha traído como consecuencia la utilización masiva de granos procesados en diferentes formas. Aunque los granos procesados generalmente son más digeribles y producen ganancias de peso más eficientes, tienen mayor probabilidad de producir trastornos digestivos si se utilizan en forma impropia en las raciones de finalización.<sup>13</sup>



## **6.2 Alimentación de rumiantes**

Los rumiantes domésticos se alimentan principalmente de forrajes: plantas herbáceas y arbustivas de pastos naturales, plantas forrajeras cultivadas y subproductos agrícolas. (pajas, etc.)

La cantidad de energía que un rumiante puede obtener de un forraje consumido a voluntad depende de dos características de este forraje:

- Su ingestibilidad, que es la cantidad de forraje ingerida y se expresa siempre en Kg de materia seca, para obviar el inconveniente que representan las grandes variaciones existentes en el contenido de agua de los alimentos
- Su digestibilidad, es decir la proporción de este forraje, o más precisamente de su materia orgánica, que se absorbe en el tubo digestivo. Este parámetro determina el valor energético.

Estas dos características varían dentro de límites muy amplios. De manera general, ambas disminuyen en el curso del ciclo de vegetación, al aumentar las proporciones de tallos, de tejidos lignificados y de paredes celulares.

En las raciones de los animales con producciones elevadas, los forrajes se complementan con alimentos más digestibles, con menor (o nulo) contenido de tejidos lignificados, y que son ricos en proteínas y otros constituyentes intracelulares; estos alimentos son los frutos, los granos y las raíces, así como diversos subproductos de todos ellos.<sup>14</sup>

### **6.3 Digestión ruminal**

La mayor parte de la digestión de materiales empleados para la alimentación animal de rumiantes ocurre en el rumen, un especializado órgano en el cual los microorganismos fermentan el material alimenticio para producir principalmente ácidos grasos y aminoácidos que son usados por el animal como una fuente de energía y proteína, respectivamente.<sup>15</sup>

Los rumiantes no tienen incisivos superiores por lo que dependen de una almohadilla dental superior y de los incisivos inferiores en unión con los labios y la lengua para la prensión de los alimentos, además de una abundante y continua producción de saliva que es fuente de nitrógeno, fósforo y sodio que utilizan los microorganismos del rumen.

El estómago del rumiante se divide en 4 compartimentos: el retículo; que moviliza el alimento digerido hacia el rumen, el rumen; que actúa como un recipiente de fermentación con una alta población microbiana, el omaso; que ayuda en la reducción del tamaño de las partículas del alimento digerido así como el control del paso del bolo digestivo y finalmente el abomaso.

En todo el proceso digestivo existe un patrón bien desarrollado de las contracciones rítmicas que se llevan a cabo en los diversos compartimentos del estómago, las cuales hacen que el alimento ingerido penetre y circule a través del rumen, luego pase por el omaso y salga de éste para penetrar finalmente en el abomaso. También tienen importancia las contracciones que ayudan a la regurgitación durante la rumia que es un fenómeno natural siendo ésta una forma controlada del vómito, que permite que los

materiales semilíquidos se regurgiten al esófago, los líquidos se deglutan y se efectúe una remasticación pausada y una nueva deglución de los sólidos, y finalmente el eructo que permite eliminar el gas producido por la fermentación microbiana.<sup>13</sup>

La información que se tiene sobre los rumiantes domésticos indica que aproximadamente dos terceras partes de la sustancia orgánica digerible y de la energía se absorbe del estómago anterior (retículo-rumen, omaso) y el resto se digiere en los intestinos. Las porciones más fibrosas (fibra cruda, paredes celulares), lo mismo que los glúcidos de fácil disponibilidad, también se digieren en una proporción un poco mayor (de 65 al 90% de la digestión total) en el estómago anterior. La digestibilidad del nitrógeno es bastante variable pero es relativamente mucho más importante en el intestino delgado; esto refleja el paso de grandes cantidades de proteínas microbianas al intestino delgado.<sup>13</sup>

#### **6.4 Características del rumen**

El rumen reúne una serie de condiciones favorables a la actividad de una población microbiana anaerobia extraordinariamente densa, como son: el aporte alimenticio semi-continuo un medio diluido y bien acondicionado y la eliminación de los productos residuales de la fermentación.<sup>14</sup>

La población microbiana en el rumen está regulada por el peculiar balance ecológico que da condiciones para que prevalezcan ahí. El ambiente del rumen contiene un número de cualidades únicas que provocan diferencias con otros sistemas anaeróbicos ya que es

esencialmente isotérmico y está regulado por el metabolismo homeotérmico de los animales huéspedes.

Los microorganismos del rumen son predominantemente anaerobios obligados aunque pueden tolerar algo de oxígeno, a lo largo de la fermentación algo de oxígeno es introducido a través del alimento y el agua, y se difunde a través de la pared del rumen.<sup>16,17</sup>

La población microbiana del rumen incluye: bacterias, protozoos y hongos.

Existen más de 200 especies de bacterias, aproximadamente  $10^{10}$  bacterias por mL de contenido ruminal, donde destacan las especies celulolíticas, que tienen un papel irremplazable al atacar las paredes celulares intactas. Una parte de las bacterias son destruidas en el rumen por los protozoos, pero la mayor parte, sin embargo, abandona el rumen, pasando hacia el omaso y cuajar, bien en el líquido ruminal o bien adheridas a las partículas del alimento, sin embargo estas pérdidas son compensadas permanentemente mediante la multiplicación de la población.

Los protozoos del tipo ciliado prosperan en el rumen, estos atacan todos los constituyentes principales de los alimentos, degradando incluso, algunos de ellos, las paredes celulares. Estos están en competencia con las bacterias por los sustratos nutritivos y por la importante depredación que realizan sobre éstas. En su mayor parte permanecen en el rumen.

Finalmente los hongos, que se fijan sobre soportes rígidos, son capaces de degradar la celulosa y las hemicelulosas a pesar de la presencia de lignina.<sup>14,17</sup>

## **6.5 Monogástricos**

En general los monogástricos ajustan, en la medida de lo posible, el consumo de alimento a sus necesidades energéticas, de conservación y producción; viéndose influenciado por el contenido de proteína de la ración, apetitos específicos (v.g. la gallina presenta un apetito específico para el calcio durante el período de formación de la cáscara de huevo), la forma de presentación del alimento etc.<sup>18</sup>

## **6.6 Generalidades sobre alimentación de cerdos (monogástricos)**

El manejo de la nutrición y la alimentación son aspectos importantes en la producción porcina. El programa de alimentación puede tener un efecto importante sobre el desarrollo del animal y sobre toda la rentabilidad del rebaño de cerdos.

En general, el cerdo tiene la habilidad de obtener nutrientes a partir de una amplia variedad de alimentos. Esta especie, junto con las aves y a diferencia de los rumiantes, depende totalmente de los aminoácidos presentes en la proteína dietética, por lo que el balance de aminoácidos en la proteína es extremadamente importante, ya que, a diferencia de los rumiantes, tanto los cerdos como las aves no pueden sintetizar todos los aminoácidos a partir de proteínas de pobre calidad o de fuentes de nitrógeno no proteínico, además estas especies requieren carbohidratos fácilmente digeribles para cubrir sus necesidades de energía por lo que celulosa y hemicelulosa no son aprovechados adecuadamente por éstos.<sup>19</sup>

Los cambios en los requerimientos nutricionales que se presentan a medida que el cerdo madura se relacionan con los cambios en la tasa de crecimiento y la composición corporal.

La alimentación completa de los cerdos con una dieta alta en energía produce un índice máximo de ganancia y de eficiencia en la utilización del alimento. La alimentación limitada puede producir canales magras, pero la tasa de crecimiento más lenta disminuye la eficiencia energética debido a la mayor proporción del consumo de energía diaria que se necesita para el mantenimiento.

El hecho de suministrar una dieta deficiente de proteínas durante el período de crecimiento trae como resultado la presencia de una canal más grasa. Además de los factores nutricionales, la forma física de la dieta es importante. El hecho de hacer comprimidos de ciertas dietas, especialmente aquellas con cebada y granos fibrosos, puede mejorar el crecimiento y la eficiencia en la utilización del alimento. El grado de trituración y pulverización contribuye a que se presenten variaciones en el rendimiento de los cerdos en crecimiento.<sup>13</sup>

## **6.7 Características de la digestión de cerdos**

La boca y las estructuras afines: lengua, labios y dientes, se utilizan para obtener y masticar los alimentos. En las especies omnívoras, las que se alimentan tanto de plantas como de alimentos de origen animal, tal como los cerdos, los dientes incisivos se utilizan principalmente para morder los trozos de comida y los dientes molares se han adaptado para la masticación de alimentos no fibrosos. Durante el proceso de la masticación se

vierte la saliva, que proviene principalmente de tres pares de glándulas bilaterales: las submaxilares, las sublinguales y las parótidas. La saliva ayuda a convertir la comida en un bolo que se deglute fácilmente además de suministrar una fuente de enzimas para iniciar los procesos digestivos.

El cerdo tiene un estómago relativamente grande, con tejidos mucosos que recubren el interior del estómago el cual tiene diferentes clases de glándulas. En la región del cardias, las células producen principalmente moco como medio de protección del recubrimiento gástrico. En la región glandular péptica, la mucosa está recubierta con depresiones gástricas que se comunican con las glándulas gástricas. Estas producen una secreción mixta de ácido, enzimas y moco dando lugar a enzimas proteolíticas y producción de HCl.

El intestino delgado es relativamente largo; el duodeno, primera sección corta produce varios jugos digestivos. Además de esta función, una gran variedad de jugos digestivos provenientes del páncreas, lo mismo que la bilis, penetran al duodeno a una corta distancia del píloro. Se puede presentar un volumen considerable de absorción en el duodeno. En términos generales, el intestino delgado es el responsable de la mayor parte de la absorción del aparato digestivo y está recubierto por vellosidades de borde en cepillo que aumentan el área de absorción. El intestino grueso está formado por el ciego, el colon y el recto. En general el intestino grueso funciona como una zona de absorción del agua y de secreción de algunos elementos minerales, tales como el Ca. En el ciego y en el colon se lleva a cabo una cantidad considerable de fermentación bacteriana. Esta área resulta indispensable para la síntesis de algunas vitaminas hidrosolubles.

El páncreas y el hígado son indispensables para efectuar los procesos digestivos debido a las secreciones digestivas que producen. La bilis, que proviene del hígado, tiene muchas funciones importantes y éste es un órgano sumamente activo para la síntesis y desintoxicación; también es un sitio de almacenamiento importante de la mayoría de las vitaminas y de minerales traza.<sup>13</sup>

### **6.8 Generalidades sobre alimentación de aves**

Los principales ingredientes que forman en la actualidad una parte integral de las raciones para aves de corral son el maíz, como fuente de energía, y la soya, como complemento proteínico. Estos son disponibles y permiten que haya un crecimiento rápido o una elevada producción de huevo y carne con una conversión alimentaria bastante eficiente. Sin embargo, las raciones de maíz-soya suelen ser deficientes en algunos nutrimentos.

Debido al acelerado crecimiento de los pollos, los requerimientos nutricionales son muchos más importantes que en las aves adultas. Por lo que se debe brindar más atención a la calidad de la proteína y a la suficiencia de los aminoácidos indispensables especialmente metionina y lisina. Las dietas ricas en energía requieren una concentración mayor de todos los otros nutrimentos, siempre y cuando no se altere la digestibilidad y absorción.<sup>13</sup>

### **6.9 Características de la digestión de aves**

El aparato digestivo de las especies aviarias se diferencia considerablemente en su anatomía con relación a las especies monogástricas. El pico y las garras, les sirven para



reducir parcialmente los alimentos a un tamaño que puede deglutirse. La comida digerida pasa directamente al buche donde probablemente se lleva a cabo la fermentación.

El proventrículo de las aves es el lugar donde se producen los jugos gástricos, la molleja ejerce algunas de las funciones de los dientes en las especies mamíferas, por medio de las cuales se reduce físicamente el tamaño de las partículas de comida. El pH del intestino delgado es ligeramente ácido y se supone que la digestión de las proteínas se lleva a cabo mediante una combinación de las enzimas proteolíticas comunes.

La absorción es semejante a la de las especies de los mamíferos. La reabsorción del agua se lleva a cabo en el ciego y el intestino grueso. Alguna parte de la digestión de las fibras se lleva a cabo en el ciego por medio de la fermentación bacteriana, pero en un nivel mucho más bajo que la mayoría de los mamíferos.<sup>13</sup>

La tabla 4 muestra los principales requerimientos nutricionales necesarios para el adecuado desarrollo de las 3 especies antes mencionadas.

**Tabla 4.** Requerimientos nutricionales para animales en etapa de desarrollo.<sup>19,20</sup>

Requerimiento	Rumiantes	Aves	Cerdos
Proteína total (%)	10-12	14-18	15
Proteína digerible (%)	7.5	**	**
Calcio (%)	0.20-0.25	3.2	0.6
Fósforo (%)	0.20-0.21	0.56	0.5

\*\*valores no reportados para esa especie

Los valores pueden cambiar dependiendo el estado de desarrollo del animal, así como la función del mismo.

Los datos se expresan en % en la ración.

## **7. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS Y SU IMPORTANCIA**

Los animales requieren la ingestión permanente de alimentos para el funcionamiento normal de sus procesos vitales. Los alimentos de especies animales explotadas por el hombre son principalmente, vegetales o productos de origen vegetal así como algunos subproductos de origen animal; al ser consumidos, la energía contenida en ellos es utilizada para el mantenimiento de las funciones orgánicas, para la formación de tejidos en los animales en crecimiento así como para a producción de leche, huevos, lana, etc.

El agua es, cuantitativamente hablando, el componente predominante en el organismo animal, superando con diferencia a la suma de los demás componentes. La mayor parte de la materia seca de los animales y plantas, se compone de tres grupos de compuestos orgánicos (proteínas, grasa e hidratos de carbono) así como de materia inorgánica (minerales) y componentes presentes en cantidades reducidas como vitaminas, ácidos nucleicos y otros compuestos.<sup>11</sup>

### **7.1 Agua**

La mayoría de las funciones biológicas del agua están relacionadas con su propiedad de actuar como solvente de numerosos compuestos. Participa en la digestión (hidrólisis de las proteínas, grasas e hidratos de carbono), la absorción de los nutrimentos digeridos, el transporte de metabolitos en el organismo y la excreción de los productos de desecho así como medio donde se llevan a cabo las reacciones metabólicas de un organismo.

Los animales pueden tener acceso al agua de las siguientes formas: como agua de bebida, la contenida en los alimentos y el agua metabólica. Los forrajes y ensilados suelen contener hasta un 90% de humedad, lo que representa un aporte sustancial para cubrir las necesidades de los animales, mientras que los alimentos secos como los concentrados y el heno, contienen entre el 7% y el 15%.

El contenido en humedad superior al 15% en los alimentos secos no es admisible, ya que se supone una disminución del valor nutritivo y la predisposición de los mismos para el desarrollo de hongos y podrirse.<sup>21</sup>

## **7.2 Hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono constituyen una de las tres principales clases de nutrimentos y suelen proporcionar la mayor parte de la energía en las dietas.<sup>22</sup> Se hallan en los alimentos como azúcares y almidones, mismos que representan una de las principales fuentes de energía de la dieta, y como celulosa, la cual es uno de los principales componentes de la fibra dietética.<sup>23</sup>

En términos químicos, los hidratos de carbono están compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno, con dos átomos de hidrógeno por cada uno de oxígeno. El grupo comprende los azúcares (mono, di y trisacáridos), así como almidones y celulosas que son polisacáridos.

Sólo las plantas y frutos inmaduros forman almidón. Durante la digestión en el animal, éste se hidroliza a glucosa.

La rafinosa y la estaquiosa son oligosacáridos compuestos por unidades de D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa, no reductor.<sup>24</sup> La presencia de estos oligosacáridos, puede producir gases en el tracto gastrointestinal (flatulencia), estos compuestos no son asimilados adecuadamente debido a la ausencia de  $\alpha$ -galactosidas en la mucosa intestinal, sin embargo, bacterias anaeróbicas fermentativas pueden romper el enlace  $\alpha$ -(1-6) con la consecuente emisión de hidrógeno, bióxido de carbono, metano y ácido sulfhídrico, dando lugar a flatulencias e interfiriendo con una adecuada digestión. Cabe mencionar que los rumiantes son capaces de asimilar estos oligosacáridos por sus características de digestión antes mencionadas.<sup>25</sup>

Otro grupo de hidratos de carbono corresponde a la celulosa; compuesta por enlaces glucosídicos del tipo beta que sólo es asimilable por rumiantes, bovinos y ovinos, por lo que éstos pueden utilizarla como fuente de energía gracias a las enzimas producidas por microorganismos presentes en el rumen.<sup>22</sup>

### **7.3 Fibra**

La fibra es un residuo orgánico insoluble constituido principalmente por la celulosa, pectina, lignina, hemicelulosa, gomas y mucílagos.

La celulosa es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza y es uno de los principales componentes estructurales de las células vegetales, representando un 20-40% de la materia seca de las plantas verdes. La unión de las moléculas de glucosa, mediante un enlace  $\beta$  hace a la celulosa esencialmente insoluble y resistente a la degradación por las enzimas digestivas en los animales. No obstante, puede degradarse por la

fermentación llevada a cabo por los microorganismos ya que éstos conservan la enzima celulasa que los animales superiores han perdido en el proceso de evolución. Es por ello que tanto en el rumen como en la porción distal del tracto digestivo sea posible la degradación de celulosa, sin embargo animales monogástricos no poseen esta habilidad.

Las pectinas son polímeros compuestos principalmente de unidades de (1-4)- $\alpha$ -D-galacturonapiranosilo, y se encuentran en las laminillas intermedias de las celulas vegetales. Un aspecto que diferencia a las pectinas entre sí es su contenido en esteres metílicos, o grado de esterificación, que disminuye al producirse la maduración de plantas.<sup>24</sup>

La hemicelulosa es de los polisacáridos más complejos, sin embargo al igual que la celulosa puede ser aprovechada por rumiantes gracias a microorganismos con actividad celulolítica y su digestión es considerada semejante a la de la celulosa en rumiantes.<sup>17,21</sup> Esta, posee un esqueleto de tipo xilano compuesto por unidades (1-4)- $\beta$ -D-xilopiranosilo. Este polímero contiene frecuentemente cadenas laterales de L-arabinofuranosilo unidos a la posición 3 de algunas unidades de D-xilosilo. Otros constituyentes típicos son el 4-O-metiléter del ácido D-glucurónico, D- o L-galactosa y grupos acetiléster. No se conoce bien su función en la dieta, pero es buena fuente de fibra dietética al formar parte del complejo no digestible de las paredes vegetales, pareciendo probable que tenga efectos nutritivos y fisiológicos beneficiosos sobre la motilidad intestinal, peso y volumen del bolo alimenticio y tiempo que éste tarda en recorrer el intestino.<sup>24</sup>

La lignina se asocia a los hidratos de carbono de la pared celular, es un polímero tridimensional formado por unidades de fenil-propano (tales como el siringaldehído y la

vainillina) unidos mediante cadenas alifáticas laterales de tres carbonos. La lignificación de las membranas celulares, en especial de aquellas de los tejidos xilemáticos y esclerenquimáticos, les proporciona una considerable resistencia y rigidez.<sup>24</sup>

La lignina no es aprovechada adecuadamente; ya que la capacidad nutricional de la celulosa depende notoriamente de la relación lignina-celulosa presente y en ocasiones cuando existe un alto contenido de lignina en los alimentos, los tratamientos con álcalis que disuelven parcialmente la lignina y rompen los enlaces entre la lignina y los hidratos de carbono, permiten un mejor aprovechamiento de la celulosa. Se ha comprobado que el contenido de lignina está relacionado con una digestibilidad baja de los principios nutritivos de los alimentos.

Durante la maduración se acumulan concentraciones crecientes de fibra lignificada en la armadura estructural de las plantas, esto da lugar a menores valores de proteína e hidratos de carbono digestibles.

Se ha comprobado que el contenido de lignina está relacionado con una digestibilidad baja en los principios nutritivos de los alimentos.<sup>14,17</sup>

## **7.4 Grasas**

Las grasas son un importante combustible contenido en los alimentos debido al alto aporte calórico que suministran y representan un almacenaje importante de energía. Son considerados químicamente como ésteres de ácidos grasos y glicerol. Entre las

funciones más importantes de las grasas son: el mantenimiento del calor corporal, reserva energética y vehículo de vitaminas liposolubles.<sup>22</sup>

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados en el organismo mediante vías metabólicas específicas, sin embargo existen ácidos grasos de importancia nutricional ya que son indispensables, es decir es necesaria su ingesta ya que el organismo no los produce; tal es el caso del ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, los cuales son necesarios para realizar funciones importantes en los organismos.

Así mismo existen las ceras que son derivados de los lípidos que se componen de un ácido graso de cadena larga esterificado con un alcohol monohídrico de alto peso molecular. No son fácilmente digeridas por los animales y carecen de valor nutritivo.<sup>21,24</sup>

## **7.5 Proteínas**

Las proteínas son el componente fundamental de los tejidos animales, siendo necesario un aporte continuo a lo largo de la vida. Se consideran moléculas complejas compuestas por aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico, que contienen un grupo carboxilo, un grupo amino en posición  $\alpha$  y un grupo R que varía en los distintos aminoácidos. A excepción de la glicina, que no tiene átomo de carbono asimétrico debido a que dos de sus sustituyentes son hidrógenos, los aminoácidos presentes en las proteínas pertenecen a la serie L-, siendo los comúnmente empleados por los animales con fines metabólicos.

Al igual que los ácidos grasos, existen aminoácidos que los organismos no son capaces de sintetizar (indispensables), este hecho determina pues, la calidad de una proteína, la cual a su vez determina la utilidad de una proteína alimenticia para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Se consideran aminoácidos indispensables: leucina, isoleucina, lisina, metionina, valina, treonina, triptófano, fenilalanina e histidina.<sup>22</sup>

En la tabla 5 se muestran los aminoácidos considerados indispensables para aves y cerdos, sin embargo dada la compleja digestión existente en rumiantes no se sabe con exactitud que aminoácidos son indispensables para estas especies.

En alimentación animal la proteína tiene una importancia primordial ya que los alimentos destinados a animales se formulan normalmente **en base a la proteína**, y sus requerimientos son influidos mayormente por la edad y el peso de los animales.<sup>18</sup>



**Tabla 5.** Requerimientos de aminoácidos indispensables para la producción animal <sup>a 18,19</sup>

<b>Aminoácidos (%)</b>	<b>Cerdo en crecimiento<sup>b</sup></b>	<b>Pollo en crecimiento<sup>b</sup></b>
Arginina	0.20	1.03
Histidina	0.18	0.39
Isoleucina	0.5	0.78
Leucina	0.6	1.38
Lisina	0.7	0.98
Metionina y cistina	0.45	0.75
Fenilalanina y tirosina	0.70	1.31
Treonina	0.45	0.59
Triptofano	0.12	0.19
Valina	0.50	0.86

a. valores expresados en % de la ración

b. estos valores pueden cambiar dependiendo el estado de desarrollo del animal así como la función que éste desempeña.

## **7.6 Minerales**

Los minerales tienen funciones específicas en los organismos; principalmente estructurales; como calcio y fósforo, electrolíticas; como sodio y potasio y catalíticas; como magnesio y zinc.

Los animales domésticos obtienen la mayoría de los minerales en los concentrados y forrajes que consumen.

### Antecedentes

Los animales en general requieren muy pequeñas cantidades de minerales siendo los requeridos en mayores cantidades el calcio y el fósforo que incluso son suministrados en cantidades complementarias en las raciones para los animales. Otros elementos menores que necesitan los animales para un crecimiento y reproducción normales son el boro, cobalto, cobre, cloro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, sodio y zinc, que se encuentran en cantidades adecuadas en la mayoría de los forrajes y otros alimentos destinados a alimentación animal.<sup>11,14,18.</sup>

Existen a su vez, otros elementos tales como el plomo, arsénico, bismuto que son considerados como metales pesados que se encuentran en productos agrícolas debido a la contaminación del suelo, éstos son considerados tóxicos y pueden tener efectos perniciosos al consumirse ya sea por efecto inmediato o por envenenamiento acumulativo debido a la ingesta por periodos largos. Entre los efectos principales causados por este tipo de elementos se encuentran: la destrucción de la vitamina C, retraso mental e incluso la muerte. De ahí la importancia del conocimiento del contenido de este tipo de elementos en los alimentos.<sup>26,27</sup>

## 8. DIGESTIBILIDAD

La digestión se define como la preparación de los alimentos para su absorción en el aparato digestivo, ella precede a la "absorción", que es la entrada de nutrimentos, iones y moléculas a las células de la mucosa intestinal. Digestión y absorción se miden combinados y al valor obtenido se le llama digestibilidad de un nutrimento. La información obtenida a partir de pruebas de digestibilidad, se utiliza en forma muy extensa en la nutrición de los animales para evaluar los alimentos o estudiar la utilización de nutrimentos.

Varios factores pueden alterar el grado de su digestión, dentro de los cuales se encuentran el nivel de consumo del alimento, los trastornos digestivos, el contenido de fibra, la frecuencia de la alimentación, las deficiencias de los nutrimentos, el procesamiento de alimento y otros efectos que se relacionan con los nutrimentos.<sup>13</sup>

El valor nutritivo potencial de un alimento puede ser determinado en primera instancia por el análisis químico proximal, pero el valor real del mismo para el animal sólo se puede lograr a través de un análisis de las pérdidas inevitables que ocurren durante la digestión, absorción y metabolismo. Esto obedece a que después de consumir un alimento, hay residuos no digeridos y que son excretados en las heces, lo cual significa una pérdida en términos de la utilización del alimento, por lo que la primera pérdida impuesta al mismo está representada por la parte que no es digerida ni absorbida en el animal.<sup>11,13</sup>

Existen técnicas *in vitro* que al involucrar procesos semejantes a los que ocurren dentro de un animal, permiten obtener un valor de digestibilidad de diversos alimentos y forrajes,

ya que simulan los procesos digestivos donde se lleva a cabo una digestión enzimática, en las que intervienen pepsina, tripsina, quimiotripsina y peptidasa en el caso de animales monogástricos y la determinación de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares para obtener la digestibilidad en el caso de forrajes destinados a la alimentación de rumiantes.<sup>28</sup>

En la tabla 6 se muestran valores de digestibilidad obtenidos experimentalmente en desechos obtenidos a partir del procesamiento de la uva.

**Tabla 6.** Digestibilidad de productos de desechos obtenidos a partir del procesamiento de uva.<sup>19</sup>

<b>Subproducto</b>	<b>PDIA (%)</b>	<b>PDIN (%)</b>	<b>PDIE (%)</b>
Orujo de uvas sin semilla	22	37	24
Pulpa de uvas	25	29	36
Torta de semillas de uva	14	39	27

PDIA : Proteínas digeribles en el intestino de origen alimenticio

PDIN: PDIA más proteína microbianas digeribles en el intestino correspondientes al nitrógeno del alimento degradado en el rumen

PDIE: PDIA más proteína microbianas digeribles en el intestino correspondientes a la energía del alimento fermentada en el rumen

## **9. FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES**

Este apartado, pretende dar una breve descripción acerca de los factores tóxicos y antinutricionales que fueron parte del análisis toxicológico del residuo de la vid.

Las semillas de plantas representan una de las mayores fuentes de proteína dietética, variando de un 8% a 15% en cereales y aproximadamente 20% a 35% en leguminosas.

El valor nutricional de una proteína esta determinado por su digestibilidad, su contenido de aminoácidos indispensables y la disponibilidad de aminoácidos individuales , en algunos alimentos la presencia de un bajo contenido de aminoácidos azufrados o lisina, estructuras compactas de proteínas y la presencia de compuestos no proteicos (fibra dietética, taninos, fitatos) y / o proteínas antifisiológicas (inhibidores de tripsina, lectinas) , pueden perjudicar y aumentar la excreción de nitrógeno endógeno, disminuyendo el valor nutritivo de un alimento.<sup>29</sup>

Las sustancias antinutritivas se definen pues, como aquellos compuestos que están presentes de manera natural en algunos alimentos y actúan provocando una pérdida de nutrimentos indispensables o interfiriendo en su utilización y función metabólica. Su presencia en los alimentos no implica necesariamente un problema de toxicidad aguda y sus riesgos pueden no ser serios en países desarrollados, pues una alimentación equilibrada, o incluso el aumento del aporte en la dieta del nutrimento afectado, puede mejorar rápidamente el estado general. Sin embargo, es esencial que éstos compuestos sean identificados y cuantificados, de tal manera que su riesgo real para la salud humana

o animal sea evaluado y puedan tomarse las medidas preventivas o correctivas correspondientes.

Existen además sustancias tóxicas, tales como el cianuro liberado a partir de glucósidos cianogénicos, que tienen efecto a corto tiempo y pueden incluso causar la muerte.<sup>30</sup>

### **9.1 Hemaglutininas**

También conocidas como lectinas, son un grupo de proteínas o glicoproteínas enterotóxicas, presentes comúnmente en las leguminosas comestibles, que suelen presentar la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos sanguíneos. Todas las lectinas producen síntomas parecidos, entre los que resaltan la intensa inflamación de la mucosa intestinal, con la posterior destrucción de los epitelios, edema y la hemorragia del tejido linfático. Las lectinas se unen a las microvellosidades de los enterocitos del yeyuno y obstaculizan su función. Hay destrucción entonces de las células de la mucosa, disminución de la actividad enzimática, aumenta la descamación de las células de la mucosa y las vellosidades disminuyen de tamaño, con lo que se disminuye la superficie de absorción. Sin embargo es importante mencionar, que la presencia de hidratos de carbono en la molécula de las lectinas, les da especificidad hacia las células lo que repercute de manera importante en su acción, pues de no ser específicas no pueden unirse a las células y causar daño, además para que el efecto, vía oral, de las lectinas sea efectivo, éstas deben resistir el ataque de las proteasas a lo largo del tracto digestivo.<sup>31</sup> Estas suelen destruirse por métodos de calentamiento como el secado o cocción.

## **9.2 Inhibidores de proteasas**

Son sustancias de naturaleza proteínica ampliamente distribuidas en los alimentos de origen vegetal, que interfieren inhibiendo la actividad de las proteasas las cuales permiten la asimilación adecuada de proteínas, afectando primordialmente el crecimiento, digestibilidad del alimento y utilización metabólica de los alimentos. Los inhibidores tienen uno o más péptidos de unión (sitio reactivo), los cuales interaccionan con el sitio reactivo de la enzima; ésta inhibición se traduce en una reducción de la digestión proteínica y por consecuencia también de su asimilación.<sup>12</sup> Mediante el calentamiento apropiado puede destruirse el efecto de los principales inhibidores de las proteasas o al menos disminuirlo en gran parte, aunque ésta destrucción depende de la temperatura, duración y tipo de calentamiento.<sup>31,32</sup>

## **9.3 Glucósidos cianogénicos**

La bioquímica de los glucósidos cianogénicos es relativamente bien conocida. Sin embargo se desconoce el metabolismo de los glucósidos que contienen ácido cianhídrico.

Son compuestos con una parte polar (azúcar) y el aglucón que es el que tiene el efecto tóxico, el oligosacárido no causa daño, sino el aglucón pues produce la liberación de ácido cianhídrico. La ingestión del glucósido no es venenosa, ya que en el tracto digestivo no existe ninguna enzima como la  $\beta$ -glucosidasa que lo libere, pero algunas bacterias intestinales pueden descomponer el glucósido dejando en libertad el ácido cianhídrico. En las plantas que contienen éstos glucósidos la  $\beta$ -glucosidasa es extracelular y solamente por destrucción física o química de la pared celular puede llegar

a ponerse en contacto con el compuesto. Además del peligro del envenenamiento agudo hay que considerar el del envenenamiento crónico, que hasta el momento permanece sin explicación<sup>30,31,33</sup>.

#### **9.4 Taninos**

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua con un peso molecular en un rango de 500-3000 Da, están distribuidos en los alimentos de origen vegetal.

Los taninos son clasificados como condensados o hidrólizables, en base a su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos, particularmente ácidos. Ellos pueden formar complejos solubles e insolubles con proteínas, los cuales pueden ser responsables del efecto antinutricional de éstos.<sup>34</sup>

Se consideran indeseables pues la oxidación de los grupos fenólicos de los taninos a quinonas puede formar enlaces covalentes entre los grupos  $\epsilon$ -amino de los restos de lisina y arginina en las cadenas peptídicas lo que produce la precipitación de las proteínas y en consecuencia una reducción del valor nutricional del alimento. La unión de los taninos a las enzimas digestivas impide su acción; la unión con las proteínas del alimento dificulta su digestión y su unión a la mucosa intestinal disminuye la absorción de los alimentos.<sup>31</sup>

Los taninos se consideran como posibles inhibidores de celulasas presentes en rumiantes, observándose una disminución de la digestibilidad de diversos forrajes.<sup>17</sup>



### **9.5 Ácido fitico**

Se encuentra en concentraciones elevadas en diversos alimentos como ácido inositol hexafosfórico, es una estructura altamente reactiva, debido a que la molécula posee múltiples grupos fosfato reactivos, capaces de formar complejos con cationes. Su acción principal es la disminución de la absorción o biodisponibilidad de minerales divalentes como Ca, Co, Cu, Mg, Mo, Mn, Fe y Zn con los que forma sales insolubles. Además forma complejos insolubles fitato-mineral-proteína, provocando la disminución de la solubilidad y digestibilidad de las proteínas en el organismo así como la inhibición de enzimas digestivas, bajo condiciones fisiológicas, como la pepsina, tripsina y  $\alpha$ -amilasa.

Se encuentra fundamentalmente en cereales, leguminosas y semillas oleaginosas siendo la forma de almacenaje de fósforo. Sin embargo en ésta forma de fosfato permanece no disponible para el hombre y animales monogástricos, debido a que están desprovistos de suficiente actividad de fosfatasas endógenas que sean capaces de liberar grupos fosfato de la estructura del fitato. <sup>13,30,35</sup>

### **9.6 Metales pesados**

El mercurio inorgánico; como cloruro, sales orgánicas de mercurio (metilo, etilo, fenilo, etilmercuriosilicato, diuréticos mercuriales), el plomo inorgánico, plomo orgánico, cadmio, uranio, oro, cobre, arsénico, arsina, trióxido de cromo, talio, vanadio y bismuto, son considerados metales pesados, a los que se les atribuyen serios trastornos nefrotóxicos y neuronales y en general son tóxicos directos a las células por diversos mecanismos.

### Antecedentes

Los metales pesados, suelen acumularse en las células debido a su transporte sobre sitios de fijación, como los grupos sulfhidrilo (SH).

Se atribuyen como principales causas de su acumulación: la exposición industrial, la contaminación del agua, suelos, vino o alcohol, las minas o la inhalación de humo o gasolina con plomo.<sup>36</sup>

## **METODOLOGÍA**

### **1. Información acerca de la muestra**

**La muestra fue proporcionada por:** Casa Pedro Domecq.

**Procedencia de la muestra:** Valle de Guadalupe, Baja California, México.

Los residuos provienen de vinos y bebidas alcohólicas elaborados por la Casa Pedro Domecq a partir de: *Vitis vinifera* variedad tinta **Rubi Cabernet**.

**Tratamientos después de la recepción:** La muestra se mantuvo en congelación en bolsas de plástico selladas durante 48 horas, previo a la conservación (secado y liofilizado) y determinación de humedad analítica.

#### **Conservación de la muestra**

Una vez recibida la muestra, se determinó el contenido de humedad total, para referir posteriormente los resultados en la base original. Después se procedió a la conservación: esta actividad tuvo como objetivo dar condiciones adecuadas a la muestra para su posterior análisis, determinándose en primer lugar el contenido de humedad, para posteriormente poder referir los resultados a base húmeda. En ambos métodos (secado y liofilización), el fundamento de conservación se basa en una disminución de la actividad acuosa en el residuo, de tal manera que se evita la descomposición de la muestra por actividad química o microbiana.<sup>24,26</sup>

- **Secado**

2.3 Kg de la muestra se sometieron a secado por un periodo de 24 horas a  $55^{\circ}\text{C} \pm 3$  en una estufa de corriente de aire (Lab-Line Imperial III, Radiant Heat Oven Modelo 293 A). Terminado el tiempo de secado, la muestra fue colocada en bolsas de plástico y a su vez introducidas en un bote de plástico y se almacenaron en un lugar sin luz.

- **Liofilización**

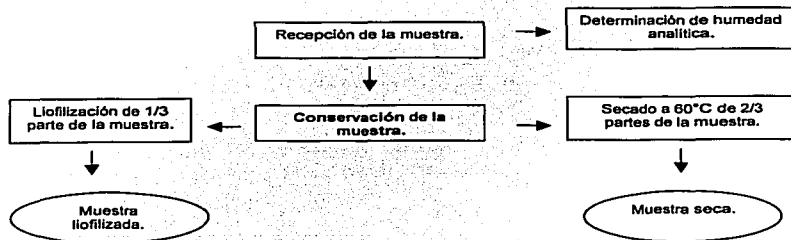
1.15 Kg de la muestra, se dividieron en lotes de aproximadamente 70 – 100 g. Cada lote se sometió a congelamiento rápido con nitrógeno líquido, posteriormente se sometió a un proceso de liofilización (Liofilizadora Labconco Freeze Dryer Modelo 4.5) por un periodo de 8 horas, a una temperatura no mayor a  $-50^{\circ}\text{C}$  y una presión de 10 micrómetros de mercurio. Al terminar la liofilización, la muestra fue colocada en bolsas de plástico y a su vez introducidas en un bote de plástico y se almacenaron en un lugar sin luz.

**Operaciones de reducción de tamaño de la muestra (molienda)**

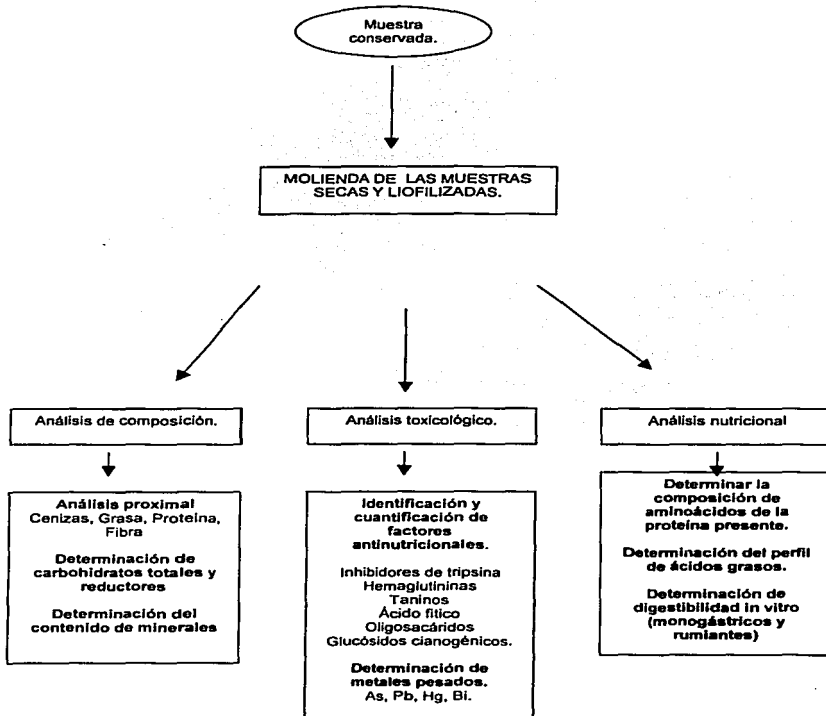
La muestra seca empleada para las determinaciones del análisis proximal fue molida en un molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4, pasadas a través de una malla de 1mm de diámetro.

Las muestras secas y liofilizadas empleadas para las demás determinaciones fueron molidas en un molino Weber-Bros & White mod. 553853 y pasadas a través de una malla 0.5mm de diámetro.

## 2. Conservación de la muestra



### 3. Diagrama general



#### **4. Descripción de la metodología**

### **ANÁLISIS PROXIMAL**

□ **Determinación de humedad analítica**

#### **Fundamento**

Es un método que involucra la determinación de la pérdida de peso debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas cercanas a él. La proporción de agua perdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto, es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado, más aún, si es factible que ocurra alguna descomposición. A su vez, la pérdida en peso depende de diversos factores como son: el tamaño de la partícula y el peso de la muestra, el tipo de cápsula de porcelana y las variaciones de temperatura entre una y otra charola del horno.

#### **Material**

- 3 charolas de aluminio
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Desecador de vidrio

#### **Procedimiento** (Técnica descrita por la AOAC -14.004- 1989) <sup>37</sup>

Las charolas de aluminio se colocaron en la estufa de vacío hasta que éstas alcanzaron peso constante (aproximadamente 24 horas), el cual fue registrado. Posteriormente se

pesaron aproximadamente 2 gramos del residuo, el cual había permanecido en congelación, cabe mencionar que la muestra no sufrió ningún tratamiento previo. Las charolas con el residuo se introdujeron en una estufa de vacío la cual mantuvo las siguientes condiciones: Presión no menor a 15 mm de Hg y temperatura de 60-65°C y durante aproximadamente 96 horas.

Durante el tiempo en que las charolas con el residuo permanecieron en la estufa de vacío, se realizaron pesadas periódicas de las mismas; sacándolas de la estufa y colocando inmediatamente en un desecador donde permanecían aproximadamente 10 minutos; y después cada charola con el residuo fue pesado en una balanza analítica.

Esta actividad se realizó hasta que se alcanzó el peso constante el cual también fue registrado.

La determinación se hizo por triplicado

### **Cálculos**

$$\text{Muestra seca} = \text{peso charolas} + \text{residuo seco} - \text{peso charola}$$

$$\text{Contenido de humedad} = \text{muestra húmeda} - \text{muestra seca}$$

$$\% \text{ de humedad} = (\text{contenido de humedad} / \text{muestra húmeda}) \times 100$$



□ **Determinación de cenizas**

**Fundamento**

La determinación de cenizas se basa en la destrucción de la materia orgánica contenida en una matriz alimentaria, considerándose a las cenizas como el residuo inorgánico que queda después de incinerar dicha materia orgánica en una mufla.<sup>26</sup>

**Material**

- 3 crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio
- Mechero bunsen
- Campana de extracción
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)

**Procedimiento** (Técnica descrita por la AOAC -7.009- 1989)<sup>37</sup>

Los tres crisoles se colocaron en la mufla a una temperatura de 500°C, hasta alcanzar peso constante el cual se registró.

En cada crisol a peso constante se colocaron aproximadamente 2 gramos de residuo secado, el cual fue previamente molido.

El crisol con el residuo se colocó en la flama de un mechero con el fin de carbonizar el residuo hasta que se observó un mínimo desprendimiento de humo. Posteriormente los

crisoles se introdujeron en la mufla, la cual mantenía una temperatura entre 500°C y 550°C.

Después de aproximadamente 2 horas los crisoles fueron colocados en un desecador por aproximadamente 15 minutos y fueron pesados en la balanza analítica. Posteriormente se realizaron pesadas periódicas de los crisoles hasta que éstos alcanzaron peso constante, los cuales también se registraron.

La determinación se hizo por triplicado.

### **Cálculos**

$$\text{Cantidad de cenizas} = \text{peso}_{\text{crisol} + \text{cenizas}} - \text{peso}_{\text{crisol}}$$

$$\% \text{ de cenizas} = (\text{cantidad de cenizas} / \text{peso}_{\text{muestra}}) \times 100$$

#### □ **Determinación de grasa**

### **Fundamento**

Los constituyentes grasos de las materias orgánicas son diversas sustancias lipídicas. El contenido de grasa es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. La determinación se basa en la extracción con una fracción ligera de petróleo o con éter etílico del material seco y molido en un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente.<sup>26</sup>

### **Material y reactivos**

- Aparato de extracción Goldfish (Labconco Mod 35001-00CV)
- 3 vasos de borde esmerilado (Labconco 35051)
- 3 porta dedales de vidrio
- 3 anillos metálicos para extracción Goldfish
- 3 tubos recuperadores de disolvente
- 3 cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Satorius Analytic)
- Bomba de recirculación (Little Grant pump Mod. 1)
- Éter de petróleo

### **Procedimiento** (Técnica descrita por la AOAC - 7.063 - 1989 )<sup>37</sup>

Se colocaron los vasos esmerilados en la estufa de vacío hasta que éstos alcanzaron peso constante el cual fue registrado.

En los cartuchos de celulosa se colocaron aproximadamente 5 g del residuo seco y previamente molido, posteriormente los cartuchos se taparon con algodón introduciéndose a los porta dedales de vidrio y se colocaron en el compartimiento de extracción de Goldfish.

En los vasos esmerilados se colocaron aproximadamente 50 mL de éter de petróleo y fueron colocados con ayuda del anillo metálico en el aparato de extracción, el cual a su vez se conectó con una bomba de recirculación de agua helada.

Finalmente se subió la parrilla de calentamiento del equipo y se trabajó con el control de calentamiento en la posición LOW durante un periodo de 2 horas y media. Al término de éste tiempo se bajaron las parrillas de calentamiento y se sacaron los porta dedales, sustituyéndose por el tubo recuperador de disolvente y se volvió a colocar nuevamente el vaso para iniciar de nuevo el calentamiento, cuando los vasos se encontraron libres de disolvente, fueron retirados del equipo y colocados durante unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa remoción del disolvente. Los vasos fueron colocados en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante, el cual se registró.

La determinación fue hecha por triplicado

### **Cálculos**

$$\text{Cantidad de grasa} = \text{peso vaso} + \text{grasa} - \text{peso vaso}$$

$$\% \text{ grasa} = (\text{Peso}_{\text{grasa}} / \text{Peso}_{\text{muestra}}) \times 100$$

#### **□ Determinación de Fibra cruda**

### **Fundamento**

La fibra cruda es el residuo orgánico insoluble y comestible que queda después de tratar la muestra desengrasada en las condiciones descritas a continuación; hidrólisis ácida con ácido sulfúrico, seguido de una hidrólisis alcalina, lavado con alcohol con una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono no degradables. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda, que consiste principalmente en celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original.<sup>26</sup>

### **Material y reactivos**

- 3 vasos de Berzelius de 600 mL (Kimax)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Satorius analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)
- Mechero bunsen
- Aparato de digestión (Labconco)
- 3 crisoles de porcelana
- 3 matraces de vidrio Kitasato (Kimax)
- Silicato de aluminio
- Embudo buchner tipo california
- Solución de  $H_2SO_4$  al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Solución antiespumante
- Alcohol etílico

### **Procedimiento** (Técnica descrita por la AOAC - 7.074 - 1989 )<sup>37</sup>

La muestra desengrasada obtenida a partir de la determinación de grasa, se pasó cuantitativamente a los vasos de Berzelius que contenían aproximadamente 0.5 g de silicato de aluminio.

A continuación se le adicionaron 200 mL de  $H_2SO_4$  al 1.25% (m/v), en ebullición , así como unas gotas de antiespumante y perlas de vidrio para controlar la ebullición.

Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión, el cual estaba previamente calentado, y se dejó digerir por un tiempo de 30 minutos exactos. Al término de éste tiempo se vació el contenido sobre un embudo tipo california y se filtró con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua (destilada) caliente hasta que se eliminó el ácido.

Nuevamente el residuo fue transferido cuantitativamente al vaso Berzelius, y se adicionaron unas gotas de antiespumante y 200 mL de NaOH al 1.25% (m/v) hirviendo y se mantuvieron en el aparato de digestión por un tiempo de 30 minutos exactos. Transcurrido éste tiempo, se vació nuevamente al embudo buchner tipo california y se filtró, lavando el residuo con agua caliente hasta que se logró la eliminación del álcali y finalmente se agregaron 25 mL de alcohol etílico.

El residuo se trasladó a un crisol de porcelana el cual previamente fue puesto a peso constante registrando éste valor. Se colocó en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzó peso constante. (se registró el peso del crisol más residuo digerido)

A continuación se carbonizó el residuo con un mechero y se introdujo en la mufla, los crisoles fueron pesados en diferentes periodos de tiempo hasta que éstos alcanzaron peso constante registrando el valor obtenido.

La determinación se hizo por triplicado.

### **Cálculos**

$$\% \text{ de fibra} = \left[ \frac{(\text{Peso}_{\text{crisol con residuo después de secado}} - \text{Peso}_{\text{crisol + cenizas}})}{\text{peso}_{\text{muestra}}} \right] \times 100$$

□ **Determinación de Proteína cruda**

**Fundamento**

Para la determinación de proteína, es comúnmente empleado el método Kjeldahl, que en realidad determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia. Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio. El digerido, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y posteriormente titulado.<sup>26</sup>

El contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno, pues, por lo general, las proteínas tienen 16% de nitrógeno.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



**Material y reactivos**

- Digestor (Tecator 20 – 40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto analyzer Tecator Mod 1030)
- 4 tubos de digestión de 75 mL (Tecator)

- Mezcla digestiva (3 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y 430 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (reactivo analítico)
- Solución de NaOH al 40%
- Solución de ácido bórico con indicadores (se pesaron 5 g de ácido bórico, 35 mL rojo de metilo y 10 mL de verde de bromocresol y se llevó a un volumen final de 1L)
- Solución de HCl 0.01 N valorada

### **Procedimiento**

El contenido de proteína se determinó con el método 2.055 de AOAC 1989<sup>37</sup> con las siguientes modificaciones: 1) se colocaron aproximadamente 70 mg del residuo secado y molido y se agregaron 0.5 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y 3 mL de mezcla digestiva en los tubos de digestión y se colocaron en el digestor; 2) después de 15 minutos en el digestor a 340° C, se sacaron los tubos y se mantuvieron a temperatura ambiente 5-10 minutos. Se adicionaron 1.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y se colocaron de nuevamente en el digestor a 370° C hasta que se logró transparencia en la mezcla y 3) se realizó la destilación recibiendo en ácido bórico con indicadores, valorando con HCl 0.01 N normalizado. El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno fue lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminas o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio. Se realizó el mismo tratamiento con caseína (88.88% de proteína) para corregir el valor obtenido. Se utilizó como blanco dextrosa. Esta determinación se realizó con  $n = 4$ .

$n$  = repeticiones realizadas en la determinación.



**Cálculos**

$$\% \text{ de nitrógeno} = [(M - Y) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F$$

Donde:

M : mL titulación de la muestra

Y: mL titulación del blanco

N: Normalidad de la solución de HCl

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m : peso de la muestra en gramos

F: factor de conversión de proteína que en el caso del residuo se empleó el valor de 6.25

## **DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO (reductores directos y totales)**

### **Fundamento**

El método se basa en la extracción de la matriz alimentaria con etanol a reflujo, en donde los vapores condensados arrastran los hidratos de carbono solubles, lo cuales después pueden ser cuantificados por algún método colorimétrico; en éste caso fue empleado el método DNS (ácido dinitro salicílico), el cual a su vez se basa en el aprovechamiento de las propiedades reductoras de los hidratos de carbono, donde los grupos nitro del DNS son reducidos a grupos amino por los hidratos de carbono reductores, apreciándose un cambio de coloración que va del amarillo al naranja, dicha coloración permite construir una curva patrón en donde se aprecia una respuesta proporcional al color producido en función de la concentración.

Finalmente, para la determinación de hidratos de carbono como reductores totales es necesario llevar a cabo un proceso de hidrólisis ácida el cual nos permite (por la suma de hidratos de carbono reductores e hidratos de carbono obtenidos después de la hidrólisis) conocer el contenido de hidratos de carbono totales que existen en la matriz. Dicha hidrólisis libera hidratos de carbono que están unidos por enlaces glucosídicos exponiendo grupos carbonilos; los cuales presentan ya propiedades reductoras para poder ser cuantificados. <sup>26</sup>

◦ **Procedimiento para la extracción de hidratos de carbono**

(Técnica descrita por la AOAC - 925.05 - 1990) <sup>38</sup>

**Material y reactivos para la extracción de hidratos de carbono**

- 3 matraz de bola de 250 mL (Kimax)
- 3 matraz aforado de 100 mL
- Parrilla eléctrica con calentamiento y agitación
- Refrigerante
- Mangueras
- Papel filtro Whatman # 40
- Bomba de recirculación de agua (Little Grant pump Mod. 1)
- Rotavapor (Büchi Mod. RE 111)
- Baño para rotavapor (Büchi Mod. 461 water bath)
- Solución de etanol al 80% (v/v)

**Procedimiento**

En los matraces de bola se colocaron aproximadamente 2 g del residuo liofilizado y desengrasado y molido.

Se adicionaron 100 mL de la solución de etanol al 80% (v/v), se colocó el refrigerante y se sometió a reflujo por un periodo de 2 horas y media. Al término de éste tiempo el extracto se dejó enfriar y se filtró a través de papel Whatman.

Se eliminó el residuo y el extracto etanólico se colocó en un rotavapor a una temperatura de 70°C hasta la eliminación del etanol sin llevar el residuo a sequedad. El extracto sin

etanol se aforó a 100 mL a partir del cual se realizó la cuantificación de hidratos de carbono como reductores directos y totales por el método DNS.

Se realizaron tres extractos de la muestra.

□ **Procedimiento para la cuantificación hidratos de carbono (reductores directos) por el método DNS.**<sup>26</sup>

**Material y reactivos**

- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos
- Espectrofotómetro (Sequoia -Turner mod. 340)
- Balanza analítica (Sartorius Analytic)
- Celdas de vidrio para el espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz
- Baño de agua hirviendo
- Solución de NaOH al 1.4% (1.4 g de NaOH se aforó a 100 mL con agua destilada)
- Reactivo DNS (0.75 g de 3,5-ácido dinitro salicílico en 20 mL de NaOH 1.4 % y se agregaron 50 mL de agua destilada con 10 g de tartrato doble de sodio y potasio, finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada)
- Solución estándar de glucosa 2 mg/mL (0.2 g de glucosa anhidra se aforaron a 100 mL con agua destilada ) este estándar debe utilizarse el mismo día de la preparación o bien adicionar 1mL de tolueno y almacenar en refrigeración para su conservación.

**Procedimiento**

Se tomó 1 mL del extracto preparado del residuo de vid y se colocaron en un tubo de ensaye, se adicionó 1 mL de la solución DNS y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 5 minutos exactos.

Pasado éste tiempo se sacan los tubos y se dejan enfriar para finalmente diluir con 10 mL de agua destilada.

Así mismo se corrió un blanco en donde se sustituyó 1 mL del extracto por 1 mL de agua destilada.

Finalmente se ajustó con éste blanco el espectrofotómetro y se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 540 nm.

Al mismo tiempo que se trabajó con la muestra, se realizó una curva de calibración (ver anexo figura 5) la cual permitió cuantificar posteriormente el contenido de reductores directos en el residuo; se adicionaron 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL de la solución estándar de glucosa 2 mg/mL y se completó hasta un volumen final de 1 mL con agua destilada cada tubo y se prosiguió de la misma manera en que se trató la muestra.

Finalmente se construyó una curva patrón de absorbancia en función de la concentración.

El resultado obtenido fue considerado como la cantidad de reductores directos obtenidos en el extracto.

De cada extracto se desarrolló color por triplicado.

- o **Procedimiento para la determinación de hidratos de carbono totales (después de la hidrólisis).** (Técnica descrita por la AOAC - 923.09- 1990)<sup>38</sup>

### **Material y reactivos**

- 3 matraces Erlen Meyer de 250 mL
- 3 matraces aforados de 100 mL
- HCl concentrado (densidad 1.18 a 20°C y pureza 37.3%)
- Hidróxido de sodio 1 N
- Solución de azúcar invertido al 1% (m/v) (se pesaron 9.5 g de sacarosa pura y se adicionaron 5 mL de HCl concentrado con 100 mL de agua destilada, se almacenó por 3 días a temperatura ambiente (20-25°C), al término de éste tiempo se diluyó con agua destilada hasta 1 L)
- Solución estándar de azúcar invertido 2 mg/mL (se neutralizó una alícuota de la solución de azúcar invertido al 1% con NaOH 1 N y se diluyó hasta alcanzar la concentración deseada en el estándar de azúcar invertido, la cual fue de 2 mg/mL)

### **Procedimiento**

Se tomó una alícuota de 50 mL del extracto del residuo de vid y se agregaron 5 mL HCl concentrado, se almacenó durante 3 días a temperatura ambiente. (20-25°C)

Cuando la hidrólisis se completó, se neutralizó el extracto hidrolizado con NaOH 1 N y se llevó a un volumen final de 100 mL a partir del cual se determinaron hidratos de carbono de la misma manera en que se describió en el procedimiento para determinar reductores

directos por el método de DNS. Sin embargo para la curva patrón aunque se preparó de la misma manera se utilizó el estándar de azúcar invertido (2 mg/mL) antes descrito. (Ver anexo figura 6)

Los extractos se hicieron por triplicado, de cada extracto a su vez se hizo un triplicado para la determinación colorimétrica así como para el tratamiento de hidrólisis.

## **Cálculos**

- **Reductores directos**

El valor de absorbancia obtenido, se convirtió a concentración con ayuda de la curva patrón realizada, se multiplicó por el factor de dilución y se dividió por la cantidad de muestra empleada.

- **Reductores después de la hidrólisis**

Se obtuvo el valor de hidratos de carbono de la misma manera que se hizo con reductores directos y se siguió la siguiente ecuación.

**% reductores**<sub>después de la hidrólisis</sub>

$$= (\text{reductores}_{\text{después de la hidrólisis}} - \text{reductores}_{\text{antes de la hidrólisis}}) \times 0.95$$

a. se obtuvieron con una curva patrón de azúcar invertido (ver anexo figura 7)

- **Reductores totales**

$$\text{Reductores totales} = \text{reductores}_{\text{directos}} + \text{reductores}_{\text{después de la hidrólisis}}$$

## **DETERMINACIÓN DE MINERALES Y METALES PESADOS (Método PIXE)**

### **Fundamento**<sup>39</sup>

El método PIXE (emisión de rayos X inducida por partículas), se basa en la ionización de las capas internas de un átomo blanco por la incidencia de un ión positivo y la subsecuente desexcitación del átomo por el decaimiento de un electrón desde la capa superior para cubrir la vacante, con la emisión de un fotón de rayos X para eliminar el exceso de energía en el átomo. La energía del fotón emitido es característica del elemento en cuestión, por lo cual es posible, mediante la medición de dicha energía, la identificación del elemento. La forma de producir los iones se logra a través de un acelerador conocido como Peletrón, el cual produce átomos de gran energía y funciona con un proceso de doble aceleración de los iones.

### **Material y equipo**

- Pastilladora manual
- Acelerador Peletrón del Instituto de Física, UNAM.
- Haz de protones para emisión de Rayos X
- Detector de germanio de alta pureza ( (LEGe) marca Canberra)
- Detector de silicio (marca Amptek)
- Amplificadores (Canberra Mod. 2026)
- Analizador multicanal (Oxford-Tennelec PCA3-Plus)
- Multiplexor (Oxford-Tennelec)
- Material de referencia certificado de sedimento lacustre (SL-1 Organismo Internacional de Energía Atómica)



## **Procedimiento**

- **Preparación de la muestra**

Se prepararon 4 pastillas de aproximadamente 1 g del residuo liofilizado y molido, cuidando que se tuviera una buena compactación para evitar la ruptura de las pastillas.

- **Análisis mediante la técnica de Emisión de rayos X inducida por partículas PIXE**

Las cuatro pastillas fueron analizadas mediante la técnica de PIXE bajo las siguientes condiciones:

Se utilizó el sistema de haz a la atmósfera del acelerador Peletrón,<sup>40</sup> el cual tenía una ventana de aluminio de 8  $\mu\text{m}$  de espesor.

Los rayos X emitidos por las muestras por la irradiación con un haz de protones (con una energía de 3.3 MeV al salir del acelerador y 3 MeV al alcanzar la muestra), fueron captados con un detector de germanio de alta pureza y un detector de silicio marca Amptek.

Las señales electrónicas producidas por ambos detectores fueron procesadas con amplificadores Canberra y los espectros resultantes se colectaron en un analizador Multicanal junto con un Multiplexor. El diámetro del haz de protones fue de 2 mm sobre el blanco. El ángulo de incidencia del haz fue de 0° con la normal al blanco, y el ángulo de detección fue de 47° con respecto a la misma normal.

El material de referencia SL-1 se usó para determinar la eficiencia del detector.

El análisis de PIXE ofreció información sobre los elementos más pesados que Na, presentes en las muestras.

Los espectros de rayos X obtenidos con PIXE se analizaron con los programas QXAS<sup>41</sup> y PIXEINT.<sup>42</sup>

## **IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES**

- **Determinación del contenido de taninos** <sup>43</sup>

### **Fundamento**

Se basa en la extracción de taninos con dimetilformamida, seguida de una centrifugación y adición de citrato férrico amónico a una alícuota obtenida a partir del sobrenadante obtenido de la centrifugación, de éste modo se da lugar a la formación de un complejo colorido del cual puede obtenerse espectrofotométricamente la absorbancia de dicha alícuota a una longitud de onda 525 nm. A su vez se emplea una curva de calibración utilizando un estándar de ácido tánico y de éste modo conocer el contenido de equivalentes de ácido tánico existentes en la alícuota del extracto.

### **Material y reactivos**

- Parrilla con agitación magnética de 4 platos (Thermolyne Mod. SP –13025)
- Centrifuga (DINAC)
- Tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL
- Magnetos
- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Espectrofotómetro (Sequioa-Turner Mod. 340)
- Pipetas con capacidad de 1, 5, 20 mL
- Pipetas graduadas con capacidad de 5 y 10 mL
- Tubos de ensaye (140 x 14 mm)
- Matraces aforados de 25 mL

- Solución patrón de ácido tánico de 2 g/L (Merck 773) (se pesaron 0.05 g de ácido tánico para ser llevados a un volumen final de 25 mL)
- Solución de amoníaco 8 g/L, como  $\text{NH}_3$  ( se tomaron 1.54 mL de hidróxido de amonio con densidad de 0.896 a 20°C y 29 % de pureza llevándose a un volumen final de 50mL)
- Solución de dimetilformamida 75% (v/v) ( se tomaron 375 mL de dimetilformamida y se llevaron a un volumen final de 500 mL con agua)
- Solución de citrato férrico de amonio 3.5 g/L (se tomaron 0.35 g de citrato férrico amoniacal y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua) ésta solución se preparó 24 horas antes de la determinación.

## **Procedimiento**

### **• Extracción**

Se colocó aproximadamente 1 g del residuo liofilizado y molido dentro de un tubo de centrifuga y se añadieron 25 mL de solución de dimetilformamida al 75%. Posteriormente se sometió el tubo a agitación durante 60 minutos en una parrilla, transcurrido éste tiempo se centrifugó el tubo por 10 minutos con una aceleración de 3000g.

### **• Preparación del blanco**

Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación y se introdujo en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 6 mL de agua desionizada y 1mL de solución de amoníaco (8 g/L) y se agitó durante unos segundos en un vórtex.

### **• Preparación de la muestra para el desarrollo de color**

Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación y se introdujo en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 5 mL de agua desionizada y

1 mL de solución de citrato férrico amoniacal (3.5g/L) finalmente se agregó 1 mL de amonio y se agitó durante unos segundos en un vórtex

El blanco y la muestra se transfirieron después de 10 minutos a una celda de vidrio y se midió la absorbancia a 525 nm en el espectrofotómetro.

Se realizaron 3 extractos y de cada uno se hicieron 3 determinaciones espectrofotométricas.

• **Preparación de la curva patrón de ácido tánico**

En 6 matraces aforados de 25 mL se colocaron respectivamente: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL de la solución estándar de ácido tánico (2 g/L) y se aforó cada uno de los matraces con solución de dimetilformamida al 75%.

De cada matraz aforado se tomó 1 mL de la solución y se adicionaron 5 mL de agua desionizada, 1 mL de citrato férrico amoniacal, se agitaron durante unos segundos, después se agregó 1 mL de la solución de amonia y se volvió a agitar por unos segundos más.

El contenido de cada tubo se transfirió respectivamente a una celda de vidrio 10 minutos después de su preparación, y se midió la absorbancia a 525 nm en el espectrofotómetro.

Finalmente se construyó una curva patrón de la absorbancia en función de la concentración ( $\text{mg}_{\text{ácido tánico}}/\text{mL}$ ) con los datos registrados. (Ver anexo figura 8)

De cada matraz se tomaron 3 alícuotas con el fin de tener un triplicado de cada punto de la curva patrón.

## **Cálculos**

El valor de absorbancia se convirtió a concentración con la curva patrón realizada

$$\% \text{ ac. tánico} = \left[ \left( \frac{\text{mg}_{\text{ac. tánico}}}{\text{volumen}_{\text{alícuota}}} \times \text{volumen}_{\text{aloro}} \right) / \text{g}_{\text{muestra}} \right] \times 100$$

### □ Determinación de inhibidores de tripsina <sup>44</sup>

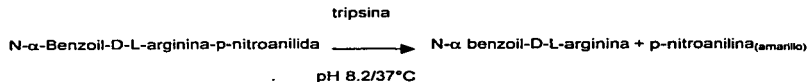
#### **Fundamento**

Se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina.

El extracto se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un sustrato sintético (BAPNA), el cual producirá coloración al ser hidrolizado por la enzima, la cual se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm, donde la coloración es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra.

La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida (U.T.I), donde una unidad de tripsina se define arbitrariamente como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm.

La reacción antes mencionada es la siguiente:



### Material y reactivos

- Potenciómetro (Corning Mod. 10)
- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Baño de agua a 37°C (Grant Mod. 67530)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Tubos de ensayo
- Solución de NaOH 0.01 N
- Solución de ácido acético al 30 %
- Solución amortiguadora TRIS pH 8.2 y 0.05M (3.025 g de hidroximetil-amino-metano y 1.47 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O se disolvieron en 450 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un volumen de 500mL)
- Solución BAPNA (100 mg de N-α-benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida-HCl se disolvieron en 2.5 mL de dimetil-sulfóxido y se diluyen a 250 mL con amortiguador TRIS el cual se calentó previamente a 37°C) esta solución se preparó el mismo día de la determinación.
- Solución estándar de tripsina 20 µg/mL (se pesaron 4 mg exactos de tripsina bovina –SIGMA T-8253) y se disolvieron en 200 mL de HCl 0.001 N)

## **Procedimiento**

### **• Preparación del extracto**

Se pesó aproximadamente 1 g del residuo liofilizado y molido en un vaso de precipitados y se adicionaron 45 mL de NaOH 0.01 N, posteriormente se ajustó el pH a  $9.6 \pm 0.2$  y se aforó con NaOH 0.01N a 50 mL, se introdujo un magneto en el vaso y se colocó en agitación por un periodo de 2 horas y media a 300 r.p.m.

Transcurrido el tiempo se quitó el magneto del vaso y se dejó reposar el extracto por 30 minutos y posteriormente por decantación se obtuvo el extracto eliminándose el residuo insoluble.

### **• Determinación de la actividad del extracto**

Se introdujeron dentro de un tubo de ensaye 0, 0.6, 1, 1.4 y 1.8 mL del extracto obtenido y se ajustó cada tubo a un volumen final de 2 mL con agua destilada. Los tubos se introdujeron en el baño de agua a 37°C y se adicionaron 2 mL de solución estándar de tripsina a 37°C y se mantuvieron así por 10 minutos exactos. Después se adicionaron 5mL de BAPNA a 37°C a cada tubo, se mantuvieron así por 10 minutos exactos a 37°C, finalmente se detuvo la reacción con adición de 1 mL de ácido acético al 30% y se homogeneizó.

En el caso del blanco después de agregar la solución estándar de tripsina, se le adicionó inmediatamente 2 mL de ácido acético para detener la reacción.



Los tubos de reacción después de un tiempo de reposo de 15 minutos se filtraron a través de papel filtro Whatman # 1 ya que presentaban ligero enturbiamiento.

De cada tubo se realizó la lectura de transmitancia en el espectrofotómetro (ajustado a 100% de transmitancia con el tubo que contenía 0 mL del extracto) a una longitud de onda 410 nm.

La técnica fue ensayada previamente con un extracto de soya.

Se realizaron 3 extractos de inhibidores de tripsina.

### **Cálculos**

El valor de transmitancia fue convertido a un valor de absorbancia la cual se multiplicó por 100, para convertir a unidades de tripsina inhibidas (UTI); se restó a cada valor obtenido el valor de la referencia que es el tubo al cual no se le agregó extracto. Después se dividió cada valor entre la cantidad de extracto empleada de tal modo que se tienen UTI/mL. A continuación se relacionó el volumen de extracto con UTI/mL con un modelo de regresión lineal.

$$UTI/mg_{muestra} = \text{ordenada al origen}_{regresión\ lineal} \times (\text{volumen}_{extracto}/mg_{muestra})$$

**Nota:** La ecuación anterior es utilizada siempre y cuando los inhibidores de tripsina determinados muestren una cinética de inhibidores tipo Kunitz; esto es cuando el coeficiente de correlación de la ecuación de la recta sea  $-0.9$ , de no de ser así se obtiene el promedio de un cuadruplicado y se reporta el valor.

- **Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa)** <sup>45</sup>

### **Fundamento**

La detección de hemaglutininas o lectinas se basa en la observación de la aglutinación de glóbulos rojos provocada por un extracto de lectinas proveniente de una muestra. La

técnica incluye diluciones seriadas del extracto, en la cual se determina el punto final por una estimación visual de la aglutinación de los glóbulos rojos los cuales son lavados y activados con una solución de proteasa (pronasa), lo cual aumenta la sensibilidad de la aglutinación.

### **Material y reactivos**

- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Centrífuga para tubos (DYNAC)
- Tubos graduados de 15 mL para centrífuga
- Incubadora a 37°C (Blue-M)
- Adaptador para celdas de 10 x 75 mm (acondicionado a una abertura de 1 cm<sup>2</sup>)
- Kit de Microtitulación (Microtiter Kit cook Eng-Alexander Virginia USA)
- Placas tipo "V" para microtitulación
- Dispositivo con espejo para la lectura de las placas de microtitulación.
- Papel Whatman de filtración rápida
- Matraces aforados de 20mL
- Solución de pronasa 0.2% en solución salina
- Solución salina al 1% (m/v)
- Solución salina al 0.9% (m/v)
- Solución anticoagulante (heparina)
- Sangre de hámster (aproximadamente 50 gotas)

## **Procedimiento**

### **• Preparación del extracto**

Se pesó 1 g del residuo liofilizado, desengrasado y molido y 1 g del residuo secado y desengrasado, para posteriormente suspenderse, cada uno en 10 mL de solución salina al 1%.

La suspensión se sometió a agitación mecánica durante 2 horas a 300 r.p.m. a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de agitación, el extracto se centrifugó durante 15 minutos con el fin de eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de vidrio sobre un matraz aforado, llevando el extracto a un volumen final de 10 mL con solución salina al 1%.

Se realizaron 3 extractos de cada residuo y 1 extracto de frijol negro jamapa que se utilizó como control positivo.

### **• Preparación del paquete de eritrocitos**

#### **Lavado de eritrocitos**

Se obtuvieron aproximadamente 50 gotas de sangre de hámster, las cuales fueron colocadas en un matraz de 25 mL que contenía heparina, posteriormente se diluyó la sangre con solución salina al 0.9% en una relación 1:5 v/v (sangre:solución salina), la sangre fue distribuida en 4 tubos graduados para centrifuga y se sometieron a centrifugación a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, al término de éste tiempo se separó el sobrenadante y se volvieron a diluir los eritrocitos con la misma relación antes mencionada para volver a ser centrifugados bajo las mismas condiciones.

Esta operación se repitió 3 veces.

Finalmente el paquete de eritrocitos se diluyó a una concentración de 4% de eritrocitos, para lo cual se agregaron por cada 1 mL de eritrocitos 24 mL de solución salina al 0.9%

### **Sensibilización de eritrocitos**

A la solución al 4% de eritrocitos, se agregó por cada 10 mL de solución, 1 mL de solución de pronasa al 0.2% en solución salina, fueron colocados en una incubadora durante 1 hora a 37°C y al término de éste tiempo la solución de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrifuga y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 10 minutos con el fin de eliminar la pronasa. Finalmente se sometieron los eritrocitos a 3 lavados con solución salina al 0.9% de la misma manera mencionada en el lavado de la sangre.

Después del último lavado el paquete de eritrocitos fue llevado a una suspensión al 4% con solución salina al 0.9%, para lo cual se consideró que por cada 1 mL de eritrocitos se agregaron 24 mL de solución salina.

### **Ajuste de la suspensión de eritrocitos**

Se tomaron 0.1 mL de la suspensión de eritrocitos y se agregaron 4.9 mL de solución salina en una celda de vidrio, midiéndose inmediatamente el valor de transmitancia en el espectrofotómetro a 620 nm utilizando un adaptador de celdas que permitiera el paso de 1cm<sup>2</sup> de luz. (el espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.9%). La lectura apreciada fue de 24.3% de transmitancia,

considerándose adecuada para la determinación. (El valor de % de transmitancia debió estar en el rango de 24 – 29% T)

- **Microtitulación**

En las placas tipo "V" se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50  $\mu$ L de solución salina al 0.9% con un pipetero de gota (es necesario evitar tocar las paredes de los pozos).

Posteriormente se llenó el microdilutor con 50 $\mu$ L del extracto y se procedió a realizar 24 diluciones sucesivas en forma de culebra (ocupando 2 hileras), después se llenó el microdilutor con 50  $\mu$ L del extracto de referencia y se realizaron 12 diluciones sucesivas. (ocupando 1 hilera)

Finalmente en cada pozo se colocaron 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada. Las placas se rotaron en forma circular y se introdujeron a la incubadora a 37°C por 1 hora.

- **Lectura de las placas**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación , se colocó la placa en el dispositivo de lectura y se reportó la máxima dilución que presentó aglutinación.

- **Determinación de oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa)**<sup>25</sup>

### **Fundamento**

La cuantificación de rafinosa y estaquiosa se basa en la extracción con etanol de la rafinosa y estaquiosa de una matriz alimentaria y su posterior cuantificación por

cromatografía de líquidos de alta eficiencia utilizando una columna aminada, mezclas de acetonitrilo-agua como fase móvil y un detector de índice de refracción.

### **Material y reactivos**

- Parrilla de agitación magnética con control de temperatura
- Magnetos para agitación
- Centrifuga (DYNAC)
- Rotavapor (Büchi Mod. RE 111)
- Baño para rotavapor (Büchi 461 water bath)
- Equipo HPLC (Perkin Elmer chromatography Mod. 250 – bomba (Perkin Elmer 250 bomb), sistema de inyección (Rheodine 7125 NS injection valve) , detector (Series 200 refraction index detector) y sistema de integración (Perkin Elmer 1020 integration system) - )
- Columna aminada de sílica para HPLC (Altech Econosphere 150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m de tamaño de partícula)
- Matraces de bola de 250 mL
- Papel filtro Whatman # 5
- Matraces aforados de 10 mL
- Acrodiscos de 0.2 y 0.4  $\mu$ m (Waters)
- Cartuchos Sep-pack C18 (Waters)
- Jeringa de vidrio con capacidad de 100 $\mu$ L
- Solución de etanol al 50% (v/v)
- Agua grado HPLC (Agua desionizada, filtrada por filtro millipore 0.2 y degasificada por 20 minutos)

- Solución estándar de rafinosa y estaquiosa 0.02M (se pesaron 0.067 g de estaquiosa y 0.0504 g de rafinosa y se llevaron a un volumen final de 5 mL con agua grado HPLC)
- Fase móvil 75:25 acetonitrilo:agua (Se colocaron 750 mL de acetonitrilo grado HPLC en una probeta de 1L y se agregó agua grado HPLC en la misma probeta hasta alcanzar el volumen final de la misma)

## **Procedimiento**

### **• Preparación del extracto**

Se pesaron 3 g del residuo molido, liofilizado y desengrasado, se colocaron en un vaso con un magneto y se agregaron 30 mL de solución de etanol al 50%. La suspensión se sometió a agitación constante 300 r.p.m. por 1 hora a 55-60°C.

Al término de éste tiempo el extracto fue centrifugado por 30 minutos y posteriormente se filtró el sobrenadante a través de papel Whatman # 5, lavando cuantitativamente.

El extracto filtrado se introdujo al rotavapor a una temperatura de 65°C con el fin de eliminar el etanol presente y posteriormente se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada.

2 mL del extracto obtenido fueron pasados a través de un cartucho Sep-Pack C18 (previamente activada pasando 3 mL de metanol seguido de 3 mL de agua desionizada) con el fin de eliminar interferencias no polares.

Antes de la inyección, el extracto fue filtrado a través de un acrodisco de 0.4  $\mu\text{m}$  de tamaño poro y después por un acrodisco de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Se realizaron tres extractos

- **Acondicionamiento del equipo**

Se encendió la bomba del HPLC junto con el detector 1 hora antes de realizar las inyecciones, y se dejó pasar la fase móvil (acetonitrilo: agua 75:25) hasta que se apreció estabilidad del detector por más de 10 minutos. Cambiando el flujo de la fase móvil cada 10 minutos desde 0.1 mL/min hasta llegar a 1.5 mL/min

- **Condiciones de trabajo del equipo HPLC**

Flujo de la fase móvil: 1.5 mL/min

Tiempo de corrida: 8 minutos

Temperatura: ambiente 20-25°C

Cuantificación del pico: Por altura

Ancho de pico: 5.5 – 13 s

Presión : 2000 psi

- **Cuantificación de rafinosa y estaquiosa**

Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto, con un tiempo de corrida de 8 minutos, durante el cual fueron cuantificables, la rafinosa y estaquiosa presentes en el residuo.



A su vez se prepararon soluciones con concentraciones de 0.009, 0.01, 0.015 y 0.020M de rafinosa y estaquiosa con el fin de construir una curva patrón en donde se relacionó la altura de cada pico en función de la concentración molar de rafinosa y de estaquiosa, para la cuantificación posterior de estos compuestos en el residuo. De cada concentración se inyectaron 20  $\mu$ L por triplicado. (Ver anexo figura 9 y figura 10)

Los picos se identificaron por el tiempo de retención; los cuales fueron de 3.5 min. para la rafinosa y 5.2 min para la estaquiosa. (Ver anexo figura 13)

Cada extracto fue inyectado 3 veces.

□ **Determinación de ácido fítico** <sup>46,47</sup>

**Fundamento**

Este método emplea una columna de intercambio iónico, con el fin de purificar los extractos del ácido fítico, eliminando las fracciones menores de fosfatos de inositol, permitiendo una cuantificación real del ácido fítico. A su vez, la determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo  $\text{FeCl}_3$ -ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del  $\text{Fe(III)}$  con el ácido fítico.

**Material y reactivos**

- Parrilla con agitación magnética (Thermoline Mod. SP-13025)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Centrifuga para tubos (DYNAC)

- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Tubos para centrífuga
- Jeringas de 3 mL (plastipak)
- Gradilla metálica para las jeringas
- Probetas de 20 mL
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Tubos de ensaye 10 x 160 mm
- Solución de NaOH 1 N
- Solución de NaCl 0.1 N
- Solución de NaCl 0.7 N
- Solución de HCl 0.65N
- Agua desionizada
- Resina de intercambio iónico Dowex AG1 X 8 (200-400 mesh, Bio Rad no. de catálogo 140-141)
- Solución estándar de ácido fítico (1000  $\mu\text{g}$  ácido fítico/ mL), (se pesaron exactamente 0.080 g de fitato de sodio con pureza del 94% y humedad de 8.3% y se aforaron con agua desionizada hasta un volumen de 50 mL)
- Reactivo de Wade ( se pesaron 0.03 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (sigma F-2877) y 0.3 g de ácido sulfosalicílico (sigma S-0640) y se disolvieron en agua desionizada hasta un volumen de 100 mL, el reactivo fue preparado en el momento en que se hizo la determinación espectrofotométrica)

## **Procedimiento**

### **• Preparación de la muestra**

1 g del residuo liofilizado y desengrasado, se colocó dentro de un vaso de precipitado, posteriormente se le adicionaron 20 mL de HCl 0.65 N, esto con el fin de disociar al fitato de complejos con minerales y proteínas. Esta solución se sometió a agitación vigorosa por un tiempo de 2 horas a temperatura ambiente y el extracto obtenido se transfirió cuantitativamente a un tubo para centrifuga, éste se sometió a centrifugación (aproximadamente 12000 r.p.m) a temperatura ambiente por 10 minutos, y se colectó el sobrenadante.

### **• Preparación de la columna de intercambio iónico**

Se pesó aproximadamente 1 g de resina de intercambio iónico y se hidrató con 1.2 mL de agua desionizada.

A parte a una jeringa Plastipak se le colocó un tapón de fibra de vidrio en el fondo.

Posteriormente se vertió la resina hidratada sobre la jeringa (columna), es importante hacer notar que la resina debió quedar asentada uniformemente sobre la columna. Una vez que la resina se empacó bien en la columna, se hicieron pasar 15 mL de NaCl 0.7N y posteriormente se lavó con 60 mL de agua desionizada. (se dejó agua suficiente, aproximadamente 5 cm de altura por encima de la resina empacada, para que ésta no se seque) y así quedó lista hasta que se llevó a cabo la determinación.

• **Purificación por columna de intercambio iónico**

Se tomó una alícuota de 3 mL de los extractos recolectados y se diluyeron a 25 mL con agua desionizada. Esta alícuota fue ajustada a pH 6 con NaOH 1 N. Posteriormente se tomaron 10 mL de la alícuota diluida y se transfirió cuantitativamente a la columna preparada como se mencionó anteriormente. La columna fue lavada con 15 mL de NaCl 0.1 N con el fin de eliminar el fosfato inorgánico y fracciones menores de inositol y se desechó el agua de lavado. Finalmente se eluyó al fitato con 15 mL de NaCl 0.7 N, colectándose el extracto purificado.

• **Preparación de la curva patrón**

A partir del estándar de ácido fítico, se prepararon soluciones que fueron desde 5 hasta 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esto se logró colocando 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.000 y 1.250 mL del estándar concentrado, en respectivos matraces aforados de 25 mL, cada matraz con la respectiva cantidad de estándar se aforó con agua destilada. De cada uno se tomaron 3 mL y se realizó la determinación espectrofotométrica como se indica posteriormente, a partir de la cual fue posible la construcción de una curva de calibración que relacionaba la concentración de ácido fítico y la absorbancia obtenida para la posterior cuantificación del ácido fítico en el residuo de vid. (Ver anexo figura 11)

• **Determinación espectrofotométrica**

Se tomaron 3 mL de agua desionizada la cual fue usada como blanco, 3 mL de los estándares (soluciones de fitato de sodio con contenido de 5 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 3 mL del extracto purificado del residuo previamente ajustados a pH 3.

Estas cantidades de agua, estándares y extracto fueron colocadas en respectivos tubos de ensaye y se le agregó a cada tubo 1 mL del reactivo de Wade y se sometió a agitación en un vórtex por 5 segundos leyendo inmediatamente la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro.

### **Cálculos**

El valor de absorbancia fue convertido a concentración con la siguiente fórmula

$$\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}} = \text{Abs}_{\text{real}}$$

Con el resultado obtenido se convirtió a concentración con la curva patrón realizada para obtener la cantidad de ácido fítico en g/mL

La cantidad de muestra se trata como sigue:

$$g_{\text{muestra}}/\text{mL} = (g_{\text{muestra}}/\text{vol}^{\text{a}}_{\text{extracto}})(\text{dilución empleada}^{\text{b}})(\text{Factor}^{\text{c}})$$

a: Volumen de HCl para la extracción 20 mL

b: dilución empleada 3mL/25mL

c: Factor 10mL/15mL, se refiere a la alícuota que se coloca en la columna de intercambio iónico y el volumen al que se lleva con la solución de NaCl 0.7N que lo eluye.

Este último valor obtenido se considera el 100%, así que se relaciona el valor de concentración de ácido fítico obtenido a partir de la absorbancia y se obtiene el porcentaje de ácido fítico en la muestra.

### □ Determinación de glucósidos cianogénicos <sup>48</sup>

#### **Fundamento**

El ácido cianhídrico en cantidades traza, está ampliamente distribuido en el reino vegetal y se presenta principalmente en forma de glucósidos cianogénicos; sin embargo

concentraciones relativamente altas de estos tóxicos son encontradas en algunas gramíneas, leguminosas, raíces feculentas y almendras de frutas.

Este método aprovecha la reacción sensible y específica de Guignard, la cual es ampliamente utilizada en pruebas cualitativas para la detección tanto de glucósidos cianogénicos como del propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de  $\beta$ -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. Con este método es posible detectar cantidades del orden de 5  $\mu$ g de HCN, equivalentes a 46 mg de glucósidos cianogénicos referidos como linamarina.

### **Material y reactivos**

- Incubadora (Blue -M)
- Congelador comercial
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)
- Baño de agua con agitación (Lab-Line/Dubnoff incu-Shaker Mod. 357)
- Tubos de cultivo con tapón de rosca (PIREX)
- Papel con picrato de sodio alcalinizado (se cortaron tiras iguales de papel filtro Whatman no. 2, y se empaparon con una solución de picrato de sodio alcalinizada, éstas se dejaron escurrir y se colocaron en una estufa a secar a una temperatura de 55-60°C por 30 minutos)

- Solución de  $\beta$ -glucosidasa (1mg/mL) con activador (se pesaron 0.25 g de  $\beta$ -glucosidasa y se disolvieron con buffer de fosfatos pH 7 agitando suavemente, ya disuelta la enzima se adicionaron 1.7 g de nitrato de sodio el cual actuó como activador de la enzima, todo lo anterior se llevó a un volumen de 250 mL con el buffer de fosfatos pH 7)
- Solución de KCN equivalente a 100  $\mu$ gHCN/mL
- HCl 0.5 N
- Buffer de fosfatos pH 7
- Solución de picrato de sodio alcalinizada (se disolvieron 2.5 g de ácido pícrico seguidos de 12.5 g de carbonato de sodio en agua destilada, y se llevó a un volumen de 500 mL)
- Fécula de maíz comercial (maizena)

## **Procedimiento**

### **• Elaboración de la curva patrón**

Se utilizó una solución estándar de HCN (1 $\mu$ g/mL), y con el fin de simular la interacción muestra-HCN se introdujo fécula de maíz como matriz alimentaria.

Se adicionaron 0, 0.05, 0.10, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mL de la solución estándar en los tubos con tapón de rosca, a cada tubo se adicionaron previamente 500 mg de fécula de maíz y 5 mL de buffer pH 7, se homogeneizó esta solución y se colocó en cada tubo una tira de papel indicador (previamente humedecida con algunas gotas de agua) en la boca del tubo y se cerraron los tubos herméticamente con un tapón de rosca.

### Metodología

Los tubos se mantuvieron a 40°C por un tiempo de 4 horas en un baño con agitación, al término de éste tiempo se adicionó a cada tubo 1 mL de HCl 0.5N en frío.

La liberación de HCN se realizó sacando de cada tubo el papel e introduciéndolo en un tubo de ensayo, posteriormente se agregaron 20 mL de agua destilada y se sometió cada tubo a agitación por un espacio de 2 minutos, al término de éste tiempo se filtró la solución y se mide absorbancia.

Se tomó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm.

Esta curva patrón se presentó un rango de 5 a 60 µg de HCN. (Ver anexo figura 12)

#### • **Preparación de la muestra**

Se pesaron en tres tubos 200 mg, 300 mg y 500 mg del residuo liofilizado respectivamente. A cada tubo se le adicionaron 5 mL de solución de β-glucosidasa fría , se homogeneizó esta solución en un vórtex con la muestra y se colocó la tira de papel indicador (humedecida previamente con algunas gotas de agua) en la boca del tubo y se cerró herméticamente con un tapón de rosca.

Los tubos se colocaron en el baño de agua a una temperatura de 40°C por 4 horas, con la agitación ajustada a 3.5. Al término de éste tiempo los tubos se sacaron del baño y se colocaron en el congelador por espacio de 30 minutos.

Transcurrido éste tiempo se sacaron los tubos y se les adicionó 1 mL de HCl (frío), los tubos se volvieron a cerrar y se homogeneizó cuidando la solución no tocara el papel



### Metodología

indicador, se colocaron los tubos en una incubadora a una temperatura de 60°C y al término de éste tiempo se tomó la lectura cualitativa de los tubos, considerándose una mínima coloración rojiza como prueba positiva.

## **DETERMINACIONES EMPLEADAS PARA LA EVALUACIÓN NUTRICIONAL DEL RESIDUO DE VID.**

- **Determinación de digestibilidad *in vitro* para monoqástricos** <sup>38</sup>

### **Fundamento**

La digestibilidad *in vitro* se basa en la simulación del proceso de digestión, involucrando condiciones de pH, temperatura y la presencia de enzimas tales como la tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, peptidasa y proteasa, sobre una matriz alimentaria de tal modo que al interactuar ésta junto con las condiciones y enzimas antes mencionadas, se produce la liberación de aminoácidos que a su vez produce un cambio de pH de tal modo que mediante una ecuación para éste método es posible conocer el % de digestibilidad de una proteína.

### **Material y reactivos**

- Vasos viales de vidrio enchaquetados con entrada y salida para recirculación de agua.
- Juego de mangueras para la unión de los vasos viales a la recirculación de agua
- Potenciometro (Corning Mod. 10)
- Baño de agua a 37°C con dispositivo para recirculación de agua (Grant Mod. 67530)
- Baños de agua a 55°C con dispositivo para recirculación de agua (Instrument Company Mod. 12002)
- Magnetos para agitación
- 2 parrillas para agitación

- Solución A (se disolvieron 227040 BAEE unidades de tripsina tipo IX (0.0136g) , 1860 BAEE unidades de  $\alpha$ -quimotripsina tipo II (0.0365 g) y 0.520 unidades de L-Leucina  $\beta$ -naftilamida unidades de peptidasa (0.0051 g) y se llevaron a un volumen final de 10 mL)
- Solución B (se disolvieron 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (0.0118 g) y se llevaron a un volumen final de 10 mL)
- Material de referencia (Caseinato de sodio liofilizado )

### **Procedimiento**

Se pesaron 600 mg del residuo liofilizado y 76.12 mg de caseinato de sodio liofilizado, la cantidad de muestra era equivalente a 10 mg de nitrógeno.

El residuo se colocó en el vaso vial y se agregaron 10 mL de agua destilada. Posteriormente se activó la agitación así como la recirculación de agua del baño a 37°C y se mantuvo así durante 1 hora.

Al término de este tiempo se ajustó el pH a un valor de  $8.00 \pm 0.03$  con NaOH 0.01 M. Una vez ajustado el pH se agregó 1 mL de la solución A y se dejó actuar a ésta durante 10 minutos exactos con agitación y a una temperatura de 37°C.

Al término de éste tiempo se agregó 1 mL de la solución B al mismo tiempo que se cambió la recirculación de agua a 37°C por el baño a 55°C, ésta solución, junto con la muestra se mantuvieron en agitación y a 55°C por un tiempo de 9 minutos exactos (tiempo total: 19 min.).

Posteriormente se volvió a cambiar la recirculación de agua por el baño a 37°C y se mantuvo así, sin detener la agitación, por 1 minuto. De tal modo que al minuto 20 (exacto) se determinó el pH.

Este mismo procedimiento se empleó para el material de referencia. (caseinato de sodio liofilizado)

La determinación se hizo por triplicado, tanto para el residuo como para el material de referencia.

**Nota:** Para llevar a cabo esta prueba es indispensable probar los reactivos preparados con el material de referencia (caseinato de sodio liofilizado) donde deberá obtenerse un valor de pH de  $6.42 \pm 0.05$ .

### **Cálculos**

El porcentaje de digestibilidad está dado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (x)$$

Donde x, corresponde a la lectura de pH tomada al minuto 20.

- o **Determinación de la digestibilidad *in vitro* para rumiantes** <sup>28</sup>

### **Fundamento**

Se basa en la simulación de la digestión de los rumiantes; al poner en contacto una muestra con líquido ruminal, desarrollar una digestión bacteriana y posteriormente con pepsina en medio ácido, que permite una digestión enzimática.

Finalmente hay una posterior determinación gravimétrica de los constituyentes no digeridos de las paredes celulares para obtener finalmente la digestibilidad de la materia en estudio considerándose el peso final de los mismos.

### **Material y reactivos**

- Baño de agua con agitación (Lab-Line/Dubnoff incu-Shaker Mod. 357)
- Matraces Erlen Meyer de 25 mL
- Tapones de hule acondicionados con una aguja hipodérmica simulando una válvula de Bunsen
- Papel filtro Whatman # 4 (filtración rápida)
- Solución amortiguadora de McDougall [(Solución 1: se pesaron 3.7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9.8g  $\text{NaHCO}_3$  y se llevaron a un volumen final de 1 L con agua desionizada a 40°C) (Solución 2: se pesaron 4.7 g NaCl, 5.7 g KCl, 0.4  $\text{CaCl}_2$  y 0.6 g MgCl y se llevaron a un volumen final de 100 mL) , la solución amortiguadora se preparó adicionando 10 mL de la solución 2 a 1 L de la solución 1, y se agitó durante 15 minutos, esta solución se preparó el mismo día en que inicia la determinación)]
- Solución de HCl 6 N
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  al 4% (m/v)
- Solución de HCl 3 N
- Solución de pepsina ácida (pepsina con actividad 1:10 000) (se pesaron 0.2 g de pepsina y se disolvieron en 1 mL de HCl 6N. Ésta relación es por matraz)
- Líquido ruminal (obtenido en Cruz Blanca no. 486 San Miguel Topilejo, Facultad de Veterinaria y Zootecnia UNAM) . Este fue extraído por medio de una sonda gástrica introducida en la boca de un vacuno.

## **Procedimiento**

### **• Preparación de la solución amortiguadora-líquido ruminal**

El líquido ruminal obtenido, fue transportado hasta el lugar de la determinación en un termo de tal modo que no hubiera importantes variaciones de temperatura. Posteriormente el líquido fue filtrado a través de gasas y se mantuvo a 38°C conservándose así las condiciones del rumen.

Se ajustó la solución amortiguadora de McDougall a pH=7 y se adicionó 1 mL de  $MgCl_2$  al 4% por cada litro de solución amortiguadora de McDougall a utilizar. Posteriormente se tomaron 5 mL de ésta solución y se mezclaron con 15 mL de líquido ruminal. (ésta relación fue por matraz)

La solución amortiguadora-líquido ruminal se introdujo en un baño de agua a 38°C y se le burbujeó  $CO_2$  (proveniente de hacer reaccionar  $CaCO_3$  y  $H_2SO_4$  concentrado) por un tiempo de 8 minutos.

### **• Determinación de la digestibilidad**

#### **PASO 1**

Se pesaron 0.25 g residuo liofilizado y molido, y se colocaron en un matraz erlen meyer, a cada matraz con el residuo se le adicionaron 20 mL de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38°C, posteriormente se taparon los matraces con el tapón de hule acondicionado con una aguja hipodérmica para eliminar el  $CO_2$ , y se introdujeron al baño de agua a una temperatura de 38°C, el baño se cubrió de tal modo que se mantuvieran

las condiciones de oscuridad prevalentes en el rumen, se mantuvo la agitación por 48 horas.

## **PASO 2**

Al término de éste tiempo se sacaron los matraces del baño y se adicionaron 5 gotas de HCl 3 N para detener la digestión bacteriana, en seguida se adicionó, a cada matraz 1 mL de la solución de pepsina ácida agitando suavemente; los matraces volvieron a colocarse a las mismas condiciones de la digestión bacteriana, por 48 horas.

## **PASO 3**

Transcurrido el tiempo, se sacaron los tubos del baño y se filtraron por gravedad con papel filtro Whatman (previamente a peso constante) de filtración rápida, el residuo se lavó con agua destilada y se dejó filtrar por aproximadamente 12 horas. Posteriormente el papel con el residuo digerido se secó en la estufa de vacío hasta que éste alcanzó peso constante.

De manera simultánea se realizó un blanco, el cual solamente contenía la solución amortiguadora-líquido ruminal.

De la muestra y el blanco se realizó un triplicado para la determinación.

## **Cálculos**

$$\text{Muestra digerida} = (\text{Peso Muestra digerida} + \text{Peso papel}) - \text{Peso papel}$$

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{[\text{peso muestra} - (\text{peso muestra digerida} - \text{peso blanco digerido})] \times 100}{\text{peso muestra}}$$

□ **Determinación del perfil de ácidos grasos** <sup>26,49,50,51</sup>

**Fundamento**

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos después de un proceso de saponificación, son separados y determinados en un cromatógrafo de gases, donde son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida contenida en una columna.

**Material y reactivos**

- Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System Gas Chromatograph, Integrador PE Nelson Model 1022)
- Columna para la separación cromatográfica (Alltech Capillary Column 30x0.32 mm ID x 0.25  $\mu\text{m}$ . AT<sup>(TM)</sup> – SILAR Serie no. 1303512H)
- Gases: Helio, Hidrógeno, Aire de alta pureza (99.997%)
- Baño a 80°C (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de teflón (Kimax)
- Pipetas graduadas de 2 y 4 mL
- Matraces aforados de 5 mL
- Jeringa de 10  $\mu\text{L}$  para inyección en el cromatógrafo (Hamilton)
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Pipetas pasteur
- Solución de KOH al 5% en metanol
- Solución de HCl al 10% en metanol
- Estándar de ácidos grasos SIGMA (Esteres metílicos de palmitato C16, estearato C18, oleato C18:1, linoleato C18:3, araquidato C20:0)



- Mezcla de disolventes Tolueno:Hexano (80:20) (se colocaron 80 mL de tolueno en una probeta de 100 mL y se completó este volumen con hexano).

Nota: todo el material de vidrio se lavó perfectamente con agua destilada y posteriormente se lavó primero con tolueno seguido de acetona después metanol y finalmente acetona, (en ese orden) antes de ser utilizado. Todos estos reactivos fueron de grado analítico.

## **Procedimiento**

- **Esterificación de los ácidos grasos**

En un tubo con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de aceite extraído a partir del residuo liofilizado, la extracción se llevó a cabo con éter de petróleo en un equipo de extracción Goldfish (Labconco Mod 35001-00CV).

Al tubo con muestra se adicionaron 2 mL de KOH al 5% en metanol y se colocaron en un baño a 80°C por 1 hora.

Al término de éste tiempo el tubo se dejó enfriar y se agregaron 2 mL de HCl al 10% en metanol y 100  $\mu$ L de  $BF_3$  y se volvió a introducir en el baño a 80°C por 1 hora.

Posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de agua y 2 mL de mezcla Tolueno:Hexano (80:20), se agitó en un vórtex por espacio de 1 minuto y se separó la fase orgánica, a ésta se vuelven a agregar nuevamente 4 mL de agua y 2 mL de mezcla tolueno:Hexano (80:20) y se separa la fase orgánica.

Finalmente dicha fase se llevó a un volumen final de 5 mL , de ésta solución se tomó 1 $\mu$ L y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

• **Inyección de la muestra**

Se encendió el cromatógrafo de gases junto con el integrador, posteriormente se abrió la válvula principal del gas acarreador (helio) y gases de combustión (hidrógeno y aire) y se ajustó la presión de salida de estos a las siguientes condiciones:

80 psi para el Helio

30 psi para el hidrógeno

40 psi para el aire seco

Se utilizó un programa de temperatura que dio las condiciones físicas adecuadas para la obtención del análisis de composición de los ácidos grasos, estas condiciones fueron las siguientes:

Temperatura inicial del horno: 50°C

Temperatura inicial del detector: 300°C

Temperatura inicial del inyector: 250°C

Presión de gas (flujo): 10 psi

Finalmente se inyectó 1 $\mu$ L de la muestra previamente esterificada y se llevó a cabo el análisis.

El estándar de ácidos grasos se utilizó con el fin de identificar los picos en los cromatogramas por su tiempo de retención, del estándar se inyectó 1 µL. (Ver anexo figura 14 y figura 15)

La esterificación se llevó a cabo por triplicado, y de cada muestra esterificada se realizó una inyección.

### **Cálculos**

Se calculó el porcentaje de cada ácido graso de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\% \text{ del ácido graso} = (\text{Área ácido graso} / \Sigma \text{Área ácidos grasos}) \times 100$$

#### □ **Determinación del perfil de aminoácidos**

### **Fundamento**

La cuantificación de aminoácidos se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando resinas de intercambio iónico, previa hidrólisis de la proteína. Los métodos basados en HPLC (high performance liquid chromatography) han permitido que éstos se impongan dada su mayor rapidez y sensibilidad<sup>52</sup>. Debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, la formación de un derivado antes del análisis por HPLC en fase reversa es necesaria<sup>53</sup>. Se ha reportado que los derivados formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil-carbamato son estables y permiten incrementar la precisión del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización pre columna, dada la menor manipulación de la muestra durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados después de haber hidrolizado la proteína.<sup>53,54,55</sup> La cuantificación de aminoácidos en alimentos sigue a una etapa de hidrólisis, en la cuantificación por

intercambio iónico, el alimento se hidroliza a 145°C durante 4 horas, sin que se reporten mermas significativas en los rendimientos de los aminoácidos. La hidrólisis ácida en fase de vapor (HCl 6 N, 0.1% de fenol), es una adaptación que ha permitido incrementar el rendimiento del proceso de hidrólisis, pues las pérdidas por oxidación de aminoácidos se reducen gracias a la combinación de nitrógeno y vacío durante la preparación de las muestras a hidrolizar, el contacto de HCl gaseoso con la muestra y un control eficiente de temperatura y tiempo de hidrólisis (145°C por 4 horas)<sup>52,56</sup>. Entonces al combinar la derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidrosuccinimidil-carbamato, la cuantificación por HPLC y la hidrólisis de material proteínico con HCl 6 N, 0.1% de fenol, en fase de vapor, a 145°C por cuatro horas, es posible llevar a cabo la cuantificación de aminoácidos con buena selectividad y precisión.

## **Material y reactivos**

### **Hidrólisis**

- Estación de trabajo Pico Tag (Waters)
- Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag
- Bomba de alto vacío RV8 (Edwards)
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm (Corning)
- Marcador de tinta permanente Esterbrook de Berol
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad de 200-1000µL (Finnpipette)
- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Agua destilada y desionizada (agua purificada de 18 Mohm de resistividad o agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22µm)
- Hielo seco

- Metanol (Q.P)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%) (Infra)
- HCl 6 N, 0.1% de fenol

### Preparación de la muestra

- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200  $\mu$ L (Finnpipette)
- Pipeta Pasteur (3)
- Vórtex (Lab-line instruments. Mod. 1290)
- Matraz aforado de 1 mL (3)
- Jeringas de 10 mL (9)
- Acrodisco de nylon, 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro (Gelman)
- Tubos de ensayo de 10 x 70 mm (Pirex) (9)
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM (disolución de norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1M suficiente para obtener 10 mM al final)
- Acetonitrilo:Agua 20:80 (200 mL de acetonitrilo grado HPLC, más 800 mL de agua purificada)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT-Baker)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

### Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm (Corning) (3)
- Parrilla de calentamiento (Stirrer/Hot Plate Corning) con baño de agua a 55° C
- Micropipeta (y puntas) con capacidad 5-50  $\mu$ L. (Finnpipette)
- Micropipeta (y puntas) con capacidad 50-200  $\mu$ L. (Finnpipette)

- Micropipeta (y puntas) con capacidad 100-1000  $\mu\text{L}$ , (Finnpipette)
- Vórtex (Lab-line instruments mod. 1290)
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos H 2.5 mM, excepto Cistina: 1.25 mM, Pierce (Ver anexo figura 16)
- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), (Waters AccQ Fluor Reagent kit)

### Análisis cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (2), (Waters mod. 510)
- Inyector con loop de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne)
- Jeringa para HPLC 25  $\mu\text{L}$  (Hamilton)
- Detector UV-Vis Waters 486 (Waters)
- Horno y unidad de control de temperatura modelo III (Waters)
- Controlador automático de gradiente modelo 680 (Waters)
- Adquisición e integración de datos Chromjet modelo 54076 (Waters)
- Sistema de filtración a vacío (2) (Millipore )
- Filtro de tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  tipo HA (Millipore)
- Filtro de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  tipo GV (Millipore)
- Filtro pre columna en línea (Waters)
- Columna AccQ-Tag Nova Pak  $\text{C}_{18}$ , tamaño de partícula 4  $\mu\text{m}$ , de 3.9 mm x 150 mm, (Waters)
- AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) (Waters )
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker)
- Agua destilada y desionizada (mismas condiciones que en hidrólisis)

## **Procedimiento**

- **Preparación de la estación de trabajo.**

Se preparó la estación de trabajo Pico Tag (Ver anexo figura 18); se depositó hielo seco en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y metanol suficiente para cubrir el hielo seco que se había depositado. Además se verificó que los controles de vacío y de Nitrógeno se encontraran cerrados. Se encendió la bomba de vacío y después de cinco minutos se verificó que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fuera de 50-70 miliTorr.

- **Preparación de la muestra: secado.**

Se pesaron, por triplicado, 15 mg del residuo seco y desengrasado (el cual había sido previamente molido en un molino Weber-Bros & White mod. 553853 y pasado a través de una malla 0.5mm.) en el interior de un tubo de 4 x 50 mm, previamente marcado con marcador de tinta permanente. Se agregó una gota de agua (aproximadamente 50  $\mu$ L) y se agitó durante algunos segundos en el vórtex, con la finalidad de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición a los vapores de HCl. Los tres tubos se depositaron en el interior del vial de reacción. (Ver anexo figura 17)

Se colocó la tapa y se deslizó el botón rojo a la posición abierto. (los viales de reacción deben estar secos, para lo cual se introdujeron en la estación de trabajo vacíos y en la posición abierto, tras lo cual se abrió la válvula de vacío y se dejaron así hasta que alcanzaron una presión de 50-70 miliTorr) El vial se colocó en la estación de trabajo, se abrió la válvula de Nitrógeno durante 10-15 segundos, la presión de salida del Nitrógeno

no debió exceder  $0.3 \text{ kg/cm}^2$ , después se abrió lentamente la válvula de vacío hasta alcanzar una presión de 1-2 Torr.

Se abrió y cerró la válvula de nitrógeno para controlar la espuma y ebullición de la mezcla con la muestra para evitar pérdidas por proyección del material al exterior del tubo. Una vez que desapareció la espuma, se cierra la válvula de Nitrógeno y se mantuvo abierta la del vacío hasta secar las muestras. (cuando la presión fue de 50-70 miliTorr) Se cerró la válvula de vacío y se retiró el vial de la estación de trabajo.

• **Preparación de las muestras: purga con nitrógeno.**

Se agregaron  $200 \mu\text{L}$  de HCl 6 N con 0.1 % de fenol en el fondo del vial de reacción, cuidando no introducir ácido al interior de los tubos con muestra. Para purgar el vial de hidrólisis, se cerró el vial y se introdujo nuevamente en la estación de trabajo Pico Tag, se abrió lentamente el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr de presión, y se mantuvo abierto hasta que empezó la ebullición del ácido clorhídrico; se cerró el vacío y se purgó el vial con nitrógeno durante 5 segundos; se cerró el nitrógeno y se repitió éste ciclo dos veces más.

Al finalizar el tercer ciclo, se abrió el vacío del mismo modo y se mantuvo hasta que alcanzó una presión ligeramente menor a 1 Torr. Se cerró el vial deslizando el botón verde a la posición cerrado, se cerró el vacío y se sacó el vial de reacción de la estación de trabajo.



- **Hidrólisis en fase de vapor.**

Una vez finalizada la preparación, se introdujo el vial al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145° C (colocando el botón oven en la posición de encendido y ajustando la temperatura con la perilla temp al mismo tiempo que se mantiene hacia arriba el botón set), durante 4 horas.

- **Eliminación del exceso de HCl.**

Transcurrido el tiempo, se sacó el vial del horno, se dejó enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de extracción, se deslizó el botón rojo a la posición abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que se generaron durante el proceso; después se abrió el vial de reacción y se sacaron los tubos con los hidrolizados, se enjuagó el exterior de cada uno con agua y se depositaron en un vial de reacción seco. Después, se procedió a eliminar el exceso de ácido del interior de cada uno de los tubos con ayuda de vacío; se tapó el vial asegurando que se encontrara en la posición abierto, se introdujo en la estación de trabajo picotag y se abrió el vacío hasta que alcanzó 1-2 Torr, y se mantuvo abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fue de 50-70 miliTorr. Se cerró el vial, así como el vacío y se conservaron los hidrolizados en una atmósfera inerte por aproximadamente 12 horas.

- **Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa**

**PASO 1. Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado**

A cada uno de los tubos con hidrolizado se agregaron 100 µL de norleucina 5 mM - HCl 10 mM, el primero como estándar interno y el ácido clorhídrico para rehidratar y extraer

los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agitó un minuto en vórtex y se dejó reposar un minuto para después agregar de 100 a 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo 20%, se agitó un minuto más en vórtex y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 mL con ayuda de una pipeta pasteur, se lavó con acetonitrilo al 20% y se agitó hasta que la solución de lavado fue incolora (volumen menor a 1 mL), se transfirió cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 1 mL y se llevó al aforo con agua purificada. (Concentración final de norleucina: 0.5 mM)

Se filtró la muestra a través de un acrodisco de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, conectado en la punta de otra jeringa, desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperando el resto, del cuál fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

## **PASO 2. Preparación del estándar de aminoácidos**

En un tubo de ensayo de 4x50 mm, se depositaron 10  $\mu\text{L}$  del estándar de aminoácidos o de la muestra purificada y filtrada, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70  $\mu\text{L}$  del buffer de boratos, se agitó el tubo en un vórtex por 10 segundos y finalmente se agregaron 20  $\mu\text{L}$  del reactivo de derivatización AQC (3mg/5mL, de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) se agitó en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se llevó a cabo la reacción y se hidrolizó el exceso de AQC), se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a 55° C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina. Se dejó enfriar.

Se repitió la misma operación con un estándar de aminoácidos 0.2 mM-N-Leu 0.5mM

• **Análisis cromatográfico**

Finalmente se inyectaron 5µL de la muestra derivatizada en el cromatógrafo de líquidos con un tiempo de corrida de 50 minutos.

Gradiente de elución empleado para la determinación de aminoácidos.

Tiempo (min)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/min)
Inicio	100	0	1
0,5	98	2	1
15	93	7	1
19	90	10	1
32	67	33	1
35	67	33	1
36	0	100	1
41	0	100	1
42	100	0	1
43	100	0	1.2
48	100	0	1.2
49	100	0	1
58	100	0	1

**Cálculos**

Se calcula el contenido de cada uno de los 17 aminoácidos comparando la relación  $Area_{aminoácido}/Area_{norleucina}$  de la muestra contra la relación  $Area_{aminoácido}/Area_{norleucina}$  del estándar de aminoácidos, de acuerdo a la ecuación 1, para reportar el contenido en  $g_{aminoácido}/16 g N$ .

Cálculo del contenido de aminoácidos en g/16 g de N

$$1.6 \times [(A_{aa}/A_{n-leu})_{mtra} \times (A_{n-leu}/A_{aa})_{std} \times C_{std} \times a \times P. M.] / [mg_{mtra} \times \% N]$$

donde:

$A_{aa}$  = área del aminoácido dado

$A_{n-leu}$  = área de norleucina

mtra = en la muestra

std = en el estándar

$C_{std}$  = concentración del aminoácido dado en el estándar

a = aforo del hidrolizado

P.M. = peso molecular del aminoácido dado

mg<sub>mtra</sub> = cantidad de muestra en mg

%N = porcentaje de nitrógeno en la muestra seca y desengrasada.

## □ **Determinación de triptofano**<sup>66</sup>

### **Fundamento**

Debido a la destrucción del triptofano por hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática se convierte en una alternativa viable para la determinación de éste aminoácido indispensable. El método consiste en la hidrólisis enzimática dada por la pepsina durante 3 horas y posteriormente con pancreatina durante 24 horas, el hidrolizado al reaccionar con p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) y nitrito de sodio como reactivo de contraste da lugar a la formación de un compuesto colorimétrico el cual permite cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de triptofano en una muestra a 590 nm de longitud de onda.

### **Material y reactivos**

- 3 matraz aforado de 50 mL (Kimax)
- Pipetas con capacidad de 10, 7.5, 0.5, 2 mL.
- Tubos de ensaye (Kimax)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner mod. 340)
- Celdas de vidrio para el espectrofotómetro
- Campana de extracción
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Vortex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Potenciometro (Corning Mod. 10)
- Buffer de fosfatos pH 8 (Solución A: Se pesaron 2.78 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y se aforaron a 100 mL. Solución B: Se pesaron 26.82 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se

- aforaron a 500 mL. Se tomaron 5.3 mL de la solución A y 94.7 mL de la solución B y se llevaron a 200 mL con agua destilada. Se ajustó el pH a un valor de 8.0)
- Solución de pepsina 0.3 % (p/v) (se pesaron 300 mg de pepsina y se aforaron a 100 mL con solución de HCl 0.1 N)
  - Solución de pancreatina 0.4 % (p/v) (se pesaron 400 mg de pancreatina y se aforaron a 100 mL con buffer de fosfatos)
  - Solución de DMAB 0.5 % (p/v) (se pesaron 0.5 g de DMAB y se disolvieron y posteriormente aforaron hasta 100 mL con HCl concentrado.
  - Solución de nitrito de sodio 0.2 % (p/v) (se pesaron 200 mg de nitrito de sodio y se aforaron a 100 mL con agua)
  - Solución estándar de triptofano (0.05 mg/mL) (se pesaron 5 mg exactos de triptofano y se aforaron a 100 mL con agua destilada)

## **Procedimiento**

### **• Preparación del hidrolizado**

Se pesó 1 g del residuo seco y molido y se colocó en un matraz aforado de 50 mL, posteriormente se agregaron 10 mL de la solución de pepsina, se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas con agitación ocasional. Al término de éste tiempo se añadieron 10 mL de la solución de pancreatina y se incubó por un periodo de 24 horas con agitación esporádica.

El hidrolizado se aforó a 50 mL con agua destilada y se filtró. Del filtrado se tomó una alícuota de 2 mL y se colocó dentro de un tubo de ensayo, a éste se le agregaron 7.5 mL de DMAB y se agitó dejando en reposo durante 15 minutos en la oscuridad, después de

éste tiempo se agregaron 0.5 mL de nitrito de sodio y se dejó en reposo por 15 minutos más. Posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a 590 nm.

Al mismo tiempo se realizó un blanco de la muestra en el cual se toman 2 mL del extracto pero se sustituyó la cantidad de DMAB por 7.5 mL de HCl concentrado.

Nota: Se realizaron 3 hidrolizados y de cada uno se hizo un blanco y se tomaron 2 alícuotas de 2 mL para desarrollar color.

#### • Preparación de la curva patrón

Se tomaron 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 mL de la solución estándar de triptofano y se depositaron en tubos de ensayo, cada tubo se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se adicionaron 7.5 mL de DMAB se agitaron y se dejaron en la oscuridad por 15 minutos, posteriormente se agregaron 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitaron y se dejaron en reposo por 15 minutos más, al término de éste tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 590 nm. Finalmente se construyó una curva patrón que relacionara los mg de triptofano con la absorbancia. (Ver anexo figura 19)

Nota: Cada punto de la curva se hizo por duplicado

#### Cálculos

Al valor de absorbancia de la muestra se le restó el valor de absorbancia del blanco, y posteriormente se convirtió a g de triptofano con la curva patrón realizada.

$$\text{g trp/16gN} = (\text{gtrp}/2\text{mL}_{\text{hidrolizado}} \times 100 \text{ mL}_{\text{aloro}}) (1/\text{g}_{\text{muestra}}) (1/\text{g}_{\text{proteína en el residuo}}) \times 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Composición proximal

En la tabla 7 se presentan el análisis proximal en base seca y base húmeda realizado al residuo de vid destinado a la elaboración de vinos y licores.

**Tabla 7.** Análisis proximal del residuo de uva<sup>a</sup>

Componente	Base seca	Base húmeda
humedad	—	45.01 ± 0.65
Cenizas	5.20 ± 0.05	2.86 ± 0.03
Proteína	10.39 ± 0.18	5.72 ± 0.10
Grasa	8.11 ± 0.08	4.46 ± 0.04
Fibra	38.13 ± 0.17	20.97 ± 0.091
hidratos de carbono <sup>b</sup>	38.17	20.99

- a. Resultados expresados en g/100g de muestra ± desviación estándar, determinaciones realizadas mínimo por triplicado (n=3) y en todos los casos se obtuvo un % coeficiente de variación menor a 5%.
- b. Se calcularon por diferencia.

De acuerdo con los resultados expresados en la tabla 7, la composición proximal de los residuos de la vid destinada a la elaboración de vinos y licores indica que el contenido de proteína es mayor al que se ha reportado en el maíz, cebada y paja ( 8%, 9% y 9% respectivamente en base seca), pero es menor al del sorgo (17% en base seca), siendo éstos de los principales productos destinados a alimentación animal en México.<sup>19</sup> Esta proporción es relevante, pues en la elaboración de dietas para animales la cantidad así



como la calidad de proteínas son la base del diseño en las formulaciones para alimentación de animales. El porcentaje de proteína obtenido en la muestra es menor a los valores recomendados para animales (10%-18%)<sup>18,20</sup>, principalmente si se trata de cerdos y pollos, en el caso de rumiantes, el contenido de proteína del residuo se encuentra dentro del límite recomendado, sin embargo, si se maneja como complemento, podría aumentarse el contenido de proteína combinándolo de otro alimento destinado a alimentación animal.

El contenido de grasa, como extracto etéreo, en la muestra analizada es alto, considerando los contenidos reportados en maíz y cebada<sup>22</sup> (5% y 2% respectivamente), aún cuando estos porcentajes corresponden al producto entero y no a la fórmula para alimentación animal.

El relativamente alto contenido de grasa se asocia, principalmente, a la semilla de la vid, presente en el residuo y es de relevancia, debido al aporte energético que la grasa proporciona. (9 Kcal/g) Debido a que el contenido de grasa es mayor que en otros alimentos empleados en alimentación animal, se decidió analizar el perfil de ácidos grasos el cual se analizará más adelante. (Ver tabla 14)

El contenido de cenizas es elevado en relación con la composición de la uva, lo que aumenta la probabilidad de encontrar minerales de importancia en alimentación animal (calcio y fósforo) y ayudar a cubrir las necesidades de los mismos, sin embargo, también existe la posibilidad de encontrar metales pesados que pudieran ser tóxicos por consumo del residuo. Más adelante se muestran los resultados de metales pesados. (ver tabla 9)

El contenido de fibra cruda encontrado, es mayor al que se reporta en la mayoría de los productos destinados a alimentación animal (27%-30% en base seca) excepto cuando se emplea paja en su elaboración (39 - 52% en base seca)<sup>19</sup>, ésta proporción representa una ventaja si se decidiera destinar el residuo a la preparación de alimentos para rumiantes, ya que éstos son capaces de utilizar la fibra para la obtención de energía, en el caso de animales monogástricos, sería una limitante pues podría llegar a provocar una baja asimilación de nutrimentos, siendo el componente que podría limitar más la utilización del residuo, ya que el tipo de fibra influye considerablemente en el aprovechamiento adecuado de la misma, sobre todo si la lignificación del producto es elevada.<sup>10,17</sup> Se sabe que dicha lignificación aumenta a medida que un fruto va madurando, la vid se corta en un grado de maduración ligeramente avanzado<sup>2,57</sup>, por lo que, se cree, la lignificación también aumenta, lo que repercute sin duda en la calidad de fibra del residuo. Este problema podría disminuir al utilizar este residuo como complemento, es decir mezclado con otros alimentos y no como alimento único.

Respecto al contenido de hidratos de carbono, se considera elevado y de relevancia para la obtención inmediata de energía; sin embargo, fue necesario determinar el tipo de hidratos de carbono presentes, ya que existía la probabilidad de encontrar elevadas concentraciones de estaquiosa y rafinosa (ver tabla 12), los cuales se encuentran de manera natural en la uva y que podrían interferir en la digestión de un preparado para alimentación animal elaborado a partir de éste residuo siempre que el contenido de éstos fuera elevado, sin embargo, la presencia de éstos fue menor que el límite de cuantificación (0.009M) del método empleado para su cuantificación (HPLC)<sup>25</sup>, por lo que se consideran que no podrán interferir en la digestión y asimilación del residuo.

El análisis presentado anteriormente se refiere a los valores en base seca, debido a que el alto contenido de humedad aumenta la posibilidad de degradación química y microbiológica del residuo <sup>24</sup>, limitando su posible aplicación en la elaboración de un alimento destinado a alimentación animal, además, se recomendaría el secado del producto, pues se concentrarían los nutrimentos de importancia una vez eliminada el agua.

Sin embargo este paso de secado elevaría el costo del residuo seco, podría entonces proponerse el uso del material fresco pero mezclado, lo cual también disminuiría la humedad del producto, o bien el secado al sol.

## 2. Contenido de minerales y metales pesados

En las tablas 8, 9 y 10 se presenta el análisis elemental realizado al residuo liofilizado de vid, en la tabla 8 se presentan los minerales de importancia nutricional, la tabla 9 presenta el análisis de metales pesados que tienen importancia debido a la toxicidad que pueden presentar y finalmente en la tabla 10 se muestran otros elementos presentes en el residuo.

**Tabla 8.** Concentraciones elementales de los minerales determinados en el residuo de vid.

	<b>Elemento</b>	<b>Contenido <sup>a</sup></b>
<b>Mg</b>	Magnesio (%)	5.00 ± 1.00
<b>Fe</b>	Hierro (%)	0.13 ± 0.03
<b>P</b>	<b>Fósforo (%)</b>	<b>0.66 ± 0.17</b>
<b>S</b>	Azufre (%)	0.36 ± 0.05
<b>K</b>	Potasio (%)	2.28 ± 0.08
<b>Ca</b>	<b>Calcio (%)</b>	<b>0.78 ± 0.16</b>
<b>Cu</b>	Cobre (ppm)	16.0 ± 4.00
<b>Cr</b>	Cromo (ppm)	20.0 ± 6.00
<b>Mn</b>	Manganeso (ppm)	29 ± 6.00
<b>Zn</b>	Zinc (ppm)	12 ± 4.00

a. Se muestra contenido promedio de 4 pastillas ± desviación estándar.

Los minerales más importantes, por su demanda, en alimentación animal, son el calcio y el fósforo, además de ser los de mayores requerimientos; dado que en la industria animal se requiere un crecimiento adecuado, estos minerales permiten una adecuada

mineralización ósea y adecuada formación de miembros<sup>13,18</sup>; de acuerdo a los requerimientos (ver antecedentes tabla 4), el contenido de calcio en el residuo es adecuado para rumiantes y cerdos, sin embargo, en el caso de su utilización en alimentos para pollos, este mineral sería insuficiente y por lo tanto, sería necesario añadirlo en la dieta. Sin embargo, el contenido de fósforo en el residuo, es adecuado tanto para rumiantes, como para monogástricos, de acuerdo con las recomendaciones de éstos.(ver antecedentes tabla 4).

Otros minerales que son considerados nutricionalmente importantes son el zinc y el hierro; el residuo es deficiente en zinc, ya que se requieren aproximadamente valores de 30 a 60 mg/Kg en el alimento; el problema principal es que una deficiencia de zinc, se refleja en la disminución de la velocidad de crecimiento en los animales<sup>13,18</sup>, además, se debe considerar la presencia de ácido fítico en el producto; pues se sabe se compleja con elementos como el zinc, el hierro y el calcio<sup>18</sup>.

Los requerimientos de hierro serían cubiertos de modo adecuado ya que el contenido de este mineral en el residuo es mucho mayor que lo requerido por animales monogástricos y rumiantes (50 a 60 mg/Kg<sub>de alimento</sub>)<sup>13,18</sup>, sin embargo, es importante mencionar que es hierro de origen vegetal, por lo tanto aunque es una buena fuente de hierro, se sabe que su absorción se vería limitada por la presencia de fitatos, taninos y fibra contenidos en el residuo.<sup>58</sup>

También se aprecia un alto contenido de magnesio, cuya cantidad no representa riesgo en el consumo, y en general nunca es necesario suplementarlo dado que suele estar

presentes en cantidad suficiente en las raciones de los alimentos usados comúnmente en alimentación animal.

El contenido del resto de los elementos encontrados en el residuo (ver tabla 10) también es adecuado, de acuerdo a los requerimientos de los animales.

**Tabla 9.** Concentraciones elementales de los metales pesados determinados en el residuo de vid.

Elemento		Contenido <sup>a</sup>
<b>Ti</b>	Titanio	100 ± 30
<b>V</b>	Vanadio	58 ± 14
<b>Ni</b>	Niquel	2 ± 1
<b>As</b>	Arsénico	2 ± 1
<b>Hg</b>	Mercurio	ND
<b>Pb</b>	Plomo	ND

- a. Se muestra contenido promedio en mg/Kg de muestra de 4 pastillas ± desviación estándar.  
ND: No detectado

Respecto al contenido de metales pesados presentes en el residuo, ninguno representa riesgo en el consumo del residuo, aún cuando se aprecia un elevado contenido de titanio, no se han encontrado efectos nocivos de este metal; incluso es usado con fines terapéuticos debido a su inocuidad.

El plomo no fue detectado al igual que el mercurio, que, junto con el arsénico se consideran los metales pesados de mayor riesgo<sup>36</sup>.

**Tabla 10.** Concentraciones de otros elementos obtenidos durante el análisis elemental del residuo de vid.

Elemento (mg/Kg <sub>muestra</sub> )		Contenido <sup>a</sup>
Ga	Galio	2 ± 1
Rb	Rubidio	10 ± 4
Sr	Estroncio	7 ± 2
Zr	Zirconio	17 ± 1
Al	Aluminio <sup>b</sup>	0.48 ± 0.08
Si	Silicio <sup>b</sup>	0.37 ± 0.12

- a. Se muestra contenido promedio en mg/Kg de muestra de 4 pastillas ± desviación estándar.  
b. Se muestra contenido promedio en g/100g de muestra de 4 pastillas ± desviación estándar.

De los resultados mostrados en la tabla 10 se aprecia un contenido apreciable de aluminio, el principal problema que causa el exceso de este elemento es osteomalacia (deficiencia de vitamina D) en humanos adultos cuando se emplean altas dosis terapéuticas con el fin de fijar fosfatos <sup>36</sup>, sin embargo no se encuentran datos reportados para animales en donde el exceso de este elemento pueda ocasionar algún trastorno.

Nota. La información antes mostrada (tabla 8, 9 y 10) corresponde a los elementos presentes en el residuo de vid más pesados que el sodio (Na)

### 3. Factores tóxicos y antinutricionales

En la tabla 11 y 12 se presentan los resultados del contenido de factores tóxicos y antinutricionales obtenidos experimentalmente en el residuo liofilizado de vid destinada a la elaboración de vinos y licores, sólo en el caso de hemaglutininas la prueba se realizó con la muestra liofilizada y con la muestra secada en la estufa, esto con el fin de apreciar si la aplicación del calor a través del secado ( $55^{\circ}\text{C} \pm 3$ ) modificaba la presencia de estas enterotoxinas.

**Tabla 11.** Contenido de factores tóxicos y antinutricionales

Componente	Resultado	Expresado en
Acido tánico <sup>a</sup>	$0.88 \pm 0.04$	g/100gmuestra
Acido fítico <sup>a</sup>	$0.67 \pm 0.03$	g/100gmuestra
	muestra seca en estufa	muestra liofilizada
Hemaglutininas	3	9
		Título de aglutinación <sup>b</sup>
Inhibidores de tripsina	$1.13 \pm 0.38$	UTI/mgmuestra <sup>a,c</sup>
Glucósidos cianogénicos	Negativo	Prueba cualitativa

- a. Se muestran resultados promedio  $\pm$  desviación estándar con un coeficiente de variación menor a 5% y n=3  
 b. Título: máxima dilución en la que se presentó aglutinación en eritrocitos de hámster  
 c. UTI: Unidades de tripsina inhibida



No se detectaron glucósidos cianogénicos. El contenido de inhibidores de tripsina es menor a 10 unidades de tripsina inhibida por miligramo de muestra, lo cual no se considera de riesgo<sup>59</sup> y por lo tanto, los glucosidos cianogénicos e inhibidores de tripsina, no presentan un efecto toxicológico y / o antinutricional de importancia.

El contenido de taninos encontrado (0.87%) no representa un riesgo de importancia en el consumo de este residuo; si se considera que la dosis diaria admisible (DDA) de ácido tánico es de 500 mg/Kg<sub>p.c</sub> día<sup>60</sup>; para un animal rumiante como la vaca (400 Kg<sub>p.c</sub>. promedio) sería necesaria una ingesta diaria mayor a 23 Kg del residuo seco, en el caso de un pollo (2 Kg<sub>p.c</sub>. promedio), 115 g y para un cerdo (100 Kg<sub>p.c</sub>. promedio), 5 Kg, se observa entonces que quizás los animales más susceptibles al efecto de los taninos presentes sean los pollos y los cerdos.

Es importante mencionar que se sabe que los taninos son inhibidores de las celulasas del rumen lo que sin duda podría afectar la adecuada digestión del residuo (ver tabla 20), y no se conoce a que nivel o que concentración de taninos es necesaria para que se presente el efecto sobre estas enzimas, pero la concentración encontrada en el residuo podría considerarse baja como para causar un daño a nivel de la flora ruminal.

En el caso del contenido de ácido fítico, se sabe que los alimentos con un contenido mayor a 400 mg/100g<sub>muestra</sub> son considerados alimentos desmineralizantes<sup>59</sup>, por lo que el residuo de vid cae dentro de ésta clasificación al contener 673 mg/100g de muestra seca, lo que implica que la presencia de este factor antinutricional, sea una de las principales limitantes para su utilización, pues se trata de un compuesto termoestable, lo que hace difícil, en este caso, la destoxificación del residuo. Sin embargo el valor de con el que se

está comparando es para animales y se sabe que para animales el límite de seguridad suele ser mayor, sumado a lo anterior se encuentra una buena cantidad de minerales divalentes tales como calcio y magnesio en el residuo, que podrían contrarrestar el alto contenido de ácido fítico en éste, sin embargo para asegurar la inocuidad de los taninos, y reducir el efecto desmineralizante del ácido fítico, sería conveniente mezclar este residuo con algún otro producto, de modo que estos componentes sean diluidos, es decir, emplear el residuo como complemento a otro ingrediente en una dieta para animales.

En lo que respecta a las hemaglutininas, se considera que un título mayor a 10 representa riesgo<sup>59</sup>, siempre y cuando la lectina posea afinidad por las células del intestino de los animales a los cuales se podría destinar el residuo, sin embargo por tratarse de glicoproteínas se puede detoxificar el residuo con aplicación de calor durante el secado, el título obtenido se encuentra justo por debajo del límite antes mencionado y es apreciable que al secar el producto ( $55^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$  por 24 horas), el tratamiento empleado, es posible disminución en el título, llegando a un valor de 3, el cual ya no representa riesgo.

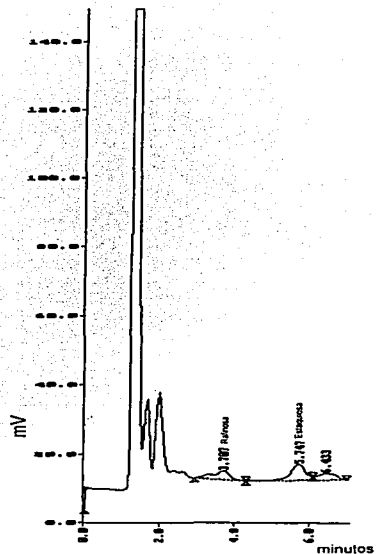
#### **a. Contenido de oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa)**

En la tabla 12 se muestra el contenido de oligosacáridos obtenidos por HPLC en el residuo de vid.

**Tabla 12.** Contenido de oligosacáridos determinados en el residuo de vid <sup>1</sup>

<b>Oligosacárido</b>	<b>Resultado (g/100g<sub>muestra</sub>)</b>
<b>Rafinosa</b>	<b>Menos de 1.51</b>
<b>Estaquiosa</b>	<b>Menos de 1.99</b>

1. En ambos casos los resultados obtenidos a partir del análisis del residuo de vid por HPLC, fueron menores al mínimo valor detectable por el equipo (0.009 mol/L).



**Figura 2.** Cromatograma de rafinosa y estaquiosa contenido en el residuo de vid obtenido a partir del análisis de HPLC, se muestran los puntos de retención para ambos oligosacáridos.

Como se mencionó anteriormente, el contenido de rafinosa y estaquiosa no representa ningún problema dado que se encuentra en baja concentración en el residuo (incluso por debajo del límite de cuantificación de la técnica empleada para su determinación), de

modo que problemas digestivos como la flatulencia<sup>24,25</sup>, no serían atribuibles a la presencia de estos compuestos.

De destinarse el residuo a rumiantes, aún cuando existiera un alto contenido de rafinosa y estaquiosa, la flora ruminal permite romper el enlace  $\beta(1-4)$  existente en estos compuestos, por lo que sería utilizable con fines energéticos para estos animales.

**d. Contenido de hidratos de carbono (reductores directos y totales)**

En la tabla 13 se muestra el contenido de hidratos de carbono expresados como reductores directos y reductores obtenidos después de la hidrólisis ácida, éstos fueron determinados con el método colorimétrico DNS en el residuo de vid.

**Tabla 13.** Contenido de hidratos de carbono en g/100g<sub>muestra</sub> ± desviación estándar presentes en el residuo de vid.

<b>Tipo de hidrato de carbono</b>	<b>Resultado (g/100g<sub>muestra</sub>)</b>
Reductores directos <sup>1</sup>	5.84 ± 0.42
Reductores obtenidos después de la hidrólisis ácida <sup>2,3</sup>	0.55 ± 0.08
Reductores totales <sup>4</sup>	6.39

1. Se obtuvo un coeficiente de variación de 7.2459%
2. Resultado obtenido después de la hidrólisis con HCl, y es considerado como la resta del valor obtenido del contenido de reductores después de la hidrólisis y el valor de reductores directos, dicha resta es multiplicada por un factor de 0.95 (AOAC)
3. Se obtuvo un coeficiente de variación de 14.28%
4. Es considerado el valor obtenido de la suma de reductores directos y reductores obtenidos después de la hidrólisis.

Como se aprecia en la tabla 13, se encontró un bajo contenido de hidratos de carbono solubles, considerando el valor de hidratos de carbono reportado en el análisis proximal (ver tabla 7), esto se debe a que se cuantifican, por diferencia, otros compuestos que no son cuantificables dentro de éste análisis, tal sería el caso de las antocianinas que se

sabe están en altas concentraciones en la uva tinta<sup>57</sup> así como otras sustancias pertenecientes a la parte de la fibra presente en el propio residuo que no se cuantifican como podrían ser las pectinas.

Respecto al valor encontrado, éste se esperaba que no fuera alto; dado que el objetivo primordial durante la maceración de la uva en la elaboración de vino es la extracción de hidratos de carbono necesarios para la fermentación<sup>1,5</sup>. El contenido de éstos en el residuo debe ser mínimo, y sí lo es, pues sólo se encontró un 6% de los mismos, dado que son azúcares sencillos, pueden ser fácilmente asimilados en el caso de monogástricos, o bien utilizados por la flora del rumen para obtener energía necesaria durante los procesos de digestión, aún cuando sea una baja proporción.

Finalmente otra posible explicación al bajo valor de hidratos de carbono encontrados se atribuye al método de cuantificación de éstos, es decir el método sólo permite la medición de hidratos de carbono con capacidad reductora y existen otros azúcares en concentración apreciable en la uva como la xilosa por ejemplo, que no tienen capacidad reductora<sup>57</sup>. El modo de corroborar esto sería la aplicación de cromatografía de líquidos de alta eficiencia lo que nos permitiría corroborar la presencia de otros azúcares no reductores e inclusive su cuantificación.

**5. Perfil de ácidos grasos**

En la tabla 14 se muestra el porcentaje obtenido de los ácidos grasos que se encuentran en la porción lipídica del residuo de vid obtenidos por cromatografía de gases, así mismo en la figura 3 se muestra el cromatograma donde se aprecia el perfil de ácidos grasos presentes en este residuo.

**Tabla 14.** Contenido de ácidos grasos presentes en el extracto etéreo del residuo de vid.

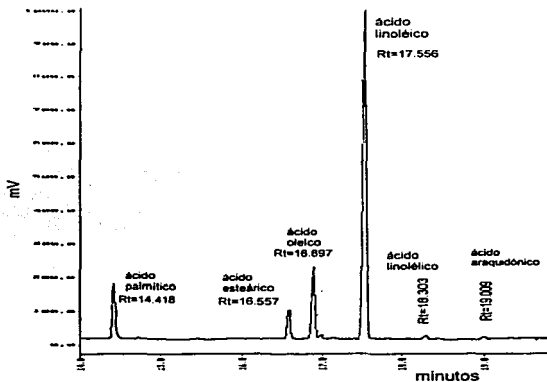
Ácido graso	Porcentaje <sup>1</sup>	% coeficiente de variación
Palmítico	8.70 ± 0.38	4.42
Esteárico	4.82 ± 0.21	4.29
Oleico	13.46 ± 0.44	3.28
Linoleico	71.10 ± 0.77	1.09
Linolénico	0.98 ± 0.22	22.01
Araquidónico	0.95 ± 0.27	28.36
Erúxico	No se detectó.	---

1 % promedio ± desviación estándar de cada ácido graso, obtenido al compararse contra un estándar

En los datos mostrados en la tabla 14 se aprecia un elevado contenido de ácido linoleico, el cual al ser insaturado, representa ventajas importantes ya que además de ser insaturado es indispensable <sup>61</sup>, además, el contenido de grasa en el residuo es significativo, por lo que se consideraría una buena fuente de grasa y sobre todo de calidad adecuada sobre todo si sólo se tratara la semilla presente en el residuo eliminando la demás parte fibrosa.

El ácido erúxico considerado tóxico, no se detectó en el aceite. (sin embargo, sería necesario analizar otros parámetros para la adecuada caracterización de éste aceite de tal modo que se asegurara que el consumo del mismo fuera seguro) Si se desea un adecuado procesamiento de este residuo, la utilización del aceite contenido en la semilla presente en el mismo; sería otra opción además de su empleo en alimentación animal, por ser una adecuada fuente de ácido linoleico.

Respecto a los otros ácidos grasos encontrados en el residuo su composición es **similar a aceites comúnmente encontrados mostrando gran semejanza con el perfil de ácidos grasos de los aceites de maíz y girasol** quienes también son ricos en ácido linoleico y oleico. <sup>61</sup>

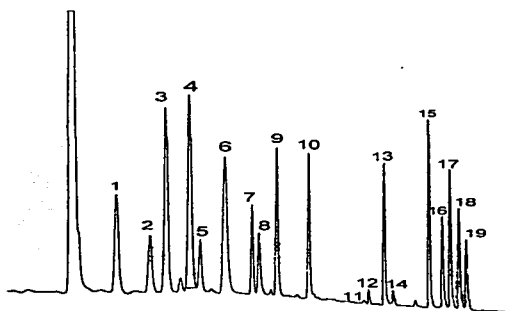


**Figura 3.** Cromatograma del perfil de ácidos grasos obtenido en la muestra de vid.



## 6. Perfil de aminoácidos

En la tabla 15 y figura 4 se muestra el contenido de aminoácidos presentes en la proteína del residuo de vid. Estos fueron obtenidos a partir de un análisis por HPLC a excepción del triptófano el cual fue determinado por método enzimático, la tabla 16 muestra la calificación química obtenida en el residuo.



**Figura 4.** Cromatograma del perfil de aminoácidos en el residuo de vid.

1 Aspártico, 2 serina, 3 glutámico, 4 glicina, 5 histidina, 6 amoniaco, 7 arginina, 8 treonina, 9 alanina, 10 prolina, 11 cistina, 12 tirosina, 13 valina, 14 metionina, 15 lisina, 16 isoleucina, 17 leucina, 18 norleucina, 19 fenilalanina.

Tabla 15. Contenido de aminoácidos presentes en la proteína del residuo de vid.

Aminoácido	Resultado <sup>1</sup> (g/16g N)	% aminoácidos en la proteína	g <sub>a.a.</sub> /100g <sub>residuo</sub>
Aspártico	8.36 ± 0.60	10.44	0.87
Serina	3.31 ± 0.17	4.13	0.34
Glutámico	15.17 ± 1.32	18.94	1.58
Glicina	7.08 ± 0.11	8.84	0.74
Arginina	5.16 ± 0.36	6.45	0.54
Alanina	4.54 ± 0.21	5.67	0.47
Prolina	5.19 ± 0.04	6.48	0.54
histidina	3.19 ± 0.11	3.99	0.33
<b>Treonina</b>	2.92 ± 0.07	3.65	0.30
<b>Cistina</b>	0.09 ± 0.01	0.12	0.01
<b>Tirosina</b>	0.61 ± 0.06	0.76	0.06
<b>Valina</b>	5.01 ± 0.08	6.25	0.52
<b>Metionina</b>	0.56 ± 0.03	0.70	0.06
<b>Lisina</b>	5.28 ± 0.30	6.59	0.55
<b>Isoleucina</b>	3.92 ± 0.07	4.90	0.41
<b>Leucina</b>	6.33 ± 0.13	7.91	0.66
<b>Fenilalanina</b>	3.34 ± 0.23	4.17	0.35
<b>Triptofano</b> <sup>2</sup>	0.24 ± 0.018	0.29	0.03
Total aminoácidos	80.31	—	—
Total indispensables	28.28	—	—

1. Se muestra el contenido de cada aminoácido promedio (g/16 g N) ± desviación estándar con coeficiente de variación menor a 9%
2. Obtenido por método enzimático
3. Proporción de aminoácidos respecto al total de los mismos en el residuo (aminoácido<sub>g/16gN</sub> / total aminoácidos)\*100
4. Aminoácidos indispensables (con negritas)

Tabla 16. Calificación química de la proteína contenida en el residuo de vid.

Aminoácido indispensable	Contenido de aminoácidos en el residuo (g/16gN)	Contenido de aminoácidos en el patrón (g/16gN) <sup>1</sup>	Calificación química <sup>2</sup>
Isoleucina	3.92	4.00	> 100
Leucina	6.46	7.04	> 100
Lisina	5.28	5.44	> 100
Azufrados <sup>3</sup>	0.66	4.72	18
Aromáticos <sup>4</sup>	3.95	6.08	85
Treonina	2.92	4.00	96
Valina	5.01	4.96	> 100
Triptofano	0.24	1.00	31

**Calificación química: 18**

1. patrón establecido (FAO, 1973)<sup>63</sup>
2. Se calculó de la siguiente manera:  $([a.a_{muestra}/total\ a.a_{muestra}]/[a.a_{patrón}/total\ a.a_{patrón}]) \times 100$
3. metionina + cistina
4. tirosina + fenilalanina

De acuerdo a las tablas 15 y 16, es evidente que los aminoácidos limitantes en la proteína del residuo son los azufrados (metionina y cistina), semejando un patrón similar al de las leguminosas, las cuales, se sabe, también son deficientes en estos aminoácidos<sup>61</sup>, sin embargo el contenido de proteína (ver tabla 7) no es similar a una leguminosa, sino semejante al de un cereal. Al emplear éste residuo como complemento, sería posible lograr una adecuada suplementación con cereales ya que la lisina, que es importante nutricionalmente hablando debido a su escasez, no resulta ser un problema, debido al adecuado contenido en el residuo.

De acuerdo a los requerimientos de aminoácidos reportados para especies como el cerdo y la res, son cistina y metionina, los aminoácidos que sería importante suplementar; pues no cumplen con los requerimientos para estos animales, ya que se requiere de 0.71% en el alimento, donde el residuo se encuentra muy por debajo de éste valor.

La cantidad encontrada de los demás aminoácidos, cumple adecuadamente con los requerimientos especificados para este tipo de especies.

Con el fin de evaluar la posible suplementación se hicieron mezclas teóricas con el residuo y sorgo o maíz (ver tablas 17 y 18), que son de los alimentos más comúnmente empleados en alimentación animal y que al ser cereales suelen ser limitantes en lisina, pero no en metionina y cistina<sup>13,1</sup>, se esperaría entonces suplementación en dicha mezcla; <sup>22</sup> debido a que el residuo de vid es limitante en estos aminoácidos (metionina y cistina) pero no lo es en lisina, de tal modo que sería posible proponerlas para utilizar el residuo en alimentación animal.

Los resultados de las mezclas se muestran en las tablas 17 y 18, en donde es apreciable que aumenta considerablemente la calificación química comparada con la del residuo (ver tabla 16). (sin embargo, se observa que la calificación química del maíz y sorgo disminuyen, pero no considerablemente (la calificación química para el maíz es 55 y para el sorgo 44) <sup>62</sup> además cambia el aminoácido limitante. (antes lisina y en la mezcla azufrados)

Debido a que con las dos mezclas con cereales (maíz y sorgo) continúan siendo los aminoácidos azufrados los limitantes aún cuando se incrementa la calificación química del

residuo. Podría buscarse otro grano de cereal o bien oleaginosas como el algodón o el ajonjolí por ejemplo, que al igual que incrementarían el contenido de proteína aumentarían a su vez la calificación química.

Si se propone dirigir este residuo primordialmente a alimentación de rumiantes, debido al alto contenido de fibra encontrado, es posible ajustar a 10% de proteína, de tal modo que se cumpliría con las recomendaciones de este nutrimento para éste tipo de animales<sup>20</sup>. Otra ventaja que se encuentra al dirigir este residuo a rumiantes, es que ningún aminoácido se considera indispensable para ellos, y lo que sería necesario saber es si el aporte que brindara el residuo ya sea sólo o con alguna mezcla, sea aporte suficiente para la flora del rumen.

Finalmente sería importante conocer si se puede lograr una disminución en el contenido de fibra al mezclar maíz o sorgo con el residuo, de tal modo que además de lograr suplementación en la proteína, se disminuye el contenido de fibra y otros factores antinutricionales y quizá fuera posible lograr su aplicación, como alimento, a pollos y cerdos.

**Tabla 17.** Contenido de aminoácidos y calificación química de la mezcla teórica propuesta (50%:50%) en base a proteína ( maíz:residuo de vid) ajustado a 10% de proteína en la mezcla.

Aminoácido esencial	Contenido de aminoácidos en la mezcla maíz <sup>5</sup> :residuo	Contenido de aminoácidos en el patrón. <sup>1</sup>	Calificación química <sup>2</sup>
Isoleucina	3.8	4.00	> 100
Leucina	9.43	7.04	> 100
Lisina	3.98	5.44	82
Total azufrados <sup>3</sup>	2.07	4.72	49
Total aromáticos <sup>4</sup>	6.32	6.08	> 100
Treonina	2.10	4.00	59
Valina	4.93	4.96	>100
Triptofano	0.47	1.00	53

#### Calificación química: 49

1. patrón establecido (FAO, 1973)<sup>63</sup>
2. Se calculó de la siguiente manera:  $([a.a_{\text{mezcla}}/\text{total a.a}_{\text{mezcla}}]/[a.a_{\text{patrón}}/\text{total a.a}_{\text{patrón}}]) \times 100$
3. metionina + cistina
4. tirosina + fenilalanina
5. referencia del contenido de aminoácidos (62)

**Tabla 18.** Contenido de aminoácidos y calificación química de la mezcla teórica propuesta (50%:50%) en base a proteína ( sorgo:residuo de vid) ajustado a 10% de proteína en la mezcla.

<b>Aminoácido esencial</b>	<b>Contenido de aminoácidos en la mezcla sorgo<sup>5</sup>:residuo</b>	<b>Contenido de aminoácidos en el patrón.<sup>1</sup></b>	<b>Calificación química<sup>2</sup></b>
Isoleucina	3.92	4.00	> 100
Leucina	9.82	7.04	> 100
Lisina	3.65	5.44	74
Total azufrados <sup>3</sup>	1.78	4.72	41
Total aromáticos <sup>4</sup>	5.76	6.08	> 100
Treonina	2.97	4.00	82
Valina	5.00	4.96	>100
Triptofano	0.73	1.00	80

**Calificación química: 41**

1. patrón establecido (FAO, 1973) <sup>63</sup>
2. Se calculó de la siguiente manera:  $([a.a.muestra/total a.a.muestra]/[a.a.patrón/total a.a.patrón]) \times 100$
3. metionina + cistina
4. tirosina + fenilalanina
5. referencia del contenido de aminoácidos (62)

En la tabla 19 se muestra la cantidad en gramos para preparar 1 Kg de una mezcla 50%:50% del residuo con maíz o con sorgo, apreciándose que se requiere aproximadamente de la mitad de cada uno de los componentes lo que significaría una disminución de casi el 50% en el consumo de cereales como el maíz que se encuentra en continua competencia entre el hombre y animales.<sup>9,13</sup>

**Tabla 19.** Cantidad de maíz, sorgo y residuo de vid necesarios para preparar una mezcla teórica 50:50 en base a proteína (maíz:residuo y sorgo:residuo) al 10% de proteína en la mezcla.

<b>Componente</b>	<b>% de proteína</b>	<b>Cantidad en 1Kg de mezcla 50:50 (g)</b>
Maíz / Residuo de vid	9.5 / 10.4	526.3 / 480.8
Sorgo / Residuo de vid	10.1 / 10.4	495.1 / 480.8



## 7. Pruebas de digestibilidad

En la tabla 20 se muestra el valor de digestibilidad *in vitro* para monogástricos, el cual fue obtenido por método enzimático, así mismo, se muestra el valor de digestibilidad *in vitro* después de haber sometido al residuo a un tratamiento con líquido ruminal.

**Tabla 20.** Digestibilidad *in vitro* para monogástricos y rumiantes del residuo de vid.

Digestibilidad	Valor (%)
Monogástricos <sup>1,3</sup>	73.84 ± 2.64
Rumiantes <sup>2</sup>	30.94 ± 4.18

1. Se muestra el porcentaje promedio ± desviación estándar con coeficiente de variación de 3.5805 %
2. Se muestra el porcentaje promedio ± desviación estándar con coeficiente de variación de 13.5122%
3. La referencia utilizada (caseinato de sodio liofilizado) arrojó un valor de digestibilidad de 93.6% de digestibilidad.

De acuerdo a la tabla 20, los valores encontrados para digestibilidad en monogástricos del residuo se consideran bajos si se comparan con valores de digestibilidad *in vitro* reportados para otros alimentos como maíz, soya, trigo, harina de pescado etc. (de 90 a 83%)<sup>64</sup>, sin embargo, si se compara este valor con algunas leguminosas silvestres, que actualmente se estudian para su introducción en la dieta humana o animal, se encuentran valores de 69 a 75% de digestibilidad<sup>65</sup>, siendo éstos muy semejantes al valor obtenido para el residuo.

Los valores de digestibilidad para ruminantes se esperarían que fueran mayores, dado el aprovechamiento de la fibra por el rumen, sin embargo no es así; se considera que productos con un 45.5% de digestibilidad ya pueden ser considerados como forrajes útiles en alimentación animal,<sup>65</sup> el valor obtenido en el residuo, es aproximadamente 15 unidades menor. Sin embargo, en productos destinados a alimentación animal tales como alfalfa, pasto tropical y pajas, se reportan valores de digestibilidad ruminal que oscilan entre un 40 y 60%, que son valores que se encuentran más cercanos al valor obtenido en el residuo.

Este bajo porcentaje de digestibilidad, como se ha mencionado antes, puede ser debido a la lignina presente en el residuo, la cual no es aprovechable y demerita el valor nutritivo del residuo<sup>10,17</sup>; anteriormente se ha mencionado que en el grado de madurez en el que se cultiva la uva para la elaboración de vinos y licores el grado de lignificación ya es considerable. Otra posible explicación es el modo en el que se lleva a cabo la técnica para la medición de digestibilidad ruminal, debido a que las condiciones en que se obtiene el líquido ruminal no son óptimas, por lo que se sugeriría obtener el líquido de un rumiante fistulado y no por sonda, además de considerar otras técnicas existentes como la bolsa de nylon<sup>26</sup> en donde la digestión del material se lleva directamente dentro del animal por lo que es más eficiente pues se controlan adecuadamente condiciones anaeróbicas y de temperatura necesarias para la adecuada determinación de digestibilidad.

Si se consideran las mezclas mostradas en las tablas 17 y 18 a partir de la mezcla maíz:residuo (50:50) sería posible aumentar la digestibilidad además de la calificación química de la proteína como ya se vio anteriormente. Si este bajo valor de digestibilidad fuera atribuible al contenido de lignina, una mezcla con otros alimentos, daría lugar a una

dilución de los componentes que pudieran estar afectando el valor de digestibilidad. De usar el sorgo en la mezcla se corre el riesgo de aumentar el contenido de taninos por el alto contenido que comúnmente se encuentra en este cereal <sup>31</sup> por lo que el maíz sería tal vez una mejor opción.

## CONCLUSIONES

- El contenido de grasa y proteína se encuentran en una concentración apreciable, representando una ventaja en su utilización como alimento.
- El elevado contenido de fibra es un factor limitante para destinar el residuo a la elaboración de alimento para animales monogástricos, y una posible ventaja para su aprovechamiento en rumiantes.
- El contenido de calcio, fósforo y hierro en el residuo, de acuerdo con los requerimientos para cerdos y rumiantes, se encuentran en valores adecuados para su consumo.
- El residuo es deficiente en Zinc.
- No se encontraron cantidades importantes de metales pesados, que representen riesgo toxicológico durante el consumo del residuo.
- No se detectaron glucósidos cianogénicos y el bajo contenido de inhibidores de tripsina, hemaglutininas, rafinosa y estaquiosa no representan riesgo en el consumo del residuo.
- El contenido de taninos está en un límite permisible, sin representar un riesgo elevado, sin embargo, puede tener un efecto negativo si se emplea en alimentación para aves.
- El contenido elevado de ácido fítico en el residuo excede el límite permisible.
- Se encontró un bajo contenido de hidratos de carbono solubles.
- El residuo podría considerarse como una fuente de grasa de buena calidad, debido al contenido de ácidos grasos indispensables como el ácido linoléico que éste contiene.
- La cistina y la metionina, son aminoácidos limitantes en la proteína del residuo dando lugar a una calificación química baja de la proteína contenida en el residuo.

### Conclusiones y recomendaciones

- La calificación química de la proteína contenida en el residuo aumenta considerablemente al hacer una mezcla teórica con sorgo y con maíz.
- Se encontraron bajos valores de digestibilidad ruminal y digestibilidad para monogástricos.
- El residuo de vid resultante del prensado en la elaboración de vino, mezclado con cereales, podría ser utilizado como complemento en la elaboración de alimentos para animales, siendo recomendable primordialmente para rumiantes.

## **RECOMENDACIONES**

- Es importante realizar las pruebas biológicas con animales monogástricos (pollos) y con rumiantes (cabras) para confirmar la calidad nutricia del residuo de uva.
- Se recomienda investigar la calidad del aceite de la semilla del residuo de vid debido a la composición obtenida en el perfil de ácidos grasos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Reynoso, J. *Viticultura, enología y algo más...* . McGraw-Hill, 1ª edic., México, D.F., pp. 3, 18-20, 35-43, 1996.
2. Macías, H. *Manual práctico de viticultura*. Trillas, 1ª edic., México, pp. 9, 44-46, 81-82, 1993.
3. INCAP, Instituto Nacional de Nutrición de Centro América, Organización Panamericana de Salud, 1ª. Sección., Cd. de Guatemala, pp. 30, 1996.
4. Hidalgo, L. *Tratado de viticultura*. Mundi-Prensa, 1ª edic., Madrid, pp. 10, 790-798 1993.
5. De Rosa, T. *Tecnología del vino tinto*. Mundi-Prensa, 1ª edic. Madrid, pp. 21, 115, 1988.
6. Vedprakash, K. Patil, V.R. Chakrawar, P.R. Narwadkar, and G.S. Shinde. Grape. In: *Handbook of fruit science and Technology Production, composition, storage and processing*. Marcel Dekker Inc., 1ª edic., N.Y., pp. 28, 1995.
7. Simon, A.L.. *Wines of the world*. Mc Graw-Hill, 2ª edic., Rahway, N.J., pp. 211-212, 1999.
8. Hui, V.H. *Enciclopedia of Food Science and Technology*. Vol. 4. Willey Interscience, 1ª edic., Washington D.C., pp. 2795-2801, 1991.
9. Maynard, L.A. *Animal Nutrition*. McGraw-Hill, 7ª edic., New York., pp. 4-5, 19, 1990.
10. Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán García, M.J., Esqueda, M., *Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding*. *J. Agric. food Chem*. Vol. 50: 2537-2542, 2002.

11. Velazquez, P., Efecto del tratamiento térmico y paletizado sobre la composición química y digestibilidad de los residuos orgánicos utilizados en la alimentación de cerdos. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 2-3, 36, 66, 1998.
12. Sotelo, A. Constituents of wild food plants. In: *Functionality of Food Phytochemicals*, Plenum Press, 1ª edic., New York., pp. 89-111, 1997.
13. Church, D.C. *Basic animal nutrition and feeding*. John Wiley and Sons Inc., 2ª edic., Portland O., pp. 15, 31-47, 279-294, 1987.
14. Gonzalez, C.J., *Alimentación de Bovinos, ovinos y caprinos*. Mundi-Prensa, 1ª edic. Madrid, pp. 29-42, 1990.
15. Weimer, P.J., Mackney, J.M., Jachim G.J., Hatfield R.D., *Fermentations of a Bacterial Cellulose/xylan composite by Mixed Ruminant Microflora: Implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability*, *J. Agric. food Chem.* 48:1727-1733, 2000.
16. Church, D.C., *Digestive Physiology and nutrition of ruminants*. Vol. 1 *Digestive Physiology*, O & B Books, 2ª edic., Portland O., pp. 174-214, 1976.
17. Hughes, M.D., Heath, M.E., Metcalfe, D., *Forages, The Science of grassland Agriculture*, The Iowa State University Press, 2ª edic., Iowa, pp. 95-117, 152-177, 1966.
18. Fraga, F., Fernandez, C., Alegre, J. *Alimentación de los animales monogástricos; cerdo, conejos y aves*. Mundi-Prensa, 1ª edic., Madrid, pp. 24-28, 37-50, 67-84, 103-122, 1985.
19. Church, D.C. *Alimentos y alimentación del ganado*. Mundi Prensa, 1ª edic. Barcelona., pp. 704-724, 1997.
20. Church, D.C. *Digestive Physiology and Nutrition*. Vol. 3 *Practical Nutrition*, O & B Books, 2ª edic., Portland O, pp. 35-39, 1974.
21. Aron, A. B. *Nutrición animal. Acribia*, 1ª edic., Zaragoza., pp. 43-59, 79-106, 1988.

22. Fisher, P.B. Valor nutritivo de los alimentos. Limusa, 1ª edic., México D.F., pp. 138-139, 149, 2000.
23. Brian, A.F., Allan, G.C. Ciencia de los alimentos, nutrición y salud., Limusa-Noriega Editores., 5ª edic., México D.F., pp. 113-129, 1997.
24. Fennema, O., Química de alimentos., Acirbia, 2ª edic. Zaragoza., pp. 65-71, 100-101, 140-150, 960-965, 1993.
25. Sotelo, A., Rodríguez, A., Validation of the liquid chromatography method for raffinose and stachyose determination in legumes and cereals, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM. Artículo en proceso., pp. 1-14.
26. Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. Composición y análisis de alimentos de Pearson. CECSA, 2ª edic., México D.F., pp. 12-29, 36-37, 199-250, 397, 671-721, 1996.
27. Almela, C., Algora, S., Benito, V., Clemente, M.J., Devesa, V, Suñer M.A., Vélez, D., Montoro, R., Heavy Metal total arsenic, and inorganic arsenic contents of algae food products. *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 918-922, 2002.
28. Tejada, I. Manual de Laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal. SARH Patronato de apoyo a la investigación y explotación pecuaria en México. A.C. , 1ª edic., México D.F., pp. 272-281, 1985.
29. Carbamaro, M., Grant, G., Marsilio, C., Pusztai, A. Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins:antinutritional compounds or storage proteins?, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 742-748, 2000.
30. Partearroyo, M.A., Fernandez-Quintela A., Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. *Alimentaria* 267:115-119. 1995.
31. Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Acirbia, 2ª edic., Zaragoza., pp. 4, 5-17, 82-96, 1995.



32. Martínez, B., Rincón, F. Inhibidores de tripsina I: Características y significado en alimentación humana. *Alimentaria*. 279:27-31, 1997.
33. Dicenta, F., Martínez, G. P., Grané, N., Martín, M.L., León, A., Canovas, J.A., Berenguer, V., Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves and root of sweet and bitter kernelled almonds, *J. Agric. Food Chem.*, 50:2149-2152, 2000.
34. NaczK, M., Nichols, T., Pink, D., Sosulski, F., Condensed tannins in canola hulls., *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2196-2200, 1994.
35. Khokhar, S., Phytate Content of Indian Foods and Intakes by Vegetarian Indians of Hisar Region Haryana State. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2440-2444. 1994.
36. Berkow, R., El manual Merck de diagnóstico y terapéutica, Doyma, 8ª edic., Barcelona, pp. 1777-1780, 1984.
37. Williams, S. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, AOAC, Washington D.C., Métodos 14.004, 7.009,7.063, 7.074, 1989.
38. Williams, S. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists AOAC, Washington D.C. , Métodos 925.05, 923.09, 982.30. 1990.
39. Miranda, J., Técnicas Analíticas de Origen Nuclear: Un curso introductorio, Instituto de Física, UNAM. México D.F., pp. 61-70, 2000.
40. Ruvalcaba, J.L., Monroy, M., Morales, López, K., The new external beam set-up of the Pelletron Accelerator at UNAM, México., Abstracts for the ninth international conference of PIXE and its analytical applications, University of Guelph, Guelph, pp. 62, 2001.
41. Manual for QXAS (International Atomic Energy Agency, Vienna), 1995.
42. Miranda, J., Lucio, O.G., Santillana, E., Lugo, M., Aguilar, D.L., PIXEINT: un programa para análisis cuantitativo con PIXE (Resúmenes del XL Congreso Nacional de Física, Soc. Mex. de Fís., México D.F., pp. 27, 1997.

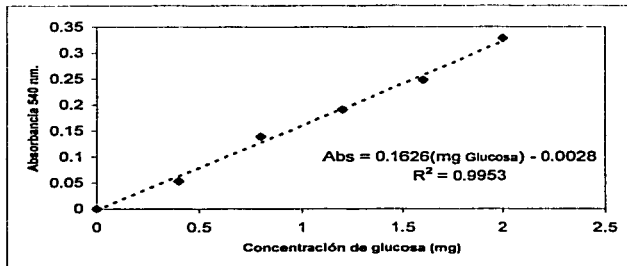
43. International for Standardization Organization. Sorghum. Determination of tannin content (ISO 9648). ISO, 1ª edic., 1988.
44. Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E., Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51: 376-382, **1974**.
45. Jaffe, W.G., Levy, A., Gonzalez, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem.* 13 :2685-2693, **1974**.
46. Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., Santillan, S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Anal Biochem.* 225:206-211, **1995**.
47. Mendoza, J.B., Validación de una metodología para la determinación de ácido fítico en alimentos. Tesis. UNAM. México D.F., pp. 50-52, 82-85, 2001.
48. Lucas, B., Sotelo, A. A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wild and cultivated seeds. *Nutr. Rep. Int.* 29: 711-719, **1984**.
49. Harris, C.D., Análisis químico cuantitativo, Iberoamericana., 1ª edic., México D.F., pp. 637-653, 1990.
50. Laureles, L. R., Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) Hybrids and Their parentals, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 1581-1585, **2002**.
51. Sotelo, A., Lucas, B., Garza, L., Giral, F., Characteristics and fatty acid content of the fat of seeds of nine wild Mexican plants., *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1503-1505, **1990**.
52. Alegria, A., Barberá, R., Lagarda, M., López, J., Determinación de aminoácidos en fórmulas para lactantes por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. *Alimentaria.*, 295: 103-110, **1998**.

53. Cohen, S., Michaud, D. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolyzate amino acids via HPLC. *Anal Biochem.* 211: 279-287, 1993.
54. Díaz, J., Lliberia, J., Comellas, L., Broto, F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 719: 171-179, 1996
55. Strydom, D. Cohen, S. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate pre column derivatization. *Anal Biochem.*, 222: 19-28, 1994.
56. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., Rapid analysis of amino acids using pre column derivatization. *J. chromatogr.* , 336:93-104, 1984.
57. Amerine, M.A., The technology of wine making, Avi Publishing, 4<sup>a</sup> edic. N.Y., pp. 77-145, 1980.
58. Benitez, M.A., Grijalva, M.I., Valencia, M.E., Total and soluble Iron content and effect of certain inhibitors present in selected varieties of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1300-1302, 1994.
59. López, E.M. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 34-39, 73, 77, 2000.
60. Hidalgo, A.G. Adaptación y validación de métodos cuantitativos para determinar Nitratos y Taninos en muestras vegetales. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 4-18, 1999.
61. Ekhard, E.Z., filer J. Present Knowledge in Nutrition., ILSI Press., 7<sup>a</sup> edic., Washington D.C., pp. 58-85, 1996

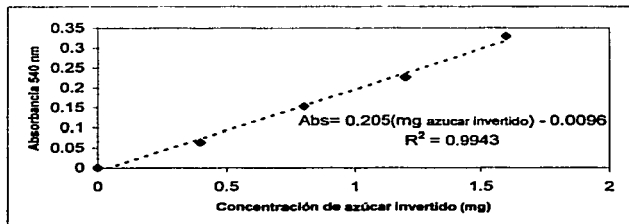
62. FAO, Amino-Acid Content of foods and biological data on proteins, Organization of the United Nations, 1ª edic., Roma, pp. 38-39, 42-43, 1970.
63. Food Agricultural Organization / World Health Organization: Energy and Protein Requirements, WHO, Technical Report Series No. 522. Geneve, 1973.
64. Carias, D., Cioccia, M. A., Hevia, P., Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el cómputo químico, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 45: 111, 1995.
65. Sotelo, A, Migliaro, P., Toledo, A., Contreras, J., Chemical composition, digestibility and antinutritional factors content of two wild legumes: *Styphonolobium burseroides* and *Acacia bilimekii*, *Plant foods for Human Nutrition*, 54: 59-65, 1999.
66. Torres, C.M., Comparación de diferentes métodos químicos y microbiológicos para la determinación de triptofano. Tesis. Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México D.F., 1979.

## ANEXO

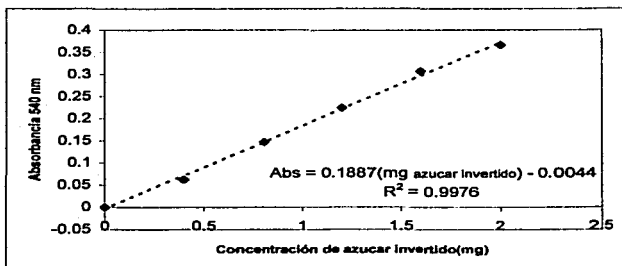
A continuación se presentan las curvas patrón así como los cromatogramas que se emplearon para las diferentes determinaciones mencionadas en las metodologías aplicadas al residuo de vid.



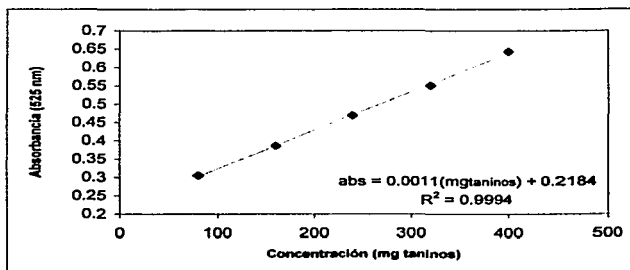
**Figura 5.** Curva patrón de glucosa y ecuación de regresión para la determinación de hidratos de carbono. (reductores directos)



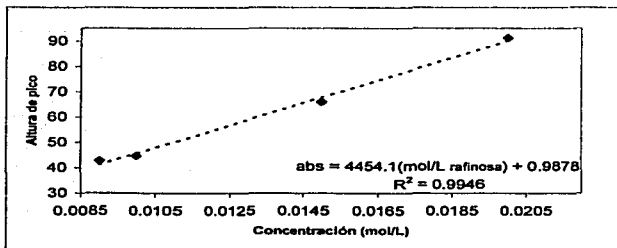
**Figura 6.** Curva patrón de azúcar invertido y ecuación de regresión para la determinación del contenido de hidratos de carbono antes de la inversión.



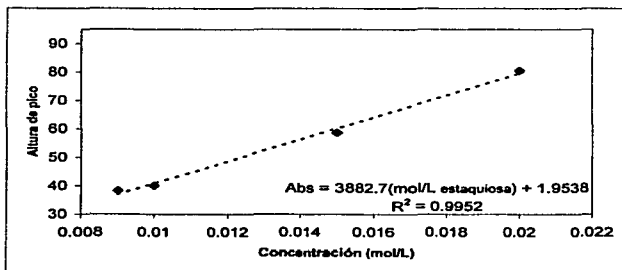
**Figura 7.** Curva patrón de azúcar invertido y ecuación de regresión para la determinación de hidratos de carbono después de la inversión.



**Figura 8.** Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación del contenido de taninos.



**Figura 9.** Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación del contenido de rafinosa.



**Figura 10.** Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de estaquiosa.

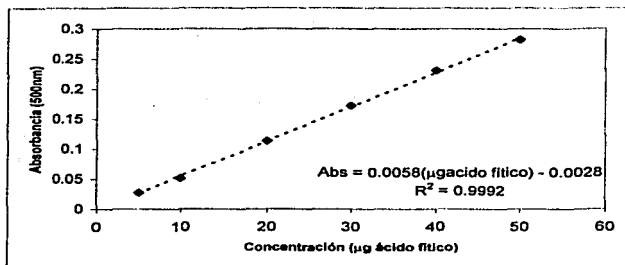


Figura 11. Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de ácido fítico.

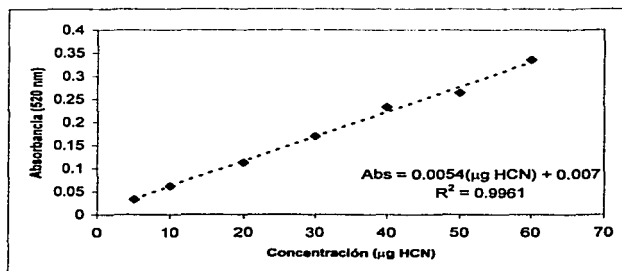
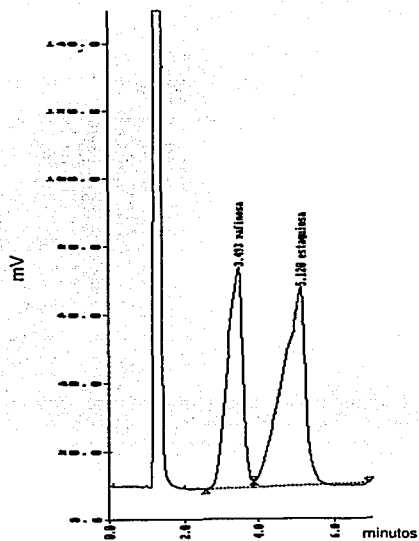
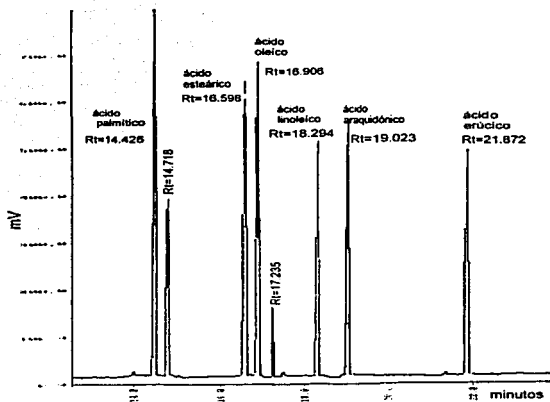


Figura 12. Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de glucósidos cianogénicos.

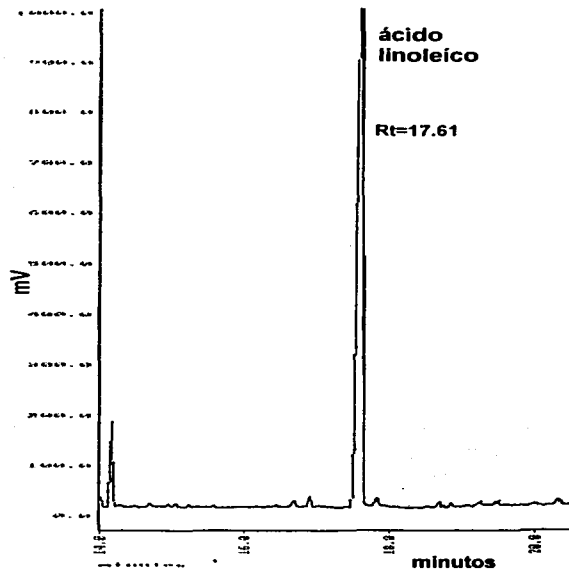




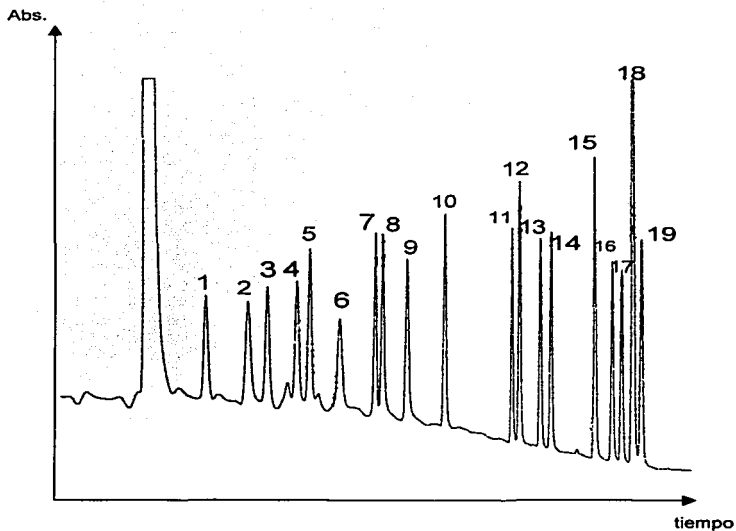
**Figura 13.** Ejemplo de cromatograma del estándar de rafinosa y estaquirosa (concentración 0.015M).



**Figura 14.** Cromatograma del estándar de ácidos grasos para la obtención del perfil de ácidos grasos.



**Figura 15.** Cromatograma del estándar de ácido linoléico para la obtención del perfil de ácidos grasos en el residuo de vid.



**Figura 16.** Cromatograma del estándar de aminoácidos para la obtención del perfil de aminoácidos en el residuo de vid (concentración 0.2mM)

1 Aspártico, 2 serina, 3 glutámico, 4 glicina, 5 histidina, 6 amoniaco, 7 arginina, 8 treonina, 9 alanina, 10 prolina, 11 cistina, 12 tirosina, 13 valina, 14 metionina, 15 lisina, 16 isoleucina, 17 leucina, 18 norleucina, 19 fenilalanina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

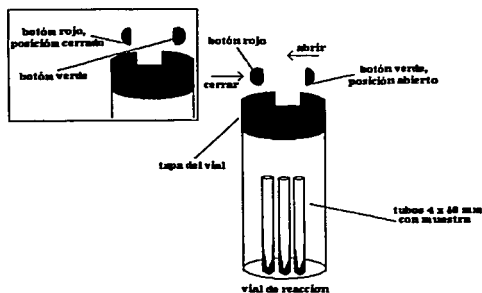


Figura 17. Vial de reacción empleado para la preparación de muestras e hidrólisis en la determinación del perfil de aminoácidos.

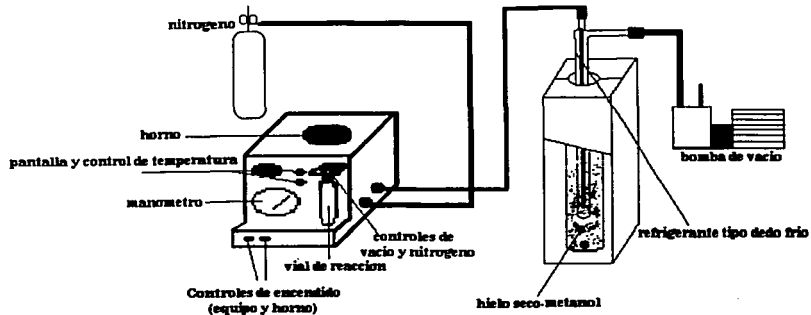
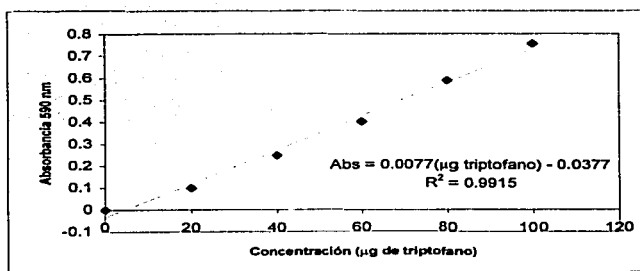


Figura 18. Estación de trabajo Pico-Tag, empleada en la determinación del perfil de aminoácidos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 19.** Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación de triptofano en el residuo de vid.