



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**Manzana Golden (*Malus sp.*): Estudio para
Evaluar el Uso Alternativo de Residuos
como Fuente de Compuestos Bioactivos**

TESIS

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

PRESENTA

MARTÍNEZ ORTEGA MIGUEL ÁNGEL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS.
Vocal	Prof. MARIA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ.
Secretario	Prof. LUIS ORLANDO ABRAJAN VILLASEÑOR.
1er suplente	Prof. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE.
2do suplente	Prof. MARÍA TERESA PLATA JIMÉNEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. 323, CONJUNTO E

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

M.C. María de los Ángeles Valdivia López.

Asesor del tema

Miguel Ángel Martínez Ortega.

Sustentante

*Para
María,
Miguel
Martínez,
Lorena
y Lidia*

¿Cuánta verdad puede un espíritu soportar, a cuánta verdad se atreve? Cada vez más ésa se volvió para mí la auténtica medida del valor. El error... no es ceguera, el error es cobardía. Cada logro, cada paso hacia delante en conocimiento, proviene del coraje, de la dureza con uno mismo, de la limpieza en relación a sí mismo.

Friedrich Nietzsche

Agradecimientos

Muchas gracias a mi asesora, María de los Ángeles, que hace poco más de un año me brindó la oportunidad y confianza de realizar este trabajo que llegó a convertirse en toda una Odisea, siendo esta travesía realmente fascinante, hasta que el viaje debió de tener alguna culminación.

A la maestra Julieta Sandoval por su apoyo, entusiasmo y los buenos detalles, que siempre procuro para situarnos en el laboratorio como si fuera nuestra otra casa.

Muchas gracias al profesor Luis Orlando y a la maestra Fanny por el tiempo dedicado a la revisión de este libro y que en su momento colaboraron con una buena dosis de estrés, pero que fue realmente estimulante.

Muchas gracias al Dr. Jesús Torres por las facilidades que tuvo para el préstamo del equipo de extracción y a los compañeros del laboratorio de Ingeniería Química que nos asistieron .

A mis compañeros del laboratorio: Luis B., Luis H., Claudia, Brenda, Vianey, Bárbara, Grissel, Nayeli, Fabian, J. Paola, Daniela, Erica que me permitieron conocerlos entre sustanciales charlas entre matraces y tubos de ensaye; a César Hernández, auténtico cómplice del viaje y si he olvidado a alguien, ruego que me perdone.

A Alejandra Pérez por convertirse en mi amiga y a Luis Armando Reyes por convertirse en mi hermano.

Gracias...

*Miguel
Ángel
Martínez
Ortega.*

<u>ÍNDICE</u>	Página
Prólogo	6
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Objetivo General	10
1.2. Objetivos Particulares	10
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1. Nutraceuticos. Panorama General y Tendencias	11
2.2. Sustancias Bioactivas en los alimentos. Fitoquímicos	12
2.3. Efectos causados por radicales libres en sistemas Alimenticios	14
2.4. Extracción de Nutraceuticos derivados de vegetales	17
2.5. Antioxidantes Fitoquímicos	18
2.5.1. Carotenoides	23
2.5.2. Compuestos Polifenólicos	25
2.5.2.1. Ácidos fenólicos	26
2.5.2.2. Flavonoides	27
2.5.2.3. Flavonoles	29
2.6. Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos	30
2.6.1. Métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante	30
2.6.1.1 Sistema modelo del ácido linoleico - β -caroteno (β -CLAMS)	33
2.6.1.2. Método del radical ABTS ⁺	33
2.6.1.3. Método del radical DPPH ^o	34
2.7. Subproductos agro-industriales como fuente de antioxidantes	34
2.7.1. Residuo Industrial de la Producción de Jugo de Manzana como fuente de compuestos fenólicos	37
2.7.2. Antioxidantes Naturales en Alimentos	39
Capítulo 3. Desarrollo Experimental	
3.1. Diagrama General de Trabajo	42
3.2. Diagrama para la Obtención de los Extractos Fitoquímicos	43
3.3. Diagrama para Evaluación de la Oxidación lipídica en Harina de Chía	45
3.4. Reactivos	46

3.4.1. <i>Materia Prima</i>	46
3.4.2. <i>Reactivos</i>	46
3.5. Equipo	48
3.6. Metodología	50
3.6.1. <i>Extracción sólido- líquido con agitación a temperatura ambiente, (método A)</i>	50
3.6.2. <i>Extracción sólido- líquido PIGNAT, tipo Soxhlet, (método B)</i>	50
3.6.3. <i>Extracción sólido- líquido PIGNAT, tipo Soxhlet, (método C)</i>	51
3.6.4. <i>Hidrólisis Química</i>	52
3.6.5. <i>Extracción de aglicones</i>	52
3.6.6. <i>Cuantificación de Fenoles Totales</i>	52
3.6.7. <i>Cuantificación de Flavonoles y Flavonoides</i>	53
3.6.8. <i>Identificación y cuantificación por HPLC</i>	53
3.6.9. <i>Actividad Secuestrante del Radical DPPH°</i>	54
3.6.10. <i>Actividad Secuestrante del Radical ABTS⁺</i>	55
3.6.11. <i>Sistema modelo de β-caroteno/ácido linoleico (β-CLAMS)</i>	56
3.6.12. <i>Aspersión del EF (Extracto fitoquímico) sobre harina de Chía (Prueba de Shaal Oven)</i>	56
3.6.13. <i>Extracción del aceite de Chía</i>	57
3.6.14. <i>Micrométodo para la Evaluación de Peróxidos</i>	57
3.6.15. <i>Método para la Evaluación de Productos Secundarios de Oxidación. Índice de Kreis</i>	57
Capítulo 4. Resultados y Discusión.	
4.1. <i>Obtención del extracto Crudo Etanólico por los métodos A, B y C</i>	58
4.2. <i>Efecto del Secado</i>	60
4.3. <i>Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Métodos B y C)</i>	61
4.4. <i>Contenido Fenólico: Cuantificación de Flavonoides y Flavonoles</i>	62
4.5. <i>Identificación y Cuantificación por HPLC de los extractos hidrolizados</i>	67
4.6. <i>Caracterización de los extractos fenólicos</i>	73
4.7. <i>Actividad secuestrante del radical DPPH°</i>	74
4.8. <i>Actividad Secuestrante del radical ABTS⁺</i>	77
4.9. <i>Actividad Antioxidante del sistema modelo beta caroteno/acido linoleico</i>	79
4.10. <i>Evaluación de la Oxidación Lipídica en Harina de Chía</i>	81
Capítulo 5. Conclusiones	87
Capítulo 6. Bibliografía	90
6.1. <i>Apéndice 1</i>	97
6.2. <i>Apéndice 2</i>	98

Prólogo

Exhaustivas evidencias indican que el estrés oxidativo puede conducir al daño celular y tisular (Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W., Kleinjans, J. C. S., 2005; Balz, F., Lotito, S. B., 2004; Pérez, Trueba, G., 2003; Cadenas, E., Packer, L., 2002); ya que los radicales libres que son generados durante el estrés oxidativo e incluso durante el metabolismo normal, pueden provocar enfermedades e incluso la muerte; sin embargo, se ha demostrado que la dieta que contiene un alto contenido de fitoquímicos, pueden proveer de protección contra varias enfermedades, lo que ha provocado que el mercado de compuestos nutraceuticos este aumentando considerablemente. Actualmente, el entorno económico mundial favorece el intercambio de productos alimenticios entre los países, con una tendencia hacia los alimentos lo menos adicionados “químicamente” para su producción y conservación (Ortiz, A., Mora, R., Santiago, T., Dorantes, L., 2003). A su vez, los consumidores actuales demandan cada vez con mayor frecuencia alimentos de alta calidad que sean frescos (sin aditivos “químicos”) y nutritivos, por lo que se hace indispensable y todo un reto para la industria el cumplir estas demandas (Singh, R. P., 2001).

En alimentos, el deterioro oxidativo más significativo, es en aquellos que contienen en su composición ácidos grasos insaturados, los cuales por acción de los radicales libres, causan el decremento de la calidad química, nutricional, sensorial y adicionalmente representan un riesgo a la salud por la presencia de especies radicales altamente reactivas. Por estas razones, la adición de antioxidantes es requerida para conservar las características de sabor, color y la calidad nutrimental de los alimentos.

Muchos productos naturales que poseen alta actividad antioxidante son ampliamente utilizados como aditivos en alimentos como: el beta-caroteno, el ácido rosmarínico, tocoferoles, ácido ascórbico, entre otros. De acuerdo a esto, la identificación de antioxidantes naturales con características de inocuidad, bajo costo, adecuada incorporación y estabilidad térmica y química, es esencial para un mejor uso comercial de aditivos antioxidantes.

Actualmente se desarrolla investigación sobre muchos fitoquímicos que han sido hallados en frutas, vegetales, especias y plantas medicinales tradicionales, los cuales exhiben un amplio rango de efectos fisiológicos (Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2005; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C., 2001; Hollman, P. C. H., Katan, M. B., 1999) para satisfacer la creciente demanda de aditivos naturales y siendo esto la causa, la

industria se ha enfocado a los subproductos y residuos generados por las industrias agro-alimentarias, con el fin de incrementar un valor adicional a sus residuos, que por sus altos volúmenes de producción, alto potencial antioxidante confirmado, además de proporcionar algún efecto fisiológico, resultan atractivos para su explotación, Ej. Manzana, tomate, mango, nopal, cebolla, espinaca, etc., (Peschel, W., Sánchez Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R.; Buxaderas, S.; Codina, C., 2005; Balasundram, N., *et al.*, 2005; Shieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R., 2001; Moure, A., *et al.*, 2001).

Dentro de los residuos generados a una escala mayor en el ámbito mundial, esta el bagazo de manzana y numerosos estudios en la última década proponen su utilización sustentada en la obtención de compuestos bioactivos que den valor agregado y reemplazar su explotación más extendida como forraje y fertilizante.

Lo anterior motivó, que en este estudio se planteó como propuesta el conocer sí el bagazo de manzana cultivada en México, representa una fuente atractiva de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante. El presente trabajo pretende contribuir a difundir la importancia de fortalecer y mantener una visión de aprovechamiento integral de los residuos o subproductos de la industria agro-alimentaria, sobre todo aquella que procesa la manzana para la elaboración de jugos.

Capítulo 1. Introducción

1.1. Objetivo General

Evaluar la potencialidad de un residuo industrial de manzana mexicana, var. *Golden sp.*, como fuente de compuestos bioactivos, para su eventual uso como aditivo.

1.2. Objetivos particulares

- I. Establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción, que permita la obtención de compuestos con actividad antioxidante derivados de un residuo industrial de la elaboración de jugo de manzana.
- II. Cuantificar los compuestos fenólicos derivados del residuo industrial por métodos espectrofotométricos (Fenoles Totales, Flavonoides y Flavonoles).
- III. Identificar y cuantificar los tipos de compuestos obtenidos en el extracto fitoquímico (EF), derivados del residuo industrial, por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).
- IV. Establecer la actividad antioxidante del EF en diferentes sistemas *in vitro* (DPPH, ABTS y β -CLAMS).
- V. Monitorear la oxidación del aceite de Harina de Chía en presencia del EF a diferentes concentraciones frente a un antioxidante derivado del α -tocoferol (Prueba de Shaal Oven).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. Nutraceuticos. Panorama General y Tendencias.

En 1900, la esperanza de vida era de 47 años, con enfermedades infecciosas como la tuberculosis como principal causa de mortalidad. En el año 2000, la esperanza de vida había aumentado hasta los 75 años para hombres y 80 para las mujeres. Estos datos tienen importantes implicaciones demográficas, por ejemplo; se ha calculado que en la Unión Europea, entre 1995 y 2015, el grupo comprendido entre los 20 y 29 años de edad, disminuirá en 11 millones (un descenso del 20%) y el grupo de 50 a los 64 años de edad aumentará en 16.5 millones (un incremento del 25%). Junto con éstos cambios, también se darán incrementos significativos en la incidencia absoluta de las grandes enfermedades crónico degenerativas relacionadas con el envejecimiento (enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, etc.), así como aumentará el riesgo de infecciones, con implicaciones concomitantes para los costos de sanidad (Rowland, I., 2002).

Se han utilizado muchas expresiones para describir los múltiples productos naturales con efectos sobre la salud que han surgido actualmente. Algunas de éstas expresiones son “nutraceuticos”, “alimentos funcionales”, “farmalimentos”, “alimentos de diseño”, “vitalimentos”. “sustancias fitoquímicas” y “alimentacinas” (Mazza, G. Ph. D., 2000).

En Norteamérica, se han utilizado indistintamente las expresiones alimento funcional y producto nutraceutico, y se han dado diversas definiciones que describen el amplio conjunto de productos (Scott, F. W. N. S., Lee, R., Mongeau, N., Hidiroglou, M., L´Abbé, A., Sarwar, R., 1996).

El Health Protection Branch de Canada, organismo responsable de la protección de la salud de los ciudadanos canadienses, ha sugerido que las expresiones “alimento funcional” y “nutraceutico” se utilicen de forma independiente para referirse a éstas dos formas de presentación, según las siguientes definiciones:

“Un alimento funcional tiene una apariencia similar a la de un alimento convencional, se consume como parte de una dieta normal y, además de su función nutritiva básica, se ha demostrado que presenta propiedades fisiológicas benéficas y/o reduce el riesgo de contraer enfermedades crónicas”.

“Un producto nutraceutico es un producto elaborado a partir de un alimento, pero que se vende en forma de píldoras, polvos, (pociones) y otras presentaciones farmacéuticas no

asociadas generalmente con los alimentos y que han demostrado tener propiedades fisiológicas benéficas y/o protege contra enfermedades crónicas”, (Rowland, I., 2002; Mazza, G. Ph. D., 2000).

Así mismo, los fitoquímicos son nutraceuticos por definición (Andlauer, W., Fürst, P., 2002), y la tabla 1, muestra algunos ejemplos de los efectos benéficos que éstos proporcionan.

2.2. Sustancias bioactivas en los alimentos. Fitoquímicos.

Las sustancias bioactivas o fitoquímicos se encuentran abundantemente en alimentos de origen vegetal. Los fitoquímicos son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las rutas metabólicas pentosa-fosfato, shikimato y fenilpropanoide de las plantas. Éstos compuestos tienen funciones básicas, fisiológica y morfológicamente para las plantas, ya que juegan un papel importante en el crecimiento, reproducción y proveen protección frente a parásitos y depredadores, además de contribuir en las características sensoriales de las distintas frutas y vegetales.

Los fitoquímicos que han sido hallados en frutas, vegetales, especias y plantas medicinales tradicionales, exhiben un amplio rango de efectos fisiológicos, tales como; anti-alergénicos, anti-inflamatorios, anti-microbianos, antioxidantes, anti-trombóticos, anti-cariogénicos, cardioprotectores y vasodilatadores (Balasundram, N., *et al.*, 2005; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Moure, A., *et al.*, 2001; Hollman, P. C. H., Katan, M. B., 1999). Los fitoquímicos no tienen una función nutricional definida, pero debido a los efectos citados anteriormente, es que tienen un impacto significativo en el curso de enfermedades crónicas y de envejecimiento; ya que son preventivos contra: el cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, malaria, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas (Balz, F., Lotito, S. B., 2004; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Mazza, G. Ph. D., 2000; Hollman, P. C. H., Katan, M. B., 1999; Dwyer, J., 1996).

En la Tabla 1, se presentan algunos fitoquímicos y sus fuentes, con su mecanismo de acción y otros detalles. En la actualidad estas sustancias, están en el candelero de los laboratorios de investigación de la industria farmacéutica y alimentaria, ya que son indispensables a largo plazo para la salud de los seres humanos.

Tabla 1. Algunos Fitoquímicos y sus Fuentes.

NOMBRE QUÍMICO	FUENTES ALIMENTARIAS	ACCIONES	OBSERVACIONES
Isotiocianatos	En especies del Superorden Violiflorae, Capparales, Familia Brassicaceae. Las Brassicaceas o Crucíferas (bok choy, brécol, repollitos de Bruselas, col de oja, coliflor, col común, col rizada, colinabo, hojas de mostaza, rutabaga, nabos, berro) y aceites de mostaza, contienen indoles e isotiocianatos, los cuales son productos de la hidrólisis de glucosinolatos formados durante el procesamiento, cocción y masticación. También pueden estar presentes otras sustancias activas como sulforafano, anetol, ditiolione, etc.	Diferentes compuestos varían en su vía de acción inhibitoria. Los indoles bloquean los carcinógenos antes de que alcancen sus sitios de acción en las células; los isotiocianatos pueden suprimir el crecimiento de tumores mediante bloquear las enzimas en Fase II.	Se dispone de marcadores en la orina para los alilisotiocianatos. La iberina, producto de hidrólisis del glucosoinolato I-isotiocianato-3 (metilsulfinil)-propano (IMSP) se consume aproximadamente 1 micromol/kg/día, y los buenos efectos de los vegetales crucíferos pueden deberse a eso. Otros creen que el alilisotiocianato o algún producto de transformación es el compuesto activo.
Polifenoles	Los ácidos fenólicos están presentes en ajo, té verde, granos de soja y de cereales, plantas crucíferas, umbelíferas, solanáceas y cucurbitáceas, también en raíz de regaliz y semillas de lino. El epigallocatequingalato (ECGC) es un polifenol activo del té verde.	Antioxidante. Puede reducir la peroxidación de los lípidos.	
Flavonoides	Las frutas, vegetales, vino, té verde. Las frutas cítricas contienen hesperidina y naringina (glicósidos), nobiletina y tageretina (moléculas metoxiladas), y narirutina. Los más activos de los más de 4000 bioflavonoides están en las frutas cítricas. La quercetina y rutina son otros flavonoides. Las cebollas, manzanas, col rizada y judías son también buenas fuentes. La distribución incluye cantidades considerables en té verde, granos de soja y de cereales, crucíferas, umbelíferas, cítricos, solanáceas y cucurbitáceas, raíz de regaliz y semillas de lino.	Reducen el riesgo de cáncer por su acción antioxidante, bloqueando el acceso de los carcinógenos a las células, suprimiendo los cambios malignos en las células, interfiriendo con el enlace de las hormonas a las células, quelando los metales, induciendo a las enzimas a modificar su carcinogenicidad, estimulando la respuesta inmune o combinación de estas acciones.	Las ingestas estimadas son crudas, probablemente 1 g/día. Las principales fuentes parecen ser: 1/3 las frutas y jugos, 1/3 el vino, cerveza, café, té, y el resto, hierbas, vegetales y otros alimentos de plantas. El té es rico en flavonoides, con más de 100 mg/taza.
Monoterpenos (d-limoneno Y d-carvona)	Ajo, frutas cítricas (d-limoneno), semillas de alcaravea y sus aceites (d-carvona); plantas umbelíferas, solanáceas y cucurbitáceas; salvia, alcanfor y eneldo. El POH (alcohol perílico) también parece activo.	Bloquean la acción de carcinógenos al inducir la Fase I y II de las enzimas o durante la inhibición inicial de la isoprenilación postranslateral del crecimiento catalizando la pequeña proteína G, haciendo lenta la promoción y progresión, y rediferenciación del tejido.	Alta relación terapéutica; no se notó toxicidad a 100 mg/kg de limoneno en flanes usados en estudio de toxicidad aguda.

Tabla 1. (continuación) Algunos Fitoquímicos y sus fuentes.

NOMBRE QUÍMICO	FUENTES ALIMENTARIAS	ACCIONES	OBSERVACIONES
Organosulfurados (alildisulfuro especialmente potente)	Vegetales del Superorden Liliiflorae, dentro de la familia de las cebollas (Alliaceae) que contienen el género Allium como ajo, cebollas, puerro, cebollín. La mayor parte de los sulfuros están en el ajo y las crucíferas.	Bloquean o suprimen la carcinogénesis. También pueden alterar los lípidos séricos y la agregación plaquetaria.	En algunos estudios de puerro, ajo y cebollas o suplementos de ajo, no se observaron efectos sobre el cáncer de mama o pulmón en humanos. En otros se sugiere que el grupo de vegetales Allium puede inducir pemphigus.
Isoflavonas	Los fitoestrógenos se encuentran en granos de soja (grandes cantidades) y muchas otras legumbres (Fabifloras superorden Fabacreae, familia Leguminosae) en menores cantidades. Los fitoestrógenos incluyen la genisteína, biochanina A, daidzeína, formononetina, y el producto intestinal equol, entre otros.	Diferentes efectos que bloquean y suprimen los carcinógenos; las isoflavonas bloquean la entrada de los estrógenos a las células y otras acciones.	Las bacterias del colon convierten las moléculas precursoras en formas activas.
Lignanós	Semillas de lino, productos de cereales enteros, vegetales, frutas. Los lignanos son el otro tipo de fitoestrógenos (además de las Isoflavonas).	Parecen ser antioxidantes. Enlazan a los receptores de estrógenos y actúan como débiles antiestrógenos, aumentan la síntesis de hormonas sexuales enlazando la globulina, y bajan los niveles circulantes de estradiol libre, así o por otras acciones pueden bloquear o suprimir los cambios cancerosos.	Las bacterias colónicas convierten las moléculas precursoras en las formas activas.
Saponinas	La mayoría de los vegetales y hierbas, tales como los granos de soja.	El mecanismo de actividad anticáncer no está claro, aunque tienen otros efectos.	
Carotenoides	Vegetales y frutas de color amarillo, naranja oscuro y verde intenso.		

Nota: Los superórdenes de las plantas se identifican con el sufijo –iflorae, los órdenes con –ales, y las familias con –aceae.

Fuente: Dwyer, J., 1996.

2.3. Efectos causados por radicales libres en sistemas Alimenticios.

Los radicales libres también pueden ocasionar daños en los alimentos, los cuales tienen como principales componentes, proteínas, lípidos y carbohidratos, que están sujetos a cambios durante los procesos de elaboración y almacenamiento del producto final. Debido a la complejidad de las distintas matrices alimentarias, son los lípidos, los componentes más susceptibles al deterioro oxidativo; este deterioro oxidativo en los aceites y las grasas, da lugar a la aparición de sabores y olores rancios (Moure, A., *et al.* , 2001; Fennema, O. R., 1993), con el subsiguiente decremento de la calidad nutricional y

seguridad de los alimentos, ya que hay la formación de compuestos secundarios que son potencialmente tóxicos (Moure, A., *et al.*, 2001). Los principales sustratos de éstas reacciones son los ácidos grasos insaturados, que en estado libre se oxidan a una mayor velocidad que cuando forman parte de las estructuras de los triacilgliceroles o de los fosfolípidos. De modo paralelo, este tipo de alteración puede acontecer también sobre otros sustratos no saturados: el escualeno, un hidrocarburo presente en los aceites de pescados; los pigmentos carotenoides; las estructuras insaturadas de los tocoferoles, aunque estos últimos pueden presentar una actividad antioxidante frente a otros compuestos lipídicos y retrasar su oxidación.

Precisamente, la presencia de sustancias prooxidantes de una parte y antioxidante de otra, explica el diverso comportamiento con respecto a la oxidación de los lípidos observados en los diferentes alimentos.

Las posibles alteraciones que pueden tener como sustratos a los lípidos alimentarios se pueden agrupar en cuatro tipos diferentes (tabla 2).

Tabla 2. Mecanismos de Alteración de los lípidos en las Matrices Alimentarias.

Lipólisis. Separación de glicerol y de ácidos grasos libres.

Oxidaciones. Intervención del oxígeno del aire sobre los ácidos grasos, de modo principal en estado libre. Puede corresponder a tres mecanismos distintos:

- a) Autooxidación o enranciamiento oxidativo, que afecta a los ácidos grasos, con preferencia insaturados.
- b) Oxidación por lipooxigenasas, que afecta a los ácidos grasos con estructuras <<1,4 pentadieno cis-cis>>.
- c) Oxidación cetónica, que afecta a los ácidos grasos saturados de bajo peso molecular.

Reversión. Modificaciones indeseables del olor y sabor, principalmente en grasas que contienen ácido linoléico.

Polimerizaciones provocadas por el calor. Formación de estructuras poliméricas, y a veces cíclicas, a partir de los ácidos grasos, como consecuencia de un tratamiento térmico elevado.

Fuente : Bello, G., J., 2000.

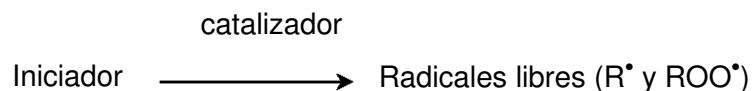
En los alimentos, los lípidos se pueden oxidar por medio de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Fenemma, O. R., 1993). Sin embargo, desde el punto de vista químico, es la autooxidación, el proceso más común e importante de todos los que afectan a la alteración de los alimentos, puesto que la sufren la mayoría de las grasas y aceites comestibles que en su composición incluyen ácidos grasos insaturados, este mecanismo

puede definirse como el fenómeno espontáneo de oxidación de los lípidos contenidos en los alimentos cuando toman contacto con el oxígeno del aire. Se caracteriza por integrar un proceso de reacciones en cadena, que se produce de modo autocatalítico a través de radicales libres que actúan de componentes químicos intermediarios.

En cuanto a su mecanismo se trata de una reacción entre el oxígeno molecular y los compuestos orgánicos bajo condiciones suaves. El oxígeno del aire bajo su estado excitado de triplete ($^3\text{O}_2$) actúa de un modo especial al comportarse como un biradical ($^*\text{O}-\text{O}^*$). Aunque la autooxidación es una reacción que bajo condiciones suaves se produce de modo espontáneo, sin embargo con frecuencia se inicia por la actividad catalítica de metales, peróxidos e hidroperóxidos, por lo general presentes en los alimentos en calidad de impurezas.

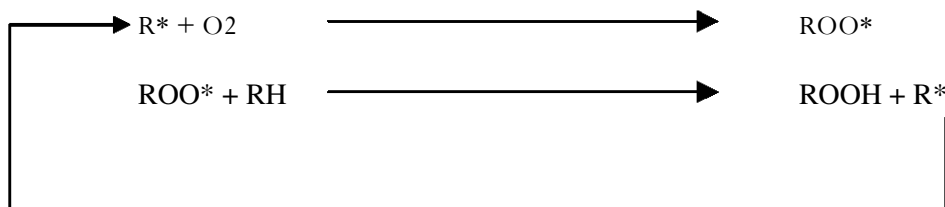
La alteración suele compensar con la aparición de un sabor suave y dulzón, que se hace cada vez más picante a medida que progresa la oxidación, como consecuencia de la formación de productos secundarios: aldehídos, cetonas, ácidos, etc. Son compuestos que pueden proceder tanto de la degradación de los ácidos grasos, como de otros componentes de los alimentos con estructuras insaturadas, tales como carotenoides y tocoferoles. La autooxidación de los lípidos se desarrolla a través de reacciones en cadena con formación de radicales libres, su mecanismo puede ser descrito en términos de tres etapas fundamentales: 1) iniciación; 2) propagación y 3) terminación (Bello, G. J., 2000; Allen, J.C., Hamilton, R. J., 1994; Fenemma, O. R., 1993).

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

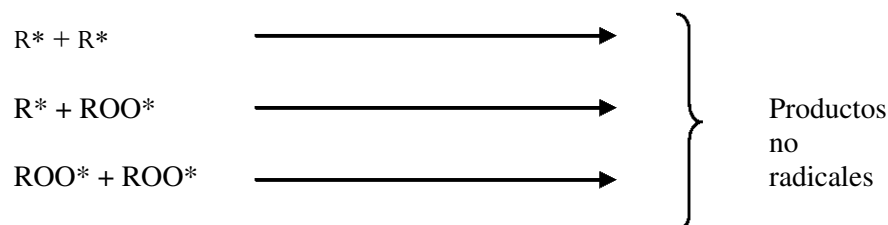


En este periodo la oxidación toma lugar muy lentamente, y los productos secundarios se acumulan en una concentración que no puede ser detectada organolépticamente.

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



c) **Terminación:** En esta última etapa se forman compuestos estables la reaccionar los radicales hidroperóxido entre sí y con otros radicales libres por medio de reacciones de condensación, dando lugar a: aldehídos, cetonas, epóxidos, polímeros, etc. (Fenemma, O. R., 1993).



2.4. Extracción de nutraceuticos derivados de vegetales

Las técnicas clásicas de extracción de nutraceuticos con disolventes de las distintas matrices vegetales, están basadas sobre la elección del disolvente acoplada con el uso de calor y/o agitación (Wanj, L., Weller, L. C., 2006). Las metodologías usadas para analizar este tipo de compuestos generalmente incluyen la extracción con disolventes, como metanol, etanol, acetona o mezclas de éstos con agua, limpieza y posterior fraccionamiento por Extracción líquido-líquido (LLE), usualmente con acetato de etilo; Cromatografía en Columna (CC) y Extracción en fase sólida (SPE). Finalmente, los extractos son concentrados y los polifenoles son separados por Cromatografía Líquida de

Alta resolución en fase inversa (HPLC-RP) acoplado a un detector de UV-Vis o espectrometría de masas. En otros trabajos, las muestras son extraídas por sonicación con el disolvente y los extractos crudos son inyectados directamente al sistema de HPLC. Generalmente, en las publicaciones acerca de productos naturales se da poca información de los procesos de optimización para los métodos analíticos usados y muy frecuentemente éstos métodos no son validados y los procedimientos de extracción a menudo ofrecen “cuellos de botella” analíticos (Alonso-Salces, R. M., Berrueta, L. A., Barranco, A., Corta, E., Gallo, B., Vicente, F., 2005; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Naczki, M., Shahidi, F., 2004)

Actualmente, se están empleando novedosas técnicas para la extracción de compuestos bioactivos, tales como: Extracción ultrasónica, Extracción con microondas, Extracción con fluidos supercríticos y extracción acelerada de disolventes (Wanj, L., Weller, L. C., 2006), pero debido al amplio repertorio de vegetales, la variación en composición de las diferentes partes de las plantas y la diversidad estructural y fisicoquímica de los antioxidantes fitoquímicos, no es ni cercanamente posible tener un procedimiento definitivo para la extracción de nutraceuticos, por lo que cualquier técnica que se emplee debe ser mejorada en proceso, remoción de barreras técnicas, además de mejorar el diseño y escalamiento para sus aplicaciones industriales.

2.5. Antioxidantes Fitoquímicos.

El creciente conocimiento acerca de los beneficios en la salud de los antioxidantes en los alimentos diarios, aunado a que los antioxidantes sintéticos pueden tener efectos nocivos en la salud de los consumidores, fija la base para una mayor investigación y enfoque sobre los fitoquímicos con actividad antioxidante (Peschel, W., *et al.*, 2005).

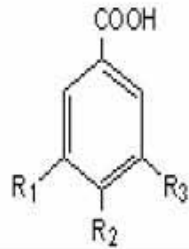
Los antioxidantes fitoquímicos son de interés al menos por tres razones.

1. Ya sea por vía endógena o por adición, los antioxidantes brindan protección a los componentes del alimento contra el deterioro oxidativo.
2. Los antioxidantes provenientes de la dieta pueden ser absorbidos por el cuerpo humano, proveyéndole de efectos benéficos, y;
3. Por el creciente interés de los antioxidantes fitoquímicos para su uso terapéutico (Ej. Como anti-inflamatorio, anti-isquémico y como agentes antitrombóticos), (Cadenas, E., Packer, L., 2002).

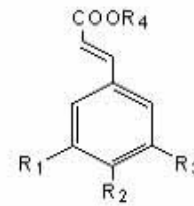
Muchos fitoquímicos que están presentes en los alimentos pueden proveer y han sido implicados de ser capaces de interferir en las reacciones en cadena de los radicales libres durante el deterioro oxidativo de los lípidos. Los fitoquímicos inhiben la formación de hidroperóxidos (ROOH), catalizada por metales, radiación, y los radicales libres en sí; además presentan capacidad secuestrante de los radicales peroxi, alcoxi, hidroxil y oxígeno singulete (Branen, L. A., Davidson, M. P., Salminen, S., Thorngate III, J. H., 2002). Antioxidantes, como la Vitamina C y tocoferoles son utilizados ampliamente en la industria y son esenciales para la protección contra las ERO (Especies reactivas al Oxígeno); sin embargo, éstos están siendo sustituidos por los Flavonoides, debido a que se ha comprobado que la actividad mayoritaria de la capacidad antioxidante en las frutas y vegetales es debida principalmente por los ácidos fenólicos y los flavonoides, y no de las Vitaminas C, E y/o β -carotenos (Tsao, R. *et al.*, 2004). La contribución de la vitamina C a la actividad total de las frutas, ha sido determinada y generalmente esta es < 15 % (Won, Lee, K., Yong, L., Dae-Ok, K., Chang, L., Hyong, Joo, L., Young, Jun, K., 2003). La tabla 3, muestra los grupos mayoritarios de antioxidantes fitoquímicos, así como a los compuestos representativos de las subclases y la figura 1 muestra las estructuras de los fitoquímicos más representativos.

Tabla 3. Grupos Mayoritarios de Antioxidantes Fitoquímicos y algunos compuestos representativos (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

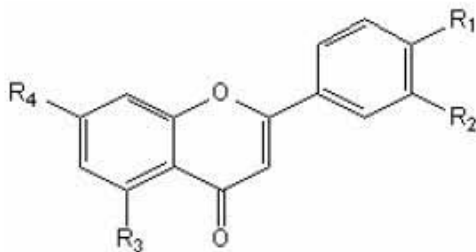
Fitoquímico	Acidos Benzoico	Ácido galico
		Ácido vanillico
		Ácido siríngico
	Acidos cinámicos	Ácido p-cumárico
		Ácido cafeico
		Ácido ferúlico
		Ácido clorogénico
	Flavonas	Apigenina
		Luteolina
	Flavonoles	Kaempferol
		Quercetina
		Myricetina
	Flavanonas	Naringenina
Hesperetina		
Chalconas	Phloridzina	
	3-Hidroxiploridzina	
Antocianinas	Pelargonidina	
	Cianidina	
Isoflavonas	Daidzina	
	Genisteina	
	Pomiferina	
	Osajina	
Flavanoles	Catequina	
	Epicatequina	
Procianidinas	Procianidina B1	
	Procianidina B2	
Carotenoides	Licopeno	
	B-caroteno	
	Zeaxantina	
	Astaxantina	
	Luteina	
Capsaicinoides	Capsaicina	
	Homocapsaicin	



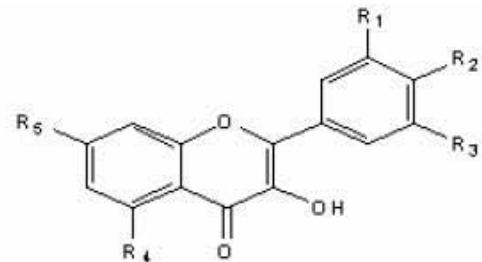
Ácidos Benzoicos	R1	R2	R3
Ácido gálico	OH	OH	OH
Ácido vainílico	OCH3	OH	H
Ácido siríngico	OCH3	OH	OCH3



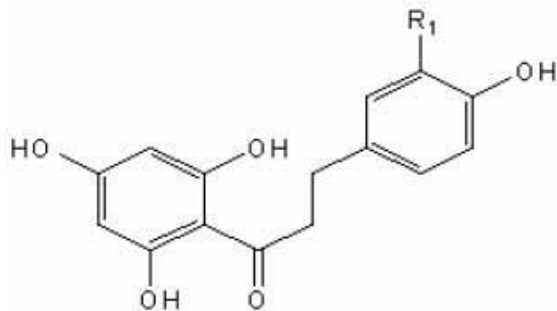
Ácidos Cinámicos	R1	R2	R3	R4
Ácido p-cumárico	H	OH	H	H
Ácido cafeico	H	OH	OH	H
Ácido ferúlico	OCH3	OH	H	H
Ácido sinápico	OCH3	OH	OCH3	H
Ácido clorogénico	H	OH	OH	Ácido 5-quinico



Flavonas	R1	R2	R3	R4
Apigenina	OH	H	OH	OH
Luteolina	OH	OH	OH	OH

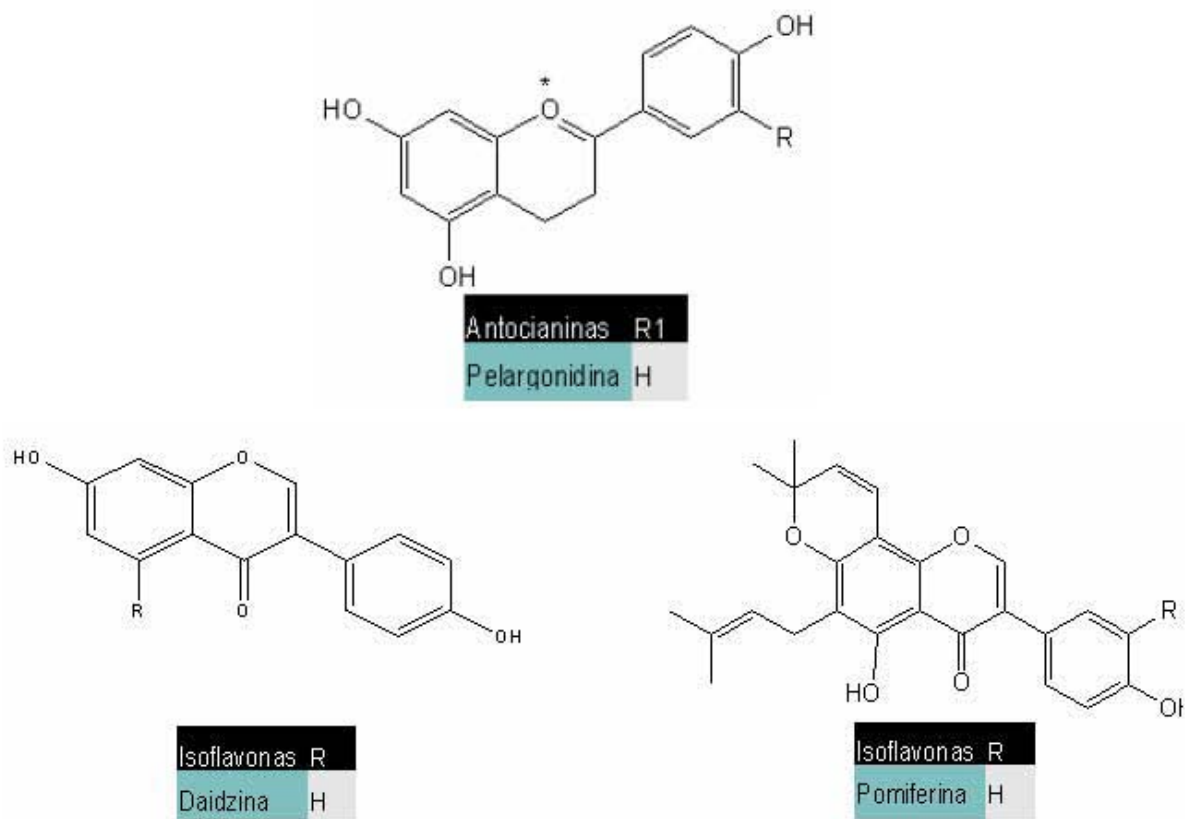


Flavonoles	R1	R2	R3	R4	R5
Kaempferol	H	OH	H	OH	OH
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH
Myricetina	OH	OH	OH	OH	OH

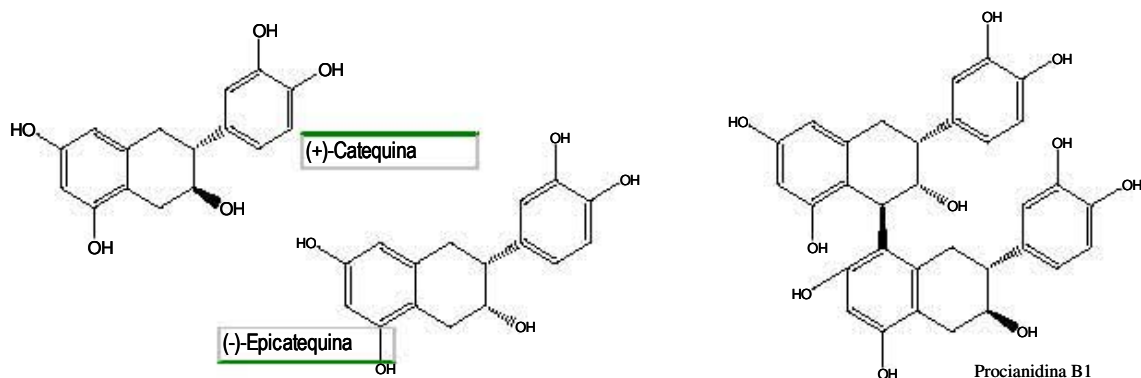


Chalconas	R1
Phloridzina	H
3-Hidroxifloridzina	OH

Fig. 1. Estructuras Químicas de Antioxidantes Fitoquímicos mayoritarios y algunos ejemplos representativos (Tsao, R., Deng, Z., 2004).



Isoflavonas



Flavanoles y procianidinas

Fig. 1 (Continuación). Estructuras Químicas de Antioxidantes Fitoquímicos Mayoritarios y algunos compuestos representativos (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

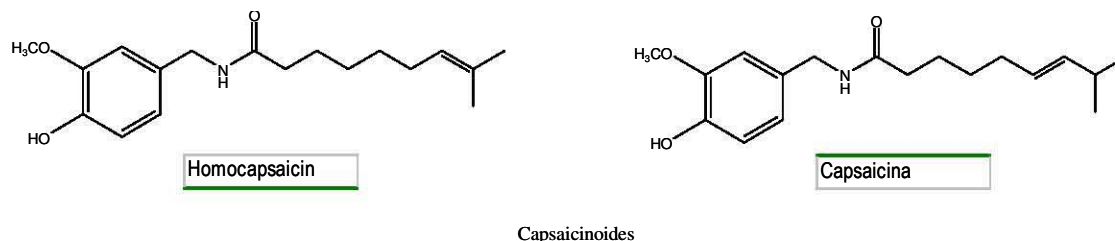


Fig. 1 (Continuación). Estructuras Químicas de Antioxidantes Fitoquímicos Mayoritarios y algunos compuestos representativos (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

La ingesta de dietas controladas ricas en frutas y vegetales incrementan significativamente la capacidad antioxidante del plasma; en cambio este incremento no pudo explicarse por los incrementos en concentración del α -tocoferol o carotenoides en el plasma. Entre los distintos grupos de antioxidantes naturales de origen vegetal, los carotenoides y los polifenoles son quizás los dos más importantes (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

2.5.1. Carotenoides.

Los carotenoides, son un conjunto numeroso de pigmentos liposolubles de 40 átomos de carbono sintetizados por las plantas (Briton, G., Goodwin, T. W., 1982). Las principales fuentes de carotenoides en la dieta humana son las frutas y verduras de color verde, naranja y rojo. Hasta la fecha se conocen más de 600 carotenoides y se clasifican en:

- Hidrocarburos carotenoides, siendo el β -caroteno y el licopeno los más importantes y (Ver figura 2);
- Oxicarotenoides (Xantofilas), que incluyen la β - Criptoxantina, la luteína, la zeaxantina y la astaxantina (Ver figura 2).

Entre los 50-60 carotenoides que se consideran precursores de la vitamina A, el β -caroteno es el más abundante, seguido de la β -Criptoxantina y de los α - y γ -carotenos. En todos los casos, para tener actividad de vitamina A el carotenoide vegetal debe ser descompuesto enzimáticamente en el cuerpo y transformado en retinol. La vitamina A juega un papel fundamental en muchos procesos biológicos esenciales. Se conoce desde hace décadas su función como cromóforo en la función visual. También está implicada en el desarrollo fetal y en la regulación de la proliferación y diferenciación de muchos tipos de

células a lo largo de la vida (Mazza, G. Ph. D., 2000). Aunque todos los carotenoides tienen dobles enlaces conjugados, los carotenoides individuales han diferido en su potencial antioxidante en humanos. Algunos no han mostrado actividad antioxidante *in vitro* (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

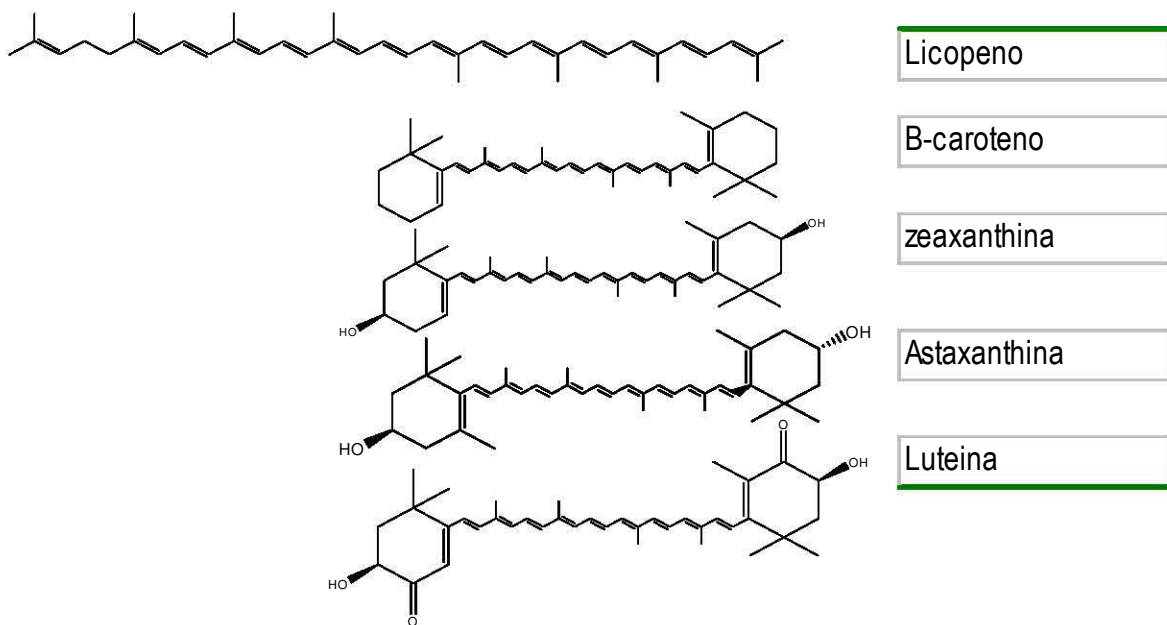


Fig 2. Estructuras Químicas de Carotenoides representativos (Tsao, R., et al., 2004).

El β -caroteno ha sido aceptado para el tratamiento general de la protoporfiria eritropoyética, esta es una enfermedad hereditaria que se manifiesta por una excesiva fotosensibilidad. Se ha comprobado su eficacia en la protección de las membranas lipídicas de los daños producidos por los radicales libres, especialmente en condiciones de baja presión parcial de oxígeno. Por lo tanto, él β -caroteno podría servir de complemento a otros antioxidantes protectores como la Vitamina C y E, cuya eficacia es máxima a presiones parciales de oxígeno normales. Otros carotenoides, además del β -caroteno, tienen propiedades antioxidantes. El licopeno es el extintor de oxígeno singulete más eficaz de entre los varios agentes lipófilos. También la Zeaxantina y la luteína son en general más eficaces que él β -caroteno como secuestradores de agentes oxidantes. También se ha comprobado que carotenoides sin actividad pro-vitamina A, como la cantaxantina, tienen propiedades antimutagénicas y anticancerígenas. Además de que el β -caroteno puede reducir la incidencia de sucesos cardiovasculares (Mazza, G. Ph. D., 2000).

2.5.2. Compuestos Polifenólicos.

Los compuestos fenólicos son considerados como metabolitos secundarios que son sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal en respuesta a las condiciones de estrés como son: infecciones, daño, radiación UV, entre otros. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en las plantas y son un grupo muy diversificado de fitoquímicos derivados de la tirosina y la fenilalanina (Naczki, M., Shahidi, F., 2004; Cadenas, E., Packer, L., 2002).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos comprenden un anillo aromático, teniendo uno ó más sustituyentes hidroxilo; los polifenoles vegetales incluyen desde simples fenoles, tales como: ácidos fenólicos (ambos derivados de los ácidos benzoico y cinámico), hasta compuestos polimerizados, tales como; cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables y condensados, lignanos y ligninas.

Aunque dicha diversidad estructural da como resultado un amplio rango de compuestos fenólicos, éstos pueden agruparse dentro de algunas clases (Tabla 4).

Tabla 4 . Clases de compuestos fenólicos en plantas.

CLASE	ESTRUCTURA
Fenoles simples, Benzoquinonas	C6
Ácidos Hidroxibenzoicos	C6 - C1
Acetofenonas, Ácidos fenilacético	C6 - C2
Ácidos Hidroxicinámicos, fenilpropanoides(cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenos)	C6 - C3
Naftoquinonas	C6 - C4
Xantonas	C6 - C1 - C6
Stilbenos, antraquinonas	C6 - C2 - C6
Flavonoides, Isoflavonoides	C6 - C3 - C6
Lignanos, Neolignanos	(C6-C3) ²
Biflavonoides	(C6-C3-C6) ²
Ligninas	(C6-C3) ⁿ
Taninos Condensados (proantocianidinas y flavonolos)	(C6-C3-C6) ⁿ

Fuente. Balasundram, N., *et al.*, 2005.

En los alimentos, los polifenoles contribuyen a la acidez, la astringencia, el color, sabor, aroma además de la estabilización lipídica de los productos.

Los polifenoles no están uniformemente distribuidos en los tejidos vegetales; Por ejemplo, los fenoles Insolubles, son los principales componentes de la pared celular, mientras que los fenoles solubles, están acoplados en el interior de vacuolas vegetales.

La mayoría de los compuestos fenólicos presentes de manera natural están presentes como conjugados, con mono- y polisacáridos, ligados a uno ó más de un grupo fenólico, además también pueden presentarse como derivados funcionales, tales como; ésteres y metil-ésteres (Balasundram, N., *et al.*, 2005; Naczk, M., Shahidi, F., 2004).

Aunque los compuestos fenólicos están presentes en casi todos los alimentos de origen vegetal; las frutas, vegetales y bebidas son las mayores fuentes de éstos compuestos en la dieta humana, siendo los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, los compuestos considerablemente mayoritarios de la dieta.

2.5.2.1 Ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos consisten en dos subgrupos: Los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos incluyen el ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanillico y siringicos, los cuales tienen una estructura común de C6 – C1. Los ácidos hidroxicinámicos, son compuestos aromáticos con un arreglo, C6 – C3, e incluye a los ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y ácidos sinápicos, que son los más comunes.

En el caso de los ácidos fenólicos, la actividad antioxidante depende del número y las posiciones de los grupos hidroxilo con relación al grupo carboxilo terminal.

Los ácidos hidroxicinámicos tienen una actividad antioxidante más alta comparada con los ácidos hidroxibenzoicos. La actividad antioxidante de éstos ácidos, puede deberse al grupo CH=CH-COOH, el cual tiene la habilidad de ser un donador de hidrógeno y la estabilización por el grupo –COOH.

Se han atribuido a los ácidos fenólicos varias funciones biológicas, como la de antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos (Cadenas, E., Packer, L., 2002).

2.5.2.2. Flavonoides.

Los Flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino tinto.

Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da. Existen subclases de flavonoides con un total de más de 5000 compuestos, 10 todos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difeníl-propa-no) derivado del ácido shiquímico y de tres restos de acetato.

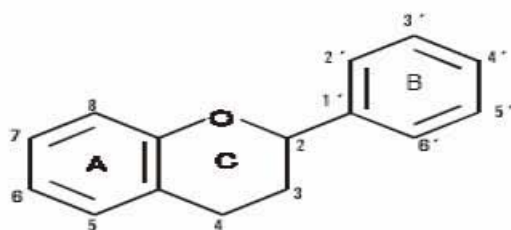


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides y Sistema básico de numeración (Pérez Trueba, G., 2003).

Los Flavonoides pueden hallarse principalmente como glicósidos en las plantas. Su forma de aglicon (forma que carece de su carbohidrato ligado), no se encuentra de manera frecuente. Se reconocen al menos ocho monosacáridos o combinaciones de éstos (di- y trisacáridos) que pueden estar ligados a los diferentes grupos hidroxilo del flavonoide aglicon (Erlund, I., 2004).

La actividad antioxidante de éstos compuestos está determinada principalmente por su estructura, en particular la deslocalización del electrón, proveniente del radical libre, alrededor del núcleo aromático (Figura 3) y la estabilización por el efecto de resonancia del núcleo aromático, que por tanto, “frena” la continuación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

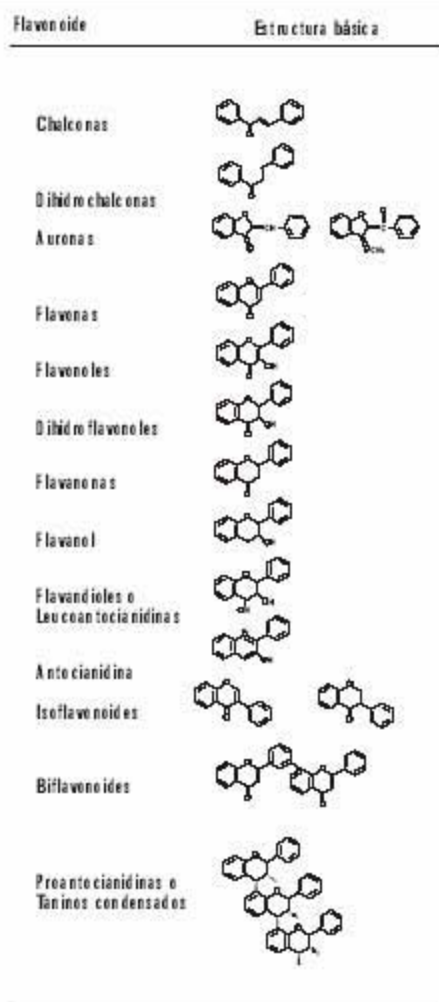


Figura 4. Subclases de Flavonoides (Pérez, Trueba, G., 2003).

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes; antiinflamatorias; antitrombóticas; antimicrobianas; antialérgicas; antitumorales; antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II. Entre todas las propiedades biológicas, las de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional (Pérez, Trueba, G., 2003; Hollman, P. C. H., Katan, M. B., 1999).

2.5.2.3 Flavonoles.

Los Flavonoles, son los Flavonoides que están distribuidos en mayor proporción entre los compuestos fenólicos, siendo quercetina el compuesto más común de la dieta, particularmente en cebollas, manzanas y el té. Quercetina esta presente de muchas formas glicosídicas, siendo quercetina 3-rhamnoglucosido, llamado también rutina, el más abundante (Erlund, I., 2004; Cadenas, E., Packer, L., 2002; Glossman-Mitnik, D., Mendoza-Wilson, A. M., 2004).

Otros , tales como: catequina y epicatequina, se encuentran en combinación con el ácido gálico, formando epigallocatequina galato y epicatequina galato, respectivamente (Erlund, I., 2004). La tabla 5, muestra los flavonoles mayoritarios en algunos alimentos.

Tabla 5. Flavonoles mayoritarios y sus fuentes.

FLAVONOL	FUENTE	Contenido de aglicones (mg/Kg)
Quercetina-3,4'-glucósido Quercetina-3-glucósido	Cebolla	284 - 486
Quercetina-3-rhamnoglucósido (rutina)	Té negro	10-25
Quercetina-3-galactosido Quercetina-3-rhamnosido Quercetina-3-arabinosido Quercetina-3-glucósido	Manzana	21-72
Quercetina-3-rhamnoglucósido (rutina) Quercetina-3-rhamnosido Quercetina-3-galactosido Myricetina-3-glucósido	Uva seca	44
(+)-Catequina	Manzana	4-16
(-)-Epicatequina		67-103
(+)-Catequina	Vino tinto	16-53
(-)-Epicatequina		9-42
(Epi)catequina y sus galatos Antocianinas	Té negro	102-418
Cianidina-3-glucosido Cinamidina-3-rutinosido Delfinidina-3-glucosido Delfinidina-3-rutinosido	Uva pasa	760 590

Fuente. Erlund, I., 2004.

2.6. Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos.

Algunos métodos *in vitro* e *in vivo* han sido desarrollados para la evaluación de la actividad antioxidante. Sin embargo, no hay un sistema perfecto disponible que nos ayude a conocer la “verdadera” actividad antioxidante, tanto de forma individual, como de una mezcla compleja de antioxidantes fitoquímicos; ya que, más de un mecanismo está involucrado.

Durante la oxidación lipídica, los antioxidantes fitoquímicos actúan de diferentes maneras (Moure, A., *et al.*, 2001):

- I. Uniéndose a metales iónicos;
- II. “Secuestrando radicales libres”, y
- III. Descomponiendo peróxidos.

Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); evitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2(FLA2),¹² al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Pérez, Trueba, G., 2003).

En comparación a los antioxidantes sintéticos, como son: el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), que sólo tienen un modo de acción, que es el “secuestro de radicales libres” (Tsao, R., Deng, Z., 2004; Moure, A., *et al.*, 2001).

2.6.1. Métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante es ampliamente usada como parámetro de caracterización, junto con otros, de los diferentes materiales naturales (Frutas, vegetales, vinos, aceites, etc.). Esta actividad está relacionada con los compuestos capaces de proteger un sistema biológico contra los potenciales daños de los efectos inducidos por la oxidación, que involucra las especies reactivas al oxígeno y las especies reactivas al nitrógeno (Arnao, B. M., 2000).

La actividad antioxidante puede y debe ser evaluada con diferentes pruebas para los distintos mecanismos. Los métodos más empleados se resumen en la tabla 9 (Moure, A., *et al.*, 2001).

La forma en la que se puede evaluar la Actividad Antioxidante puede realizarse por dos métodos:

- I. Métodos Directos;
- II. Métodos Indirectos.

En los métodos indirectos, el estudio está enfocado principalmente a la habilidad del antioxidante de “secuestrar” radicales libres, los cuales no están asociados realmente con la degradación oxidativa y los efectos de los metales de transición. Como ejemplo de este tipo de métodos algunos radicales libres que son estables y altamente coloridos (ABTS*, DPPH*) han sido empleados y para estos casos se cambia la determinación de la actividad antioxidante para determinar la actividad donante de hidrógeno. Mientras que los métodos directos están basados en el efecto del antioxidante sobre la degradación oxidativa en el sistema de prueba. Como sustratos de oxidación, pueden emplearse: lípidos individuales, mezclas de lípidos, proteínas, DNA o lípidos que contienen especies biológicamente importantes, tales como; plasma, LDL, membranas biológicas, etc. (Roginski, V., Lissi, E. A., 2005).

Tabla 6. Ensayos para determinar la actividad antioxidante.

ENSAYO
<u>Oxidación de emulsiones en sistemas hidrofílicos e hidrofóbicos</u>
Aceites vegetales y marinos
Ácidos grasos, Metil ésteres de ácidos grasos, Ácidos grasos esterificados
Fosfolípidos
Citronelal
Oxidación del Beta-caroteno en emulsion de ácido linoleico
<u>Secuestro de Radicales</u>
ABTS ⁺ (enzimático y químico)
Radical peroxi alquilo
Actividad secuestrante del radical α , α -difeníl - β - picrilhidrazilo
Actividad secuestrante del radical hidroxilo
Capacidad de absorbancia del radical oxígeno

Actividad secuestrante del radical superóxido

Otros

Potencial redox

Poder reductor (reducción del ion Fe³⁺)

Degradación proporcional de los compuestos fenólicos como consecuencia de su actividad antioxidante

Actividad quelante del Fe²⁺ y Cu²⁺

Modelos de oxidación en membranas biológicas, ensayos celulares y ensayos in vivo

Liposomas (Peroxidación lipídica inducida por rayos UV)

Oxidación mitocondrial en ratas vivas

Actividad secuestrante de radicales en plasma

Actividad antiúlceras

Microsomas

Peroxidación de microsomas inducida por NADPH/hierro

oxidación liposómica de la Fosfatidilcolina

Ensayos de Fragmentación y Oxidación del DNA, Daños del DNA dependientes de la bleomicina

Capacidad antioxidante del plasma de ratas por inducción de Cu y AAPH

Oxidación del plasma sanguíneo

Experimentos animales, reducción de toxina urémicas en la sangre de ratas

Actividad antiúlceras

Producción de leucotrienos por neutrófilos humanos

Estabilidad en Alimentos

Almacenamiento de productos cárnicos

Estabilidad lipídica en productos extruídos de maíz

Estabilidad lipídica en productos cárnicos precocidos

Estabilidad de aceites durante el freído

Estabilidad de materiales que contienen carotenoides

Estabilidad oxidativa de un homogenizado de muslo de pavo

Almacenamiento de la carne de res

Abreviaturas: AAPH, 2,2'-azobis(2-aminopropano)dihidroclorhidrico; NADPH, Dinucleotido fosfato de adenina nicotinamida en su forma hidrogenada.

Fuente: Moure, A., *et al.*, 2001.

De la “batería de pruebas” para medir la actividad antioxidante, son sólo algunas, las que de acuerdo a la logística y recursos son posibles de efectuar, por lo tanto, las siguientes metodologías son las más frecuentemente usadas, debido a que son fáciles, rápidas y sensitivas para la evaluación antioxidante *in vitro*. Estas técnicas evalúan compuestos cromógenos que tienen alta estabilidad para su evaluación (Arnao, B. M., 2000).

2.6.1.1. Sistema modelo del ácido linoleico/ β -caroteno (β -CLAMS).

El método de β -CLAMS, se basa en la decoloración del β -caroteno por los peróxidos generados durante la oxidación del ácido linoleico a una elevada temperatura. Las lecturas se llevan a cabo a 470 nm, en intervalos de 15 minutos por 100 – 300 minutos. Este método es realizado con β -caroteno y ácido linoleico, durante el cual, el β -caroteno, sufre una decoloración rápida en ausencia de un antioxidante (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

2.6.1.2. Actividad secuestrante del radical ABTS⁺.

La generación del catión ABTS* [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazolina-6-sulfónico)], es la base de un método espectrofotométrico, que puede ser aplicado para medir la actividad antioxidante total de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.

El ensayo original de ABTS, fue basado sobre la activación de la mioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS, para producir el radical catiónico en la presencia y ausencia de antioxidantes. El mejoramiento de la técnica para la generación del ABTS⁺, involucra la generación directa de la coloración azul/verdosa, característica del cromóforo ABTS⁺, por una reacción química entre el ABTS y el Persulfato de Potasio. Este cromóforo tiene las siguientes longitudes de onda de absorción máxima: 415, 645 nm, 734 nm y 815 nm, sin embargo la más usada es la de 415 nm.

La adición de antioxidantes al radical catiónico preformado, provoca la reducción del cromóforo, y esto es dependiente del tiempo, la actividad y concentración del antioxidante. De esta manera la decoloración, como porcentaje de inhibición del radical catiónico ABTS*, es determinada como una función de la concentración y tiempo, calculada respecto a la reactividad del Trolox (análogo de la vitamina E, soluble en agua) como estándar, bajo las mismas condiciones.

El método es aplicable para el estudio de antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos, compuestos puros y extractos alimentarios (Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999).

2.6.1.3. Actividad Secuestrante del radical DPPH.

La actividad secuestrante de este método está basada sobre la reducción del radical metanólico 2,2'- difenil – 2 – picrylhidrazilo (DPPH°) en la presencia de un antioxidante donador de hidrógeno.

La solución de DPPH°, es de un colorido color violeta que muestra una banda de absorción máxima en 515 nm. La absorción y el color son más bajos cuando el DPPH* es reducido por un antioxidante. El DPPH* residual corresponde, de manera inversa a la actividad secuestrante del radical por el antioxidante (Abrosca D´. B., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Pacifico, S., 2005).

2.7. Subproductos agro-industriales como fuente de antioxidantes.

En materia de compuestos bioactivos o fitoquímicos, el número de estudios sobre los subproductos provenientes de la agro-industria ha aumentado considerablemente, además de la localización específica de los compuestos activos y sus modificaciones durante el proceso (Peschel, W., *et al.*, 2005; Shieber, A., *et al.*, 2001). La disponibilidad de los compuestos fenólicos derivados de residuos agro-industriales, así como los métodos de extracción y su actividad antioxidante han sido sujetos ya de estudios previos (Balasundram, N., *et al.*, 2005; Peschel, W., *et al.*, 2005; Naczki, M., Shahidi, F., 2004; Moure, A., *et al.*, 2001). Las tablas 7 y 8, muestran el contenido de compuestos fenólicos a partir de residuos agro-industriales.

Tabla 7. Contenido fenólico total de Residuos Industriales.

MATERIAL DE RESIDUO	Contenido Fenólico total (TPC)
Residuos de la Producción de jugos	
Manzana	46 +/- 0.85
Fresa	39.39 +/- 4.60
Pera	12.9 +/- 2.39
Residuo de industrial de Conservas	
Alcachofa	42.75 +/- 12.17
Espárrago	89.40 +/- 5.07
Tomate	12.15 +/- 0.83
Remanentes de Cosechas	
Brócoli	29.87 +/- 1.58
Pepino	18.41 +/- 2.68

Nota: TPC; mg Equivalentes de ácido gálico/ g en peso seco.

Fuente: Peschel, W., *et al.*, 2005.

Tabla 8. Compuestos fenólicos de Residuos Industriales.

RESIDUO INDUSTRIAL	COMPUESTOS FENÓLICOS	NIVELES
	Ácido clorógeno	42.51 +/- 4.50/100 g residuo fresco
Cáscaras de almendra[Prunus dulcis (Mill). D.A. Webb]	4- O- Ácido cafeoilquínico	7.90 mg /100 g en residuo fresco
	3- O- Ácido cafeoilquínico	3.04 mg/100 g en residuo fresco
Cáscara de Manzanas	Flavonoides	2299 mg CE/100 g en residuo seco
	Antocianinas	169 mg/CGE/100 g en residuo seco
Aguas de escaldado de la Alcachofa	Ácido neoclorogénico Ácido criptoclorogénico ácido clorogénico cinarina Derivados del ácido cafeico	11.3 g de polifenoles/100 mL
Bagazo de Manzana seco	Flavonoles Flavanoles Dihidrochalconas Hidroxicinamatos	673 mg/Kg peso seco 318 mg/Kg peso seco 861 mg/Kg peso seco 562 mg/Kg peso seco
Cáscara de cocos secos	ácido 4-Hidroxibenzoico Ácido ferúlico	13 mg de polifenoles/g peso seco

Nota: CE: Equivalentes de catequina; CGE: Equivalentes de galatocatequina.

Fuente: Balasundram, N., et al., 2005.

A pesar de los esfuerzos por el reciclaje de los subproductos de la industria, solamente unos cuantos se han desarrollado con éxito para la obtención de compuestos bioactivos a nivel industrial, de las vastas cantidades de residuos generados por la industria procesadora de alimentos. Se ha hecho patente que los residuos de fresa, remolacha y brócoli, no tienen eficiencia práctica para la recuperación de los compuestos fenólicos.

Entre los residuos que han tenido éxito son la semilla de la uva y extractos de la oliva. Sin embargo, existen fuertes candidatos para la extracción de compuestos bioactivos, que por sus altos volúmenes de producción y alto potencial antioxidante confirmado (Ej. El tomate, la manzana y la alcachofa), soportado además por el hecho de que los polifenoles se han hallado principalmente en las cáscaras y que las condiciones de proceso (escaldado, prensado etc.) no influyen sobre el contenido fenólico, son viables para la extracción de compuestos bioactivos (Peschel, W., *et al.*, 2005). Compuestos fenólicos con actividad antioxidante han sido identificados en algunos subproductos agro-industriales, tales como; en la cáscaras de arroz, trigo y almendras. La cáscara del pistache es otra fuente de antioxidantes fenólicos, ya que contiene por encima de 34 mg de ácido tánico/ g cáscara seca.

Los residuos de la industria de cítricos, si son utilizados óptimamente podrían ser fuente importante de compuestos fenólicos, ya que contienen altas cantidades de polifenoles con respecto a las porciones comestibles; ya que se ha hallado que el contenido de polifenoles en cáscaras de limón y naranja son más altos que la parte comestible. Del mismo modo, las cáscaras de manzana, durazno y peras, contienen aproximadamente el doble de polifenoles, que en su parte carnosa (Balasundram, *et al.*, 2005; Peschel, W., *et al.*, 2005; Naczki, M., Shahidi, F., 2004; Moure, A., *et al.*, 2001; Shieber, A., *et al.*, 2001). Otros compuestos que han sido derivados de los subproductos y han presentado actividad antioxidante; son: el dipéptido de carnosina (beta-alanil-L-histidina), los hidrolizados de proteína, péptidos solubles de elastina, proteínas solubles en agua y la β -lactoglobulina presurizada.

Los aceites esenciales, ácidos linoleicos conjugados y los fosfolípidos también presentan actividad antioxidante. Productos de reacciones de Maillard también han sido reportados como agentes antioxidantes (Moure, A., *et al.*, 2001; Shieber, A., *et al.*, 2001). Por todo esto, los residuos agroindustriales, son buenas fuentes de compuestos fenólicos y están siendo explorados como fuente de antioxidantes naturales, por lo que es interesante evaluar los aspectos prácticos de eficiencia en la extracción, disponibilidad de suficiente material de desperdicio y las consideraciones toxicológicas y de seguridad.

2.7.1. Residuo Industrial de la Producción de Jugo de Manzana como fuente de compuestos fenólicos.

El residuo sólido de la producción de jugo de manzana, es una mezcla heterogénea que contiene el “corazón”, las semillas, cáscara, cáliz, tallos y parte suave de los tejidos del fruto de manzana (*Malus sp.*, Rosaceae). Este subproducto, es el residuo más grande a nivel mundial y en México se estima que durante el año 2005, se produjeron alrededor de 42 mil toneladas (<http://dgcnesyp.inegi.gob.mx>). Por tanto, con el compromiso de reciclaje de este residuo, algunas de las aplicaciones que se han hallado a escala industrial son: como forraje, fertilizante, combustibles, en la producción de etanol, ácido cítrico, pectinas, aromatizantes y saborizantes. En este contexto es deseable buscar productos de alto valor añadido derivados del residuo sólido de la industrialización del jugo de manzana, para su posible explotación económica (Lu, Y., Foo, L. Y., 1997; 1999; 2000).

El interés en este residuo en particular, es debido a los efectos proyectores *in vivo* e *in vitro* a la salud generados principalmente por los polifenoles hallados de manera cuantitativa en la cáscara y residuo sólido del procesamiento de la industria de jugos (Wilms, L. C., *et al.*, 2005; Akiyama, H., 2005; Balz, F., Lotito, S. B., 2004; Van der Sluis, A., Dekker, M., Skrede, G., Jongen, W. F. M., 2002; Lu, Y., Foo, L. Y., 1999).

Entre las clases mayoritarias de los polifenoles de la manzana, podemos hallar a los flavan-3-ol, que son preponderantes, llegando a estar presentes en formas monoméricas llamadas catequinas, o en su forma polimérica, conocidas como procianidinas. Éstas últimas, contribuyen a la astringencia y acidez de la manzana y sus productos derivados, además de inducir la formación de coloides y precipitados durante el almacenamiento del jugo y la sidra, debido a que tienen la capacidad de asociarse a las proteínas y polisacáridos.

Los ácidos hidroxicinámicos son la segunda clase presente en cantidad, y junto con las catequinas, están involucradas en el fenómeno de oscurecimiento, que se lleva a cabo durante el procesamiento de los productos de manzana, además de ser los responsables de la coloración amarillo y naranja de los productos de manzana.

Las dihidrochalconas, flavonoles y antocianinas son los componentes minoritarios que contribuyen a la pigmentación de las manzanas, y a la actividad antioxidante de las manzanas y productos derivados (Alonso-Salces, R. M., *et al.*, 2005); ésta composición y concentraciones de los polifenoles mayoritarios son también dependientes de la variedad como se ilustra en la tabla 9.

Tabla 9. Composición y Cuantificación de Antioxidantes Mayoritarios en algunos cultivos de Manzana.

ANTIOXIDANTE	Variedad					
	Golden Delicious	Cortland	Monroe	Rhode Island Greening	Empire	NY674
	(mg/100 g manzana fresca con piel)					
vitamina C	16.6	12.17	9	14.22	13.22	11.62
ácido clorogénico	8.48	5.36	10.08	14.28	11.52	4.4
Epicatequina	7.12	8.32	10.72	19.16	2.28	4.32
glicósidos de phloretina						
glucósido	1.8	1.44	2.4	2.08	2.8	1.84
xyloglucósido	1.92	3.2	4.92	5.88	1.72	3.56
procianidina B2	6.28	11.32	8.32	21.68	3.44	5.04
glicósidos de quercetina						
arabinósido	2.16	2.4	4.44	2.88	2.76	1.56
xylósido	1.68	1.08	2.28	1.92	2.16	1.2
glucósido	2.4	1.56	2.4	1.2	2.4	0.36
galactósido	4.2	3.36	4.8	4.32	4.2	1.92
rhamnósido	3.84	2.28	3.12	4.08	3.84	2.4
TOTAL	56.48	52.49	62.48	91.7	50.34	38.22

Fuente. Won, Lee, K., *et al.*, 2003.

Estudios previos han reportado a este residuo como una buena fuente de compuestos bioactivos, Van der Sluis, A., *et al.*, 2002, reporta alrededor de 599 mg polifenoles/kg residuo fresco y un extracto con una actividad antioxidante del 78% evaluada por el método *in vitro* de peroxidación lipídica (LPO).

Lu, Y., Foo, L. Y., 1997, caracterizaron y cuantificaron los polifenoles mayoritarios (Tabla 10) presentes en el residuo sólido de la industrialización del jugo de manzana variedad *Gala*; reportando lo siguiente:

Tabla 10. Cantidad de compuestos mayoritarios en bagazo de manzana determinado por HPLC.

COMPUESTO	CANTIDAD (g/Kg peso seco)
Epicatequina	0.64
Ácido cafeico	0.28
3- Hidroxiphloridzina	0.27
Phloretina- 2' - Xiloglucosido	0.17
Phloridzina	1.42
Quercetina-3-galactosido	1.61
Quercetina-3-glucósido	0.87
Quercetina-3- xylosido	0.53
Quercetina-3-arabinosido	0.98
Quercetina-3-rhamnosido	0.47
Total	7.24

Fuente: Lu, Y., Foo, L.Y., 1997.

2.7.2. Antioxidantes Naturales en Alimentos.

Debido a que los antioxidantes sintéticos están siendo sustituidos por los compuestos fenólicos, la investigación hacia los antioxidantes naturales se ha incrementado en sobremanera en la última década, ya que en la mayoría de los casos son considerados como GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros).

Se ha reportado que los extractos de romero (carnosol y ácido carnosinico) son antioxidantes efectivos en aceites de maíz, cacahuete, soya y aceite de pescado, que sin embargo son inefectivos e incluso pueden actuar como prooxidantes en emulsiones de aceite vegetal/agua. Los extractos de romero, usado en combinación con los antioxidantes sintéticos, en proporción de 75:25, 50:50 y 25:75 proveen de mayor protección contra la oxidación del aceite de soya. Actualmente se ofrecen suplementos alimenticios de este extracto, tales como; Bordantix® powder, comercializado por Extractos Vegetales S.A. en España.

Los extractos de té verde desclorofilizados (DGTE) empleados en concentraciones de \geq 200 ppm tienen una alta actividad antioxidante superior a las de los antioxidantes BHA, BHT y α -tocoferol, pero inferior a la de TBHQ (Balasundram, N., *et al.*, 2005).

McCarthy, T.L., 2001, evaluó que las catequinas del té son los más efectivos antioxidantes en formulaciones de patés de puerco cocidos.

Extractos de trigo duro (*Triticum aestivum*) variedad Trego se han demostrado que son capaces de inhibir la oxidación de aceites de pescado e incluso comparable con él α -tocoferol.

Los compuestos fenólicos del aceite extra virgen de olivo (EVOO) a 400 ppm demostraron un efecto antioxidante comparable contra una mezcla de BHA/BHT a 100 ppm (1:1) durante la oxidación térmica de los lípidos de atún a 40 y 100 °C.

Extractos de hojuelas de pistache empleados en una concentración de 0.6% (p/p), brindaron un efecto comparable al BHA y BHT en concentraciones de 0.02% durante la inhibición oxidativa de aceite de soya a 60 °C.

Catequinas del té han sido más efectivas que él α -tocoferol en concentraciones equivalentes de 300 ppm inhibiendo la oxidación lipídica de carne frescas y pescado (Balasundram, N., *et al.*, 2005).

CAPITULO 3

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Las actividades que se realizaron son las siguientes:

Primera Parte: Extracción de antioxidantes naturales a partir del residuo sólido de manzana, proveniente de la industria de jugos.

- Extracción sólido-líquido con agitación (Método A).
- Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Método B).
- Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Método C).
- Hidrólisis Química de los Extractos Crudos (Pintor, Pérez, Ma. del C., 2003).
- Cuantificación de Fenoles Totales por el método Folin- Ciocalteau (Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E., 1984).
- Cuantificación de Flavonoles y Flavonoides (Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A., 2004).
- Identificación y Cuantificación por HPLC(Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia) (Tsao, R., Yang, R., 2003).

Segunda Parte. Evaluación de la actividad antioxidante del EF (extracto fitoquímico) derivado del residuo sólido de la producción de jugo de manzana.

- Método DPPH (Matthaus, 2002).
- Método ABTS (Re, R., Pellegrini, *et al.*, 1999).
- Método β -caroteno (Lu, Y., Foo, Y. L., 2000).

Tercera Parte. Evaluación de la Oxidación lipídica en Harina de Chía en presencia del EF a diferentes concentraciones frente a un análogo del α -tocoferol (Prueba de Shaal Oven).

- Extracción del aceite de Chía (extracción por lotes).
- Micro método para la Evaluación de Peróxidos (Crowe, T. D., White, P., 2001).
- Método para la Evaluación de Productos Secundarios de Oxidación. Índice de Kreis.

3.1. Diagrama General de Trabajo.

Primera Parte:

Obtención de EF (Extracto fitoquímico) derivado de un residuo de jugo de manzana y caracterización por métodos espectrofotométricos (Fenoles Totales, Flavonoles y Flavonoides) y HPLC.

Segunda Parte:

Evaluación de la Actividad Antioxidante por métodos *in vitro* (Secuestro de Radical DPPH y ABTS, Modelo β -CLAMS).

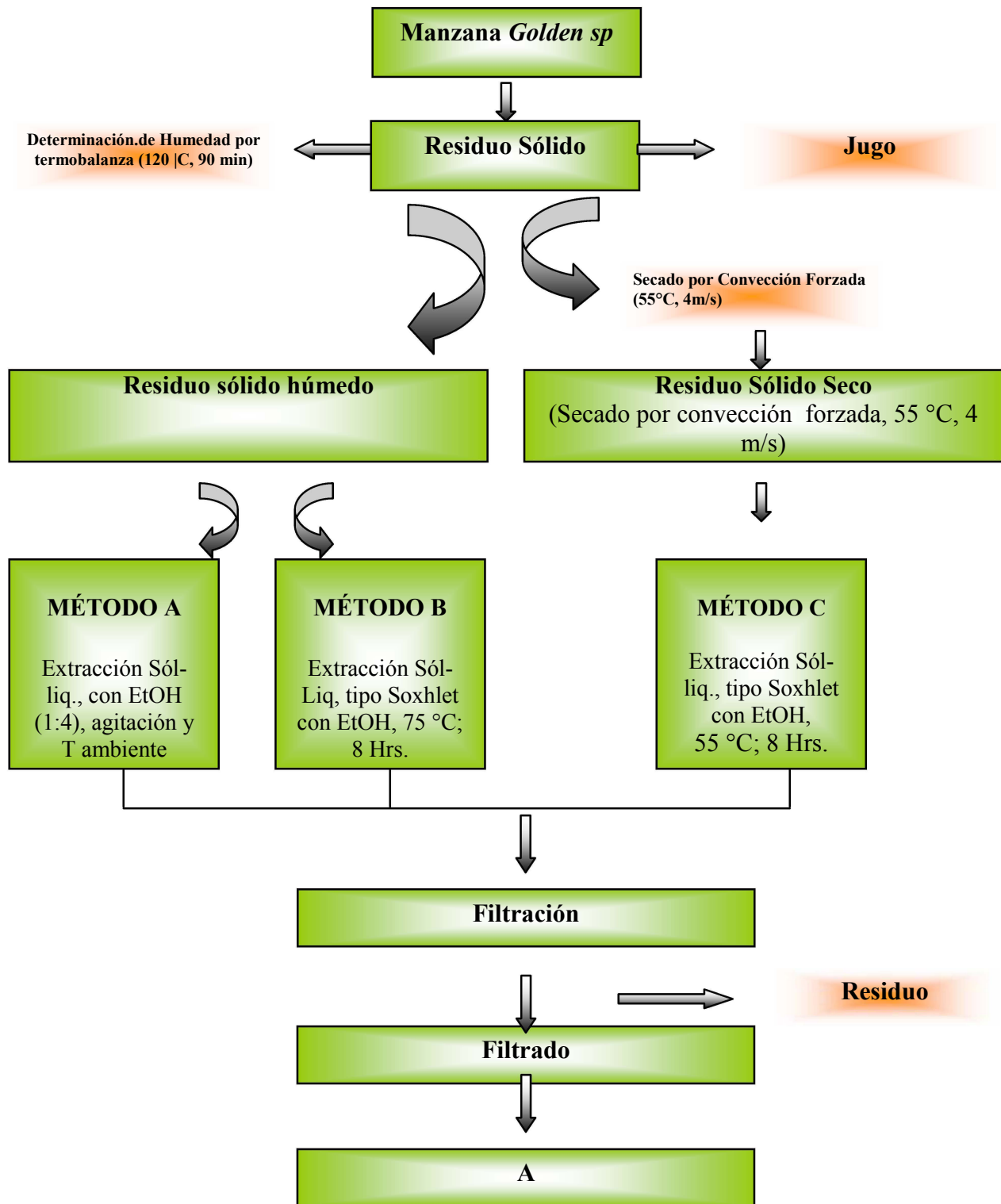
Aspersión en Harina de Chía del EF a diferentes concentraciones (200, 500, 1000 ppm) en base al contenido de grasa *versus* un antioxidante análogo de la vitamina E.

Oxidación de la muestra 45 °C (Prueba de Shaal Oven) en bolsas de polietileno con cierre hermético

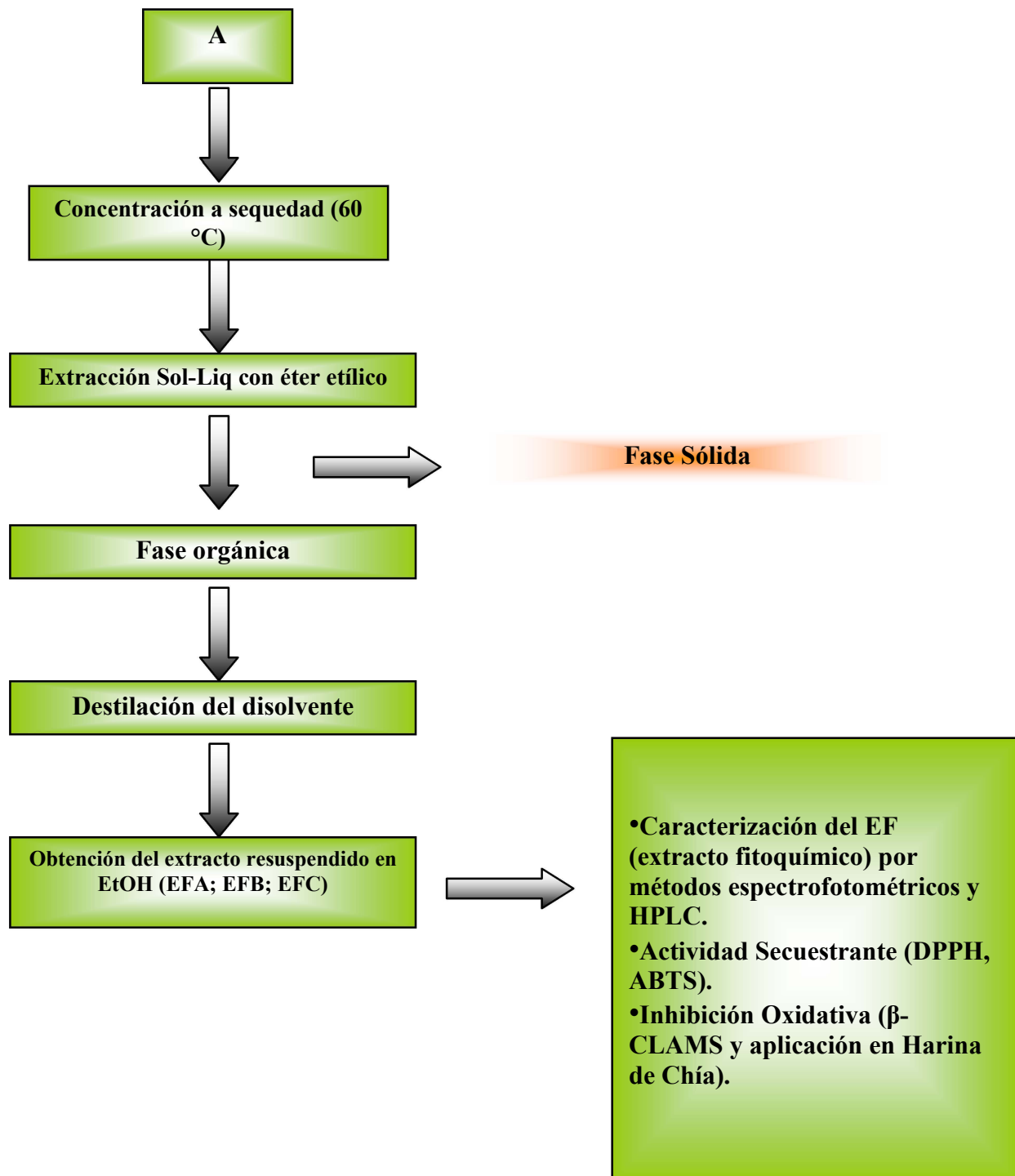
Tercera Parte:

Monitoreo de la Oxidación lipídica (Micro método de determinación de peróxidos e Índice de Kreis).

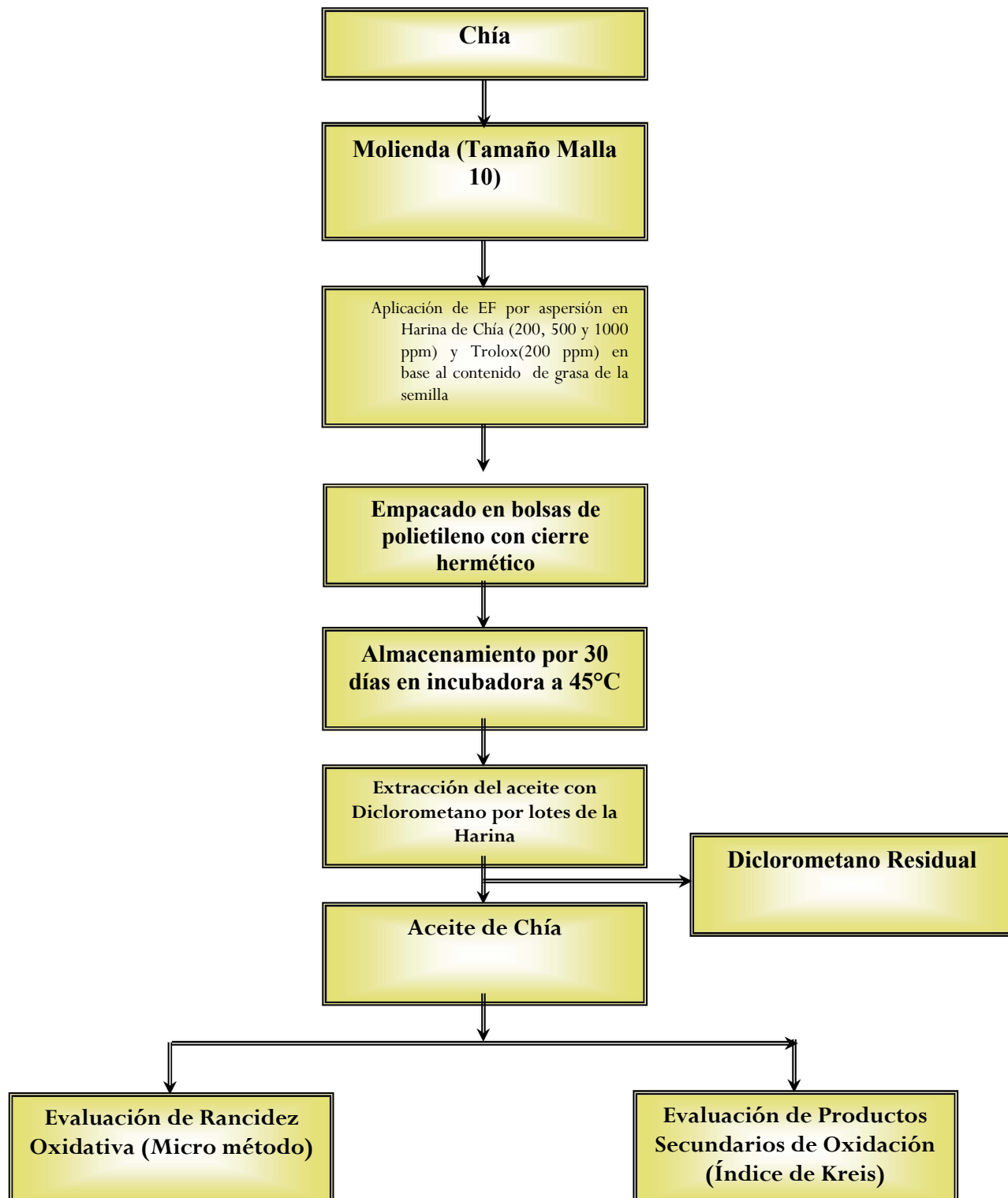
3.2. Diagrama para la Obtención de los Extractos Fitoquímicos Hidrolizados.



(Continuación)



3.3. Diagrama para la Evaluación de la Oxidación lipídica en Harina de Chía en presencia del EF a diferentes concentraciones frente un derivado del α -tocoferol (Prueba de Shaal Oven).



3.4. Reactivos.

3.4.1. Materia Prima

La manzana utilizada (*Malus sp.*, var. *Golden*¹, de 3ra calidad), proveniente del estado de Chihuahua y adquirida en la Central de Abastos de la Ciudad de México, fue sometida a una operación de extracción de jugo y el acondicionamiento del residuo para la extracción de fitoquímicos para los distintos métodos, es detallado posteriormente.

3.4.2. Reactivos

Primera Parte: *Extracción de antioxidantes naturales a partir del residuo sólido de manzana, proveniente de la extracción del jugo de manzana, variedad Golden.*

- **Extracción sólido-líquido con agitación (Método A).**
- **Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Métodos B y C).**

Alcohol Etilico 96% (Química Meyer).

- **Hidrólisis Química del extracto etanólico.**

Metanol (Reactivo analítico, High Purity); HCl (Reactivo Analítico, High Purity).

- **Extracción Sólido- Líquido para la extracción de Aglicones.**

Éter Etilico (Reactivo analítico, Reasol).

- **Cuantificación por el método Folin- Ciocalteau (Taga, M. S., 1984).**

Reactivo Folin Ciocalteau (Hycel de México S.A. de C.V.); Na₂CO₃ (Reactivo Analítico, Reasol); HCl (Reactivo Analítico, High Purity); H₂O destilada.

- **Cuantificación de Flavonoles y Flavonoides (Miliauskas, G., 2004).**

Acetato de Sodio(Reactivo Analítico, Reasol); Cloruro de Aluminio, cristal(Reactivo Analítico, Mallinckrodt); Alcohol etílico 96%(Química Meyer); Ácido Acético Glacial (Reactivo Analítico, Técnica Química).

¹ Grupo la Costeñita. Av. Reforma #538. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua. 31500. México. Tel.: (158) 2 00 15. Fax (158) 20 993. Email: gnorteni@mail.itcac.mx.

- **Identificación y Cuantificación por HPLC (Tsao, R., 2003).**

(+)Catequina (Sigma Chemical Co.); (-)(-)Epicatequina (Sigma Aldrich Chemie); Quercetina Hidratada \geq 95 % (Sigma Aldrich Chemie); Rutina Hidratada(Grado HPLC, Sigma Aldrich Chemie); Acetato de Sodio(Reactivo Analítico, Reasol); Ácido Acético Glacial (Reactivo Analítico, Técnica Química); Acetonitrilo (Grado HPLC, EMD™); el agua y el buffer empleados para el análisis de HPLC, fueron preparados con agua destilada y filtrada a través de un sistema de filtración con una membrana de 0.25 μ m.

- **Método DPPH (Matthaus, B., 2002).**

DPPH, 1,1- Difenil- 2- picrilhidrazilo (Aldrich); Metanol (reactivo Analítico, High Purity); (+)Catequina (Sigma Chemical Co.); (-)(-)Epicatequina (Sigma Aldrich Chemie); Quercetina Hidratada \geq 95 % (Sigma Aldrich Chemie); Rutina Hidratada(Grado HPLC, Sigma Aldrich Chemie); Trolox; TBHQ (Grado Alimenticio, Bresen Química, S.A de C.V.).

- **Método ABTS (Re, R., Pellegrini, N., 1999).**

ABTS, Sal diamonio 2,2'- Azino-bis(3-etilbenzotiazolina – 6 – ácido sulfónico) (Biochemika Fluka); Persulfato de potasio (99%, Sigma Aldrich); Alcohol Etilico 96%(Química Meyer); Agua desionizada.

- **Método β -CLAMS (Lu, Y., Foo, Y. L., 2000).**

β – caroteno (Sigma-Chem); Tween 80 (Canamex S.A. de C.V.); Concentrado de ácidos grasos proveniente de la semilla de chía (60% ácido linolénico, 20% ácido linoleico y 20 % de otros ácidos grasos).

- **Extracción del aceite de Chía.**

Cloruro de Metileno, Reactivo Analítico Reasol.

- **Micro método para la Evaluación de Peróxidos (Crowe, TM., White, P., 2001).**

Tiosulfato de sodio 0.001 N que fue preparado por dilución con agua hervida y fría, a partir de una solución 0.1 N de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Reactivo Analítico, Reasol). La disolución 0.001 N fue estandarizada de acuerdo al método AOAC #942.27, Almidón (Reactivo Analítico, Reasol), Cloruro de metileno (Reactivo Analítico, Reasol), Ácido acético glacial (Reactivo

Analítico, Reasol), Solución saturada de KI(Reactivo Analítico, Reasol), Agua destilada hervida y fría.

- **Método para la determinación de Índice de Kreis.**

Fluoroglucinol (Reactivo Analítico, Reasol), Ácido acético glacial(Reactivo Analítico, Reasol), Cloruro de metileno (Reactivo Analítico, Reasol), Ácido tricloroacético (Reactivo Analítico, Reasol)

3.5. Equipo.

Termobalanza O´Haus; Secador de Charolas SSE 70, Apex Construction LTD; Rotavapor Büchi 205, adaptado a bomba de vacío; Extractor Sólido-líquido PIGNAT (Francia) 9604019; Cromatógrafo de Líquidos De Alta Resolución Beckman 110 A; Detector de Absorbancia de λ (longitud de onda), dual Waters 2487; Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 3B; Extractor de Jugos Tur Mix.

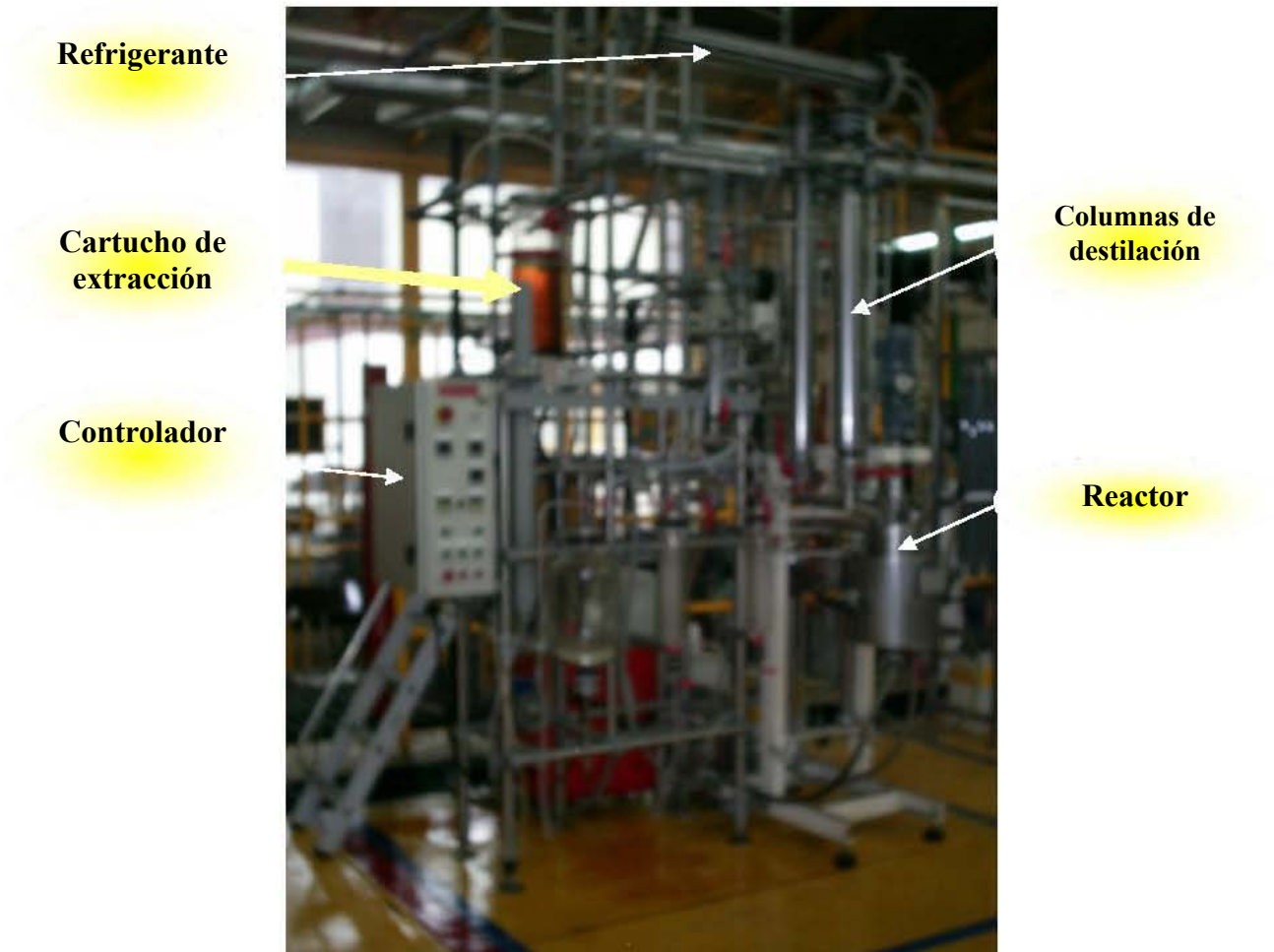


Fig. 5. Extractor Sólido-Líquido PIGNAT (Laboratorio de Ingeniería Química, Facultad de Química, UNAM).

3.6. Metodología.

3.6.1. Extracción sólido-líquido con agitación (Método A).

El método A, consistió en la recepción de la materia prima, la cual fue lavada y descorazonada, se cortó en trozos y se eliminó el jugo empleando un extractor de jugos casero; al residuo de esta operación, se le determinó humedad por termo - balanza (120 °C, 90 minutos).

Para la obtención del extracto etanólico, al residuo sólido de la extracción del jugo de manzana, en lotes de 250 g, fueron colocados en Matracas Erlenmeyer de 4 Litros y se adicionó Alcohol Etílico 96%, hasta una proporción 1:4 (residuo; Alcohol); por un periodo de 24 horas con agitación a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo se filtró y el filtrado se concentró hasta 65% de sólidos (medidos por destilación azeotrópica con Tolueno), en un rotavapor a una temperatura de 60 °C, para la obtención del extracto crudo.

3.6.2. Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Método B).

Para el tratamiento de este residuo se utilizó un extractor sólido – líquido PIGNAT.

La obtención del residuo fue generada como en el método A y la cantidad de bagazo que se trató fue de 1.044 Kg (base seca) que fueron montados en dos lotes en el cartucho de extracción, las condiciones en el extractor fueron las siguientes:

Tabla 11. Condiciones de trabajo para la extracción sólido – líquido tipo Soxhlet, del residuo sólido de la extracción de jugo de manzana.

Condiciones de Trabajo Método B	
P trabajo (mBar)	
T reactor (°C)	74.1 - 75
Tcabeza (°C)	40
Flujo (L/h)	5
Tiempo de extracción (h)	8

Para la obtención del extracto crudo, se eliminó el exceso de disolvente hasta una concentración de 65% de sólidos (medidos por destilación azeotrópica con Tolueno), en un rotavapor a una temperatura de 60 °C.

3.6.3. **Extracción sólido-líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Método C).**

Para el tratamiento de este residuo se utilizó un extractor sólido – líquido PIGNAT. La obtención del residuo fue generada como en el método A, y posteriormente fue secado por convección forzada en un secador de Charolas a 55° C y con un flujo de aire de 4 m/s, hasta alcanzar una humedad del 31% en el bagazo; la cantidad de bagazo que se empleó para este método fue de 584.375 g montado en un solo lote montado en el cartucho de extracción.

Para la obtención del extracto etanólico se utilizaron las siguientes condiciones en el equipo:

Tabla 12. Condiciones de trabajo para la extracción sólido – líquido tipo Soxhlet, del residuo industrial de manzana.

Condiciones de Trabajo MÉTODO C	
P trabajo (mBar)	335 – 450
T reactor (°C)	51 –55
Tcabeza (°C)	22 – 23.1
Flujo (L/h)	
Tiempo de extracción (h)	8

Para la obtención del extracto crudo, se eliminó el exceso de disolvente hasta una concentración de 65% de sólidos (medidos por destilación azeotrópica con Tolueno), en un rotavapor a una temperatura de 60 °C.

3.6.4. Hidrólisis Química de los extractos crudos (Pintor, Pérez, Ma. Del C., 2003).

Por cada 50 g del extracto etanólico, se adicionó una disolución de HCl (50% en MeOH) hasta un volumen final 100 mL, en una concentración final de 0.6 M; y se colocó a reflujo con agitación por tres horas a una temperatura de 80 °C; pasado este tiempo; se separó la fase líquida y se concentró a sequedad en un rotavapor a 60 °C.

3.6.5. Extracción de Aglicones.

A los extractos hidrolizados obtenidos por cada método; se le realizaron extracciones exhaustivas con éter etílico en volúmenes de 50 mL, posteriormente, se separó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente orgánico se eliminó en un rotavapor a temperatura ambiente. Los sólidos obtenidos se resuspendieron en alcohol etílico 96% a un volumen final de 25 mL. Los extractos hidrolizados obtenidos por cada método fueron denominados de la siguiente manera:

- I. Extracto derivado del método de extracción por el método A (EFA);
- II. Extracto derivado del método de extracción por el método B (EFB);
- III. Extracto derivado del método de extracción por el método C (EFC).

3.6.6. Cuantificación del contenido fenólico por el método Folin- Ciocalteau.

El contenido de fenoles totales en los extractos etanólicos hidrolizados fue determinado por el método propuesto por Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E., 1984.

Procedimiento: De los extractos fenólicos hidrolizados, se realizaron diluciones 1:100 y de cada una de éstas; se tomaron 2 ml y se llevaron a un volumen de 5 mL con una disolución de HCl 0.3% (M1). Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL de la disolución M1 y se adicionaron en otro tubo de ensaye el cual contenía 2 mL de una disolución de Na₂CO₃ al 2% (M2); y exactamente después de 2 minutos, posterior a la adición de la alícuota de M1, se adicionaron 100 µL del reactivo de Folin Ciocalteau (1:1 con H₂O destilada). Después de 30 minutos se midió la absorbancia de las disoluciones M2, a 750 nm, usando un espectrofotómetro.

La concentración de polifenoles se calculó usando ácido tánico como estándar y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido tánico. La curva de calibración

del estándar de ácido tánico se realizó con disoluciones etanólicas en concentraciones de 0.0, 0.02, 0.04, 0.08 y 0.1 mg/mL.

3.6.7. Cuantificación de Flavonoles y Flavonoides (Miliauskas, G., 2004).

El contenido de Flavonoides fue determinado por el método descrito por Miliauskas, G.; Venskutonis, P.; R., Van Beek, T., A. 2004; usando rutina, como compuesto de referencia. *Procedimiento:* 1 mL del extracto etanólico (10 g/L); se mezcló con 1 mL de $AlCl_3$ en alcohol etílico 96% (20 g/L). Después se colocó en un baño por 40 minutos a 20 °C y posteriormente se leyó la absorbancia a 415 nm.

El tubo blanco fue preparado con 1 mL del extracto etanólico adicionado de una gota de ácido acético glacial y posteriormente diluido a 25 mL.

La absorción de las disoluciones de rutina fue medida bajo las mismas condiciones.

Las disoluciones estándar de rutina fueron preparadas a partir de 0.05 g de rutina.

El contenido de Flavonoles fue determinado por el método descrito por Miliauskas, G., *et al.*, 2004. La curva de calibración del estándar de rutina se realizó mezclando 2 mL de disoluciones etanólicas de rutina en concentraciones de 0, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.166, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0166 mg/mL con 2 mL de una disolución de $AlCl_3$ (20 g/L) y 6 mL de una disolución de acetato de sodio (50 g/L); posteriormente se colocaron por 2.5 horas a 20° C y se leyó la absorbancia a 440 nm después de este periodo.

3.6.8. Identificación y Cuantificación por HPLC de los EF derivados de un residuo industrial de jugos de manzana (Cromatografía Líquidos de Alta Eficiencia) (Tsao, R.; Yang, R., 2003).

Para la cuantificación e identificación de la mezcla polifenólica por HPLC; se realizaron modificaciones al método propuesto por Tsao, R.; Yang, R., 2003.

La separación fue llevada a cabo con una columna Waters Symmetry® C18 (4.6 X 250 mm). La fase móvil consistió en un sistema binario de; 6% Ácido acético en una solución de Acetato de Sodio 2mM, con pH 2.55 (Solución B); y Acetonitrilo, grado HPLC (Solución A).

La solución B se preparó con una solución 2mM de Acetato de Sodio (Disolver 272.18 mg de Acetato de Sodio, Reactivo Analítico en 1 litro de H₂O destilada), de la cual se toman 940 mL y se mezclan con 60 mL ácido acético glacial ajustando posteriormente el pH al

valor indicado y se filtró a través de un sistema Millipore® a través de una membrana de 25 µm.

El sistema de corrida fue el siguiente y el volumen de inyección fue de 20 µL.

Tabla 13. Condiciones para Identificación y Cuantificación por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución).

Condiciones para HPLC Beckman 110 A			Condiciones del Detector
TIEMPO	DURACIÓN (minutos)	% B	Longitud de onda (nm)
0	20	100	280
20	10	80	
30	50	0	
80	0	0	

Nota: %B = Solución B; Buffer de Acetatos 2 mM, pH 2.55.

3.6.9. Actividad Secuestrante del radical DPPH (Matthaus, B., 2002).

El método está basado en la reducción del radical metanólico DPPH (2,2 – difenil – 1 - picrilhidrazilo) en la presencia de un antioxidante donador de hidrógenos.

La solución de DPPH* muestra una banda de absorción máxima a 517 nm, y la solución tiene una coloración violeta. La absorción y el color disminuyen cuando el radical DPPH* es reducido por un compuesto antioxidante.

Procedimiento.- Se adicionaron 2 mL de una solución metanólica de DPPH (3.6×10^{-5} M) a 50 µL del extracto (200 ppm de fenoles totales calculados a partir del método Folin-Ciocalteu). El decremento de la absorbancia a 517 nm, se registró continuamente cada minuto y durante los 16 minutos siguientes a temperatura ambiente.

El porcentaje de la actividad secuestrante sobre el radical DPPH, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capacidad Secuestrante del Radical DPPH} = \frac{((\text{Absorbancia}_{T=0} - \text{Absorbancia}_{t=16 \text{ min.}})) \times 100}{(\text{Absorbancia}_{T=0 \text{ min.}})}$$

3.6.10. Actividad Secuestrante del Radical ABTS⁺ (Re. R., Pellegrini, N., 1999).

La generación del catión ABTS⁺ [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfónico)], es la base de éste método espectrofotométrico, que puede ser aplicado para medir la actividad antioxidante total de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.

El ABTS; 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína – 6 ácido sulfónico), fue disuelto en 25 mL de agua en una concentración 7 mM (se pesaron 96.019 mg del 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína – 6 ácido sulfónico) en forma cristalina, y se disolvieron en 25 mL de agua desionizada).

El radical ABTS⁺, fue producido agregando 5 mL de una disolución 14.7 mM de persulfato de potasio al matraz anterior y se deja la mezcla en la oscuridad por 12 – 16 horas antes de usarla y radical generado por esta vía es estable por más de dos días, almacenándolo en la oscuridad y a temperatura ambiente.

La solución del radical ABTS⁺, fue diluida con etanol hasta una absorbancia inicial de 0.7 +/- 0.02 a 734 nm a temperatura ambiente.

Procedimiento.- El ensayo se llevó a cabo con 3 mL de la disolución catiónica de ABTS diluida a una absorbancia de 0.7 +/- 0.02 a 734 nm y colocados en una celda con la adición previa de 30 µL del extracto etanólico (200 ppm de fenoles totales calculados a partir del método Folin-Ciocalteu) e inmediatamente después se midió el decremento de la absorción medida cada minuto y durante seis minutos.

El porcentaje de la actividad secuestrante sobre el radical ABTS, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capacidad Secuestrante del Radical ABTS} = \left(\frac{\text{Absorbancia}_{T=0} - \text{Absorbancia}_{t=6 \text{ min}}}{\text{Absorbancia}_{T=0 \text{ min}}} \right) \times 100$$

3.6.11. Sistema modelo del ácido linoleico - β -caroteno (β -CLAMS).

Procedimiento.- El método se llevó a cabo con ligeras modificaciones a la metodología propuesta por Yeap, Foo, L., *et al.*, 2000. El método consistió en saturar agua desionizada con aire por 30 minutos (100 mL) y se preparó una disolución de beta- caroteno (0.2 mg/mL) en diclorometano; después se adicionó 1 mL de esta disolución en un matraz de bola ámbar; el cual contenía 20 mg del concentrado de ácidos grasos y 200 mg de Tween 80. se eliminó el exceso de disolvente en un rotavapor a 35 °C y una vez evaporado se adicionó con agitación a 50 mL del agua saturada con aire para la preparación de la emulsión.

En un tubo de ensayo, se adicionaron 0.2 mL del extracto etanólico (200 ppm de fenoles totales calculados a partir del método Folin-Ciocalteu) y se adicionan 5 mL de la mezcla anterior y se lee la absorbancia a 470 nm (tiempo cero), posteriormente la mezcla se mantuvo en baño maría a 50 °C durante 2 horas; y transcurrido este tiempo se leyó de nuevo la absorbancia (tiempo final).

De manera paralela se corrió un ensayo control adicionando 0.2 mL de etanol con 5 mL de la disolución de beta-caroteno – agua aireada.

Como blanco se usan 0.2 ml de etanol con 5 mL de agua destilada.

El porcentaje de la actividad antioxidante, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Capacidad Antioxidante} = \left[\left(1 - \frac{(\text{Abs}_{T=0} \text{ muestra} - \text{Absorbancia}_{t=120 \text{ min}} \text{ muestra})}{(\text{Abs}_{T=0} \text{ control} - \text{Absorbancia}_{t=120 \text{ min}} \text{ control})} \right) \right] \times 100$$

3.6.12. Aspersión del EF (Extracto fitoquímico) sobre harina de Chía (Prueba de Shaal Oven).

Para la aplicación del extracto en un sistema real, se colocaron 5 lotes de 500 g de harina de Chía (tamaño malla 10) esparcidos sobre una superficie lisa y plana; que posteriormente, fueron asperjados a diferentes concentraciones del EF (200, 500 y 1000 ppm de fenoles totales calculados por el método Folin-Ciocalteu) *versus* Trolox (200 ppm) utilizando como vehículo etanol y en base al contenido de grasa de la semilla (30 % grasa).

Como control, se empleo un lote con la cantidad equivalente de alcohol etílico (96°) asperjada sobre la harina.

Una vez eliminado el alcohol por evaporación, cada lote fue separado en partes de 20 g y cada una de ellas, se colocó en bolsas de plástico con cierre hermético, que posteriormente fueron almacenadas en una estufa a 45 °C por 30 días.

3.6.13. Extracción del aceite de Chía (Extracción por Lotes).

Para la extracción del aceite, se colocaban 15 g. de la harina en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de Diclorometano y la mezcla estaba en agitación por 1 hr.; posteriormente, se filtraban y el residuo sólido era devuelto al matraz al cual se le agregaban 50 mL de Diclorometano por media hora más, se filtró nuevamente y se colectaron las fracciones de Diclorometano, el cual es destilado después en un Rotavapor a una T máxima de 40 °C hasta su eliminación completa.

3.6.14. Micro-método para la Evaluación de Peróxidos.

Se pesaron 0.5 g del aceite y son disueltos en 3 mL de una mezcla Diclorometano/Ácido acético (3:2), agitando hasta la disolución total de la grasa, posteriormente se agregaron 50 µL de una solución de KI saturada (ésta disolución se prepara en el momento de realizar el ensayo) e inmediatamente después se almacenó en la oscuridad por exactamente 1 minuto, después de este tiempo se agregaron 3 mL de agua desionizada y fría. La solución se tituló con una disolución 0.001 N de Na₂S₂O₃ utilizando 1 mL de almidón(1%) como indicador.

Los meq de peróxido se obtienen por la relación:

$$\text{meq peróxido/Kg grasa} = \frac{(\text{mL gastados muestra} - \text{mL gastados blanco}) \times (1000)}{(\text{peso de la grasa (g)})}$$

3.6.15. Método para la Evaluación de Productos secundarios de Oxidación. Índice de Kreis.

Se pesan de 50 – 500 mg de la grasa y se disuelven en 5 mL de Diclorometano, después se agregan 10 ml de Ácido Tricloroacético (30% en ácido acético) y 1 ml de Fluoroglucinol (1% en ácido acético); se agitan y la mezcla se incuba a 45 °C por 15 minutos, se retiran del baño y se enfrían; posteriormente se adicionan 4 mL de Etanol y se lee la absorbancia contra un blanco de reactivos a 540 nm.

Capítulo 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Obtención del Extracto Crudo Etanólico por los Métodos A, B y C.

La extracción de compuestos fenólicos derivados de materiales vegetales es influenciada por el material de origen, su naturaleza química, el método de extracción empleado, el tamaño de partícula, el tiempo y condiciones de almacenamiento, así como sustancias interferentes; sin embargo, el problema general que se encara con la extracción de fitoquímicos es sin duda el origen y acondicionamiento previo de la muestra; ya que la obtención de un extracto tiene como objetivo transferir los fitoquímicos fisiológicamente activos a un estado de disolución evitando el estado patogénico de éstos.

De manera general, los materiales frescos y con un alto contenido de humedad son más difíciles de trabajar que los materiales secos, los cuales pueden ser fácilmente molidos a polvo con relativa facilidad.

Flores, Álvarez, D. M., 2003, indica que una humedad del 12 % es adecuada para la extracción de antioxidantes por maceración; sin embargo, se deben tener en cuenta ciertos parámetros industriales, como son: el económico y la producción. En el 2005, la producción en México se estimó en alrededor de 42 mil toneladas (<http://dgcnesyp.inegi.gob.mx>), por lo que los procesos de secado con temperaturas inferiores a los 60 °C, es realmente costoso para ésta magnitud (Peschel, W., *et al.*, 2005).

En este trabajo, se evaluó la factibilidad de emplear el residuo húmedo para la obtención de fitoquímicos derivados de este residuo.

La elección del disolvente alcohólico, está soportado por estudios previos (Peschel, W., *et al.*, 2005; Pintor Pérez, Ma. Del C., 2003), quienes evaluaron durante la extracción de fitoquímicos derivados de residuos industriales de manzana, distintos disolventes y en mezclas con otros en distinta proporción (Acetona, Agua, Metanol, Etanol/H₂O, etc.) y reportaron que el mayor rendimiento de compuestos fenólicos se obtiene con el disolvente polar, Alcohol etílico, que acoplado a estudios recientes sobre las propiedades fisicoquímicas de la pared celular de la manzana (Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau J. F., 2001), permiten formular hipótesis del tipo de compuestos fenólicos que pueden ser extraídos por los métodos aquí propuestos.

Éstos autores mencionan que tanto los ácidos hidroxicinámicos y epicatequina no están ligados tan fuertemente a la pared celular, mientras que las procianidinas, con un alto grado de polimerización el enlazamiento a la pared es mucho más fuerte, por lo tanto se

esperaría que los extractos crudos contendrán posiblemente un contenido elevado de ácidos hidroxicinámicos y flavanoles.

En la tabla 14, se reportan los rendimientos obtenidos de los extractos crudos en función de los métodos de extracción y se observa que el rendimiento promedio en un solo paso de extracción es de alrededor del 30.23 % para los residuos tratados por el método A y para el método C incluso es superior (48.77 %) y un bajo rendimiento en el extracto crudo es observable para el método B, ya que se obtiene una productividad promedio del 12.67 %; sin embargo, se puede concluir que para los distintos métodos, las extracciones consecutivas no son sugeribles.

Los rendimientos obtenidos por los métodos A y C, son comparables a los reportados por Peschel W., *et al.*, 2005, y Pintor, Pérez, Ma. del C., 2003.

Peschel, W., *et al.*, (2005), reporta un rendimiento del 26 % en un residuo de prensado de manzana y Pintor, Pérez, Ma. Del C., 2003, reporta un rendimiento del 31 %, durante la extracción por maceración con alcohol etílico de un residuo proveniente de la industria sidrera.

Tabla 14. Rendimiento de las extracciones con EtOH (96 %) a partir de un residuo industrial de manzana.

MÉTODO	A	B	C
Característica			
Humedad del Bagazo (%)	79.06 ± 1.3484		31.25 + 0.8269
Rendimiento 1ra Extracción (% base seca)	34.1266%	12.67%	48.77%
Rendimiento 2da Extracción (% base seca)	2.565 ± 0.7990		

Nota:

1. Los datos mostrados son los promedios de tres repeticiones.
2. Método A. En la extracción por este método se empleo el residuo húmedo en agitación con EtOH 96 %, por 24 Hrs. a temperatura ambiente
3. Método B. La extracción fue hecho empleando el residuo húmedo y las condiciones del extractor se detallan en el apartado 3.6.2.
4. Método. C. La extracción fue hecha empleando un residuo que fue secado por convección forzada en un secador de Charolas y con las condiciones del extractor detalladas en el apartado 3.6.3.

De acuerdo al análisis de varianza, con un $\alpha = 0.05$ (ver apéndice 1); podemos establecer que si existe diferencia significativa en los rendimientos obtenidos entre los distintos métodos de extracción; pero no podemos establecer con este análisis, cuales de los valores medios de cada método son iguales y cuales son diferentes, por lo que las comparaciones pareadas entre los distintos métodos son necesarias, haciendo uso del enfoque del intervalo de confianza (ver apéndice 1).

El anterior análisis estadístico determinó con un 95 % de confianza que si existe diferencia significativa al comparar los métodos A *versus* C y entre B *versus* C; más esta diferencia no es significativa al comparar los métodos A con B.

Las diferencias halladas entre los métodos A, B y C, son debidas principalmente a las variables experimentales sobre el método de extracción, las cuales fueron: el acondicionamiento de la muestra previo a la extracción (secado por convección forzada), la temperatura, el tiempo y equipos de extracción empleados durante la obtención de los extractos crudos etanólicos.

Las extracciones más eficientes fueron, en el siguiente orden para los distintos métodos: Método C > Método A > Método B.

A continuación se discutirá, como afectaron las variables sobre la cuantitatividad de los extractos crudos obtenidos.

4.2. Efecto del secado.

En la tabla 14, se reportan los rendimientos obtenidos en función de los métodos de extracción, de la cual se observa que en el método C, el rendimiento se incrementa en una magnitud de 1.6 en comparación al método A y de 3.5 veces mayor en comparación al método B.

El efecto de secar una matriz previa a la extracción por convección forzada, permite inducir la modificación de las propiedades físicas de los componentes presentes en la pared celular del bagazo de manzana, induciendo un colapso sobre las fibras dietéticas, particularmente en los β – glucanos (Ej. Celulosa y Xyloglucanos) y las pectinas; lo que provoca cambios en el área superficial, además de la reducción de la macroporosidad de la pared celular, dando como resultado un mejor acceso del disolvente y por tanto un mayor rendimiento en los sólidos extraíbles (Renard, C. M. G. C.; Le Bourvellec, C., 2005).

Estudios realizados por Pintor, Pérez, Ma. del C., 2003; evaluó dos condiciones de secado (temperatura ambiente y secado por liofilización), de los cuales expone que el

secado a temperatura ambiente proporciona una mayor cantidad de extracto; más, no reporta el contenido de humedad posterior a ésta operación.

El rendimiento de sólidos obtenidos por el método A, no debe descartarse, ya que los resultados son semejantes a los publicados por Peschel W., *et al.*, 2005; quien reportó un rendimiento del 26 %. El rendimiento obtenido empleando el residuo en húmedo, puede deberse a que el agua contenida en los residuos, pudo haberse conjugado con el alcohol etílico cambiando la polaridad del medio, lo que permitió una mayor solubilidad de compuestos en la mezcla Etanol/Agua (Moure, A., *et al.*, 2001). Por lo tanto, el acondicionamiento de la muestra previo a la extracción de los antioxidantes fitoquímicos, constituyó un paso clave y determinante en el rendimiento del extracto crudo (Tsao, R., Deng, Z., 2004; Moure, A., *et al.*, 2001).

4.3. Extracción Sólido – Líquido PIGNAT, tipo Soxhlet (Métodos B y C).

De acuerdo a la tabla 14, el método C, constituye el procedimiento de extracción más eficiente para la obtención cuantitativa de un extracto crudo; sin embargo, se debe de entender que para éstos dos métodos, se tienen dos variables:

1. temperatura durante la extracción, y
2. secado previo de la muestra.

Las cuales son influyentes en la cuantitatividad del rendimiento.

Las diferencias encontradas en los extractos crudos entre los métodos B y C, puede deberse al estado de madurez del cual provenía el residuo. Alonso-Salces, R. M., Berrueta, L. A., Barranco, A., Corta, E., Gallo, B., Vicente, F., 2005; exponen razones suficientes que explican que el grado de madurez de la manzana tiene una influencia notable en la concentración de polifenoles. Esta variable adicional, en el método B, dio como resultado un extracto de color verde con la formación de un precipitado, que de acuerdo a Alonso-Salces, R. M., *et al.*, 2005, son principalmente clorofilas que pueden ser extraídas conjuntamente con los polifenoles durante la extracción sólido-líquido de los materiales vegetales que contengan este tipo de compuestos, por lo que al separar las clorofilas del extracto disminuyó el contenido de sólidos.

El efecto de la temperatura durante la extracción tiene un mayor impacto en el método B; observable en la disminución del rendimiento comparado con aquellos obtenidos por los métodos A y C.

Esto puede deberse a que el incremento en la temperatura, aumenta la velocidad de las reacciones de oxidación, lo que constituye un problema para los compuestos fenólicos, dado que éste grupo puede ser fácilmente transformado a quinonas con la subsecuente polimerización afectando la integridad de los polifenoles e impidiendo, por tanto su extracción. Tsao, R., Deng, Z., 2004, menciona que aunque la mayoría de antioxidantes fenólicos son estables a altas temperaturas, otros como catequina y epicatequina pueden ser degradadas.

4.4. Contenido Fenólico: Cuantificación de Flavonoides y Flavonoles en los extractos hidrolizados.

La tabla 15, muestra la influencia del método de extracción sobre la concentración de fenoles totales (TPC), medidos por el método Folin – Ciocalteau para los distintos lotes evaluados, cabe señalar que el reactivo de Folin – Ciocalteau, no es específico y detecta todos los grupos fenólicos hallados en el extracto, incluyendo los residuos de aminoácidos aromáticos de las proteínas y otras sustancias reductoras como los azúcares libres y el ácido ascórbico (Naczki, M., Shahidi, F., 2004; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Matthaus, B., 2002); por lo tanto, la concentración del contenido fenólico puede dar una sobreestimación del contenido fenólico “real” de la muestra.

Tabla 15. Influencia del Método de Extracción sobre la Concentración de Fenoles Totales (TPC) derivados del residuo industrial de jugo de manzana.

Muestra	MÉTODO		
	A	B	C
Residuo de Manzana			
TPC (mg Ácido Tánico/Kg residuo base seca)	2689.27	1123.6	3772.1

Nota:

1. Los datos mostrados son los promedios de tres repeticiones.
2. Método A. En la extracción por este método se empleo el residuo húmedo en agitación con EtOH 96 %, por 24 Hrs. a temperatura ambiente
3. Método B. La extracción fue hecha empleando el residuo húmedo y las condiciones del extractor se detallan en el apartado 3.6.2.
4. Método. C. La extracción fue hecha empleando un residuo que fue secado por convección forzada en un secador de Charolas y con las condiciones del extractor detalladas en el apartado 3.6.3.

De acuerdo a los resultados hallados en el contenido fenólico, los valores entre cada método son variables, siendo el método C el que presentó una mayor cantidad de fenoles totales (3772.1 mg ácido tánico/ Kg bagazo seco); seguido del método A (2689.27 mg ácido tánico/ Kg bagazo seco) y por último, el método B (1123.6 mg ácido tánico/ Kg bagazo seco). Estos bajos valores del método B, se deben principalmente por las condiciones de extracción y el acondicionamiento de la muestra previo a la extracción (Naczka, M., Shahidi, F., 2004). Moure, A., *et al.*, 2001, menciona que la composición del contenido fenólico en los extractos naturales es un proceso multifactorial, debido a: la calidad de la fuente origen, la región geográfica, las condiciones climáticas, tiempo de cosecha y almacenamiento, factores ambientales y tecnológicos que afectan la actividad y el contenido fenólico de los residuos industriales, así como las condiciones del proceso de extracción para la obtención de los extractos, etc.; sin embargo, no existe hasta ahora una relación directa entre el contenido fenólico con la actividad antioxidante.

A continuación se muestran los valores del contenido polifenólico en estudios previos de manzana:

- I. Peschel, W., *et al.*, 2005, obtiene un extracto polifenólico de 1.9 mg GAE/g de residuo de prensado fresco (GAE=Equivalentes de ácido galico) y hasta de 46 g GAE/ Kg residuo sólido de manzana base seca, de residuos provenientes de una industria de jugos.
- II. Leontowics, H., 2002; analizó los compuestos bioactivos en manzana entera de una variedad silvestre obteniendo 6.8 mg GAE/Kg manzana fresca sin cáscara; y en cáscaras obtiene un valor promedio de 12 mg GAE/Kg cáscara fresca.
- III. Van der Sluis, A., *et al.*, 2002; halló 599 mg de flavonoides y ácido clorogénico/ Kg residuo prensado fresco cuantificados por HPLC.
- IV. Won, Lee, K., *et al.*, 2003; reporta un contenido fenólico, empleando manzana fresca con cáscara, var. *Golden Delicious*, de 56.48 mg fenoles totales/100 g.
- V. Lu, Y., Foo, L. Y., 1997, evaluaron los polifenoles mayoritarios en bagazo de manzana var. *Gala* y hallaron la cantidad 7.4 g Fenoles Totales/Kg base seca medidos por HPLC.

Sin embargo, debido a que existe una gran cantidad de estudios y una alta variabilidad de éstos; son sólo pocos los que ofrecen un método con condiciones reproducibles, ya que a menudo sus metodologías analíticas llevan a “cuellos de botella”, que a nivel industrial serían un caos reproducir.

Debido a esta variedad y heterogeneidad de los resultados, lo que deberá valorarse para nuestro estudio son dos factores: las condiciones de extracción y el estado de madurez.

Estudios recientes sobre la relación del contenido fenólico con el estado de madurez, indican que los fenoles totales y el contenido de procianidinas son inferiores en la pulpa y la cáscara de manzanas inmaduras. De igual forma, los flavonoles y antocianinas hallados en la cáscara y los ácidos hidroxicinámicos, así como los flavan-3-oles en la pulpa tienen una concentración más alta en las frutas maduras; además de que el promedio del grado de polimerización de las procianidinas son considerablemente más altos en las frutas inmaduras que en las maduras (Alonso-Salces, R. M., *et al.*, 2005).

Y dado que, Peschel, W., *et al.*, 2005, ha reportado hasta 46 g equivalentes de ácido gálico/Kg residuo sólido base seca, debemos suponer algunas hipótesis que pueden formularse para los resultados obtenidos, ya que por el método C, que fue el método más cuantitativo, sólo fue posible obtener 3.772 g equivalentes de ácido tánico/Kg residuo.

Las hipótesis que se proponen son las siguientes:

1. El bajo rendimiento puede deberse a la rápida oxidación del bagazo durante la extracción. Las catequinas, junto con el ácido clorogénico son buenos sustratos para la enzima polifenoloxidasa, que en la presencia de oxígeno forma complejos coloridos café; y aunque otros compuestos fenólicos, como los flavonoles, no son sustratos para esta enzima, éstos están presentes en una concentración minoritaria en el residuo de esta variedad (Won, Lee, K., *et al.*, 2003; Van der Sluis, A., *et al.*, 2002).
2. Debido al origen de obtención del residuo, es posible que una gran cantidad de compuestos fenólicos hayan sido transferidos al jugo (Peschel, W., *et al.*, 2005). Esta hipótesis puede soportarse por estudios recientes de Renard, C. M. G. C., Le Bourvellec, C., Bouchet, B., 2005 y Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J. F., 2001, quienes han expuesto la relación existente entre los polifenoles y la pared celular de la manzana; los cuales indican que algunos polisacáridos tienen la habilidad de formar un gel o desarrollar estructuras secundarias, formando una especie de bolsas hidrofóbicas capaces

de encapsular y formar complejos que podrían trasladarse al jugo durante su obtención.

La tabla 16, muestra la influencia de los métodos de extracción en la cuantificación de flavonoides y flavonoles derivados de los residuos analizados; la relevancia de cuantificar estos dos grupos es que tanto en estudios *in vitro* e *in vivo*, son los fitoquímicos que han presentado una mayor actividad biológica que puede ser benéfica (Wilms, L. C., *et al.*, 2005; Hollman, P. C. H., Katan M. B., 1999; Gross, G. G., Hemingway, W. R., Yoshida, T. 1999).

Balansundram, N., *et al.*, 2005; reportó el contenido de grupos fenólicos en bagazo de manzana seco con valores de 673 mg Flavonoles/Kg; 318 mg Flavonoles/Kg; 861 mg Dihidrochalconas/Kg Y 562 mg de Hidroxinamatos/Kg.

De acuerdo a la tabla 16, se establece que la cantidad presente en los residuos después de la hidrólisis obtenidos por los métodos A y C, la concentración es promedio a la obtenida por Balansundram, N., *et al.*, 2005, a excepción del método B, donde los valores obtenidos son inferiores (ver tabla 16), debido presumiblemente por el estado de madurez de la manzana y la temperatura durante la extracción. Este método de cuantificación fue evaluado espectrofotométricamente, siendo ésta una desventaja, ya que por la heterogeneidad del extracto obtenido, otras sustancias pueden dar reacción positiva con el $AlCl_3$, sobreestimando la cuantificación de éstos grupos fenólicos .

Van der Sluis, A., *et al.*, 2002; analizó la relación del contenido fenólico en cada etapa del proceso de elaboración de jugos de manzana derivado de dos métodos: prensado y tratamiento enzimático, del cual concluye que los grupos mayoritarios presentes en el residuo sólido son tres en ambos métodos: glicósidos de quercetina > catequinas totales > ácido clorogénico; por lo tanto, los valores obtenidos en la cuantificación de flavonoles en nuestro estudio son un grupo mayoritario presente en los extractos hidrolizados derivados de este residuo de jugo de manzana var. *Golden*.

Tabla 16. Influencia del método de Extracción en la Concentración de Flavonoles y Flavonoides en el residuo sólido derivado de un residuo industrial de jugos de manzana

Muestra	Residuo		
	A	B	C
Flavonoides (mg ER/Kg residuo b.s.)	92.988 +/- 0.076	38.023 +/- 0.005	126.93 +/- 0.012
Flavonoles (mg ER/Kg residuo b.s.)	561.92 +/- 0.530	192.38 +/- 0.008	766.6 +/- 0.354

Nota:

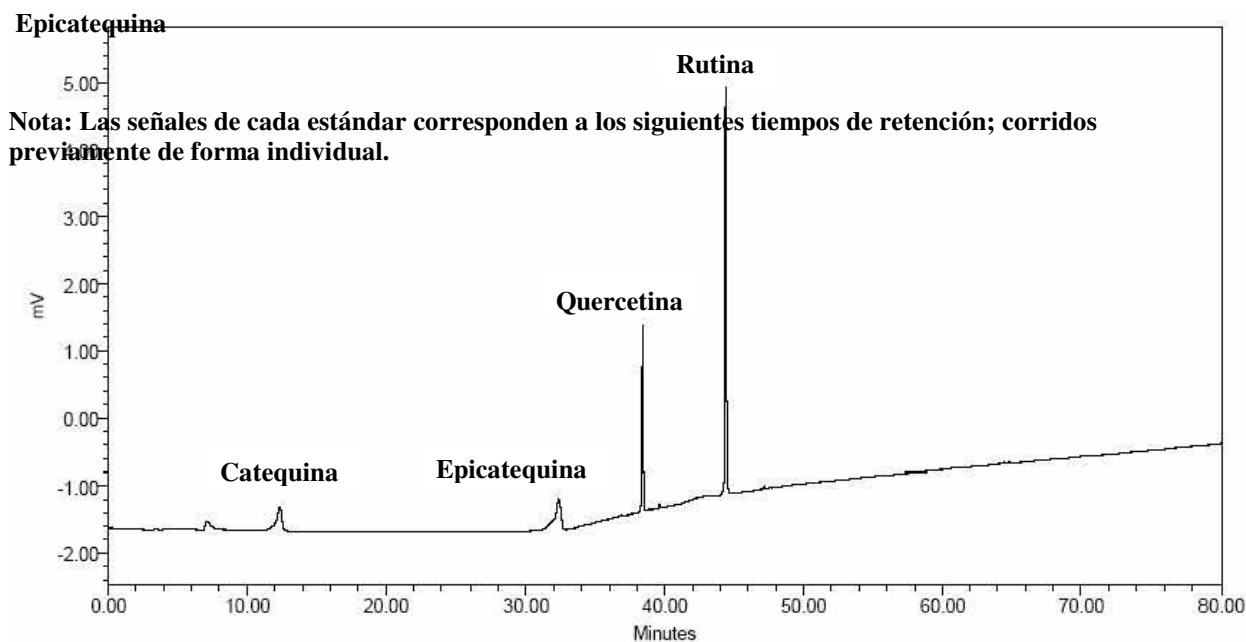
1. Los datos mostrados son los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.
2. Método A. En la extracción por este método se empleo el residuo húmedo en agitación con EtOH 96 %, por 24 Hrs. a temperatura ambiente
3. Método B. La extracción fue hecha empleando el residuo húmedo y las condiciones del extractor se detallan en el apartado 3.6.2.
4. Método. C. La extracción fue hecha empleando un residuo que fue secado por convección forzada en un secador de Charolas y con las condiciones del extractor detalladas en el apartado 3.6.3.
5. ER = equivalentes de rutina.

4.5. Identificación y Cuantificación de los extractos hidrolizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Para poder hacer el análisis de los extractos, se emplearon estándares comerciales de catequina, epicatequina, quercetina y rutina, por ser compuestos con actividad antioxidante que se encuentran mayoritariamente en el fruto, a excepción de rutina que se encuentra en una proporción mínima (Lu, Y., Foo, L. Y., 1997). Los estándares fueron utilizados como patrones de referencia para los extractos obtenidos durante el análisis y la fig. 6, muestra el cromatograma de la mezcla de estándares empleados.

Lu, Y., Foo, L. Y., 1999, identificó los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de manzana var. *Gala*, sin embargo el método analítico difiere por mucho del método cuantitativo, que es lo que realmente se requiere para el aprovechamiento en la extracción de los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de manzana, por la producción que de éste se genera.

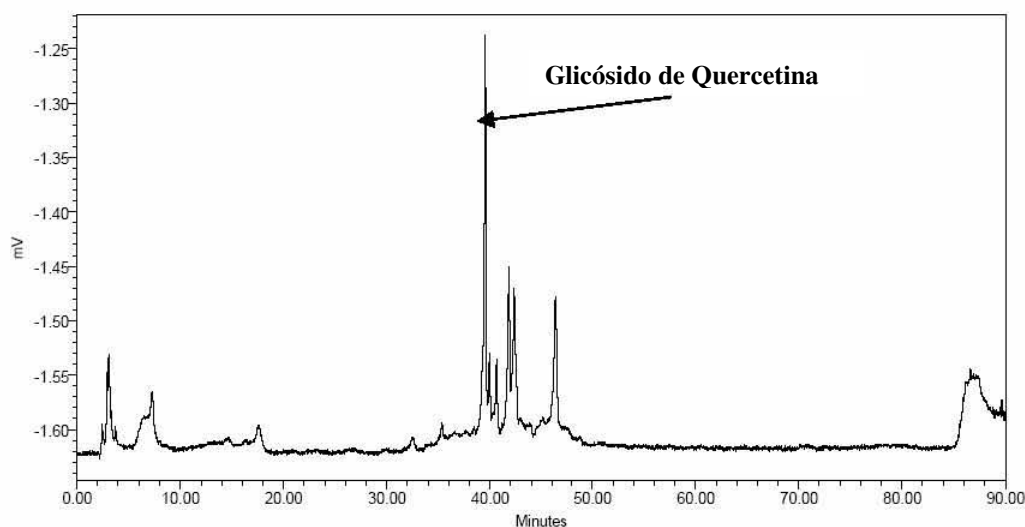
Fig 6. Cromatograma de la mezcla de estándares corridos con 6% Ácido Acético en 2mM de Acetato de Sodio a una longitud de 280 nm.



Compuestos glicosilados presentes en los extractos etanólicos crudos.

Mucho se ha comentado que la cantidad y calidad de polifenoles extraídos depende de las condiciones de extracción, sin embargo, los flavonoles, al igual que la mayoría de los flavonoides carecen de un grupo 3 - hidroxilo, que generalmente esta glicosilado en la posición 3 del anillo C (Gross G. G., *et al.*, 1999), por tanto, al hacer una corrida del extracto crudo etanólico, permite identificar que señales de posibles compuestos glicosilados están presentes en los extractos y cuáles de éstas, son mantenidas después de los procesos de hidrólisis y extracción con éter . La fig. 7, muestra el cromatograma de los compuestos extraídos con el alcohol etílico.

Fig. 7. Cromatograma del extracto etanólico, en una longitud de 280 nm.

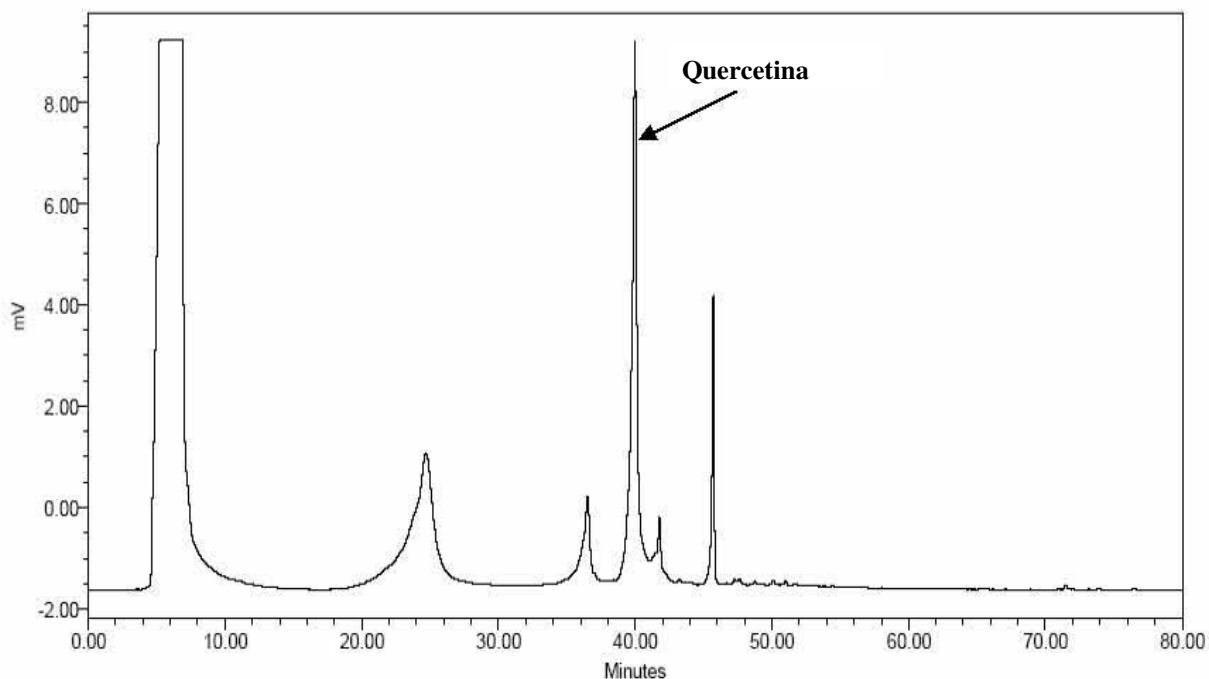


Del cromatograma de la fig. 7, podemos identificar principalmente el registró de señales muy débiles, lo que ratifica, que estos compuestos al estar glicosilados o unidos entre ellos formando unidades poliméricas, tienen una respuesta inferior a la forma libre.

Comparando estas señales con las obtenidas con la mezcla de estándares, podemos observar que la señal en 38 minutos es la mayoritaria, correspondiente a quercetina, de lo cual podemos suponer que las señales desplazadas a su derecha posiblemente sean glicósidos de ésta, tales como: Quercetina-3-galactósido, Quercetina-3-glucósido, Quercetina-3- xylósido o Quercetina-3-arabinósido (Lu, Y., *et al.*, 1999).

Las Fig. 8, 9 y 10, muestran los cromatogramas de los EF hidrolizados derivados de los distintos métodos de extracción empleados.

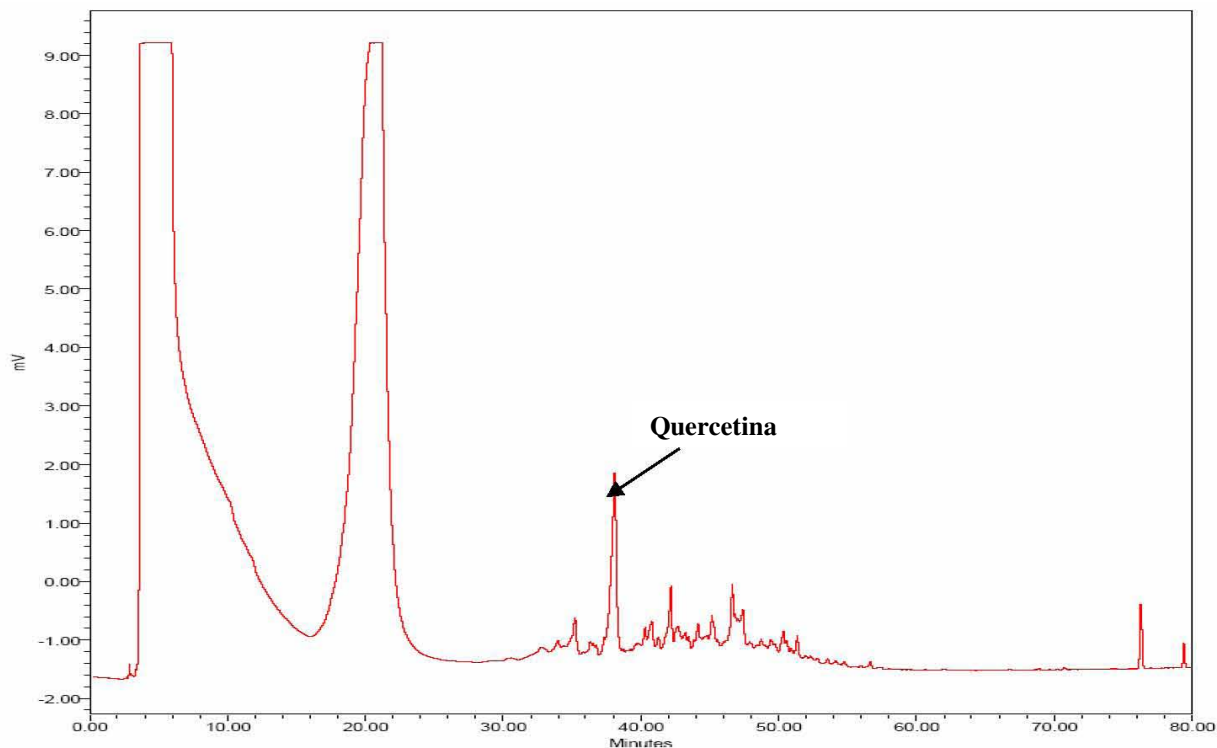
Fig. 8. Cromatograma de Extractos etanólicos Hidrolizados obtenidos por el método A, en una longitud de 280 nm.



Las señales que se identifican originadas por el método A y bajo este sistema, se detallan en la siguiente tabla:

MÉTODO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA	% ÁREA	COMPUESTO	CUANTIFICACIÓN
A	5.35	1458590	67.08		27.11 mg quercetina/ mL extracto
	24.694	308395	14.18		
	36.508	60179	2.77	Considerando éstas 3 señales provenientes de quercetina	
	39.982	269210	12.38		
	41.759	14900	0.69		
	45.711	63.162	2.9		

Fig. 9. Cromatograma de los extractos etanólicos hidrolizados, obtenidos por el método B en una longitud de onda de 280 nm



Las señales que se identifican originadas por el método B y bajo este sistema, se detallan en la siguiente tabla:

MÉTODO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA	% ÁREA	COMPUESTO	CUANTIFICACIÓN
B	3.771	2873548	65.11		
	21.171	1597888	35.09		
	38.097	81809	1.8	Quercetina	0.64 mg quercetina/ mL extracto

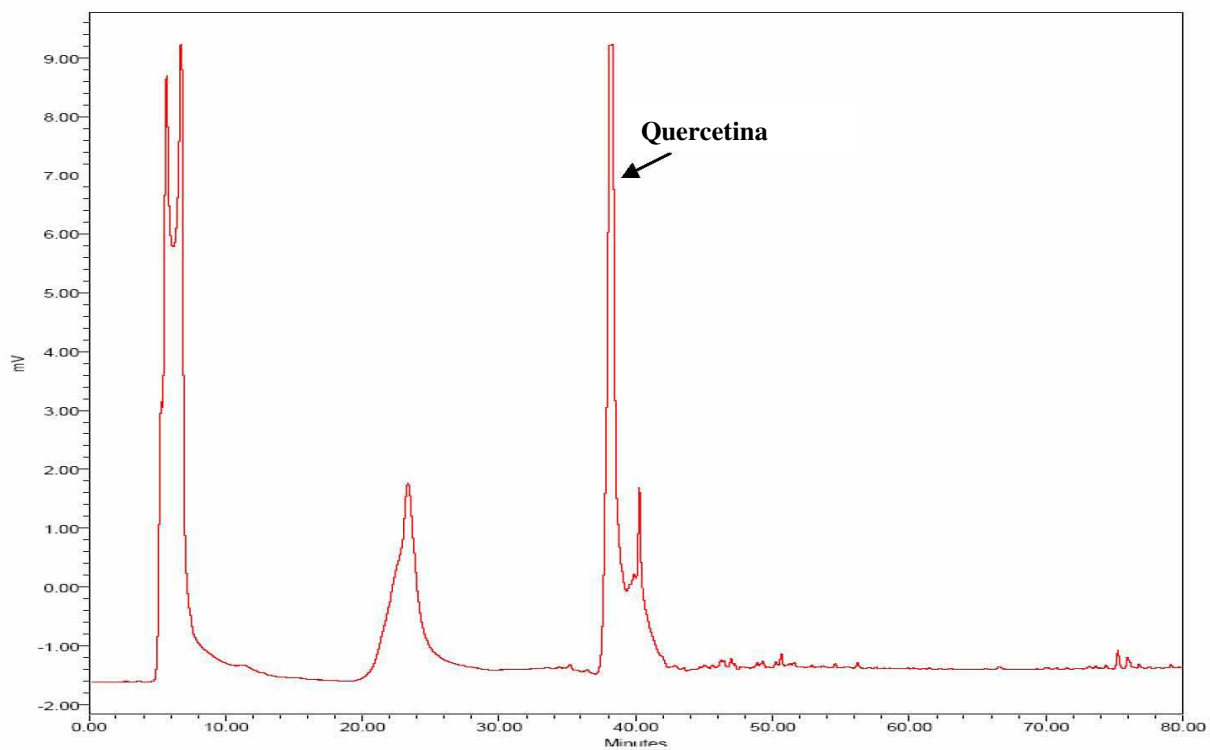


Fig. 10. Cromatograma del extracto etanólico obtenidos por el método C, en una longitud de 280 nm.

Las señales que se identifican originadas por el método C y bajo este sistema, se detallan en la siguiente tabla:

MÉTODO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)	ÁREA	% ÁREA	COMPUESTO	CUANTIFICACIÓN
C	6.762	939 683	46.98		
	23.350	404363	20.22		
	38.217	656010	32.80	Quercetina	51.65 mg quercetina/ mL extracto

De acuerdo a los cromatogramas de las fig. 8, 9 y 10; se puede observar el cambio en la magnitud de las señales de los extractos hidrolizados, en comparación al extracto crudo, debidas principalmente por la liberación de los polifenoles libres posterior a la hidrólisis ácida y tanto la cantidad y calidad de éstos, varían significativamente presumiblemente por las condiciones en los primeros pasos de extracción, lo que repercute de manera significativa sobre la composición del extracto final.

De las distintas señales que son detectadas, sólo la de Quercetina puede ser identificada y la cantidad de ésta, varía ampliamente para cada método evaluado. La cantidad de este compuesto obtenida durante estos ensayos en orden decreciente es el siguiente: Método C > Método A > Método B.

Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., Oksman-Cladentey K-M., 2002, exponen que las condiciones de hidrólisis ácida con reflujo, provocan la pérdida de ácidos fenólicos y sólo una ligera degradación de Quercetina, y esto es comprobable en los tres perfiles de los extractos derivados de cada método, ya que la señal de Quercetina es mantenida aún después de la hidrólisis en los perfiles cromatográficos de los EF. Wach, A., 2005; reporta incluso un incremento de 11.9 veces mayor en el contenido de Quercetina, como aglicon, en cáscaras de manzana posterior a la hidrólisis.

Won, Lee, K., *et al.*, 2003, cuantificó los compuestos antioxidantes mayoritarios en manzana, var. *Golden Delicious*, reportando para esta, en orden decreciente; Vitamina C > Glicósidos de Quercetina > Ácido clorógeno > Epicatequina > procianidina B2 > glicósidos de phloretina; lo que puede suponer que el mayor contenido de antioxidantes presentes en los extractos sean productos de la degradación de los ácidos cafeoilquínicos (ácido clorógeno y sus isómeros), produciendo ácido cafeíco.

La presencia de éste ácido cinámico, aunque no es un constituyente natural de la manzana, podría ser el resultado de dicha degradación, ya que éstos ácidos fenólicos han sido detectados en cantidades apreciables de la var. *Golden* (Lu, Y., Foo, L. Y., 1999; Won, Lee, K., *et al.*, 2003; Van der Sluis, A., *et al.*, 2002).

4.6. Caracterización de los extractos fenólicos.

La caracterización de los extractos fenólicos quedaría resumida en la tabla 17; esta estimación de los distintos grupos evaluados en los extractos, brinda un panorama general de la naturaleza del extracto obtenido, que es mayoritariamente un extracto de hidroxycinamatos. Éstos se distinguen porque su actividad antioxidante está dada al grupo $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$, lo que proporciona una gran habilidad de donar hidrógenos (Balasundram, N., *et al.*, 2005)..

Tabla 17. Caracterización de los extractos hidrolizados derivados de un residuo industrial de la elaboración de jugos de manzana.

	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU (mg Ácido tánico/Kg muestra base seca)	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES (mg Flavonoides en equivalentes de rutina / Kg muestra base seca)	CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOLES (mg Flavonoles en equivalentes de rutina / Kg muestra base seca)	CUANTIFICACIÓN POR HPLC (mg equivalentes de Quercetina / Kg muestra base seca)
A	2689.27	92.988	561.92	815.32
B	1123.6	38.023	192.38	549.18
C	3772	126.93	766.6	702.55

Las diferencias halladas por los distintos métodos de cuantificación se deben principalmente por la especificidad del sustrato hacia el reactivo de reacción, es decir, que el reactivo Folin- Ciocalteau, no es específico y permite la interacción con todos los grupos fenólicos hallados en el extracto, incluyendo los residuos de aminoácidos aromáticos de las proteínas y otras sustancias reductoras como los azúcares libres y el ácido ascórbico (Naczk, M., Shahidi, F., 2004; Tsao, R., Deng, Z., 2004; Matthaus, B., 2002), mientras que en el método de flavonoles y flavonoides, el AlCl_3 , puede inducir la formación de quelatos con sistemas 5-hidroxi-4-ceto, 3-hidroxi-4-ceto y sistemas *o*-hidroxilo, haciéndolo más específico hacia compuestos con éstas características.

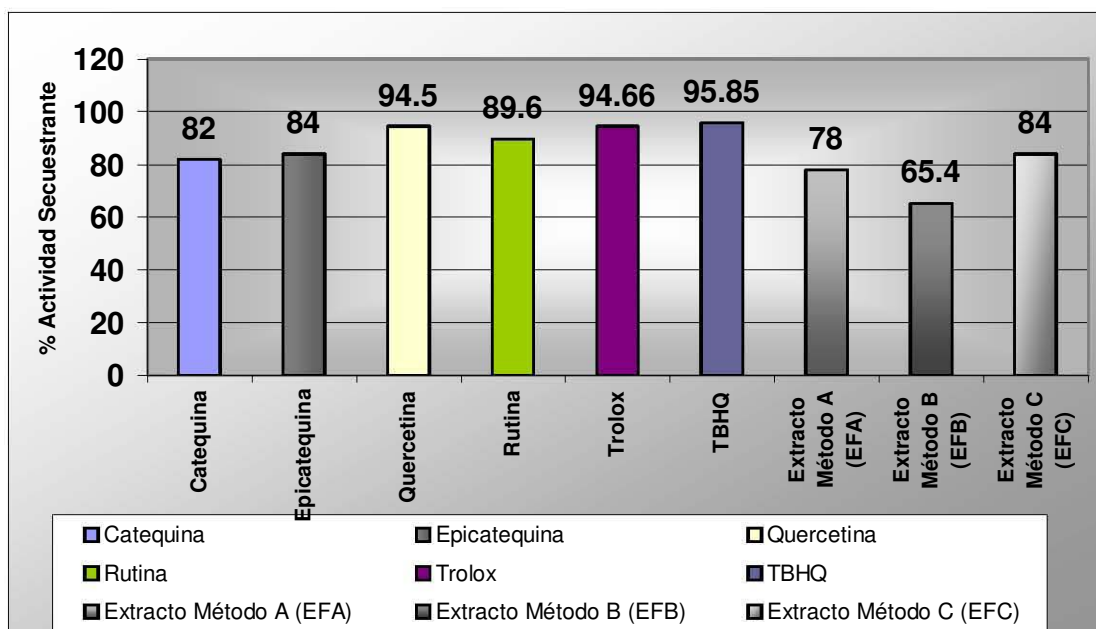
4.7. Actividad secuestrante del radical libre DPPH° de los extractos hidrolizados derivados de un residuo de manzana.

La prueba del radical DPPH° esta basada en la capacidad del radical 2,2-difenil-1-picrylhidrazilo de reaccionar con sustancias donadoras de Hidrógeno, incluyendo a los compuestos fenólicos (Roginski, V., Lissi, E. A., 2005).

La solución de DPPH° muestra una banda de absorción máxima a 517 nm, de una coloración violeta. La absorción y el color disminuyen cuando el radical DPPH° es reducido por un compuesto antioxidante.

Los resultados de la actividad secuestrante del radical libre DPPH se muestran en la Fig. 11.

Fig. 11. Gráfico de Actividad Secuestrante del Radical DPPH versus estándares comerciales



Todos los extractos hidrolizados derivados del residuo industrial de manzana, presentaron una actividad secuestrante más baja con respecto a los estándares comerciales a una concentración de 200 ppm., que son los límites que permite la Secretaria de Salud; sin embargo, para los antioxidantes naturales y sus mezclas no hay restricciones, por lo que estudios de dosis-inocuidad deben ser evaluados.

La actividad secuestrante en orden decreciente fue el siguiente: TBHQ (*terc*butil - Hidroquinona) > Trolox > Quercetina > Rutina > Extracto método C (EFC) > Epicatequina > Catequina > Extracto método A (EFA) > Extracto método B (EFB).

Los antioxidantes tales como el TBHQ y Trolox demuestran una mayor capacidad secuestrante por este método debido principalmente a su naturaleza química, lo que demuestra que tienen una alta capacidad donadora de hidrógenos.

El tercero en eficacia es el estándar Quercetina, el cual ha sido reportado que tiene ventajas estructurales porque el grupo *o*-dihidroxi en el anillo B del núcleo flavonoide le confiere estabilidad a la forma resultante de la actividad libre.

Won, Lee, K., *et al.*, 2003, reporta que los glicósidos de Quercetina en la manzana contribuyen con el 34.7% de la actividad antioxidante total de la manzana, seguida de epicatequina con un 19.9 % y procianidinas con un 19 % y en menor contribución la vitamina C, glicósidos de phloretina y el ácido clorogénico; sin embargo, de acuerdo a la evidencia experimental la forma de aglicon (estándar de quercetina) tiene una mayor actividad que el estándar rutina, por lo que suponemos que la posición 3 del anillo C, al no tener el azúcar ligado, tiene influencia sobre la capacidad donante de hidrógenos.

La actividad mostrada por los tres extractos es medianamente aceptable y un efecto de sinergismo en la mezcla es evidente; de lo cual podemos suponer que la relación de hidroxicinamatos/flavonoles, influye de manera directa en la actividad; es decir, que en los extractos, EFA y EFC, la capacidad donante de hidrógenos mayoritaria, posiblemente se deba al grupo flavonol, los cuales, cuando reaccionan con el radical libre, inducen la deslocalización del electrón excitado, particularmente por los *o*-hidroxilo en el anillo B y la estabilización del radical aroxilo (Tsao, R., Deng, Z., 2004), además de que cuentan con ciertas ventajas estructurales, tales como la presencia de los grupos hidroxilo en las posiciones 3'-. 4' del anillo B, el doble enlace entre los C-2 y C-3, conjugados con el grupo 4-oxo y el doble enlace entre los C-2 y C-3, combinado con el grupo 3-OH, del anillo C, son en conjunto ventajas estructurales que parecen incrementar la capacidad secuestrante de éstos flavonoides. En contraste, para EFB, la actividad será debida quizás a los ácidos hidroxicinámicos, los cuales se distinguen por el grupo $\text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$, el cual asegura una mediana capacidad donante de hidrógenos respecto a los flavonoles (Balasundram, N., *et al.*, 2005).

Cabe señalar que la actividad de los extractos es similar a la reportada por Peschel W., 2005; cuyas fracciones de los extractos que obtiene, oscilan entre los valores de 27.41 – 91.77 % de actividad secuestrante de este radical, sin embargo, los resultados de capacidad secuestrante por el método de DPPH°, no son determinantes para definir la actividad antioxidante de los extractos, pero si se puede establecer una mediana actividad donante de hidrógenos.

Manzana Golden (Malus sp):.

Estudio para Evaluar el uso Alternativo de Residuos como Fuente de Compuestos Bioactivos.

Llesuy, S., 2001, halló que el té verde era 6.5 veces más poderoso que la actividad del té negro en el secuestro del radical DPPH°; sin embargo, en un estudio *in vivo* de peroxidación lipídica en homogenizados renales, inducidos por H₂O₂ y Fe (II), el té verde fue solamente 1.5 veces más eficiente.

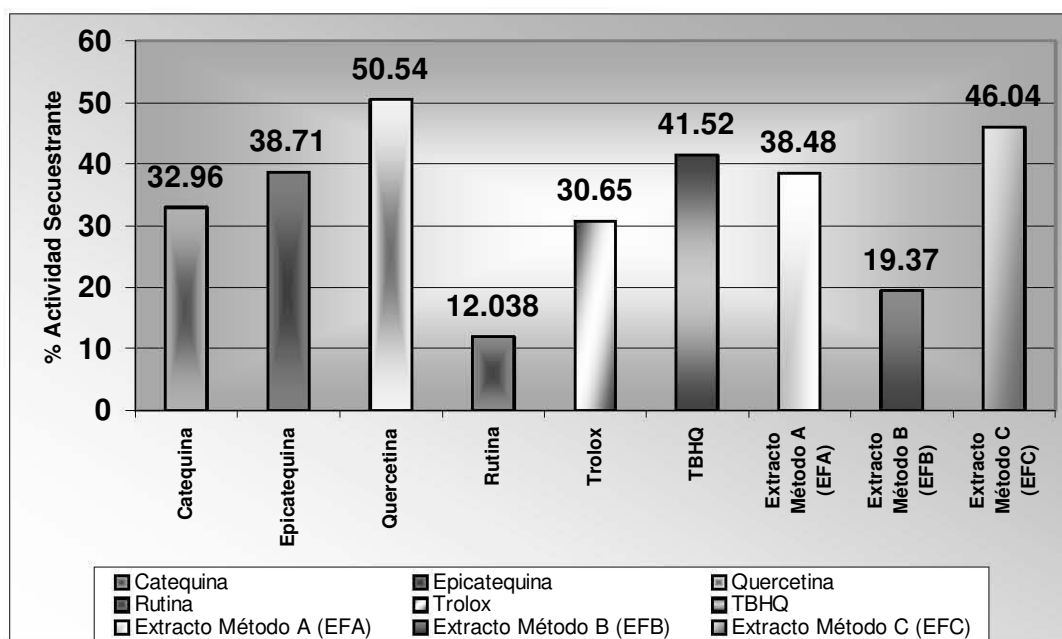
4.8. Actividad Secuestrante del radical ABTS⁺ de los extractos hidrolizados derivados de un residuo de manzana.

Este método está basado en el monitoreo del decaimiento en la absorbancia del radical catiónico ABTS⁺ (2, 2'azinobis(3-etilbenzotiazolina – 6 ácido sulfónico)), causado por la adición de una muestra que contiene compuestos fenólicos. Este radical catiónico, tiene una fuerte absorción en el rango de 600 – 750 nm y puede ser fácilmente determinado espectrofotométricamente.

En la ausencia de compuestos fenólicos, el ABTS⁺, es realmente estable, pero reacciona energéticamente con moléculas donadoras de hidrógeno, como los fenoles, llegándolo a convertir a la forma reducida y no colorida.

El radical catiónico puede ser generado por reacción con el radical ferromioglobina, o con reacción con peróxido de hidrógeno en la presencia de peroxidasa, sin embargo la vía de generación para el ABTS y el cambio en la naturaleza de un antioxidante de referencia pueden ser variables (Roginski, V., Lissi, E. A., 2005). Los resultados de la actividad secuestrante del radical libre ABTS⁺, se muestran en la fig. 12.

Fig. 12. Gráfico de Actividad Secuestrante del Radical ABTS⁺



El ABTS⁺ y el DPPH[°] muestran la misma estequiometría con antioxidantes estándar como son el ácido ascórbico y Trolox, siendo la relación molar cromógeno / antioxidante de 2:1 (Arnao, B.M., 2000); por lo tanto, deberíamos esperar el mismo comportamiento al

obtenido con el DPPH; sin embargo, la respuesta de los distintos estándares y los extractos fue diferente, debido principalmente a que el DPPH° es más selectivo con compuestos donadores de hidrógeno (Roginski, V., Lissi, E. A., 2005).

La actividad secuestrante en orden decreciente fue el siguiente: Quercetina > Extracto método C (EFC) > TBHQ > Extracto método A (EFA) > Catequina > Trolox > Epicatequina > Extracto método B (EFB) > Rutina.

Es importante señalar que hasta la fecha, no existe un sistema perfecto que nos ayude a conocer el “verdadero” poder antioxidante, de un antioxidante en particular o de un extracto, hecho que puede notarse en antioxidantes como Trolox y TBHQ, donde sus respuestas en los métodos DPPH° con respecto a ABTS⁺ son distintas (Tsao, R., Deng, Z., 2004).

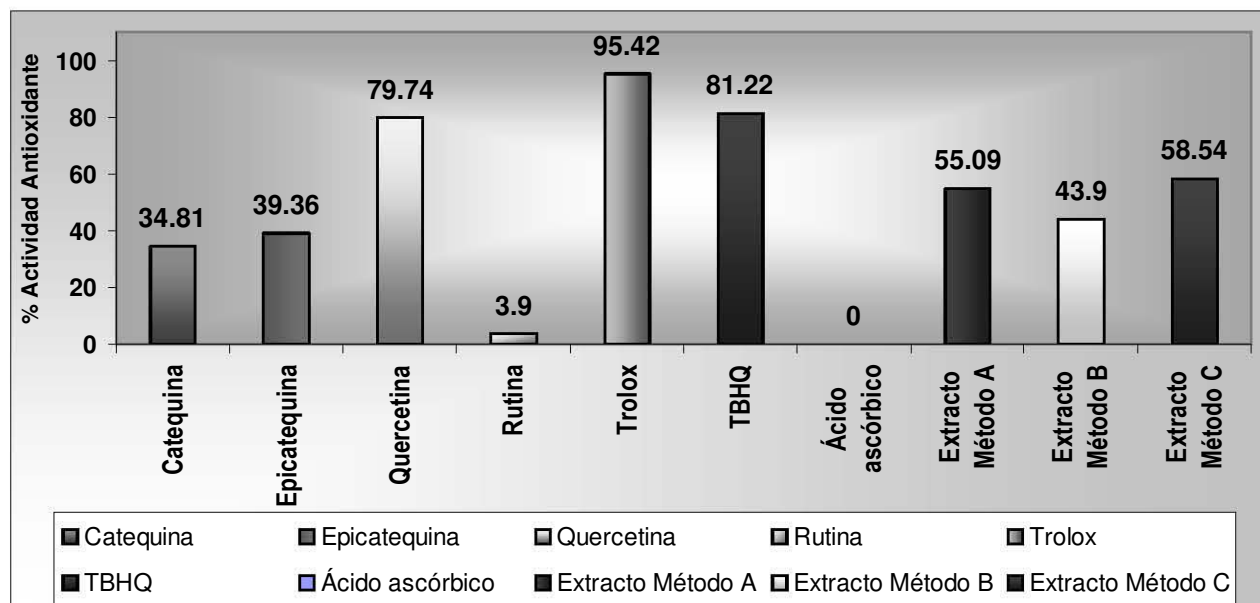
De acuerdo a lo mostrado en la figura 12, se puede observar que el método de extracción C, es un procedimiento que permite la obtención de compuestos con alta capacidad secuestrante, superando incluso en actividad a los estándares de TBHQ, Trolox, catequina, Epicatequina y rutina. Esto hace suponer que las proporciones del contenido del grupo flavonol en EF (extractos fitoquímicos) son determinantes en la mayor reactividad donadora de H; sin embargo varios hechos permiten reafirmar algunos conceptos sugeridos en el método de DPPH°.

- I. El estándar de rutina, al tener ocupada la posición 3 del anillo C en el esqueleto flavonoide, muestra una considerable disminución de la actividad con respecto a su forma libre. El estándar quercetina obtuvo un valor de actividad superior al 50%;, mientras que en el estándar glicosilado es de apenas 12.38 %.
- II. El doble enlace entre los C-2 y C-3, conjugados con el grupo 4-oxo y el doble enlace entre los C-2 y C-3, combinado con el grupo 3-OH del anillo C, son posibles contribuciones a la capacidad secuestrante, de la molécula de Quercetina *versus* los flavanoles catequina y epicatequina.
- III. Este método en conjunto con los resultados del radical DPPH°, permiten suponer que incluso la estereoquímica de las moléculas tiene repercusión sobre la capacidad para reaccionar con el radical influye, ya que epicatequina y catequina, a pesar de tener la misma estructura, difieren en la orientación del OH en la posición 3 del anillo C, lo que hace tener una afinidad distinta al interactuar con el radical (Arts, M.J.T.J., 2003).

4.9. Actividad Antioxidante del Sistema modelo de ácido linoleico / β -caroteno (β -CLAMS) de los extractos hidrolizados derivados de un residuo de manzana.

Los resultados obtenidos cuando se evaluó el ensayo modificado de β - CLAMS se detallan en la fig. 13.

Fig. 13. Gráfico de % de Actividad Antioxidante en un sistema Modelo de β - caroteno/ Ácido linoleico.



La actividad antioxidante en orden decreciente fue el siguiente: Trolox > TBHQ > Quercetina > Extracto método C (EFC) > Extracto método A (EFA) > Extracto método B (EFB) > Epicatequina > Catequina > Rutina > Ácido ascórbico.

Durante este ensayo los antioxidantes sintéticos ofrecen una mayor protección en la oxidación inducida a la molécula de β -caroteno, debido principalmente al carácter lipofílico que tienen estos compuestos en la emulsión, los cuales tienen la capacidad de interferir, unas veces con la propagación de la cadena de radicales libres, otras con la etapa de iniciación al facilitar la donación de átomos de hidrógeno a los radicales libres con una neutralización de sus efectos (Branen, L.A.; Davidson, M.P.; Salminen, S.; Thorngate III, J.H., 2002; Bello, G. J., 2000), siendo el estándar Trolox quien mostró la mejor respuesta. Entre los flavonoles, flavonoles libres y el flavonol glucosilado, los primeros presentan una mayor actividad, lo que hace suponer que la posición 3- hidroxilada, en el anillo C, tiene influencia notable sobre la actividad antioxidante (Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M.,

Rizner, Hras, A., Simonic, M., Knez, S., 2005). Adicionalmente, la actividad antioxidante de la molécula de Quercetina sobre los flavanoles es altamente contrastante. Won Lee, *et al.*, 2003, menciona, que esta molécula tiene ventajas estructurales debido al grupo *o*-dihidroxi en el anillo B del núcleo flavonoide, el cual le confiere estabilidad a la forma resultante de la actividad libre; sin embargo, presumimos que la conjugación del anillo C del núcleo flavonoide en la molécula de Quercetina tiene una mayor contribución en la efectividad antioxidante.

El ácido ascórbico presenta una actividad prooxidante bajo las condiciones de este modelo, que se debe principalmente a que este compuesto es altamente sensible y rápidamente oxidado por el aire y la luz (The Merck Index, 8va edición).

Los extractos obtenidos por los distintos métodos muestran una mediana actividad con respecto a los sintéticos, siendo EFC quien muestra una mayor actividad, seguido de EFA y por último EFB.

Esta mediana actividad hace evidente el sinergismo de la mezcla, pero puede suponerse que la mayor contribución de la capacidad antioxidante está dada mayoritariamente por el grupo flavonol y la mediana protección de evitar la oxidación del β -caroteno podría deberse al carácter hidrofílico del extracto en la emulsión (Skerget, M., *et al.*, 2005).

4.10. Tercera Parte. Evaluación de la Oxidación lipídica en Harina de Chía en presencia del EF a diferentes concentraciones frente un derivado del α -tocoferol (Prueba de Shaal Oven).

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en las pruebas *in vitro*, ABTS⁺, DPPH° y β -CLAMS), el EF (extracto fitoquímico), obtenido por el método C (EFC), demostró una mediana capacidad donadora de hidrógenos y antioxidante, pero de una capacidad superior a los EF obtenidos por los métodos A y B. Por tanto, se decidió emplear dicho extracto, EFC, para evaluar su efectividad en un sistema alimenticio bajo condiciones de deterioro oxidativo aceleradas (*Prueba de Shaal Oven*). Esto, permitirá elucidar con una mayor claridad la factibilidad de si este extracto constituye una alternativa atractiva como inhibidor del deterioro oxidativo de lípidos.

Se eligió a la Harina de Chía como sistema de prueba, debido a la cantidad de grasa presente en la semilla, 29.8 +/- 0.87 g/100 g semilla, de la cual alrededor del 88 % esta compuesta por ácidos grasos insaturados, principalmente ácido linolénico (Álvarez, Chávez, L.M., 2004); que garantiza una rápida oxidación.

Los resultados del monitoreo de la oxidación del aceite, medidos como los cambios en la concentración de peróxidos a 45°C, se muestran en las fig. 14 y 15.

El valor de estabilidad, fue considerado como el número de días necesarios para que el valor de peróxidos del aceite alcance un nivel de 20 meq/Kg. El tiempo necesario para que EFC, alcance la especificación de 20 meq/Kg aceite, a diferentes concentraciones y comparado con Trolox, se muestran en la figura 14 y los valores están listados en la tabla 18.

El lento incremento del control, es debido a que la semilla cuenta con sistemas de inhibición intrínsecos, Álvarez, Chavez, L.M., 2004, identificó a los fitoesteroles presentes en el aceite de la semilla de Chía, los cuales han demostrado una alta capacidad antioxidante (Kris-Etherton, PhD, P.M., 2002).

El EFC, a concentraciones de 500 y 1000 ppm, dan una mayor estabilidad sobre el aceite durante el almacenamiento de la harina a 45 °C; además de que en las tres concentraciones evaluadas, 200, 500 y 1000 ppm, la protección sobre la inhibición oxidativa respecto al Trolox es incluso superior.

Fig. 14. Seguimiento de oxidación Lipídica en Harina de Chía almacenada a 45 °C.

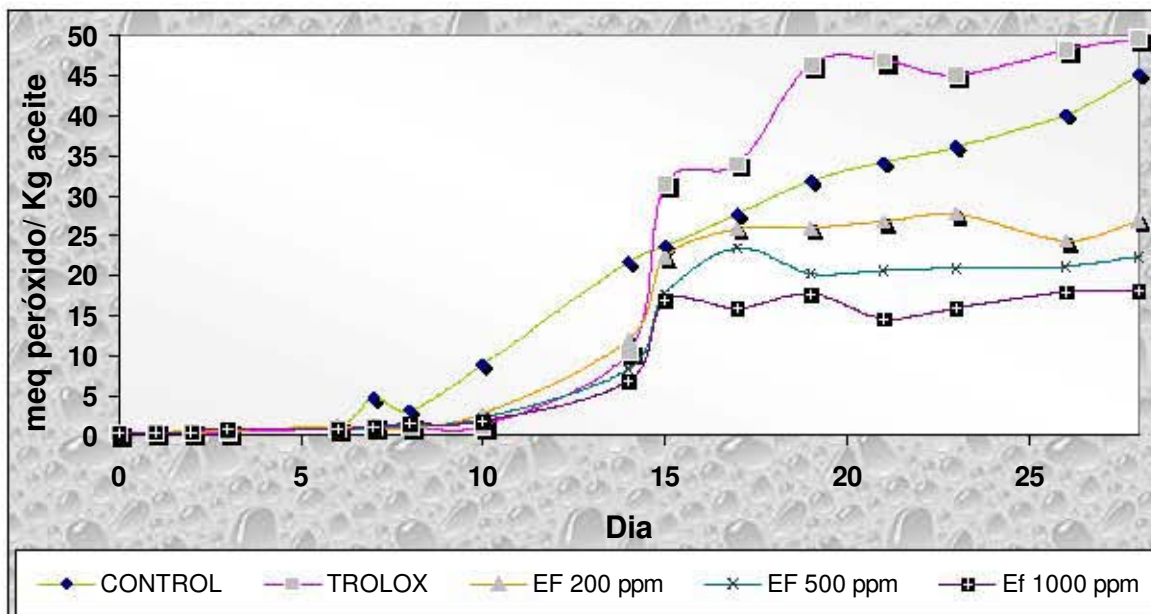
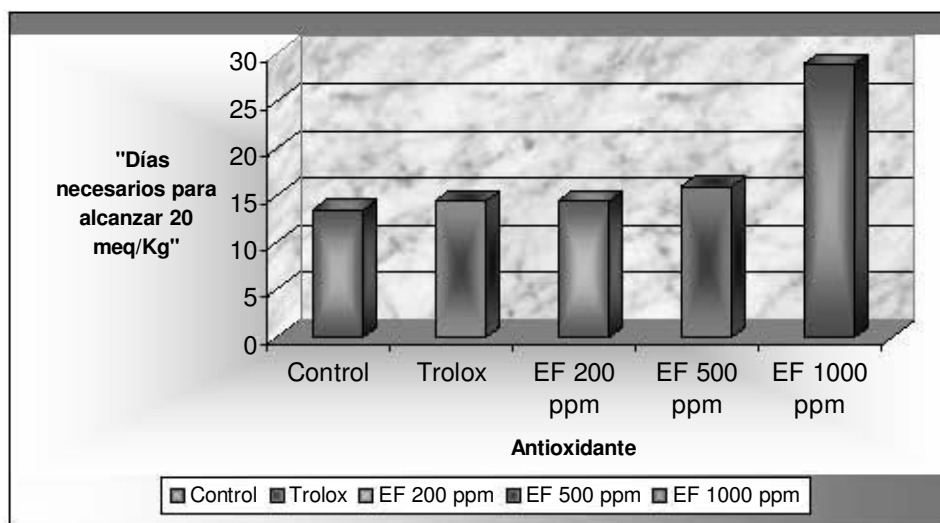


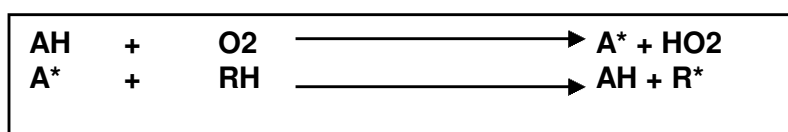
Fig. 15. Cambios en el Índice de Peróxidos del aceite de Harina de Chía almacenada a 45°C, para alcanzar la especificación de 20 meq/Kg aceite.



La inhibición oxidativa mediada por Trolox tiene particular interés, dado que hasta el día 10, el valor peróxido es inferior con respecto a las distintas muestras, pero a partir del día 15, el incremento es significativo con respecto al control, mostrándose incluso como

prooxidante, esta situación podría explicarse debido a su naturaleza, como derivado del α -tocoferol.

Los tocoferoles resultan antioxidantes de escaso poder a la concentración de 200 ppm, frente a los aceites vegetales que contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados, su actividad óptima se sitúa en los niveles de 400 y 600 ppm. Además, se ha hallado que el α -tocoferol puede, bajo ciertas condiciones de temperatura, actuar como agente prooxidante, al invertirse la reacción y generar radicales peroxilo, según los siguientes esquemas: además de ser débiles destructores de hidroperóxidos (Bello, G., J. (2000)):



La tabla 18, nos muestra el efecto de la concentración del EFC sobre la inhibición del deterioro oxidativo del aceite, donde a concentraciones de 1000 ppm el tiempo para alcanzar la especificación se alarga por más tiempo bajo éstas condiciones de ensayo y el factor de protección es incluso del doble de magnitud con respecto a Trolox (200 ppm) y las otras concentraciones de EFC (200 y 500 ppm).

Actualmente, el factor de protección se define como un valor de estabilidad del aditivo dividido entre el blanco (Bandoniené, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Gruzdiené, D., 2000).

Tabla 18. Influencia del efecto de concentración del [EF] sobre el valor peróxido y el factor de protección (FP) en el deterioro oxidativo en harina de Chía almacenada a 45 °C.

Antioxidante	Tiempo en días para alcanzar la especificación de 20 meq/Kg aceite	Factor de Protección (FP)
Control	13.5	
Trolox	14.5	1.074074074
EF 200 ppm	14.5	1.074074074
EF 500 ppm	16	1.185185185
EF 1000 ppm	29	2.148148148

Bandoniené, D., *et al.*, 2002, propone una escala para el factor de protección, donde supone que a valores de $2 < FP < 2.5$, la eficiencia es de mediana protección en el sistema de prueba, con lo cual EFC a 1000 ppm, brinda esta productividad en el sistema evaluado de harina de Chía en condiciones de deterioro oxidativo acelerado.

Bandoniené, D., *et al.*, 2002, evaluó diversos extractos en aceite de colza almacenado a 40 °C y el EFC en concentración de 1000 ppm, presenta valores superiores del FP, con respecto a algunos extractos a la misma concentración, como son: los extractos de *Hipophaë rhamnoides* y *Roman camomille*.

Abdalla, E. A., Roozen, P. J., 1999, estudio el efecto de concentración de diversos extractos en aceite de girasol en almacenamiento a 60 °C y concluye que, los extractos naturales son efectivos como inhibidores de la oxidación a concentraciones de 1200 ppm.

Sosa, Reyes, M. T., 2003; hizo la evaluación de la 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-metilalil)-Xantona proveniente de la planta *Callophyllum brasiliensis* a una concentración de 200 ppm en la inhibición de la oxidación lipídica de cacahuete tostado almacenado a 45°C y el valor máximo de peróxidos fue de 7.3_{meq/Kg} para el día 23, y posteriormente no existen cambios respecto al tiempo. En contraste, Trolox (200 ppm), como el EFC a las diferentes concentraciones (200, 500 y 1000 ppm), en la evaluación de la inhibición del deterioro oxidativo en la semilla de Chía almacenada a 45 °C, el incremento del valor peróxido es creciente a partir del día 10. Este comportamiento de los extractos es debido a la composición del extracto, ya que por no tratarse de una sustancia pura, algunos compuestos que estén presentes no contribuirán con la actividad antioxidante y para evaluar los componentes del extracto se tendría que llevar a cabo el fraccionamiento del extracto para la obtención de los compuestos individuales.

Won, Lee, K., *et al.*, 2003, ha reportado que la mayor contribución a la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en manzana entera var. *Golden*, es Quercetina; por lo que de acuerdo a la identificación por HPLC, quercetina se encuentra en una baja proporción respecto a la composición del extracto.

La figura 16, muestra el seguimiento de los productos secundarios de oxidación y se puede observar el incremento proporcional en la absorbancia, debido a que la concentración de aldehídos aumenta con respecto al tiempo; sin embargo, el cambio en la pendiente con respecto al control no es tan evidente debido a los antioxidantes intrínsecos de la semilla de Chía.

Fig. 16. Seguimiento de los Productos Secundarios de Oxidación en Harina de Chía por el índice de Kreis.

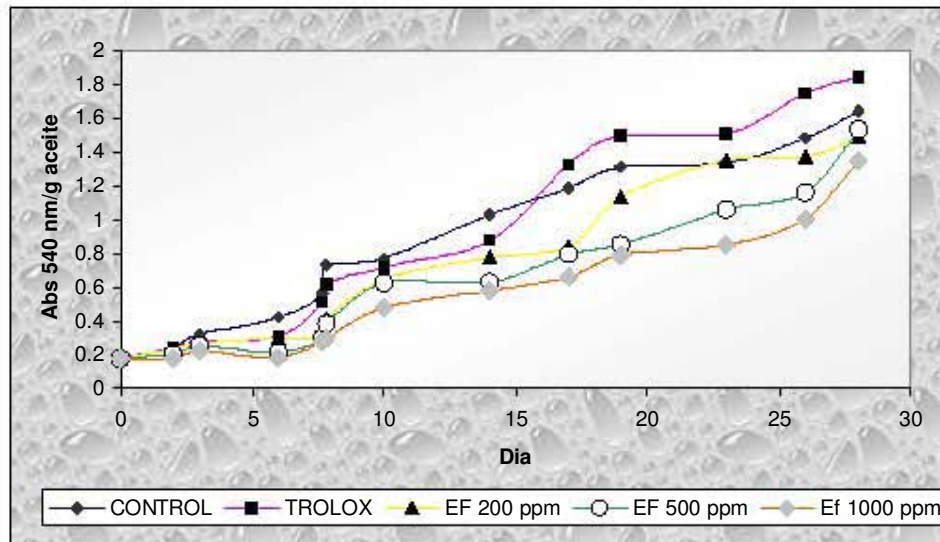
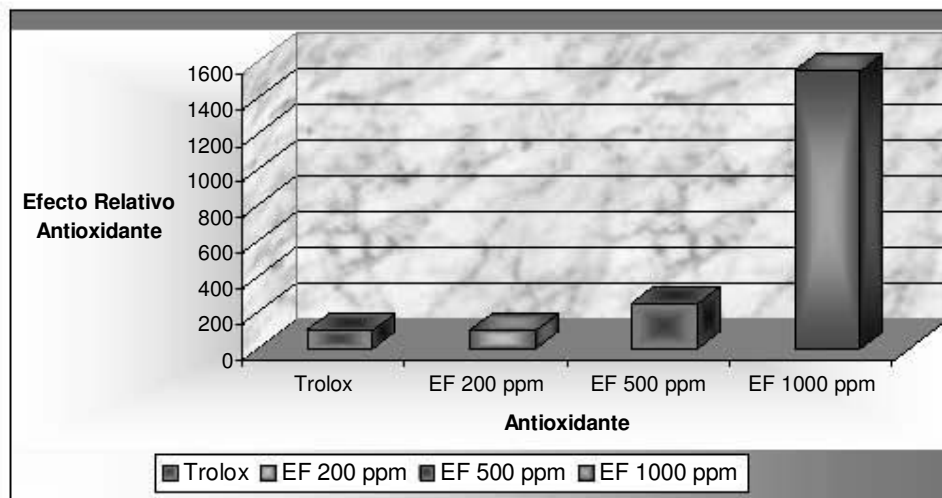


Fig. 17. Efecto Antioxidante Relativo en la Inhibición Oxidativa del aceite de Harina de Chía almacenada a 45 °C.



La figura 17, muestra el efecto antioxidante relativo del EF sobre el antioxidante Trolox, del cual se puede observar que el EF a 200 ppm ofrece la equivalencia de protección en este sistema, cuando el valor peróxido = 20 meq/Kg.

El EFC, a 500 ppm, mostró una relación superior de 2.5 veces mayor y el extracto a 1000 ppm, de hasta 15.5 veces de mayor eficiencia. Teniendo en mente éstos resultados, es evidente porque los carotenoides no son empleados en alimentos ricos en grasas siendo sustituidos mejor por los antioxidantes sintéticos, tales como: TBHQ, BHA, y BHT y o sus

Manzana Golden (Malus sp):.

Estudio para Evaluar el uso Alternativo de Residuos como Fuente de Compuestos Bioactivos.

mezclas. Cancino, Salazar. 2005; evaluó que la adición de antioxidantes en aceite de uva refinado a 60 °C, en mezclas de BHA/TBHQ y BHA/BHT en una proporción de 50:50 y una concentración final de 200 ppm, disminuyen el fenómeno de formación de peróxidos en condiciones prooxidantes.

Estos estudios junto con los realizados por Sosa, Reyes, M. T., 2003, dan la pauta para que el EFC, obtenido durante este trabajo pueda evaluarse acoplado con antioxidantes sintéticos para evaluar el efecto de sinergismo o en su caso llevar a cabo la purificación del extracto, que presumiblemente tendrá una mayor actividad antioxidante.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- El bagazo de manzana derivado de la variedad *Golden sp.* constituye una fuente atractiva de compuestos bioactivos, obteniendo hasta 3772 mg ácido tánico/Kg residuo base seca.
- La calidad y el acondicionamiento de secado del bagazo de manzana, previo a la extracción, influye de manera importante sobre la cuantitatividad de compuestos bioactivos.
- La evidencia del empleo del residuo húmedo en agitación con EtOH 96 % por 24 horas tiene un rendimiento promedio del 31 %.
- El secado por convección forzada a 55 °C y un flujo de aire de 4 m/s, en conjunto con la extracción sólido – líquido PIGNAT tipo Soxhlet, con temperatura inferior a los 60 °C, constituye un método apropiado para la extracción de compuestos bioactivos, disminuyendo incluso el tiempo de extracción a una tercera parte, con respecto a la extracción sólido-líquido en agitación por 24 horas obteniéndose un rendimiento superior.
- La identificación y cuantificación por HPLC, permiten establecer que los EF hidrolizados están compuestos mayoritariamente por hidroxicinamatos, posiblemente ácido cafeíco y flavonoles, siendo quercetina, el compuesto más representativo de este grupo y al cual se le atribuyó el mayor efecto antioxidante en estudios *in vitro*.
- En los métodos *in vitro* de actividad secuestrante de los radicales libres, DPPH° y ABTS⁺, el EFA y EFC demuestran una actividad importante como donadores de hidrógeno, siendo EFC a 200 ppm, quien presentó la mejor productividad en éstos métodos con valores de 84 % (método de DPPH°) y 46 % (método de ABTS⁺).

- De acuerdo a las evidencias experimentales derivadas de los métodos de DPPH^o, ABTS⁺ y β - CLAMS, se propone que la actividad antioxidante del flavonol quercetina está favorecida principalmente por las posiciones 3'- 4' del anillo B, el doble enlace entre los C-2 y C-3, conjugados con el grupo 4-oxo y el doble enlace entre los C-2 y C-3, combinado con el grupo 3-OH, del anillo C.
- La respuesta en los métodos de actividad *in vitro*, de los extractos EFA, EFB y EFC, sugieren que la relación hidroxicinamatos / flavonoles, es determinante en la actividad antioxidante, así como en la capacidad de donar hidrógenos.
- Durante el ensayo modificado de β - CLAMS, los EF a 200 ppm, presentan una mediana protección, en la inhibición del deterioro oxidativo de un concentrado de ácido linoleico, frente a los antioxidantes Trolox y TBHQ, quienes tuvieron una efectividad de 95.42 y 81.22 %, respectivamente.
- La evidencia de los métodos *in vitro*, permiten establecer que los extractos EFA y EFC, pueden ser potencialmente empleados en condiciones donde otros, como el ácido ascórbico, no tienen una gran actividad.
- El EFC, en concentraciones de 500 y 1000 ppm, permiten la inhibición del deterioro oxidativo en aceite de harina de Chia almacenada a 45 °C; y desde concentraciones de 200 ppm presentan un mejor comportamiento con respecto a Trolox.

RECOMENDACIONES

- Dado que el bagazo de manzana derivado de ésta variedad nacional constituyó una fuente atractiva de compuestos bioactivos, se sugiere la aplicación de éste estudio en residuos industriales de manera formal, para su escalamiento, con la finalidad de fortalecer y mantener una visión de aprovechamiento integral de los residuos o subproductos de la industria agro-alimentaria, sobre todo aquella que procesa la manzana para la elaboración de jugos..
- El acondicionamiento de la muestra previo a la extracción de fitoquímicos fenólicos constituye un paso indispensable para obtener altos rendimientos en la extracción de éstos compuestos, estudios sobre el efecto de secado en consideraciones industriales, tendrían que ser evaluados para este residuo.
- La extracción en un solo paso produce altos rendimientos de extracto crudo, sin embargo, con el fin de aumentar los rendimientos el empleo de etanol acidificado puede ser sugerible.

Podría llevarse a cabo el fraccionamiento del extracto, sin embargo, estos métodos generalmente disminuyen los rendimientos y encarecen el producto final, por lo que el empleo de un extracto enriquecido o en sinergismo con una mínima proporción de algún antioxidante sintético podría evaluarse.

CAPITULO 6.

BIBLIOGRAFÍA

Abdalla, E. A., Roozen, P. J. (1999). **Effect of plants extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion.** Food Chemistry. Vol. 64. pp 323-329.

Abrosca D´. B., Fiorentino, A., Monaco, P., Oriano, P., Pacifico, S. (2005). **Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv Annurca apple.** Food Chemistry. Article in press.

Akiyama, H. (2005). **Dietary unripe apple polyphenol inhibits the development of food allergies in murine models.** FEBS Letters, Vol. 579, pp. 4485 – 4491.

Allen, J. C., Hamilton, R. J. 1994. **Rancidity in Foods.** Great Britain: Chapman & Hall. pp. 2,7,8,11,12,14-18,22,23,26-28,31-33,68.

Alonso-Salces, R. M., Barranco, A., Corta, E., Gallo, B., Vicente, F., Berrueta, L. A. (2005). **Clasification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic composition.** Food Chemistry. 93, pp. 113-123.

Alonso-Salces, R. M., Berrueta, L. A., Barranco, A., Corta, E., Gallo, B., Vicente, F. (2005). **A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues Comparison with pressurized liquid extraction.** Talanta, Vol. 65. 654-662.

Álvarez, Chávez, L. M. (2004). **Identificación y Cuantificación de Compuestos Nutraceuticos presentes en el aceite de la semilla de Chía (Salvia Hispánica).** Tesis. Facultad de Química. UNAM. pp 7.

Andlauer, W., Fürst, P. (2002). **Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook.** Food Research International. Vol. 35. pp.171–176.

Arnao, B. M. (2000). **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case.** Trends in Food Science & Technology. Vol. 11, pp. 419-421.

Arts, M. J. T. J. (2003). **A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures.** Food Chemistry. Vol. 80 pp 409-414.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2005). **Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chemistry. Article in press.

Balz, F., Lotito, S, B. (2004). **Relevance of Apple Polyphenols as Antioxidants in Human Plasma: Contrasting in vitro and in vivo Effects.** Free Radical Biology & Medicine. Vol. 36. 201-211.

Bandoniené, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Gruzdiené, D. (2000). **Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil.** Food Research International. Vol 33. pp 785-791.

Bello, G. J. (2000). **Ciencia bromatológica : Principios generales de los alimentos.** Madrid. Pp.295-321.

Branen, L. A., Davidson, M. P., Salminen, S., Thorngate III, J. H. (2002). **Food Additives.** 2ed, Ed. Marcel Dekker, Inc. pp 523 – 538.

Briton, G., Goodwin, T. W. (1982). **Carotenoid chemistry and Biochemistry.** Elmsford, NY. Pergamon Press. pp. 398.

Cadenas, E., Packer, L. (2002). **Handbook of Antioxidants.** Editorial Marcel Dekker, Inc. E.U.

Cancino, Salazar. (2005). **Desarrollo de un proceso para la obtención de aceite refinado a partir de semillas del Orujo de la Uva**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. Pp 85-87.

Crowe, T. D., White, P. (2001). **Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples**. JAOCS, Vol. 78, no.12.

Dwyer, J. (1996). **Is there a need to change the American Diet?**. In: Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and treatment. Adv. Experim. Med. Biol. 401:192-193.

Erlund, I. (2004). **Review of flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology**. Nutrition Research. 851-874.

Fennema, O. R. (1993). **Química de los alimentos**. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 198-199.

Flores Álvarez, D. M. (2003). **Antioxidantes Naturales Derivados de la Cáscara de Uva**. Tesis. Facultad de Química. UNAM. pp 58.

Glossman-Mitnik, D. Mendoza-Wilson, A. M. (2004). **CHIH-DFT determination of the molecular structure, infrared and ultraviolet-spectra of the flavonoid quercetin**. Journal of Molecular Structure (Theochem). Vol. 681. 71 – 76.

Gross, G. G., Hemingway W. R., Yoshida T. (1999). **Plant Polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology**. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pp 415.

Hollman, P. C. H., Katan M. B. (1999). **Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability**. Food and Chemical Toxicology 37. 937-942.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). **Antioxidant Activity of plants Extracts Containing Phenolic Compounds**. J. Agric. Food Chem. Vol. 47, 3954 – 3962.

Kris-Etherton, PhD, P.M. (2002). **Bioactive compounds in Foods: Their role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer.** The American Journal of Medicine. Vol. 113 (9B).

Leontowics, H. (2002). **Comparative content of some bioactive compounds in apple, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats.** Journal of Nutritional Biochemistry. Vol. 13. pp 603-610.

Llesuy, S. (2001). **Methodologies for the evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review.** Biological Research. Vol. 34. pp 51-73.

Lu, Y., Foo, Y. L. (1997). **Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace.** Food Chemistry. Vol. 59, No. 2, pp. 187-194.

Lu, Y., Foo, Y. L. (1999). **Isolation and identification of procyanidins in apple pomace.** Food Chemistry. Vol. 64, pp. 511-518.

Lu, Y., Foo, Y. L. (2000). **Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace.** Food Chemistry. Vol. 68, pp. 81-85.

McCarthy, T. L. **Evaluation of Antioxidant potential of Natural Food/Plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin E in raw and cooked pork patties.** Meat Science. Vol. 57. pp 45-52.

Matthaus, B. (2002). **Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed.** J. Agric. Food Chem. Vol., 50, 3444-3452.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. (2004). **Screening of radical activity of some medicinal and aromatic plant extracts.** Food Chemistry. Vol. 85, pp. 231-237.

Mazza, G. Ph. D. (2000). **Alimentos funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado.** Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, pp. 401-436.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C. (2001). **Natural antioxidants from residual sources**. Food Chemistry. Vol. 72, pp. 145-171.

Naczki, M., Shahidi, F. (2004) **Extraction and analysis of phenolics in food**. Journal of Chromatography A. Vol. 1054, pp. 95-111.

Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., Oksman-Cladentey K-M. (2002). **Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolics acids from onion and spinach for HPLC analysis**. Food Chemistry. Vol. 76, pp 519 – 525.

Ortiz, A., Mora, R., Santiago, T., Dorantes, L. (2003). **Obtención de una pasta de aguacate mediante tratamiento térmico**. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). pp. 761-768.

Pérez, Trueba, G. (2003). **Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes**. Rev. Cubana Invest Biomed 22(1); 48-57.

Peschel, W., Sánchez, Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C. (2005). **An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes**. Food Chemistry. Article in press.

Pintor, Pérez, Ma. del C. (2003). **Utilización de Métodos Químicos y Enzimáticos para la Obtención de Flavonoides presentes en un residuo industrial de Manzana**. Tesis. Facultad de Química. UNAM.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation decolorization assay**. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.

Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J. F. (2001). **Interaction between procyanidins and apple cell wall and native apple polyphenols: Quantification and some consequences**. Int. J. Biol. Macromol, Vol. 29, pp. 115-125.

Renard, C. M. G. C.; Le Bourvellec, C. (2005). **Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying.** Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1725, pp. 1 - 9.

Renard, C. M. G. C., Le Bourvellec, C., Bouchet, B. (2005). **Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides.** Biochimica et Biophysica Acta, Vol., 1725, pp. 10 - 18.

Roginski, V., Lissi, E. A. (2005). **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** Food Chemistry. Vol. 92. pp. 235-254.

Rowland, I. (2002). **En Alimentos Funcionales: Probióticos.** Médica Panamericana S. A. España. Pág. 1-6.

Scott, F. W., N. S. Lee, R. Mongeau, N., Hidiroglou, M. L'Abbé, A. Sarwar, R. (1996). **Recommendations for defining and dealing with functional foods.** A discussion paper. Ottawa: Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health Canada.

Shieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R. (2001). **By-products of plant processing as a source of functional compounds – recent developments.** Trends in Food Science & Technology. Vol. 12, pp. 401-413.

Shoji, T., Akasome Y., Kanda, T., Ikeda, M. (2004). **The Toxicology and Safety of polyphenol extract.** Food and Chemical Toxicology 42. 959-967.

Singh, R. P. (2001). **“Technical Elements of New and Emerging Non-Thermal Food Technologies”** . FAO. Cap 1.

<http://www.fao.org/aq/ag/agasi/Nonthermal/COPYRIGHT.HTM>.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner, Hras, A., Simonic, M., Knez, S. (2005). **Phenols, proanthocyanidins, flavones y flavonols in some plant materials and their antioxidant activities.** Food Chemistry. Vol. 89, 191-198.

Sosa, Reyes, M. T. (2003). **Evaluación de la Actividad Antioxidante de Compuestos Aislados de Plantas Mexicanas y su Aplicación para la conservación de cacahuate tostado.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E. (1984). **Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants.** J. Am. Oil. Chem. Soc. 61, pp. 928-931.

The Merck Index. Ed Merck & Co. Inc, 8va. Ed. pp. 105.

Tsao, R., Yang, R. (2003). **Optimization of a new phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolics index using high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, Vol, 1018, pp., 29-40.

Tsao, R., Deng, Z. (2004). **Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals.** Journal of Chromatography B. Vol. 812, pp. 85-99.

Van der Sluis, A., Dekker, M.; Skrede, G., Jongen, W. F. M. (2002). **Activity and Concentration of Polyphenolics Antioxidants in Apple Juice. 1. Effect of Existing Production Methods.** J. Agric. Food Chem, Vol. 50, pp. 7211-7219.

Wach, A. (2005). **Quercetin content in some food and herbal samples.** Food Chemistry. Article in press.

Wanj, L., Weller, L. C. (2006). **Recent Advances in extraction of nutraceuticals from plants.** Trends in Food Science & Technology. Article in press.

Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A.W.; Kleinjans, J. C. S. (2005). **Protection by Quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes.** Mutation Research. Article in press.

Won, Lee, K., Yong, L., Dae-Ok, K., Chang, L., Hyong, Joo, L., Young, Jun, K. (2003). **Major Phenolics in Apple and Their contribution to the Total Antioxidant Capacity.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6516-6520.

6.1. APÉNDICE 1

Tabla 18. Análisis de Varianza Unilateral para los rendimientos entre los Métodos de Extracción empleados.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	f calculada	f 0.05 teórica (2,6)
Rendimiento del Método de Extracción	986.4858	2	493.2429	14.56	5.14
Error	203.2038	6	33.8673		
Total	1189.6896	8			

Enfoque del intervalo de confianza para una comparación pareada.

El intervalo se calculó sobre $\mu_A - \mu_C$; $\mu_A - \mu_B$ y para $\mu_B - \mu_C$, al 95% de confianza, con la siguiente relación:

$$\mu_i - \mu_j \pm t_{\alpha/2} s (2/n)^{1/2};$$

donde, s, es la raíz cuadrada del cuadrado medio del error y n es el tamaño de la muestra por cada método de extracción para toda $i = A, B$ y para toda $j = C, B$.

Esta prueba de contraste, implicó en observar si el intervalo de confianza abarcó ó no al cero. D ésta manera, si el intervalo abarcó al cero, el contraste no es significativo.

Por lo tanto, los intervalos de confianza, para las comparaciones pareadas quedaron de la siguiente manera:

Método A versus Método C; el intervalo al 95 % de confianza quedó en los valores de [-100.58,-59.68,], por lo tanto, como el intervalo no incluye al cero, la decisión es que si existe diferencia significativa entre el rendimiento de los métodos comparados.

Método A versus Método B; el intervalo al 95 % de confianza quedó en los valores de [-6.88, 34.02], por lo tanto, como el intervalo si incluye al cero, la decisión es que no existe diferencia significativa entre el rendimiento de los métodos comparados.

Método B versus Método C; el intervalo al 95 % de confianza quedó en los valores de [-46.08, -5.18], por lo tanto, como el intervalo no incluye al cero, la decisión es que si existe diferencia significativa entre el rendimiento de los métodos comparados.

6.2. APÉNDICE 2.

Curva Patrón para la Determinación de flavonoles

La curva patrón se realizó de la siguiente manera:

[mg Rutina/mL]	μL estándar rutina [0.5 mg/mL]	mL EtOH
0	0	25
0.0166	830	24.17
0.025	1250	23.75
0.05	2500	22.5
0.1	5000	20
0.166	8300	16.7
0.2	10000	15
0.3	15000	10
0.4	20000	5

Tabla 19. Absorción de las disoluciones de Rutina para la Determinación de Flavonoles.

[mg Rutina/mL]		Abs 440 nm		Abs Promedio
0	0	0	0	0
0.0166	0.074	0.068	0.076	0.073
0.025	0.193	0.19	0.185	0.189
0.05	0.275	0.276	0.273	0.275
0.1	0.533	0.53	0.535	0.533
0.166	0.826	0.801	0.81	0.812
0.2	0.958	0.965	0.951	0.958
0.3	1.286	1.291	1.295	1.291
0.4	1.475	1.719	1.712	1.635

Fig. 18. Curva Patrón de flavonoles.

