

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“FACTORES ANTINUTRIMENTALES, TÓXICOS Y
ASPECTOS NUTRICIOS EN LOS RESIDUOS DE
CUATRO VARIEDADES DE UVA (*Vitis vinifera*) Y SU
POSIBLE USO EN ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

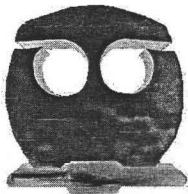
IRMA ALEJANDRA MÁRMOL SÁNCHEZ.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2005



m. 345818



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. Ángela Sotelo López.
Vocal	Prof. I. María de Lourdes Flores Téllez.
Secretario	Prof. Lucía Cornejo Barrera.
1er Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán.
2º Suplente	Prof. Gabriela López Velasco.

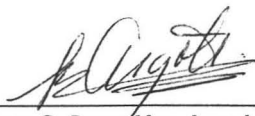
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR



M. en C. ~~Ángela Sotelo López.~~

SUPERVISOR TÉCNICO



M. en C. Rosa Ma. Argote Espinosa.

SUSTENTANTE



Irma Alejandra Mármol Sánchez.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta gran institución.

A la Facultad de Química y sus grandes profesores por la formación profesional recibida y que siempre recordaré como los mejores: R. Coello, Sunshine, P. Cañizares, Bernardo L., Marco Félix, M. Garibay, Elvia Herrera, J. Vázquez, entre otros.

A la maestra Sotelo por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo.

A Rosa Ma. Argote por su alegría, entusiasmo, por los momentos de convivencia y asesoría para la realización de esta tesis.

A la Casa Pedro Domecq y a la Universidad Autónoma de Chapingo por la muestras proporcionadas.

Al departamento de Absorción Atómica de la USAI por la determinación de metales pesados.

A Julieta S. Guillén y Elba Rojas por su asesoría y gran apoyo.

A Lety, Arge, Ili por su asesoría y convivencia en el tiempo que formé parte del laboratorio.

A los compañeros de laboratorio en especial a René, Jeannette, Fabiola y Claus.

A la Sra. Vicky por todas sus atenciones.

Dedicatorias

A Dios por darme una vida llena de salud y felicidad junto a mis padres.

A mis padres por todo su amor, apoyo, dedicación y confianza. Gracias por todo. Los amo.

A mi hermano Ber por todo su apoyo, convivencia y cariño. Te quiero mucho.

A Brenda por tantas cosas y juegos que realizamos juntas. Te quiero mucho.

A mi abuela Rosa Cortés por ser una gran y excelente persona. Gracias por todo. Te quiero mucho.

A mi abuelo Salvador Mármol te extraño y te quiero abuelo. Siempre te recordaré.

A mis tíos Lulú, Mago, Chava, Silvia y Miguel por su cariño, su apoyo y tantos momentos lindos y porque juntos forman parte de mi gran familia. Los quiero mucho.

A todos mis tíos, primos y sobrinos que les deseo lo mejor y que sean muy felices.

A mis mejores amigos Noé y Tania por tantos momentos que compartimos juntos, por formar un gran equipo, por sus palabras y apoyo en todo momento. Estarán siempre en mi mente y mi corazón. Los quiero mucho.

A Noé Bahena gracias por todo tu amor, cariño, comprensión, apoyo y esfuerzo en todo y para la realización y culminación de esta tesis. Te quiero.

A Ivonne Mora por su apoyo incondicional y convivencia.

A mis amigas Jessica e Illiana por los momentos de alegría que compartimos.

A mi Melody hermosa por ser tan noble, juguetona, te extraño y te quiero preciosa.

A la vida por darme la oportunidad de disfrutarla y ser feliz.

ÍNDICE GENERAL

TEMA	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	
Objetivo General.	5
Objetivos específicos.	5
ANTECEDENTES	
1. La vid.	6
2. El vino.	9
3. Producción vitivinícola de México.	12
4. Producción mundial de vino.	14
5. Los residuos de uva como desechos industriales.	18
6. Producción animal.	18
7. Alimentación de rumiantes.	18
7.1 Digestión ruminal.	19
7.2 Características del rumen.	21
8. Digestibilidad.	22
9. Factores antinutrimientales.	23
9.1 Taninos.	24
9.2 Ácido fítico	25
9.3 Inhibidores de proteasas	27

10. Factores tóxicos	27
10.1 Hemaglutininas	28
10.2 Glucósidos cianogénicos.	29
10.3 Metales pesados.	30

METODOLOGÍA

1. Información acerca de la muestra.	32
2 Diagrama general	33
3. Descripción de la metodología.	34

Determinación de factores antinutrimientales

1. Taninos.	34
2. Ácido fítico.	38
3. Inhibidores de tripsina.	43

Determinación de factores tóxicos

1. Hemaglutininas.	47
2. Glucósidos cianogénicos.	52
3. Metales pesados.	56

Determinación para la evaluación nutricional de los residuos

1. Digestibilidad <i>in vitro</i> para rumiantes.	60
--	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Factores antinutrimientales.64
2. Factores tóxicos.69
3. Metales pesados70
4. Digestibilidad <i>in vitro</i> para rumiantes.71
CONCLUSIONES.75
PERSPECTIVAS.76
ANEXO A77
BIBLIOGRAFÍA82

RESUMEN

La vitivinicultura es una importante actividad en el Noroeste de México y como resultado la generación de desechos es elevada y representa un problema ambiental dado que normalmente se incineran los residuos resultantes, lo que justifica la necesidad de buscar una utilidad a estos mismos, propósito del presente trabajo, el cual forma parte de un estudio completo de los residuos de cuatro variedades de uva, constituidos por hollejos, raspones y semillas, los cuales provienen de Calafia, en Baja California, México, a partir de vinos y bebidas alcohólicas elaborados por la Casa Pedro Domecq a partir de *Vitis vinifera*, estudiándose las variedades tintas: *Cabernet Sauvignon*, *Rubi Cabernet* y, las variedades blancas: *Riesling* y *Chenin Blanc*.

El estudio realizado fue la determinación de los factores antinutrimientales y tóxicos por métodos analíticos y parte de la evaluación nutricional en estos residuos con el fin de valorar su posible uso como complemento alimenticio de rumiantes. El residuo de la variedad *Riesling* es el que presenta el mayor contenido de taninos. Los residuos tienen un contenido de taninos mayor al que presenta el sorgo (1.58-2.85%)⁴⁷, uno de los granos con mayor uso en alimentación animal, excepto el residuo de la variedad *Chenin Blanc* el cual presenta un valor dentro de este intervalo. Los residuos de las variedades *Riesling* y *Rubi Cabernet* rebasan el límite permisible de ácido fítico, mientras que los residuos de las variedades

Cabernet Sauvignon y *Chenin Blanc* están por abajo del límite. Los residuos de las variedades *Rubi Cabernet* y *Riesling* presentan un mayor contenido de ácido fítico que el sorgo (0.17-0.38 %) ⁴⁸, el residuo de *Cabernet Sauvignon* se encuentra dentro de este intervalo y en el residuo de *Chenin Blanc* es inferior. En el caso de Inhibidores de Tripsina los residuos de las cuatro variedades presentan una cantidad mayor a 10 UTI/ mg de muestra seca. No representan riesgo en cuanto al contenido de hemaglutininas ni de glucósidos cianogénicos. Los cuatro residuos presentan baja digestibilidad en comparación con la alfalfa (72.8%) que es considerada como uno de los principales forrajes para rumiantes. De los cuatro residuos el de la variedad *Chenin Blanc* es el que presenta una mayor digestibilidad para rumiantes. Los metales que se determinaron no representan riesgo para rumiantes. Por los resultados obtenidos por el momento podemos concluir que los residuos en estudio pueden ser considerados inocuos y pueden formar parte como complemento alimenticio de rumiantes.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la producción de vinos y demás bebidas alcohólicas en México ocupa un lugar importante dentro de la economía generando residuos en cantidades elevadas. Estos residuos suelen ser almacenados al aire libre en las proximidades de las propias bodegas donde se prensa la uva para, posteriormente, ser incinerados. La uva, fruto de la vid (*Vitis vinifera*) es la materia prima para la elaboración de vino y otras bebidas alcohólicas. El proceso de vinificación consiste, esencialmente, en una fermentación alcohólica; el paso previo a la fermentación es la extracción de los mostos, para lo que se prensa la uva, obteniéndose, además del mosto, un residuo sólido constituido por diversos componentes (hollejos, raspones y semillas) que se denomina, genéricamente, orujo.

La gran producción de residuos que ocasiona la actual actividad humana en todos sus ámbitos, es uno de los principales problemas con los que se ha de enfrentar la humanidad. Estos residuos llevan consigo una progresiva degradación del medio ambiente que puede llegar a ser, en algunos casos, irreversible. Por ello, la eliminación controlada de los mismos reviste gran importancia y se ha de plantear la búsqueda de nuevas alternativas de uso de los mismos, con las cuales se pueda, no sólo evitar la peligrosa contaminación del medio ambiente, sino también crear una nueva fuente de riqueza adicional y, al mismo tiempo, aportar una mayor rentabilidad al proceso.

Una manera de reducir esta contaminación sería emplear los residuos como complemento alimenticio de rumiantes, ya que tienen la capacidad para utilizar con eficacia alimentos que el hombre, los cerdos y las aves digieren con dificultad, suponiendo que los factores antinutrimientales y tóxicos a determinar se encuentren dentro de niveles que no representen riesgo de consumo, además de que se reduciría con ello la cantidad de alimentos que entran en competencia directa para el consumo humano. Los animales contribuyen grandemente como proveedores de alimento para el hombre mediante la transformación de productos con escaso valor alimenticio en productos muy nutritivos. La dieta de mayor éxito para el hombre, en términos de aporte proteico, 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 este sector representa una fracción de importancia.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar los factores antinutrimientales, tóxicos y parte de la evaluación nutricional en los residuos de cuatro variedades de uva (*Vitis vinifera*), de las variedades tintas: *Cabernet Sauvignon*, *Rubi Cabernet* y de las variedades blancas: *Riesling* y *Chenin Blanc*, generados en el proceso de vinificación por la Casa Pedro Domecq (Baja California, México) con el fin de valorar su posible uso como complemento alimenticio de rumiantes.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Determinar la presencia de factores antinutrimientales, tóxicos y además algunos aspectos nutricios en los residuos de cuatro variedades de uva resultantes del proceso de vinificación con el fin de valorar su posible uso como complemento alimenticio de rumiantes.

Objetivos Específicos

- ✓ Cuantificar los factores antinutrimientales: taninos, ácido fítico, e inhibidores de tripsina, y tóxicos: hemaglutininas y glucósidos cianogénicos en los residuos de cuatro variedades de uva resultantes del proceso de vinificación.
- ✓ Determinar la presencia y cantidad de metales pesados en los residuos de cuatro variedades de uva resultantes del proceso de vinificación.
- ✓ Determinar la digestibilidad *in vitro* para rumiantes de los residuos de las cuatro variedades de uva resultantes del proceso de vinificación.
- ✓ Comparar las diferencias existentes entre los residuos de las cuatro variedades de uva resultantes del proceso de vinificación.
- ✓ Valorar el posible uso de los residuos como complemento alimenticio para rumiantes en función del contenido de factores antinutrimientales y tóxicos.

ANTECEDENTES

1. LA VID

La vid pertenece a la familia botánica de las vitáceas. Esta familia está compuesta por catorce géneros.

Las cepas del género *Vitis*, se dan en numerosas regiones del mundo, prácticamente en todas las de la zona templada. Crece de forma silvestre entre los 35 grados de latitud sur y los 53 grados de latitud norte. El género *Vitis*, especie *vinifera* es el que ha dado origen a todos los grandes vinos del mundo.¹

El fruto de la vid (*Vitis vinifera*) se presenta arracimado, distinguiéndose las siguientes partes en un racimo:

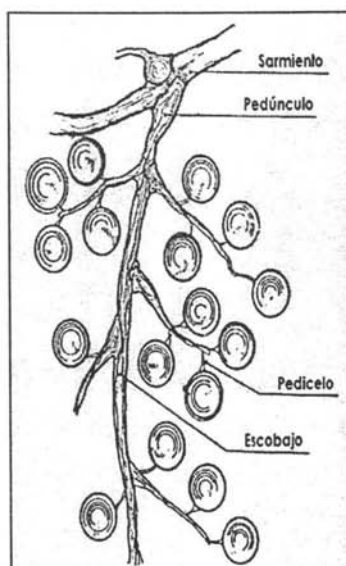


Figura 1. Estructura del racimo de uva (del Boletín Técnico de Vaslin, 1994).

Sarmiento- constituye la parte leñosa de unión entre el racimo y una de las ramas de la planta.

Pedúnculo- también de naturaleza leñosa, constituye el tronco principal del propio racimo.

Escobajo- es la continuación del pedúnculo, naciendo a la izquierda y derecha otros escobajos, sostén de los granos de uva.

Pedicelo- es la unión del grano con el escobajo.

Pedúnculo, escobajo y pedicelo se suelen agrupar bajo la denominación de raspón. Por el raspón circula la savia alimentadora del grano. El raspón puede representar del 3 al 7% del peso total del racimo.

El grano de uva como se muestra en la figura 2, está compuesto por: cabecil, pincel, pepita, película y pulpa.

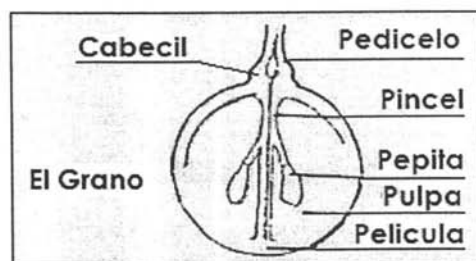


Figura 2. Estructura del grano de uva (del Boletín Técnico de Vaslin, 1994).

El cabecil es la unión entre el pedicelo y el grano de uva propiamente dicho.

El pincel atraviesa el grano en línea recta y en su estructura se sujetan las pepitas.

El grano de uva suele ser de forma esférica u ovalada de tamaños variables según la variedad de uva, grado de madurez, etc. Su color también depende de estos mismos factores, diferenciándose en general las uvas tintas de las uvas blancas, con una gama de colores muy amplia, desde el tinto oscuro, al morado, verde oscuro, verde claro, etc.

El grano de uva puede representar del 92 al 97% del peso total del racimo. Dentro del grano, la pulpa puede representar el 75 al 85% del peso del mismo, la película exterior u hollejo el 4 ó 5% en variedades de piel fina y llega incluso al 7% en variedades que poseen piel gruesa.

Las pepitas presentes en un grano oscilan entre 2 y 4 generalmente según las variedades e incluso existen uvas normalmente dedicadas a uvas de mesa, que carecen de ellas. Las pepitas tienen forma de una almendra pequeña con una cubierta leñosa, envuelta a su vez por una delgada cutícula de taninos. Estos pueden representar el 5 al 10% del peso de la pepita.

El hollejo contiene las materias colorantes flavonoles (de color amarillo) y las antocianinas (de color rojo). Los primeros son propios de la uva blanca y ambos están en la uva tinta. Además de las materias colorantes, el hollejo contiene polifenoles, ácidos libres, sales minerales, etc.^{2,3}

La proporción de los tres componentes (hollejos, raspones y semillas), varía según la clase o variedad de cepa y según los factores condicionantes del desarrollo de ésta: clima, suelo, variables meteorológicas, método de cultivo, tratamiento de enfermedades de la planta, maduración, etc.⁴

La especie *Vitis vinifera* presenta excelentes cualidades para la producción de vino, en general se utilizan cepas nobles que permiten elaborar vinos de buena calidad tales como: **Cabernet Sauvignon**, **Rubi 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, así como de uvas para el consumo en fresco (de mesa) y de uvas para la elaboración de pasas.⁵

2. EL VINO

El vino es el producto de la fermentación alcohólica del mosto de uva. A continuación se describe brevemente el proceso de vinificación con el fin de mostrar cómo se da origen al residuo sólido el cual es objeto de estudio en el presente trabajo. Además de que las características del orujo varían notablemente en función del tipo de vino producido (tinto o blanco) y de la variedad de uva.⁶

Los racimos, constituidos por el escobajo o raspón y los granos, son cortados y colocados en unos cubos de madera, hojalata o de hierro

esmaltado. En esta operación se separan las uvas sanas y maduras de las que no lo estén, o las que están echadas a perder. Una vez realizada esta operación se transporta la uva de la viña a la bodega para ser depositada en la tolva receptora, en la cual se procederá al estrujado, escurrido o prensado.

Las uvas al llegar a los locales donde se llevará a cabo la vinificación pueden someterse a dos tratamientos distintos, dependiendo a lo que serán destinadas; si es a la elaboración de vino tinto, se deben machacar y prensar para quebrar su envoltura; en seguida se ponen en cubas, en las que se mezcla el jugo, la cáscara y el escobajo, así al contacto de las partes sólidas (que es en donde se encuentran levaduras) con el jugo debe comenzar el proceso de fermentación.

El pigmento se encuentra en la piel, por tanto la intensidad del color del vino dependerá de la duración del contacto del jugo con la pulpa y piel de fruta.

Así, el primer paso es desgarrar el hollejo mediante una estrujadora de rodillos. Si es para la elaboración de vino blanco, los racimos son estrujados como para los tintos, pero deben escurrirse inmediatamente, dejando fluir el jugo blanco para que se separe de la piel y del escobajo, realizándose tal operación mediante el paso de las uvas por rodillos perforados; a la salida de éstos, los hollejos y los escobajos pasan a la prensa para extraerles todo el jugo.

El mosto es el líquido en el cual se lleva a cabo la fermentación y éste es el momento crucial del nacimiento del vino.

La fermentación alcohólica es un proceso que consiste en la transformación de los azúcares en alcohol etílico y en otras sustancias que otorgan el aroma al producto final, debido a la acción de las levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces oviformis*, provocando un desprendimiento de gas carbónico que es el indicador del inicio y terminación de este proceso.

Cuando llega esta etapa es conveniente descubar, es decir, separar el vino del orujo fermentado. Una vez que se ha 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. El vino escurrido se incorpora al obtenido en el descubado. El vino nuevo se pone en toneles y barricas, en donde completa su fermentación.⁷

Finalmente los vinos destinados al consumo rápido son filtrados y embotellados después de un corto período de reposo. Los otros son llevados hacia las bodegas de almacenamiento o de envejecimiento. Estos permanecerán en cubas por un tiempo determinado. Durante este período 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.⁵

3. PRODUCCIÓN VITIVINÍCOLA DE MÉXICO

La actual superficie vitícola de México ocupa unas 35,875 hectáreas distribuidas en distintas regiones (Tabla 1).

Tabla 1. Actual superficie vitícola de México y producción obtenida.⁸

Regiones	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada(Ha)	Producción obtenida (Ton)
Sonora	25326	24762	229482
Baja California	4790	4370	31845
Zacatecas	3396	1821	14931
Aguascalientes	1075	924	11850
Coahuila	571	210	1050
Querétaro	430	385	3280
Chihuahua	287	153	1200

La región de Baja California es la principal productora de vinos en México, ocupando la parte más septentrional del país.

Los Valles de Calafia y Guadalupe, Zona Tecate, Valle de Santo Tomás y San Vicente se localizan en la costa Oeste de Baja California y el Valle Mexicali al Noreste de la península.

La elevada latitud que ocupan los viñedos y sus condiciones geográficas y ambientales, hacen que *Vitis vinifera* pueda prosperar en condiciones climáticas óptimas para su desarrollo y calidad.

Los viñedos de Calafia se encuentran divididos entre variedades tintas y blancas. Las variedades que se cultivan se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Variedades tintas y blancas cultivadas en los viñedos de Calafia.⁹

<u>TINTAS</u>	<u>BLANCAS</u>
Garnacha	Chenin Blanc
Zinfandel	Thompson Seedless
Cariñena	French Colombard
Mision	Palomino
Petite Sirah	Moscatel
Cabernet Sauvignon	Riesling
Valdepeñas	Sauvignon blanc
Rubi Cabernet	
Barbera	
Italiana	
Ruby red	
Merlot	
Nebiolo	

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

La Casa Pedro Domecq ha sido protagonista importante en el desarrollo y tecnificación de las regiones vinícolas del país así como en la elaboración y mercadeo de productos procedentes de la uva.⁹

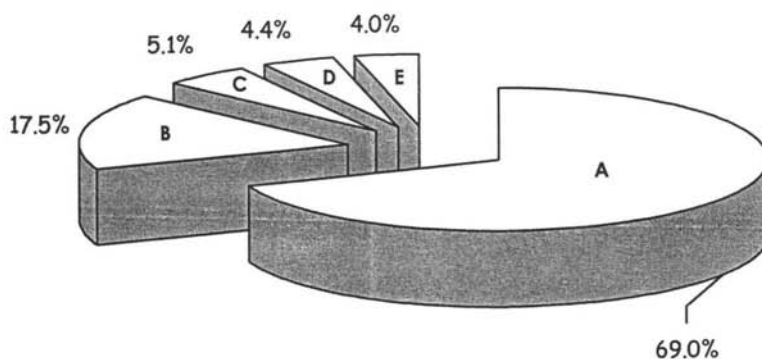
La industria vitivinícola juega un papel importante en la economía mundial, encontrándose a México con una participación significativa, principalmente en lo que a calidad de vinos respecta.¹⁰ México es el más

antiguo productor americano, pero su industria de vinos de calidad es relativamente reciente. Los vinos rústicos y el aguardiente todavía dominan la producción y el país está eclipsado por sus vecinos del norte (EE UU) y del sur (Argentina y Chile). En México se producen anualmente 10.8 millones de litros de vino, de los cuales se exporta un poco menos del 20%.¹¹

4. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE VINO

Uno de los cultivos más abundantes en el mundo es el de la uva (*Vitis vinifera*), de la cual se obtiene una producción anual de 287 millones de hectolitros de vino.¹¹ La contribución estimada de cada continente a la producción global se presenta en la figura 3.

Figura 3. Porcentaje de la producción mundial de vino por cada continente en el año 2004.¹²



A) Europa. B) América. C) Asia. D) Oceanía. E) África.

Producción mundial de vino por los 12 principales países

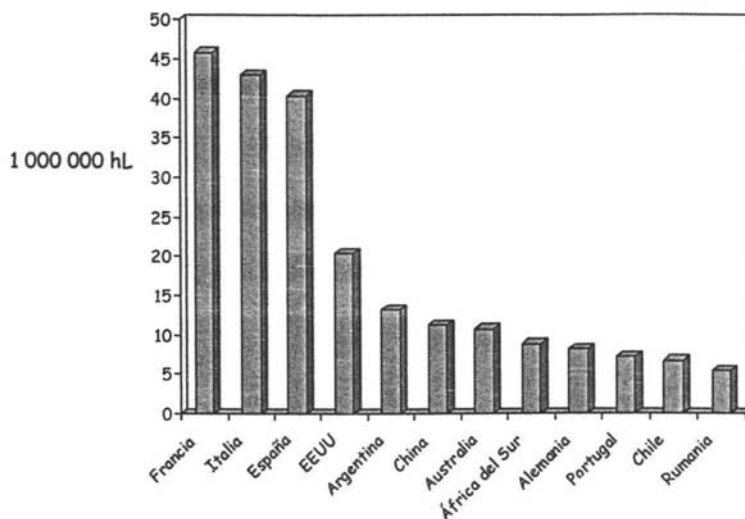


Figura 4. Producción mundial en millones de hectolitros de vino por los doce principales países en el año 2004. ¹²

Por duodécimo año consecutivo la producción mundial de vino registró crecimiento, alcanzando a 287 millones de hectolitros en 2004. Sin embargo, el consumo de vino no está creciendo tan rápidamente como la producción. ¹¹

5. LOS RESIDUOS DE UVA COMO DESECHOS INDUSTRIALES

Existe un creciente interés en la explotación de los residuos generados por la industria de alimentos. En particular, en las zonas de producción de uva y vino, una gran cantidad de residuos se generan, de los cuales el almacenamiento, transformación, o su eliminación posee problemas tanto ecológicos como económicos. ¹³ Estos pueden ser fuente de nutrientes

para los animales, pero a menudo son quemados en el campo para prevenir la proliferación de fitopatógenos, causando un daño al medio ambiente, problemas ecológicos y riesgos a la salud humana.

En México se cultivan 35,875 hectáreas con diversas variedades de vid para la producción de vino y bebidas alcohólicas dando como resultado aproximadamente un poco más de 270,000 toneladas de residuos agroindustriales cada año.

La lignina, que forma parte de este residuo, es uno de los mayores responsables de carbono agroindustrial desechado, produciendo hidrocarburos policíclicos aromáticos como el benzopireno, catecol, hidroquinonas, fenantreno y naftaleno cuando este residuo es degradado por calor. Todos estos compuestos pueden inhibir la síntesis de ADN e inducir tumores cancerígenos en hígado, pulmón, laringe y cérvix tanto en animales como en humanos.¹⁴

El orujo es un subproducto de la vinificación que generalmente es desechado en áreas abiertas, y puede ser usado en alimentación animal, especialmente en épocas de sequía cuando las pasturas suelen escasear. Su uso es limitado debido a su muy bajo valor nutrimental así como la presencia de factores antinutrimientales como compuestos fenólicos que inhiben la flora ruminal.¹⁴ Se estima que el conjunto de residuo denominado orujo representa en promedio del 13 al 17% del peso de la

uva. Las composiciones químicas de cada uno de los componentes del orujo se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Composiciones químicas de cada uno de los componentes del orujo.¹⁵

Raspones		Pepitas		Hollejos	
Agua	40-80%	Agua	27-39%	Agua	64-78%
Materia leñosa	15-20%	Materia leñosa	45-48%	Materia leñosa	20-32%
Taninos	1.0-3.0%	Grasas	4.0-10.0%	Proteína	0.15-4.23%
Ácidos libres	0.25-1.2%	Taninos	0.3-6.8%	Ácidos libres	1.0-1.3%
Materia resinosa	0.7-1.8%	Ácidos volátiles	0.5-1.0%	Minerales	1.0-2.0%
Minerales	1.0-4.0%	Materia resinosa	1.3-6.6%	Bitartrato potásico	0.0-1.0%
Creomor tártaro	0.4-1.25%	Minerales	1.3-2.0%		

Afortunadamente existen muchas oportunidades de convertir cada uno de los componentes del orujo en valiosos bioproductos, lo cual será en función de la composición química de cada uno de los componentes de este, por ejemplo: obtención de aceite de la pepita de uva, de papel a partir de los sarmientos, de alcohol y furfural a partir del orujo, de antocianos a partir de de los hollejos, de tanino, ácido tartárico o empleo

del orujo como abono orgánico y utilización para la fabricación de piensos para el ganado.¹⁵

6. PRODUCCIÓN ANIMAL

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 producción animal se deben al concepto de alimentación, por tanto lograr una reducción en el mismo, es la meta de todos los productores.¹⁶

7. ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES

La palabra rumiante procede de la palabra latina *ruminare* y significa masticar de nuevo.

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 su digestibilidad, es decir la proporción de este forraje 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 algunos animales de producción elevada, 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; estos alimentos son los frutos, los granos y las raíces, así como diversos subproductos de todos ellos.¹⁷

7.1 DIGESTIÓN RUMINAL

Los ruminantes representan una especie animal muy desarrollada y especializada debido a que tienen la capacidad de digerir fibras y otros glúcidos en una forma muy completa. No tienen incisivos superiores ni dientes caninos por lo consiguiente 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.

La producción de saliva en los rumiantes es muy abundante y relativamente continua que sirve como fuente de nitrógeno, fósforo y sodio a los microorganismos del rumen. También posee una alta amortiguación y por lo tanto ayuda a mantener un pH apropiado en el mismo.¹⁸

El alto consumo de forrajes y paredes celulares de los rumiantes es consecuencia de la existencia de cuatro compartimentos: el retículo, que moviliza el alimento digerido hacia el rumen, el cual 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 y finalmente el abomaso. Así, una serie de dispositivos anatómicos y fisiológicos retienen los alimentos en el rumen, donde éstos son sometidos simultáneamente a un fraccionamiento por la masticación en el curso de la rumiación y a una degradación química bajo la acción de la población microbiana, la cual obtiene de los mismos la energía y los sustratos necesarios para su proliferación.¹⁷

También tienen importancia las contracciones que ayudan a la regurgitación durante la rumia 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.¹⁸

7.2 CARACTERÍSTICAS DEL RUMEN

El rumen reúne una serie de condiciones favorables a la actividad de una población microbiana extraordinariamente densa, como son: el aporte alimenticio semicontinuo, un medio diluido y bien acondicionado y la eliminación de los productos residuales de la fermentación.

La temperatura se mantiene constante (39-40°C) y la cantidad de oxígeno es muy baja.

La población microbiana del rumen incluye: bacterias, protozoos y hongos. La población bacteriana es responsable de la mayor parte de la degradación de los alimentos en el rumen.

Los protozoos casi exclusivamente ciliados atacan todos los constituyentes principales de los alimentos; reducen la cantidad de glúcidos rápidamente fermentables disponibles para la población bacteriana, regulando así la velocidad de fermentación.

Los hongos, que se fijan sobre soportes rígidos, son capaces de degradar la celulosa y la hemicelulosa a pesar de la presencia de lignina.¹⁹

La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal. Mientras el rumiante aporta alimentos y las condiciones medioambientales adecuadas como temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor, las bacterias utilizan parcialmente los alimentos haciendo útiles los forrajes de otra forma indigeribles para los mamíferos y aportando productos de la

fermentación con valor nutritivo para el rumiante como ácidos grasos volátiles.⁶

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 para evaluar la calidad de los alimentos.

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 y el procesamiento del alimento.¹⁸

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 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.^{16,18} Existen técnicas *in vitro* que al involucrar procesos semejantes a los que ocurren dentro de un animal, permiten obtener el grado 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.²⁰

9. FACTORES ANTINUTRIMENTALES

Las sustancias antinutrientales son compuestos que están presentes de manera natural en algunos alimentos y actúan provocando una pérdida de nutrientes 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 nutriente 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 se tomen las medidas preventivas o correctivas correspondientes.²¹

Por otra parte, cuando se consumen en concentraciones pequeñas tales factores han mostrado una reducción de glucosa en sangre, colesterol en plasma, triacilgliceroles y en riesgos de padecer cáncer.²²

9.1 Taninos

Los taninos son un grupo de compuestos fenólicos (polifenoles) solubles en agua con un peso molecular en un rango de 500-3000 Da. Los taninos son clasificados como condensados o hidrolizables en base a su tipo estructural y su reactividad contra agentes hidrolíticos. Pueden formar complejos solubles e insolubles con proteínas, los cuales son los responsables del efecto antinutricional de estos.²³ Se encuentran en plantas comestibles y sirven como metabolitos secundarios que protegen a la planta contra daños de insectos y animales.²² Se consideran indeseables pues la oxidación de los grupos fenólicos de los taninos a quinonas puede formar enlaces covalentes entre los grupos α -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.²⁴

Los compuestos fenólicos encontrados en alimentos contribuyen generalmente a su astringencia y pueden reducir la disponibilidad de ciertos minerales como el zinc y hierro.²²

Muchos subproductos y residuos generados por las agroindustrias contienen polifenoles con un potencial de aplicación como antioxidantes en alimentos para prevenir cáncer de piel y otras enfermedades. En el caso de los residuos de uva, se han encontrado fracciones de polifenoles en la variedad *Parellada*, *Bangalore*, *Chardonnay*, *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Tempranillo*, *Garnacha*, *Albillo*, *Viura* y *Muscadine*.²⁵⁻²⁸

Los residuos de uva por ser un material rico en polifenoles y fibra dietaria, pueden ser empleados como ingredientes alimentarios.²⁹

9.2 Ácido fítico

Se encuentra en concentraciones que varían del 0.1-6.0% en diversos alimentos como ácido inositol hexafosfórico, es una estructura altamente reactiva debido a que la molécula posee múltiples grupos fosfatos reactivos, capaces de formar complejos con cationes. Su acción principal es la disminución de la absorción de minerales 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 α -amilasa.

Se encuentra fundamentalmente en granos de cereales, semillas oleaginosas y leguminosas siendo la forma de almacenaje de fósforo. Sin embargo, en esta 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.^{18, 21, 22, 30}

Aunque se considera un factor antinutricional en humanos y animales, también existen evidencias que sugieren que en humanos el ácido fítico tiene un efecto benéfico. Se ha visto implicado en el efecto de reducir colesterol en plasma y niveles de triacilgliceroles. Tal efecto puede estar relacionado con la habilidad del ácido fítico de reducir glucosa en plasma y concentraciones de insulina los cuales pueden inducir un estímulo en la síntesis de lípidos por el hígado. Puede ligar hierro, un catalizador de la oxidación de lípidos, por tanto puede reducir la formación de radicales libres. También puede interactuar en el colon reduciendo la conversión de ácidos biliares primarios en secundarios los cuales son considerados como promotores de tumores.^{22,31}

3. Inhibidores de Proteasas

Son sustancias de naturaleza proteínica ampliamente distribuidas en los alimentos de origen vegetal que interfieren inhibiendo la actividad de la proteasas y por lo tanto la asimilación adecuada de las proteínas. Un tratamiento térmico húmedo consigue desnaturalizar estas proteínas, e inactivar los inhibidores, pero hay que dosificarlo con precisión de modo que no afecte al valor nutritivo de las proteínas y más concretamente sin disminuir las disponibilidades de algunos aminoácidos indispensables.^{32,33}

10. FACTORES TÓXICOS

Formando parte de la dieta, perfectamente natural, tanto de humanos como de animales, se consumen a diario gran número de sustancias tóxicas que ofrecen estructuras tan diversas como aminoácidos, proteínas, aminas, alcaloides y glucósidos.

Es conveniente subrayar que la toxicidad viene determinada, no sólo por las propiedades químicas y biológicas del compuesto, sino también por la concentración a la que se encuentre y por el tiempo de exposición al mismo.

Aunque son muchos los alimentos vegetales que contienen sustancias tóxicas, no suelen representar un riesgo alto de intoxicación, porque estas suelen hallarse en concentraciones muy bajas.³⁴

10.1 Hemaglutininas

También conocidas como lectinas, son un grupo de glicoproteínas enterotóxicas, presentes comúnmente en las leguminosas comestibles, como en los frijoles, semilla de soya; suelen presentar la propiedad de provocar *in vitro* la aglutinación de eritrocitos de diversas especies animales. 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.^{22,24}

El daño a la mucosa intestinal puede permitir la entrada de bacterias y de sus endotoxinas al torrente sanguíneo provocando una respuesta tóxica.²²

Sin embargo, es importante mencionar que la presencia de hidratos de carbono en las lectinas, les da especificidad hacia las células lo que repercute de manera importante en su acción, pues de no ser específicas no puede 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.²⁴

Pocas lectinas o hemaglutininas de frutas han sido purificadas; la presencia y el aislamiento de lectinas de uvas todavía no ha sido reportada, excepto de la variedad de uva *Chardonnay*.³⁵

10.2 Glucósidos cianogénicos

Son relativamente numerosas las especies vegetales utilizadas como alimento que contienen glucósidos cianogénicos. Cabe citar entre ellos las semillas amargas de la almendra, las hojas verdes del sorgo y la tapioca. Se encuentran en hojas, raíces y semillas de las plantas.²² Son raros los envenenamientos causados por un consumo muy elevado de glucósidos cianogénicos, dado que la porción comestible de los vegetales antes mencionados no suele contener glucósidos. Un proceso adecuado, como el hervido, el asado, el secado al sol, la inmersión en agua o la fermentación, reduce muy marcadamente su toxicidad.³⁴

La bioquímica de los glucósidos cianogénicos es relativamente bien conocida.

Son compuestos con una parte polar (azúcar) y el aglucón que es el que tiene 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 β -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 β -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.^{21,24,36}

Las almendras de frutas (melocotón, albaricoque, ciruela, cereza) pueden dar origen a cantidades apreciables de ácido cianhídrico; los alcoholes de bebidas obtenidos por fermentación de esas frutas resultan, a veces, peligrosamente ricos en ácido cianhídrico.³³

10.3 Metales pesados

Los ejemplos de metales pesados incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb). Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre. No pueden ser degradados químicamente ni destruidos. Son peligrosos porque tienden a bioacumularse.

Contaminantes como los metales pesados tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos en plantas. Los metales pesados son potencialmente contaminantes devastadores ya que contaminan el aire, el agua y la tierra utilizados por las plantas y los demás eslabones de las cadenas tróficas. Los sustratos contaminados suelen ser producto del trabajo minero, industria de fundición y chapado, uso de fertilizantes y pesticidas. Estos metales no son sólo dañinos para las plantas, sino que se filtran en el sistema de aguas y se introducen en la cadena

trófica. En concentraciones pequeñas no suelen tener efectos, pero a medida que se va ascendiendo en la cadena la concentración se va volviendo cada vez mayor. Por ejemplo, el mercurio, producto de años de contaminación, se deposita y sedimenta en el suelo de los lagos y lentamente es convertido por bacterias en compuestos solubles de mercurio. Estos pueden introducirse en las cadenas tróficas.

Lo que hace tóxicos a los metales pesados no son en general sus características esenciales, sino las concentraciones en las que pueden presentarse, y casi más importante aun, el tipo de especie que forman en un determinado medio.^{37,38}

En la Tabla 4 se muestran los límites máximos recomendados (ppm) de algunos metales pesados para rumiantes:⁶

Tabla 4. Límites máximos recomendados (ppm) de algunos metales pesados para rumiantes.⁶

Límites máximos recomendados	ppm
Arsénico inorgánico	50
Arsénico orgánico	100
Cromo	1000
Mercurio	2
Plomo	30

1. Información de las muestras.

Las muestras son residuos que provienen de Calafia, Valle de Guadalupe, en Baja California, México, a partir de vinos y bebidas alcohólicas elaborados por la Casa Pedro Domecq a partir de *Vitis vinifera*, de las variedades tintas: *Cabernet Sauvignon*, *Rubi Cabernet* y, de las variedades blancas: *Riesling* y *Chenin Blanc*.

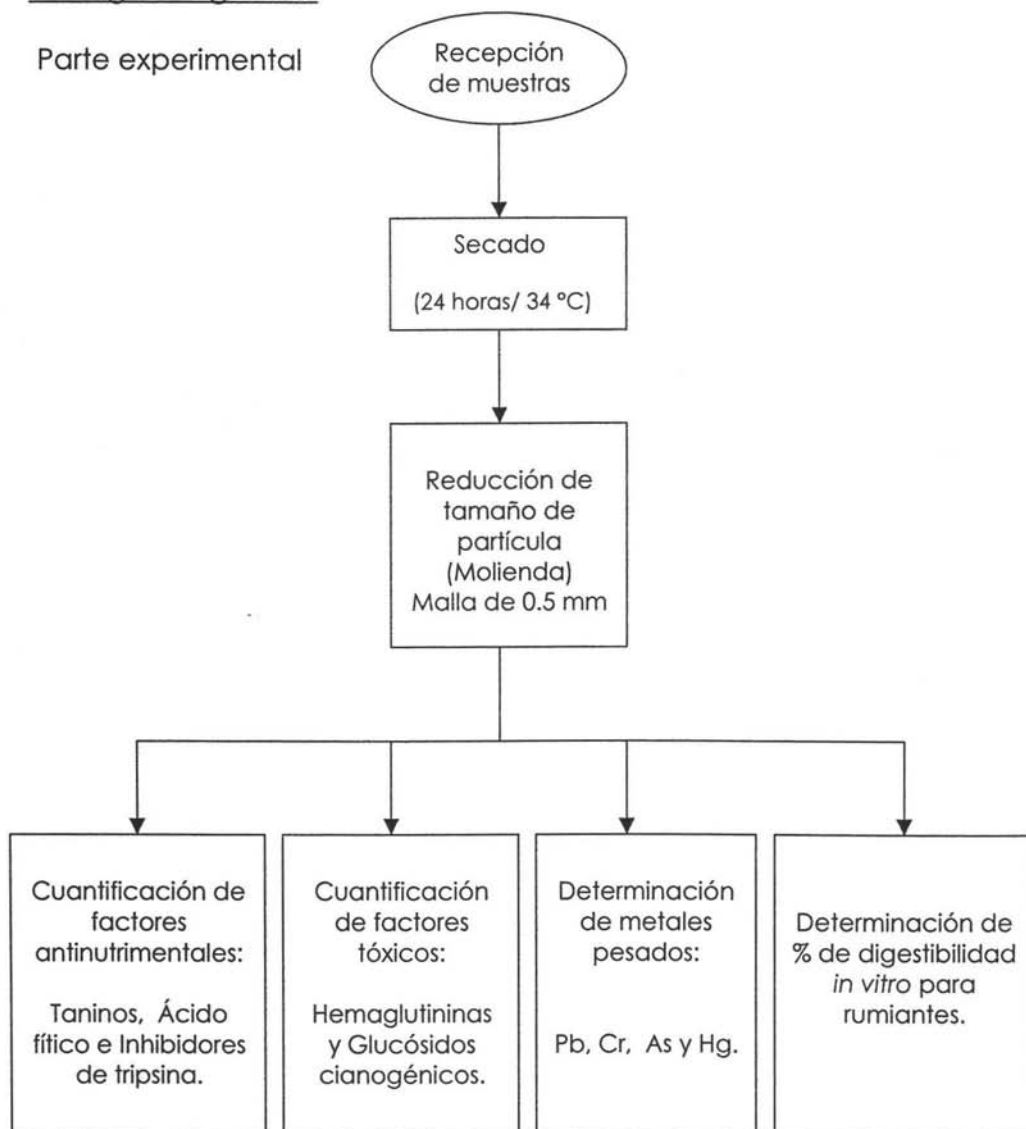
Tras la recepción las muestras secas se mantuvieron para su conservación en bolsas de papel selladas con plástico. Posteriormente se sometieron a un proceso de secado por un período de 24 horas a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$ en una estufa corriente de aire (Lab-Line Imperial III, Radiant Heat Oven Modelo 293 A) para disminuir el contenido de agua y así conservarlas, evitando la descomposición de las muestras por actividad microbiológica.

Una vez secas las muestras se procedió a una operación de reducción de tamaño de partícula mediante un molino Tomas Wiley Laboratory Hill Mod. 4, a través de una malla de 1.0 mm de diámetro y posteriormente por la de 0.5 mm. Las muestras se colocaron en botes de plástico para su conservación y posterior análisis.

METODOLOGÍA

2. Diagrama general

Parte experimental



3. Descripción de la metodología

3.1 Determinación del contenido de taninos ³⁹

Fundamento

Se basa en la extracción de taninos con dimetilformamida, seguida de una centrifugación y con la adición de citrato férrico amónico, se da lugar a la formación de un complejo colorido del cual puede obtenerse la absorbancia a una longitud de onda de 525 nm.

Material y reactivos

Parrilla con agitación magnética de 4 platos (Thermolyne Mod. SP – 13025)

Centrífuga (DYNAC)

Vasos de precipitado de 50 mL

Tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL

Magnetos

Vórtex (Lab-Line Mod. 1290 super mixer)

Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)

Pipeta automática con capacidad hasta de 10 mL

Puntas para micropipeta

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL

Tubos de ensaye (140 x 14 mm)

Matraces aforados de 25 mL

Agua desionizada

Parafilm

Solución patrón de ácido tánico de 2 g/L (Merck 773)

Solución de hidróxido de amonio 8 g/L

Solución de dimetilformamida 75%(v/v)

Solución de citrato férrico de amonio 3.5 g/L

Procedimiento

Extracción

Se colocó aproximadamente 1 g de residuo molido dentro de un vaso de precipitado y se añadieron 25 mL de solución de dimetilformamida al 75%. Se colocó el magneto y se cubrió el vaso con parafilm. Posteriormente se sometió a una agitación durante 60 minutos en una parrilla; transcurrido este tiempo se centrifugó por 10 minutos con una aceleración de 3000 r.p.m.

Preparación del blanco

Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante obtenido después de la centrifugación, se introdujo en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 6 mL de agua desionizada y 1 mL de solución de hidróxido de amonio 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; finalmente se agregó 1 mL de hidróxido 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.

Preparación de la curva patrón de ácido tánico

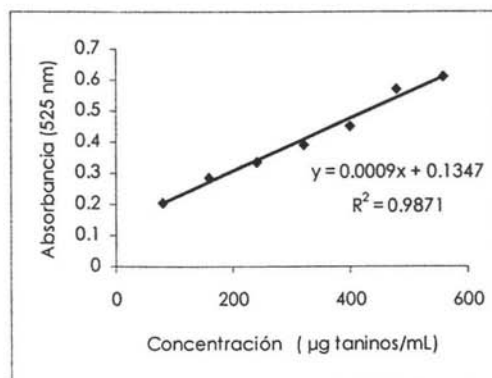
En 7 matraces aforados de 25 mL se colocaron respectivamente: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución estándar de ácido tánico y se aforó cada matraz con solución de dimetilformamida.

De cada matraz aforado se tomó 1 mL de la solución, se colocó en un tubo de ensayo, se adicionaron 5 mL de agua desionizada y 1 mL de citrato férrico amoniacal; se agitó durante unos segundos, después se agregó 1 mL de la solución de hidróxido de amonio y se agitó por unos segundos más.

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

Se construyó una curva patrón de la absorbancia (Abs) en función de la concentración (μg ácido tánico/mL) con los datos obtenidos, la cual se muestra a continuación.

FIGURA 5. Curva Patrón y ecuación de regresión para la determinación del contenido de taninos.



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

Cálculos

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

$$\% \text{ác. tánico (g/100 g muestra seca)} = \left[\left(\frac{\text{g ácido tánico}}{\text{volumen alícuota}} \times \text{volumen aforo} \right) / \text{g muestra} \right] \times 100$$

Nota: Se realizó un extracto por triplicado para cada variedad y se realizó el análisis estadístico MDS para determinar si existía una diferencia significativa del contenido de ácido tánico entre los residuos.

2. Determinación de ácido fítico ⁴⁰

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 de ácido fítico. A su vez, la determinación colorimétrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del complejo FeCl_3 -ácido sulfosalicílico (Reactivo de Wade) debido al enlace del Fe (III) con el ácido fítico.

Material y reactivos

Parrilla con agitación magnética (Thermolyne Mod. SP – 13025)

Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)

Centrífuga 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 precipitado 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 0.65 N

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 µg ácido fítico/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 realizó la determinación espectrofotométrica.

Procedimiento

Preparación de la muestra

1 g del residuo molido se colocó en un vaso de precipitado adicionándole 20 mL de HCl 0.65 N con el fin de disociar al fitato de complejos con proteínas y minerales. La solución se sometió a agitación vigorosa por 2 horas a temperatura ambiente y el extracto que se obtuvo se transfirió cuantitativamente a un tubo de centrifuga para someterse a centrifugación a 1200 r.p.m. a temperatura ambiente por 10 minutos, colectándose el sobrenadante.

Preparación de la columna de intercambio iónico

Se pesó 0.5 g de resina de intercambio iónico y se hidrató con 0.6 mL de agua desionizada.

A una jeringa se le colocó un tapón de fibra de vidrio en el fondo. Después se vertió la resina hidratada sobre la jeringa (columna); la resina quedó asentada uniformemente sobre la columna. Una vez así, se hicieron pasar 15 mL de NaCl 0.7 N y posteriormente se lavó con 60 mL de agua desionizada. (Se dejaron aproximadamente 5 cm de altura de agua por encima de la resina empacada para que ésta no se secase; una vez así quedó lista para realizar la determinación).

Purificación por columna de intercambio iónico

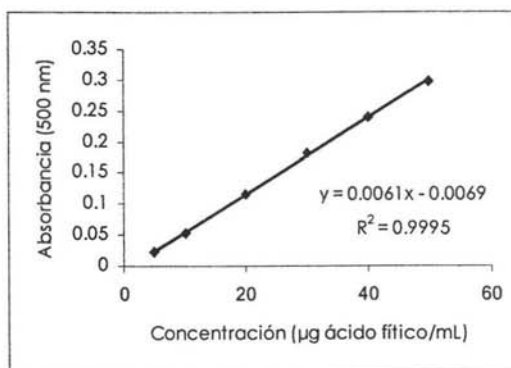
Se tomó una alícuota de 5 mL de los extractos recolectados y se diluyeron a 25 mL con agua desionizada. La alícuota se ajustó a un pH 6.0 con NaOH 1.0N. Después se tomaron 10 mL de la alícuota diluida y se transfirieron cuantitativamente a la columna preparada como se mencionó anteriormente. La columna se lavó con 15 mL de NaCl 0.1 N para 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 desde 5 hasta 50 $\mu\text{g/mL}$, esto se hizo 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 por triplicado 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 relaciona la absorbancia (Abs) y la concentración de ácido fítico para la posterior cuantificación de ácido fítico en el residuo, la cual se encuentra a continuación.

Figura 6. Curva patrón y ecuación de regresión para la determinación del contenido de ácido fítico.



Determinación espectrofotométrica

Se tomaron 3 mL de agua desionizada por triplicado que se usó como blanco, 3 mL de los estándares por triplicado y 3 mL del extracto purificado del residuo, previamente ajustados a pH 3.0. Tales cantidades se colocaron en sus respectivos tubos de ensaye y se les agregó a cada tubo 1 mL del

reactivo de Wade, agitándose en vórtex por 5 segundos leyendo la absorbancia (Abs) inmediatamente a 500 nm en el espectrofotómetro.

Cálculos

Al valor del blanco se le restó el valor de la absorbancia de la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra} = \text{Abs real (corregida)}$$

Con el resultado que se obtuvo se convirtió a concentración con la curva patrón realizada ($\mu\text{g/ml}$ vs. Abs real (corregida)), para obtener la cantidad de ácido fítico en g/mL.

La cantidad de muestra se trató de la siguiente manera:

$$\text{g muestra / mL} = (\text{g muestra/vol extracto}^1)(\text{dilución empleada}^2)(\text{factor}^3)$$

¹: volumen de HCl para la extracción 20 mL

²: dilución empleada 5mL/25mL

³: factor 10mL/15mL, alícuota que se colocó en la columna de intercambio iónico y el volumen al que se llevó con la solución de NaCl 0.7 N que lo eluyó.

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

Nota: Se realizó un extracto por triplicado para cada variedad y se realizó el análisis estadístico MDS para determinar si existía una diferencia significativa del contenido de ácido fítico entre los residuos.

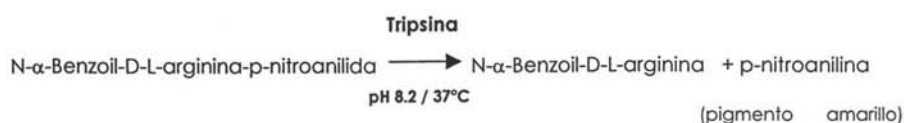
3. Determinación de inhibidores de tripsina ⁴¹

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 una 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 en 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 (Thermolyne Mod. SP-13025)

Baño de agua a 37 °C (Grant Mod. 67530)

Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)

Vórtex (Lab-Line Mod. 1290 super mixer)

Tubos de ensayo

Vasos de precipitado de 100 mL

Bureta de 50 mL

2 buretas de 25 mL

Parafilm

Magnetos

Agua desionizada

Solución de NaOH 0.01 N

Solución de ácido acético al 30%

Solución amortiguadora TRIS pH 8.2 y 0.05 M (3.025 g de hidroximetilaminometano y 1.47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 450 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.2 y se aforó a un volumen de 500 mL).

Solución BAPNA (100 mg de N- α -Benzoil-D-L-arginina-p-nitroanilida-HCl se disolvieron en 2.5 mL de dimetilsulfóxido y se diluyeron 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 molido en un vaso de precipitado y se adicionaron 45 mL de NaOH 0.01 N, posteriormente se ajustó el pH a 9.6 ± 0.2 y se aforó con NaOH 0.01 N 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 retiró 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 a un tubo de ensayo respectivamente 0, 0.6, 1.0, 1.4 y 1.8 mL del extracto obtenido y se ajustó a un volumen final de 2 mL con agua desionizada.

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 5 mL de BAPNA a 37°C a cada tubo, y se mantuvieron así por 10 minutos exactos a 37°C, finalmente se detuvo la reacción adicionando 1 mL de ácido acético y se homogeneizó.

En el caso del blanco después de agregar la solución estándar de tripsina, se le adicionó inmediatamente 1 mL de ácido acético para detener la reacción.

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

La técnica fue ensayada previamente con un extracto de soya.

Cálculos

El valor de transmitancia se convirtió 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 tuvieran UTI/ mL. A continuación se relacionó el volumen de extracto con UTI/mL con un modelo de regresión lineal.

$$\text{UTI/mg muestra} = \text{ordenada al origen} \times (\text{volumen extracto/mg muestra})$$

Nota 1: la ecuación anterior se utiliza 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 ser así, se obtiene el promedio de un cuadruplicado y se reporta el valor.

Nota 2: Se realizó un extracto por triplicado para cada variedad y se realizó el análisis estadístico MDS para determinar si existía una diferencia significativa del contenido de inhibidores de tripsina entre los residuos.

FACTORES TÓXICOS

1. Determinación de hemaglutininas (prueba semicuantitativa) ⁴²

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 (Thermolyne Mod. SP – 13025)

Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod. 340)

Centrífuga (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 1cm²

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 No. 4 (de filtración rápida)

Filtro de vidrio

Matraces aforados de 10 mL

Micropipeta múltiple (12 puntas)

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 molido suspendiéndose en 10 mL de solución salina al 1%.

La suspensión se sometió a agitación magnética 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 se filtró 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 %.

Preparación del paquete de eritrocitos

Lavado de eritrocitos

Se obtuvieron aproximadamente 50 gotas de sangre de hámster, las cuales se colocaron 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 se distribuyó en 4 tubos graduados para centrífuga 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 centrifugarse de nuevo bajo las mismas condiciones.

Esta operación se realizó tres veces.

Finalmente el paquete de eritrocitos se diluyó a una concentración de 4% de eritrocitos, agregándose 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 le agregó por cada 10 mL de solución, 1 mL de solución de pronasa al 0.2% en solución salina, colocándose en una incubadora durante 1 hora a 37°C; al término de ese tiempo la solución de eritrocitos se distribuyó nuevamente en tubos graduados para centrífuga 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 se llevó a una suspensión al 4% con solución salina al 0.9%, para lo cual se consideró que por cada 1 mL de eritrocitos se agregan 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 1 cm² de luz. (El espectrofotómetro fue ajustado a 100% de transmitancia utilizando como blanco solución salina al 0.9%). (El valor de la lectura de transmitancia

debe estar en el rango de 24-29% T). La lectura apreciada fue de 24%, considerándose adecuada para la determinación.

Microtitulación

En las placas tipo "V" se colocaron, en cada pozo de cada hilera 50 μ L de solución salina al 0.9% con una micropipeta múltiple (evitando tocar las paredes de los pozos).

Se llenó el microdilutor con 50 μ L del extracto y se procedió a realizar 12 diluciones sucesivas por triplicado para cada extracto dejándose libre de extracto una hilera en cada placa (control negativo) para adicionar con un pipetero de gota 50 μ L de la suspensión de eritrocitos sensibilizada y ajustada en todos los pozos. Las placas se rotaron en forma circular y se introdujeron en 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.

Nota: Se realizó un extracto por triplicado para cada variedad.

2. Determinación de Glucósidos cianogénicos ⁴³

Fundamento

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 el propio HCN.

Para poder cuantificar el HCN total que potencialmente puede ser liberado se hace uso de una hidrólisis enzimática (por medio de β -glucosidasa) del correspondiente glucósido cianogénico; y para poder cuantificar en forma precisa el HCN liberado, es conveniente trabajar algunos pasos a temperaturas bajas. Con éste método es posible detectar cantidades del orden de 5 μ 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 inca-Shaker Mod. 357)

Tubos de cultivo con tapón de rosca PYREX

Papel con picrato de sodio alcalinizado (se cortaron tiras iguales de 2 x10 cm de papel filtro Whatman No. 2, y se empaparon con una solución de

picrato de sodio alcalinizada, estas se dejaron escurrir y se colocaron en una estufa a secar a una temperatura de 55-60°C por 30 minutos).

Solución de β -glucosidasa (1 mg/mL) con activador (se pesaron 0.25 g de β -glucosidasa y se disolvieron con buffer de fosfatos pH 7.0 agitando suavemente; ya disuelta la enzima se adicionaron 1.7 g de nitrato de sodio el cual actúa como activador de la enzima, todo lo anterior se llevó a un volumen de 250 mL con el buffer de fosfatos pH 7.0)

Solución de KCN equivalente a 100 μ g HCN/mL

HCl 0.5 N

Buffer de fosfatos pH 7.0

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 μ 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 le adicionaron

previamente 500 mg de fécula de maíz y 5 mL de buffer pH 7.0, 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 tapón de rosca.

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

La liberación de HCN se realiza sacando de cada tubo el papel e introduciéndolo en un tubo de ensayo, posteriormente se agregan 20 mL de agua destilada y se somete cada tubo a agitación por 2 minutos; al término de tal tiempo se filtra la solución y se mide la absorbancia.

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

Esta curva patrón se presenta en un rango de 5 a 60 µg de HCN.

Preparación de la muestra

Se pesaron en tres tubos 200 mg, 300 mg y 500 mg del residuo respectivamente, por duplicado. 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 (previamente humedecida con algunas gotas de agua) en la boca del tubo y se cerraron los tubos herméticamente con 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 30 minutos. Transcurrido tal tiempo se sacaron los tubos y se les adicionó 1 mL de HCl (frío), los tubos se volvieron a cerrar y se homogeneizaron cuidando que la solución no tocara el papel 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. Aquellos tubos que no muestren ni siquiera ligera coloración café rojiza en el papel indicador, se consideran negativos, en tanto que aquellos que muestren aunque sea una tenue coloración se consideran positivos y se procede a su detección cuantitativa. Para la detección cuantitativa, se recupera el papel indicador y se coloca en un tubo de cultivo Pyrex, se le adiciona 20 mL de agua desionizada (medidos en bureta), se tapa y se agita vigorosamente con el fin de extraer el pigmento de isopurpurina del papel indicador en el agua.

Después de extraer el pigmento (2-5 minutos aproximadamente) se recupera el disolvente (agua), eliminando los residuos del papel empleando papel de filtración rápida. Se puede hacer una nueva adición de agua desionizada (20 mL) para extraer completamente el pigmento (dilución).

La solución filtrada se coloca en una fotocelda de 109 x 105 mm para su lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm; previamente ajustado a 100 %T con el blanco correspondiente.

Cálculos:

Una vez que se tiene elaborada la curva estándar en la cual se encuentra relacionado el contenido de HCN vs D.O expresado en absorbancia, se transforma el valor obtenido de %T a Abs.

$$\text{Abs} = \log (1) / (\%T/100)$$

Con el dato de absorbancia se puede interpolar o calcular de acuerdo a la ecuación de la regresión lineal el correspondiente contenido de HCN (χ).

$$(\chi \times D \times 100) / M = \text{mg HCN} / 100 \text{ g de muestra};$$

donde χ = μg de HCN, D= número de veces de adición de 20 mL de agua desionizada (dilución) y M= mg de muestra.

Nota: Se realizó la determinación por triplicado para cada variedad.

3. Determinación de metales pesados (As, Hg, Pb y Cr) por Absorción Atómica.

Los métodos fueron desarrollados en la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación ubicado en la Facultad de Química, UNAM).

Preparación de las muestras para la determinación de metales pesados.

Lavado de material de vidrio:

Material y reactivos

Vasos de precipitado de 100 mL

Vidrios de reloj

Matraces aforados de 10 mL

Matraces aforados de 25 mL

extran

extran al 5%

HNO₃ al 5%

Agua destilada

Agua desionizada

Procedimiento:

Primeramente se lavó el material con jabón no iónico extran, se enjuagó con agua de la llave y se dejó remojando toda una noche en solución de extran al 5%, al día siguiente se enjuagó con agua de la llave y después se dejó remojando una noche en solución de HNO₃ al 5%. Al día siguiente se enjugó el material con agua de la llave, agua destilada y al final con agua desionizada; por último se dejó escurrir.

Digestión de las muestras:

Material y reactivos

Baño María

Parrilla de calentamiento

Papel filtro Whatman No. 4

Embudos de filtración talle corto

H₂SO₄ 1:1 (con agua desionizada)

HNO₃ concentrado

KMnO₄ al 2%

H₂O₂ al 30%

Clorhidrato de hidroxilamina

Preparación de la muestra por digestión húmeda para Arsénico y Mercurio

Se pesaron 0.5 g de muestra en un vaso de precipitados y se adicionaron 10 mL de agua desionizada, después 10 mL de ácido sulfúrico y por último 2.5 mL de ácido nítrico, se tapó el vaso con vidrio de reloj y se colocó en baño maría aproximadamente 1 hora (hasta que se digiera la muestra). Después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se filtró empleando para ello papel filtro y posteriormente se agregaron 0.5 mL de permanganato de potasio, se agitó y se dejó reposar 15 minutos; se agregó una pizca de clorhidrato de hidroxilamina hasta que desapareciera la coloración del permanganato de potasio; finalmente se aforó a 25 mL con agua desionizada.

Se realizó un blanco para esta determinación.

Preparación de la muestra por digestión húmeda para Plomo y Cromo

Se pesaron 0.5 g de muestra en un vaso de precipitados y se adicionaron 5 mL de ácido nítrico, después 3.0 mL de H₂O₂, se tapó el vaso con vidrio de reloj y se evaporó a sequedad (hasta que quedaran aproximadamente 5 mL de muestra digerida). Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró empleando papel filtro para ello. Por último se aforó a 10 mL con agua desionizada.

Se realizó un blanco para esta determinación.

Finalmente para ambas metodologías una vez que se tuvieron las muestras digeridas se realizó la determinación y cuantificación de los metales pesados citados anteriormente en el laboratorio de absorción atómica por parte de la USAI. Los parámetros instrumentales fueron los siguientes:

	Plomo	Cromo	Mercurio	Arsénico
Longitud de onda (nm)	283.3	357.9	253.7	193.7
Slit (nm)	0.5	0.5	0.5	0.5
Método de atomización	Horno de Grafito	Horno de Grafito	Generador de Hidruros (Vapor frío)	Generador de Hidruros
Método de análisis	Curva de Calibración	Curva de Calibración	Curva de Calibración	Curva de Calibración

Equipo empleado: Varian Spectr AA220, empleando Horno de grafito acoplado GTA 110, en el caso de plomo y cromo.

Varian Spectr AA220, empleando Generador de Hidruros VGA 77, en el caso de mercurio y arsénico.

Nota: Se realizó la determinación por duplicado para cada variedad.

Determinación de la evaluación nutrimental de los residuos

1. Digestibilidad *in vitro* para rumiantes²⁰

Material y reactivos

Matraces Erlenmeyer de 25 mL

Tapones de hule acondicionados con aguja hipodérmica (Nº. 21) simulando una válvula de Bunsen.

Incubadora con agitación Lab-Line (Mod. 120)

Solución de HCl 6N

Solución de HCl 3N

MgCl₂ al 4% (m/v)

Papel filtro Whatman No. 4

Solución amortiguadora de Mc Dougall (**solución No.1**).

Solución 1: Se pesaron 3.7 g de Na₂HPO₄, 9.8 g de NaHCO₃ y se llevaron a un volumen final de 1 L con agua desionizada a 40 °C.

Solución 2: Se pesaron 4.7 g de NaCl, 5.7 g de KCl, 0.4 g de CaCl₂ y 0.6 g de 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 fue preparada el mismo día en que inició la determinación.

Solución de pepsina ácida (**solución No.2**). (Pepsina con actividad 1:10 000)

Se pesaron 0.2 g de pepsina y se disolvieron en 1 mL de HCl 6N. Esta relación es por cada matraz.

Líquido ruminal. Este se obtuvo de un rumiante fistulado. (El lugar de procedencia fue el Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo, Sede Campus Montecillo, Carretera México- Texcoco, km 36.5, Montecillo, Edo. de México).

El líquido fue transportado al laboratorio en un termo con la finalidad de que no hubiera una variación importante de la temperatura (38°C).

Procedimiento

a) Preparación de la solución amortiguadora-líquido ruminal

1. Una vez extraído el líquido ruminal se mantuvo a temperatura constante (38°C).
2. Se filtró el líquido ruminal a través de gasas.
3. Se ajustó la solución amortiguadora de Mc Dougall a pH=7.0 y se adicionó 1 mL de $MgCl_2$ por cada litro de solución amortiguadora Mc Dougall a utilizar.
4. Se tomaron 5 mL de solución amortiguadora y se mezclaron con 15 mL de líquido ruminal.
5. La solución amortiguadora-líquido ruminal se introdujo en un baño de agua a 38°C y se le burbujeó CO_2 durante 8 minutos.

b) Determinación de la digestibilidad ruminal

1. Se pesaron 0.25 g de muestra molida y se colocaron en un matraz Erlenmeyer.
2. Se adicionaron 20 mL de la solución amortiguadora-líquido ruminal a 38°C.
3. Se taparon los matraces con tapón de hule acondicionado con la aguja hipodérmica para eliminar el CO₂.
4. Se introdujeron en la incubadora a una temperatura de 38 °C bajo condiciones de oscuridad y agitación durante 48 horas.
5. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron los matraces de la incubadora y se adicionaron 5 gotas de HCl 3N a cada matraz para detener la digestión bacteriana.
6. Se adicionó a cada matraz 1 mL de la solución de pepsina ácida, agitando suavemente.
7. Se introdujeron en la incubadora a una temperatura de 38° C bajo condiciones de oscuridad durante 48 horas.
8. Se sacaron los matraces de la incubadora y su contenido se filtró por gravedad con papel filtro (previamente a peso constante).
9. Se lavó el residuo con agua destilada y dejó filtrar durante 12 horas aproximadamente.

10. Una vez transcurrido el tiempo se dejó secar el papel con el residuo digerido en estufa de vacío hasta peso constante.

CÁLCULOS

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

$$\% \text{Digestibilidad} = \frac{\text{Peso muestra} - (\text{Peso muestra digerida} - \text{Peso blanco digerido})}{\text{Peso muestra}} * 100$$

Nota: La determinación se efectuó por duplicado para cada variedad y para el blanco de la reacción. También se realizó la determinación por duplicado del heno de alfalfa como punto de comparación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FACTORES ANTINUTRIMENTALES

En la tabla 5 se muestran los resultados para los factores antinutrimientales determinados en cada uno de los residuos de las cuatro variedades de uva.

Tabla 5. Contenido de factores antinutrimientales en los residuos secos de cada variedad de uva.

Factores antinutrimientales	Variedades			
	Tintas		Blancas	
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	<i>Rubi Cabernet</i>	<i>Riesling</i>	<i>Chenin Blanc</i>
Ácido Tánico¹ g/100g muestra seca	3.65±0.01 ^c	3.19±0.10 ^b	4.54±0.05 ^d	2.05±0.05 ^a
Ácido Fítico¹ g/100g muestra seca	0.22±0.001 ^b	0.66±0.02 ^d	0.43±0.002 ^c	0.13±0.002 ^a
Inhibidores de tripsina² UTI /mg muestra seca ³	57.65±4.2 ^a	148.37±13.0 ^c	57.67± 5.7 ^a	81.2±1.6 ^b

¹ Los resultados expresan el promedio ± desviación estándar con un coeficiente de variación menor a 5% y n=3.

² Los resultados expresan el promedio ± desviación estándar con un coeficiente de variación menor a 10% y n=3.

³ UTI: Unidades de Tripsina Inhibida.

El contenido de ácido tánico presente en cada uno de los residuos de las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Rubi Cabernet* y *Riesling* sí representaría un riesgo de importancia en el consumo siendo un factor limitante para su utilización; si se considera que la dosis diaria admisible (DDA) de ácido tánico es de 500 mg/kg p.c día (valor para humanos) ⁴⁵, para una vaca que pesa aproximadamente 550 kg, sería necesaria una ingesta de residuo mayor a 7.5 kg, 8.6 kg, y 6.1 kg para las variedades anteriores, respectivamente, y efectivamente un animal como este consume más que ésta cantidad. En cuanto al residuo de la variedad *Chenin Blanc* es necesaria una ingesta mayor a 13.4 kg y no representa tanto riesgo. El valor de DDA de ácido tánico es un valor de referencia para humanos; se sabe que en animales se tiene un límite de seguridad mayor, es decir, en este caso podrían consumir más allá de este valor de DDA pero, no se sabe aún cuánto más. Por tanto, sería recomendable mezclar cada residuo por separado con algún otro producto, para reducir el efecto antinutricional de los taninos y así asegurar que no cause un daño al rumiante.

Cabe mencionar que se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples (MDS)⁴⁶ con un $\alpha = 0.05$, con el cual se puede observar en la tabla 1a (Anexo A) que el porcentaje de ácido tánico entre cada uno de los cuatro residuos presentan una diferencia significativa. La variedad influye en el contenido de ácido tánico.

El residuo de la variedad *Riesling* presenta un mayor contenido de taninos que el de la variedad *Chenin Blanc* (ambas variedades blancas); esto puede ser resultado de múltiples factores, como los condicionantes del desarrollo de estas, que aunque provengan del mismo lugar, existen variaciones importantes como lo son los cuidados que se tengan con la planta sobre alguna enfermedad, variabilidad genética, etc. Aunado a lo anterior es posible que el tiempo del proceso de estrujado para la segunda variedad fuera mayor, es decir los taninos están presentes en mayor cantidad en el mosto y no en el orujo a comparación de la primera variedad. Por tanto no implica que al ser los residuos provenientes de variedades de uva blanca presenten valores iguales de taninos.

El residuo de la variedad *Riesling* presenta un mayor contenido de taninos que los residuos de las variedades de uvas tintas, esto puede deberse a que éstos últimos fueron agotados en lo posible de taninos al momento del estrujado, es decir, ahora estos taninos están presentes en el vino tinto que es lo que se busca para un vino de esta naturaleza.

Cabe mencionar que existe una gran diversidad estructural de taninos, por tanto a esto también pueden deberse las diferencias del contenido de ácido tánico ya que también el método utilizado para la determinación no hace diferencia entre los diversos polifenoles existentes en la naturaleza.

En lo referente al ácido fítico, se sabe que éste forma complejos con proteínas y con cationes divalentes principalmente, provocando una

disminución en su absorción o biodisponibilidad, y que los alimentos con un contenido mayor a 400 mg/100 g muestra se consideran desmineralizantes⁴⁵ (valor para humanos), por tanto, los residuos de las variedades *Rubi Cabernet* y *Riesling*, así se consideran. Lo anterior implica que éste sea un factor limitante para su utilización, aunado a que es un compuesto termoestable lo que hace difícil la destoxificación de los residuos.

Por otra parte los residuos de las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Chenin Blanc* no representan riesgo alguno ya que no rebasan el valor límite y el residuo de la variedad *Riesling* no presenta tanto riesgo. Cabe mencionar que el valor de 400 mg/100 g de muestra, con el que se está comparando es un valor de referencia para humanos; se sabe que los animales son menos sensibles, pero aún no se sabe en cuánto más. Por ello se recomienda realizar una determinación de minerales y proteína presentes en cada uno de los residuos para que en su caso, se suplemente con estos o se realice una mezcla de cada uno de los residuos con algún producto y que esta finalmente resulte con valor proteínico y mineral adecuado para prevenir una deficiencia de esta naturaleza en el rumiante.

El análisis estadístico de comparaciones múltiples (MDS) con un $\alpha = 0.05$, que se presenta en la tabla 2b (Anexo A), muestra que el porcentaje de ácido fítico entre cada uno de los cuatro residuos presenta una diferencia significativa. La variedad influye en el contenido de ácido fítico.

Esto puede deberse a diversas razones como lo son los cuidados que se tengan con la planta sobre alguna enfermedad o la variabilidad genética mencionadas anteriormente.

En lo referente a los inhibidores de Tripsina, los cuatro residuos presentan una cantidad mayor a 10 UTI/ mg muestra seca (valor límite para humanos).

Por tanto, es recomendable mezclar cada residuo por separado con algún otro producto que resulte de un valor proteínico adecuado.

De acuerdo al análisis estadístico de comparaciones múltiples (MDS) con un $\alpha = 0.05$ que se presenta en la tabla 3c (Anexo A), existe diferencia entre todos y cada uno de los residuos de las variedades, excepto en *Cabernet Sauvignon* y *Riesling* (variedad roja y variedad blanca, respectivamente) que presentan el mismo contenido de inhibidores de tripsina. La variedad influye en el contenido de Inhibidores de tripsina.

FACTORES TÓXICOS

Tabla 7. Contenido de factores tóxicos en los residuos secos de cada variedad de uva.

Factores tóxicos	Variedades			
	Tintas		Blancas	
	Cabernet Sauvignon	Rubi Cabernet	Riesling	Chenin Blanc
Hemaglutininas Título de aglutinación ^a	7	8	9	8
Glucósidos Cianogénicos Detección cualitativa ^b	negativo	negativo	negativo	negativo

^a Título: máxima dilución en la que se presentó aglutinación en eritrocitos de hámster.

^b Muestras que no presentaron coloración en el papel indicador.

En cuanto a las hemaglutininas Tabla 7, un título mayor a 10 sí representa un riesgo, por tanto los residuos en estudio no representan un riesgo para su consumo. Y dado a la naturaleza proteínica de las lectinas cabría la posibilidad, en caso de que los residuos hubieran presentado un valor mayor de hemaglutininas, de asegurar una disminución de su efecto empleando métodos de calentamiento como el secado o cocción, cuidando la relación de tiempo-temperatura para estos residuos aún no determinada. No se detectaron glucósidos cianogénicos en los residuos de las cuatro variedades en estudio. Por tanto los residuos no presentan riesgo para su consumo.

METALES PESADOS

En la Tabla 8 se presentan los resultados de metales pesados determinados en los residuos secos de cada variedad de uva.

Tabla 8. Metales pesados en los residuos secos de cada variedad de uva.

Metales pesados (ppm)	Variedades			
	Tintas		Blancas	
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	<i>Rubi Cabernet</i>	<i>Riesling</i>	<i>Chenin Blanc</i>
Pb	0.8	ND	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	ND
Hg	ND	ND	ND	ND
As	3.7	3.2	3.8	3.8

ND: No Detectado.

El residuo de la variedad *Cabernet Sauvignon* sólo contiene plomo y arsénico. Los residuos de las cuatro variedades en estudio presentan arsénico y en los residuos de las cuatro variedades en estudio no se detectó la presencia de cromo ni de mercurio. Los metales presentes determinados en los residuos de las cuatro variedades de uva no

representan un riesgo para el consumo por parte de rumiantes ya que se detectó una cantidad inferior al límite máximo recomendado de metales tóxicos (ver tabla 4).

Los metales pesados determinados en los residuos de las cuatro variedades de uva provienen de la corteza terrestre (son componentes naturales), por tanto, el medio ambiente (agua, aire y suelo,...) que nos rodea incorpora invariablemente metales en mayor o menor cantidad, bien de manera natural pero también por efecto de la contaminación.

Así, los metales detectados pueden ser atribuidos a fuentes naturales (transferencia desde el suelo vía las raíces hacia la uva y finalmente al vino) y a la contaminación durante el proceso de vinificación. Los suelos de los viñedos pueden ser fuente potencial de plomo y cadmio por ejemplo. Además, durante la recolección, transporte, manipulación los metales están presentes en herramientas y utensilios.

PORCENTAJE DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* PARA RUMIANTES.

En la Tabla 9 se expresan los resultados de porcentaje de digestibilidad *in vitro* para rumiantes de los residuos secos de cada variedad de uva.

Tabla 9. Porcentaje de digestibilidad *in vitro* para rumiantes de los residuos secos de cada variedad de uva y del heno de alfalfa como punto de comparación.

Determinación	Variedades				Alfalfa
	Tintas		Blancas		
	Cabernet Sauvignon	Rubi Cabernet	Riesling	Chenin Blanc	
Digestibilidad ^a	43.7%	33.8%	37.0%	50.8%	72.8%

^a Los resultados expresan el promedio de un duplicado.

Entre los residuos de las variedades tintas, *Cabernet Sauvignon* presenta una digestibilidad mayor que *Rubi Cabernet* y entre los residuos de las variedades blancas *Chenin Blanc* presenta una mayor digestibilidad que *Riesling*.

Los residuos de la variedad *Chenin Blanc* son los que presentan el mayor porcentaje de digestibilidad. Es decir la digestibilidad aumenta en el orden: *Rubi Cabernet*<*Riesling*<*Cabernet Sauvignon*<*Chenin Blanc*. Por tanto, la variedad de uva no está implicada con la digestibilidad del residuo.

Como punto de comparación se realizó también la determinación de la digestibilidad del heno de alfalfa. La alfalfa (*Medicago sativa*), es considerada como uno de los principales forrajes para rumiantes; su composición es equilibrada (8% de pectinas, 10% de hemicelulosa, 25% de celulosa y un 7% de lignina), por ello asegura un rápido tránsito digestivo, un aporte significativo de fibra soluble y una alta capacidad tampón. Esto aunado a su elevada palatabilidad, hace de la alfalfa un ingrediente de elección para piensos de vacas de alta producción.

Para la alfalfa se encuentra reportado un valor de 44.5%-76.0%⁶ de digestibilidad para animales rumiantes. El valor que se obtuvo en el laboratorio fue de 72.8% de digestibilidad, encontrándose dentro de este intervalo. Por tanto si comparamos los porcentajes de digestibilidad de los residuos de las variedades en estudio se observa que son menores al de la alfalfa. Lo anterior puede deberse a una mayor cantidad de material lignificado lo que limita su aprovechamiento, demeritando su valor nutritivo¹⁴, o a el grado de madurez en el que se cultiva la uva (vendimia).

Si comparamos los resultados de los residuos en estudio con los valores de digestibilidad de granos enteros de cebada, centeno, maíz, trigo (84.0%, 84.0%, 91.9% y 88%⁶ respectivamente), la digestibilidad es menor para los cuatro residuos.

Por tanto se podrían emplear los residuos como parte de una mezcla con estos granos enteros, con la cual se tenga un mayor porcentaje de digestibilidad.

Cabe mencionar que el mismo alimento presentará diferente grado de digestión, por ejemplo para ganado vacuno se tiene reportado un valor de 61% de digestibilidad para el heno de alfalfa y en cabras del 59%, debiéndose a diversos factores, entre ellos a la diferencia en el nivel de consumo del alimento, los trastornos digestivos, la frecuencia de la alimentación, las deficiencias de nutrimentos, entre otros.¹⁸

CONCLUSIONES

- ✓ El residuo de la variedad *Riesling* es el que presenta el mayor contenido de taninos.
- ✓ Los residuos de las variedades *Riesling* y *Rubi Cabernet* rebasan el límite permisible de ácido fítico.
- ✓ Los residuos de las variedades *Cabernet Sauvignon* y *Chenin Blanc* presentan un valor de ácido fítico menor al valor límite permisible.
- ✓ Los cuatro residuos presentan una cantidad mayor a 10 Unidades de Tripsina Inhibida por mg de muestra seca.
- ✓ Los residuos de las variedades en estudio no presentan riesgo en cuanto al contenido de hemaglutininas.
- ✓ Los residuos de las variedades en estudio no presentan riesgo en cuanto al contenido de glucósidos cianogénicos.
- ✓ Los cuatro residuos presentan baja digestibilidad comparada a la de la alfalfa.
- ✓ El residuo de la variedad *Chenin Blanc* es el que presenta una mayor digestibilidad.
- ✓ Los residuos de las variedades en estudio no presentan riesgo en cuanto al contenido de metales pesados.

- ✓ Los residuos se pueden emplear por separado formando parte como ingredientes (mezcla con granos enteros por ejemplo) en alguna dieta para rumiantes, tras comprobar que esta reúna características o un perfil nutricional adecuado (minerales, proteína, digestibilidad, entre otros,) para una adecuada nutrición.

PERSPECTIVAS

La información obtenida en este trabajo debe complementarse con los resultados de composición proximal y ácidos grasos que se realizan como parte complementaria de la calidad nutricional de estos residuos.

ANEXO A

A continuación se presentan las tablas ANOVA (Análisis de Varianza) empleadas para determinar si existía variación en cuanto al contenido de ácido tánico (tabla 1), de ácido fítico (tabla 2) y de Inhibidores de tripsina (tabla 3) entre los residuos de las variedades en estudio, respectivamente. Y en las tablas (1a), (2b) y (3c) se muestran las comparaciones múltiples (MDS)⁴⁶ con un $\alpha = 0.05$ para en el caso de existir una variación, determinar entre qué residuos se presentaba y entre cuales no para cada una de las determinaciones.

Ácido Tánico

Hipótesis:

$$H_0: \sigma^2_1 = 0 \text{ vs. } H_a: \sigma^2_1 \neq 0$$

H_0 : La variedad de la uva no tiene efecto en el contenido de ácido tánico.

H_a : La variedad de la uva influye en el contenido de ácido tánico.

Tabla 5. ANOVA para el % de Ácido Tánico.

F.V	S.C	G.L	M.C	Fo
Entre variedades	9.73	3	3.24	648*
Dentro de cada variedad	0.04	8	0.005	
Total	9.77	11		

Donde F.V: Fuente de variación, S.C: Suma de cuadrados, G.L: grados de libertad, M.C: Media de Cuadrados.

Conclusión:

$F_o > F_{tablas}$, por tanto se rechaza H_0 ; sí existe una variación significativa en el contenido de ácido tánico entre los residuos de las diferentes variedades.

Tabla (5a). Comparaciones múltiples (MDS).

Comparaciones		Valor absoluto	Estimador estadístico ($T_{0.025,8} = 2.306$)
CS vs. RC	3.653 - 3.196 =	0.457*	LSD = 0.133
CS vs. R	3.653 - 4.546 =	0.893*	
CS vs. CB	3.653 - 6.173 =	2.520*	
RC vs. R	3.196 - 4.546 =	1.350*	
RC vs. CB	3.196 - 6.173 =	2.977*	
R vs. CB	4.546 - 6.173 =	1.627*	

CS: residuos de la variedad *Cabernet Sauvignon*, RC: residuos de la variedad *Rubi Cabernet*, R: residuos de la variedad *Riesling* y CB: residuos de la variedad *Chenin Blanc*.

* Valores que presentan diferencia significativa.

De acuerdo a las comparaciones múltiples, existe diferencia entre todos y cada uno de los residuos de las variedades. La variedad influye en el contenido de ácido tánico.

Ácido Fítico

Hipótesis:

$H_0: \sigma^2_1 = 0$ vs. $H_a: \sigma^2_1 \neq 0$

H_0 : La variedad de la uva no tiene efecto en el contenido de ácido fítico.

H_a : La variedad de la uva influye en el contenido de ácido fítico.

Tabla 2. ANOVA para el % de Ácido Fítico.

F.V	S.C	G.L	M.C	Fo
Entre variedades	0.513	3	0.171	1368*
Dentro de cada variedad	0.001	8	0.000125	
Total	0.514	11		

Donde F.V: Fuente de variación, S.C: Suma de cuadrados, G.L: grados de libertad, M.C: Media de Cuadrados.

Conclusión:

$F_o > F_{tablas}$, por tanto se rechaza H_0 ; sí existe una variación significativa en el contenido de ácido fítico entre los residuos de las diferentes variedades.

Tabla (2b). Comparaciones múltiples (MDS).

Comparaciones		Valor absoluto	Estimador estadístico ($T_{0.025,8} = 2.306$)
CS vs RC	0.224 - 0.667 =	0.443*	LSD = 0.021
CS vs R	0.224 - 0.430 =	0.206*	
CS vs CB	0.224 - 0.132 =	0.092*	
RC vs R	0.667 - 0.430 =	0.237*	
RC vs CB	0.667 - 0.132 =	0.535*	
R vs CB	0.430 - 0.132 =	0.298*	

CS: residuos de la variedad *Cabernet Sauvignon*, RC: residuos de la variedad *Rubi Cabernet*, R: residuos de la variedad *Riesling* y CB: residuos de la variedad *Chenin Blanc*.

* Valores que presentan diferencia significativa.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

De acuerdo a las comparaciones múltiples, existe diferencia entre todos y cada uno de los residuos de las variedades. La variedad influye en el contenido de ácido fítico.

Inhibidores de Tripsina

Hipótesis:

$H_0: \sigma^2_1 = 0$ vs. $H_a: \sigma^2_1 \neq 0$

H_0 : La variedad de la uva no tiene efecto en el contenido de Inhibidores de tripsina.

H_a : La variedad de la uva influye en el contenido de Inhibidores de tripsina.

Tabla 3. ANOVA para Inhibidores de Tripsina.

F.V	S.C	G.L	M.C	Fo
Entre variedades	22076.0225	3	7358.674	131.6*
Dentro de cada variedad	670.97	12	55.91	
Total	22746.997	15		

Donde F.V: Fuente de variación, S.C: Suma de cuadrados, G.L: grados de libertad, M.C: Media de Cuadrados.

Conclusión:

$F_o > F_{tablas}$, por tanto se rechaza H_0 ; sí existe una variación significativa en el contenido de Inhibidores de tripsina entre los residuos de las diferentes variedades.

Tabla (3c). Comparaciones múltiples (MDS).

Comparaciones		Valor absoluto	Estimador estadístico ($T_{0.025,12} = 2.179$)
CS vs RC	57.65 - 148.37 =	90.720*	LSD = 11.520
CS vs R	57.65 - 57.67 =	0.020	
CS vs CB	57.65 - 81.25 =	23.60*	
RC vs R	148.37 - 57.67 =	90.70*	
RC vs CB	148.37 - 81.25 =	67.120*	
R vs CB	57.67 - 81.25 =	23.580*	

CS: residuos de la variedad *Cabernet Sauvignon*, RC: residuos de la variedad *Rubi Cabernet*, R: residuos de la variedad *Riesling* y CB: residuos de la variedad *Chenin Blanc*.

* Valores que presentan diferencia significativa.

De acuerdo a las comparaciones múltiples, existe diferencia entre todos y cada uno de los residuos de las variedades, excepto en *Cabernet Sauvignon* y *Riesling*. La variedad influye en el contenido de Inhibidores de tripsina. *Cabernet Sauvignon* y *Riesling* tienen la misma cantidad de Inhibidores de tripsina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mijares y G.P., Ma. I. El vino, de la cepa a la copa. Mundi Prensa:Zaragoza, España, 1998, 23, 47-48.
2. Madrid V.A., Madrid, C.J., Madrid, C.A. Tecnología y Legislación del vino y bebidas derivadas. Mundi Prensa:Zaragoza, España, 1994), 13-15.
3. Aleixandre, B.J.L., Enología. Servicio de Publicaciones:Zaragoza, España. 1996, 16-18.
4. Ibar, L. Manual práctico de enología moderna. De Vecchi:Barcelona, España, 1985, 9-10.
5. Macías, H. Manual práctico de viticultura. Trillas: México, 1993, 9, 44-46, 81-82.
6. <http://www.etsia.upm.es/fedna/publi.htm>
7. Reynoso, J. Viticultura, enología y algo más... Mc Graw Hill: México, 1996), 35- 45.
8. http://www.gob.mx/wb2/egobierno/egob_Avance_mensual_comparativo_de_productos_peren.
9. Hidalgo, L. Tratado de Viticultura general. Mundi Prensa:Madrid, España. 1993, 790-798.
10. 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., N.Y., (1995), 28.
11. [http://www .enoforum.com](http://www.enoforum.com)
12. <http://www .oiv.int>
13. Maynard, L.A. Animal Nutrition. McGraw-Hill New York, 1990, 4-5, 19.

-
- 14.Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán, M.J., Esqueda, M. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002: 2537-2542.
- 15.López, J., De Coca Sinova, P. y Paunero, A. La utilización de los residuos de la industria vitivinícola en Castilla y León. Secretariado de publicaciones: Valladolid, España, 1994, 7,15-20, 31.
- 16.Velázquez, P. Efecto del tratamiento térmico y paletizado sobre la composición química y digestibilidad de los residuos orgánicos en la alimentación de cerdos. Tesis. Licenciatura, Química, UNAM, México, D.F. (1998), 2-3, 36, 66.
- 17.González, C.J. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Mundi-Prensa: Zaragoza, España, 1990, 29-35.
- 18.Church, D.C. Fundamentos de Nutrición y alimentación de animales. Noriega Limusa:México, 1990, 13, 31-47.
- 19.Jarrige, R. Alimentación de rumiantes. Mundi-Prensa: Madrid, 1981, 25-29.
- 20.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.,1985, 272-281.
- 21.Partearroyo, M.A., Fernandez-Quintela A. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. *Alimentaria* 1995:115-119.

-
22. Shahidi, F. Antinutrients and Phytochemicals in Food. American Chemical Society :Washington, DC, 1997, 1-7, 31-53, 171-173.
23. Naczek, M., Nichols, T., Pink, D., Sosulski, F. Condensed tannins in canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994: 2196-2200.
24. Lindner, E. Toxicología de los alimentos. Acribia: Zaragoza, España, 1995, 5- 17.
25. Torres, J.L. Valorization of grape byproducts. Antioxidant and biological properties of Polyphenolic fractions differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002: 7548-7555.
26. Chidambaram, M., K.N. Antioxidant activities of grape pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002: 5909-5914.
27. Yinrong_Lu. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry* 1999: 1-8.
28. Pastrana B.E., C. Akoh, Casimir. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003: 5497-5503.
29. Carron M.A., García A. A. Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1997: 328-332.
30. Khokhar, S. Phytate Content of Indian Foods and Intakes by Vegetarian Indians of Hisar Region Haryana State. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994: 2440-2444.
31. Feil, B. Phytic acid. *Journal of New Seeds*, 2001: 1-35.

-
- 32.Sotelo, A. Constituents of wild food plants In: *Functionality of Food Phytochemicals*. Plenum Press:New York,1997, 89-111.
- 33.Cheftel, J-C. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia:Zaragoza, España. 1992,150-155.
- 34.Wong, D. Mecanismos y Teoría . Química de los Alimentos. Acribia:Zaragoza, España, 1995, 317-319.
- 35.Laurent B, Marchal, R. Isolation of isolectins from *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999:2193-2197.
- 36.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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000: 2149-2152.
- 37.<http://www.lenntech.com/espanol/metales%20pesados.htm>
- 38.http://www.eco-sitio.com.ar/metales_pesados.htm
- 39.Norma ISO-9648. International for Standarization Organization. Sorghum. Determination of tannin content (ISO 9648),1988.
- 40.Frühbeck, G., Alonso, R., Marzo, F., Santillan, S. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Anal Biochem*, 1995:206-211.
- 41.Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E., Puski, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of on improved procedure. *Cereal Chemistry*, 1974: 376-382.

-
42. Jaffe, W.G., Levy, A., Gonzalez, D.I. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem*, 1974: 2685-2693.
43. Lucas, B., Sotelo, A. A simplified test for the quantification of cyanogenic glucosides in wildland cultivated seeds. *Nutr. Rep. Int*, 1984: 711-719.
44. Derache, R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Omega: Zaragoza, España, 1990, 111-121.
45. Kuehl, R.O. Diseño de experimentos y análisis de investigación. Thomson Learning: Arizona, 2001, 73-107.
46. López, E.M. Determinación de factores tóxicos en varias almendras no tradicionales con potencial aporte de proteína y grasa dietética (Tesis. Licenciatura, Química, UNAM. México, D.F., 2000), 34-39, 73, 77.
47. <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt/ioz/texto/sorgogramifero.htm>
48. <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/ztindice.htm>