



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN  
QUESOS COMERCIALES DE LECHE DE CABRA  
MANUFACTURADOS EN MÉXICO**

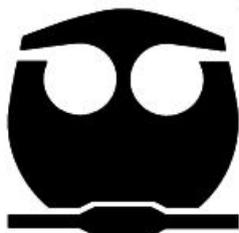
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

**LAURA ABIGAÍL PÉREZ JIMÉNEZ**



México, D.F. 2009



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:** MARÍA ELENA CAÑIZO SUAREZ  
**Vocal:** HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOMEZ  
**Secretario:** CLAUDIA DELGADILLO PUGA  
**1<sup>er</sup>. Suplente:** SANDRA PEREZ MUNGUIA  
**2<sup>o</sup>. Suplente:** ALEIDA MINA CETINA

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN  
L-321 DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA,  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

Asesor:

---

Dra. Claudia Delgadillo Puga

Sustentante:

---

Laura Abigaíl Pérez Jiménez

## AGRADECIMIENTOS

A Julieta Sandoval por ser más que mi asesora del servicio social, una amiga; por su confianza, interés, apoyo y consejos, en mi vida académica y personal...

A la Doctora Claudia Delgadillo por su orientación y asesoría; así como su tiempo y dedicación en el desarrollo de mi tesis...

A mi jurado conformado por las profesoras Hilda, Maria Elena, Sandra y Aleida, por la disposición, tiempo y consejos para la mejora de este trabajo...

A la Química de Alimentos: Merced Adame Rodríguez por su colaboración en el desarrollo experimental del presente estudio...

A la Facultad de Química y el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, grandes instituciones que fueron mi segundo hogar, donde dejo mis mejores momentos, mi formación académica y la culminación de este sueño...

Por último, agradecer a la máxima casa de estudios: *La Universidad Nacional Autónoma de México...*

...Orgullosamente UNAM... Hecho en CU...

## DEDICATORIAS

### ***A mis padres:***

**Pedro Pérez**, con el inmenso amor que le tengo, por ser una persona admirable, profesionalista exitoso y excelente padre; mi mayor orgullo e inspiración ¡Te adoro y siempre serás mi modelo a seguir!

**Graciela Jiménez**, por ser una extraordinaria mamá; a sus desvelos, disgustos, regañones, consejos, tristezas y alegrías compartidas ¡Te amo mamá!

### ***A mis hermanos:***

**Javy y Dianis**, en agradecimiento a su apoyo y comprensión; como muestra del enorme cariño que les tengo, por hacer mi vida más agradable.

### ***A mis abuelitos:***

**Paco (t)** y **Felipe (t)**, que siempre estarán en mis pensamientos y en mi corazón.

**Trini y Conchita**, por no tener para mí más que bendiciones y sabios consejos, siendo tesoros invaluable; por inspirarme una gran ternura y cariño verdadero.

**A Román y Tom** por ser dos personas esenciales en mi vida.

**A mis padrinos:** Roge y Arturo; mis tíos: Chata, Toño, Carmen, Cata y Miguel (t); Lourdes y Norma; a las familias: Pérez Jiménez, Trejo Jiménez, Jiménez Tafolla, Pérez Galindo, Vazquez Pérez, Pérez Orozco, Pérez Chavarria, Pérez Ruiz, y a la familia López, en especial López Angeles. Por el afecto mutuo que a través de los años permanece vigente.

### ***A mis amigos:***

**Idalia, Tere, Mony y Anuar**, al ocupar un lugar importante en mi vida; compañeros y amigos de siempre, por duplicar mis alegrías y dividir las penas a la mitad.

**Ari, Lilian y Alberto; Lidia, Yahir, Claudia, Yes, Cristian, Rafa, David Angel, Toño y Carlos; Lucy, Aida, Ceci y Ricardo**; con quienes compartí apuntes, prácticas y estrés, así como alegrías y mucha diversión, borrando situaciones de crisis dentro y fuera de las aulas y laboratorios.

# ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	X
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
II.1 PROCESO OXIDATIVO.....	3
II.1.1 Radicales libres.....	3
II.1.1.1 Producción de radicales libres y otras Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's).....	6
II.1.1.1.1 Cadena respiratoria mitocondrial.....	6
II.1.1.1.2 Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa y el sistema inmunológico como generadores de radicales libres.....	7
II.1.1.1.3 Factores externos asociados con la formación de radicales libres.....	9

II.1.1.2	Reacciones de los radicales libres.....	10
<b>II.1.2</b>	<b>Óxido reducción.....</b>	<b>11</b>
<b>II.1.3</b>	<b>Oxidación celular.....</b>	<b>12</b>
<b>II.1.4</b>	<b>Lesiones provocadas por las especies reactivas a moléculas esenciales del organismo.....</b>	<b>13</b>
II.1.4.1	Lesiones sobre moléculas protéicas.....	13
II.1.4.2	Lesiones sobre el ácido desoxirribo nucléico.....	14
II.1.4.3	Lesiones sobre moléculas lipídicas.....	14
<b>II.1.5</b>	<b>Oxidación en los alimentos.....</b>	<b>15</b>
II.1.5.1	Productos de la oxidación lipídica en los alimentos.....	16
<b>II.2</b>	<b>ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>17</b>
II.2.1	Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	17
<b>II.2.2</b>	<b>ANTIOXIDANTES NATURALES.....</b>	<b>19</b>
II.2.2.1	Compuestos polifenólicos.....	19
II.2.2.1.1	Métodos de extracción de los compuestos fenólicos.....	22
II.2.2.2	Ácidos hidroxicinámicos.....	23
II.2.2.3	Flavonoides.....	24

II.2.2.4	Tocoferoles y tocotrienoles.....	26
II.2.2.5	Ácido ascórbico.....	27
II.2.2.6	<b>Carotenoides.....</b>	<b>28</b>
II.2.2.7	Péptidos y aminoácidos.....	29
<b>II.2.3</b>	<b>ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....</b>	<b>29</b>
II.2.3.1	Hidroxianisol butilado.....	30
II.2.3.2	Butil hidroxil tolueno.....	31
II.2.3.3	Butilhidroquinona terciaria.....	31
II.2.3.4	Ésteres del ácido gálico.....	31
<b>II.2.4</b>	<b>ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS.....</b>	<b>32</b>
II.2.4.1	Super óxido dismutasa.....	32
II.2.4.2	Glutación peroxidasa.....	32
II.2.4.3	Catalasa.....	33
<b>II.3</b>	<b>PRUEBAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>33</b>
II.3.1	Capacidad de radicales cromógenos.....	33
II.3.2	Voltamperometría.....	34

2.3.3	Método de capacidad de reducción del hierro (FRAP).....	35
II.3.4	Blanqueo con $\beta$ -caroteno.....	35
II.3.5	Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).....	35
<b>II.4</b>	<b>ALIMENTOS FUNCIONALES.....</b>	<b>36</b>
<b>II.5</b>	<b>PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL DE CAPRINOS.....</b>	<b>38</b>
<b>II.6</b>	<b>LECHE CAPRINA.....</b>	<b>41</b>
II.6.1	Definición y generalidades.....	41
II.6.2	Producción de leche caprina.....	42
<b>II.7</b>	<b>EL QUESO.....</b>	<b>43</b>
II.7.1	Definición y generalidades.....	43
II.7.2	Proceso de elaboración.....	44
II.7.3	Producción mundial y nacional de queso de leche de cabra.....	45
II.7.4	Componentes nutrimentales del queso de leche de cabra.....	45
<b>II.8</b>	<b>ASPECTOS QUE MODIFICAN LA CALIDAD NUTRIMENTAL Y FUNCIONAL DE LA LECHE Y EL QUESO DE CABRA.....</b>	<b>47</b>
<b>II.9</b>	<b>PRESENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LECHE Y QUESO.....</b>	<b>49</b>

<b>II.10</b>	<b>FACTORES ANTIOXIDANTES EN LA LECHE.....</b>	<b>50</b>
<b>III</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
III.1	Objetivo general.....	52
III.2	Objetivos particulares.....	52
<b>IV</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>V</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>54</b>
V.1	Muestras experimentales.....	54
V.2	Extracción de compuestos fenólicos.....	54
<b>V.3</b>	<b>DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS.....</b>	<b>58</b>
V.3.1	Fenoles totales.....	58
V.3.2	Flavonoides.....	58
V.3.3	Ácidos hidroxicinámicos.....	59
<b>V.4</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>60</b>
V.4.1	Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante.....	60
V.4.2	Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante.....	62
V.4.2.1	Capacidad secuestrante del radical DPPH (2,2 difenilpicrilhidracilo)	62

V.4.2.2	Capacidad secuestrante del radical ABTS ((ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencinosulfónico-6)).....	63
V.5	Análisis estadístico.....	64
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
VI.1	Polifenoles totales.....	65
VI.1.2	Flavonoides.....	68
VI.1.3	Ácidos hidroxicinámicos.....	73
VI.2	Determinación de la actividad antioxidante.....	77
VI.2.1	Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante.....	77
VI.2.2	Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante.....	79
VI.2.2.1	Capacidad secuestrante del radical DPPH.....	79
VI.2.2.2	Capacidad secuestrante del radical ABTS.....	81
<b>VII</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>IX</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>96</b>
<b>IX.1</b>	<b>CURVAS PATRÓN.....</b>	<b>96</b>
<b>IX.2</b>	<b>CROMATOGRAMAS HPLC.....</b>	<b>98</b>

<b>IX.3</b>	<b>CINÉTICAS DE ACTIVIDAD SECUESTRANTE DE LOS RADICALES DPPH Y ABTS.....</b>	<b>100</b>
<b>IX</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>106</b>

### INDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Especies reactivas en sistemas biológicos.....	5
<b>Cuadro 2.</b> Reacciones de radicales libres.....	11
<b>Cuadro 3.</b> Recursos naturales ricos en antioxidantes.....	20
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de los compuestos fenólicos.....	21
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos bioactivos y sus fuentes naturales.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Población mundial de cabras.....	40
<b>Cuadro 7.</b> Composición química de leches de diferentes especies.....	42
<b>Cuadro 8.</b> Producción mundial de queso de cabra.....	46
<b>Cuadro 9.</b> Valores nutrimentales del queso fresco de leche de cabra....	47
<b>Cuadro 10.</b> Compuestos bioactivos en queso de leche de cabra.....	48

<b>Cuadro 11.</b>	Aspectos comerciales de los quesos de leche de cabra empleados en este estudio.....	55
<b>Cuadro 12.</b>	Soluciones estándar utilizadas en la evaluación cualitativa de la actividad antioxidante.....	61
<b>Cuadro 13.</b>	Reveladores empleados en el análisis de cromatografía en capa fina.....	61
<b>Cuadro 14.</b>	Análisis de correlación entre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante.....	85

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>	
<b>Figura 1.</b>	Ruptura de enlaces entre moléculas.....	4
<b>Figura 2.</b>	Defensa del organismo contra agentes externos.....	8
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de oxidación.....	13
<b>Figura 4.</b>	Clasificación de los antioxidantes.....	18
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	18

<b>Figura 6.</b>	Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	22
<b>Figura 7.</b>	Estructura del ácido ferúlico, caféico y cumárico.....	23
<b>Figura 8.</b>	Estructura básica de los flavonoides.....	25
<b>Figura 9.</b>	Clasificación estructural de los flavonoides.....	25
<b>Figura 10.</b>	Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.....	26
<b>Figura 11.</b>	Estructura química del ácido ascórbico.....	28
<b>Figura 12</b>	Estructura química de los carotenoides.....	28
<b>Figura 13.</b>	Estructura química de algunos antioxidantes sintéticos.....	30
<b>Figura 14.</b>	Reacción del radical DPPH (2,2-defenil picrilhidracilo).....	34
<b>Figura 15.</b>	Cromatoplaça obtenida mediante la técnica de cromatografía en capa fina y revelada con sulfato cérico.....	78
<b>Figura 16.</b>	Cromatoplaça obtenida de la técnica de cromatografía en capa fina revelada con DPPH <sup>+</sup> .....	78

## INDICE DE GRÁFICAS

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfica 1.</b> Contenido de polifenoles totales en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.....	68
<b>Gráfica 2.</b> Flavonoides presentes en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.....	71
<b>Gráfica 3.</b> Ácidos hidroxicinámicos presentes en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.....	76
<b>Gráfica 4.</b> Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los quesos en estudio, con el ensayo de DPPH <sup>+</sup> .....	81
<b>Gráfica 5.</b> Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra con el ensayo de ABTS <sup>+</sup> .....	84

## I. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo desencadena procesos dañinos que se asocian al envejecimiento celular y como consecuencia a la aparición de diversas patologías; impactando directamente sobre moléculas esenciales para la vida como ácidos nucleicos y proteínas; por su parte, los antioxidantes brindan protección múltiple y variada, operando en diferentes niveles y momentos de la oxidación. Un importante recurso antioxidante lo constituyen los compuestos fenólicos, los cuales se encuentran presentes en diversos recursos vegetales, brindando protección antioxidante, la cual puede ser transferida a los productos de consumo humano, a través de la alimentación animal.

Por otro lado, las reacciones de oxidación también participan en el proceso de deterioro de los alimentos, causando una disminución tanto en la calidad sensorial como en el valor nutricional, siendo determinantes en alimentos con alto contenido de grasas como la leche y sus derivados. Es por esto, que la presencia de antioxidantes en los alimentos bien como aditivos o como parte natural de su composición ha cobrado vital importancia tanto para el tecnólogo de alimentos, que busca favorecer la vida útil del alimento, así como para el consumidor, que demanda cada vez más alimentos que aporten beneficios a la salud. La presencia de estos y otras sustancias bioactivas resultan positivas en el combate de algunas enfermedades, por lo que a estos alimentos se les reconoce como “alimentos funcionales”.

Dentro de la dieta humana, una fuente importante de compuestos antioxidantes, además de los vegetales, son los productos lácteos, consumidos a nivel mundial. Por su parte, el queso es un alimento que se elabora desde hace muchos años, ya sea de leche de vaca, oveja, búfala y/o cabra, siendo este último, un animal universal debido a que se adapta a distintos climas y a infinidad de áreas agroecológicas, lo cual hace factible su explotación. La industria láctea es una de las más sólidas y con mayor auge; la diversidad de productos lácteos en el mercado permite a los consumidores adquirir un alimento completo que además pueda contener diversos compuestos

bioactivos que reduzcan los efectos nocivos en la célula, las membranas lipídicas y las proteínas, causados por especies reactivas del oxígeno (ERO's) en forma de radicales libres.

A nivel nacional, la industria láctea caprina ha registrado un mayor desarrollo innovando en el mercado una gran gama de productos, donde destacan diferentes tipos de quesos frescos con presentaciones y sabores variados; sin embargo es imperativo reconocer que la información nutricional y funcional de estos productos es muy limitada, por lo que en este estudio se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de algunos de estos productos que se manufacturan en el territorio nacional.

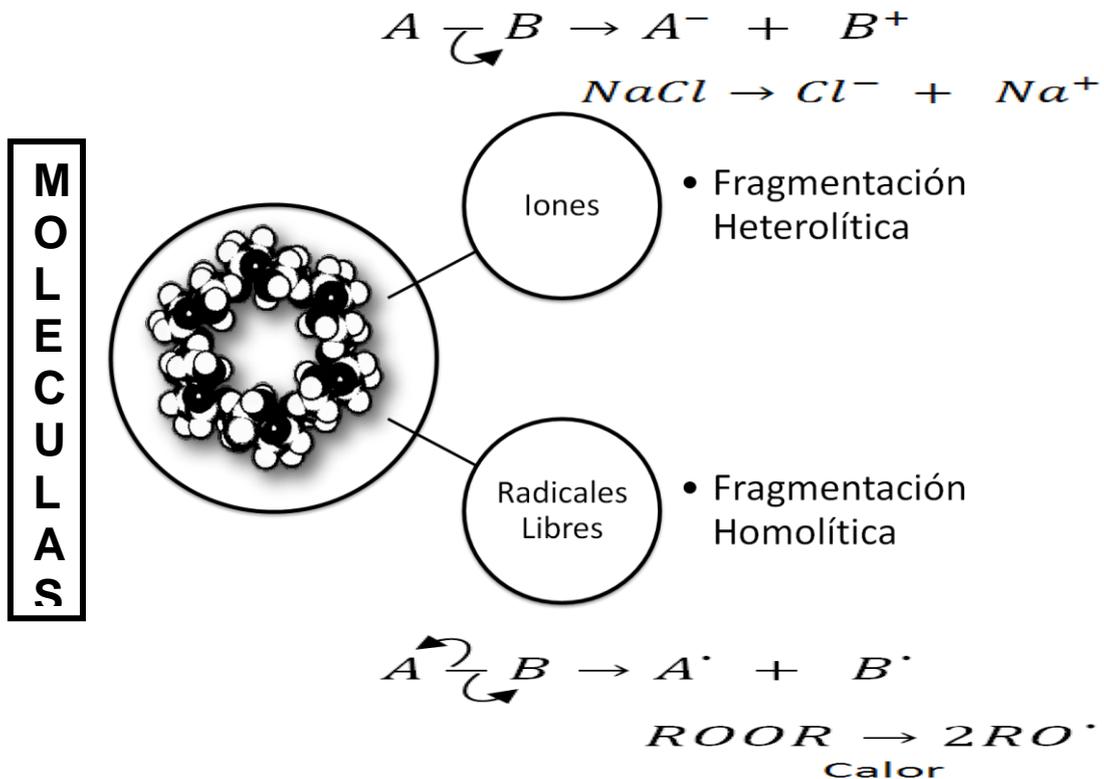
## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 PROCESO OXIDATIVO**

Todas las células de nuestro organismo dependen del oxígeno para liberar la mayor parte de la energía química disponible en los alimentos mediante su oxidación; sin embargo, el metabolismo normal del oxígeno también conlleva a la inevitable producción de radicales libres que oxidan las sustancias de las células (proteínas, lípidos, material genético y carbohidratos), lo que ocasiona el daño oxidativo y con esto la aparición de diversas patologías debidas al envejecimiento y muerte celular como el cáncer (Halliwell y Gutteridge 2007; Konigsberg, 2008).

#### **II.1.1 Radicales libres**

Las moléculas que constituyen a la materia son un conjunto de átomos unidos entre sí por enlaces químicos; la mayor parte de estos enlaces están constituidos por pares de electrones ( $e^-$ ), los cuales mantiene unidos a dichos átomos. Durante las transformaciones químicas, se rompen y se forman nuevos enlaces, entre estas etapas se pueden formar diversos intermediarios, dependiendo de cómo se rompa el enlace, siendo que en una fragmentación en donde solo uno de los productos se lleva consigo todo el par de electrones, se genera lo que se conoce como iones, siendo una fragmentación heterolítica. En este proceso, la especie que atrae los dos electrones tendrá un electrón de más, y estará cargada negativamente (anión), por el contrario, la especie que se queda sin el par de electrones tendrá un electrón menos y quedará cargada positivamente (catión), por otro lado, cuando en el transcurso de una reacción química se rompe un enlace, y cada uno de los componentes enlazados se lleva uno de los dos electrones que al principio constituía el enlace, se forman radicales libres y se dice que la fragmentación es homolítica tal como se ilustra en la Figura 1 (Miranda, 2008).



**Figura 1.** Ruptura de enlaces entre moléculas (Miranda, 2008).

Los principales agentes oxidantes son los radicales libres, generados por la utilización del oxígeno en las células, son especies capaces de existir independientemente y contienen electrones desapareados, en la mayor parte de los casos son especies altamente reactivas y tienen un tiempo de vida media menor de 1  $\mu$ seg; se combinan para generar moléculas más estables; muchos de estos radicales existen en los sistemas vivos, su producción ocurre como un proceso natural, inevitable y constante para mantener la homeostasis a nivel celular en los tejidos normales, sin embargo también se asocian con la producción del estrés oxidativo; todas las células independientemente de su tipo, están permanentemente produciendo estas moléculas, presentandose como formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno ( $O_2$ ) y generalmente provienen de la excitación de éste para formar al oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) o de la transferencia de electrones al  $O_2$  para formar al radical superóxido ( $O_2^\cdot$ ), al peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) o al radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ); además, se encuentran las especies reactivas de nitrógeno, cloro y bromo, las cuales se presentan en el Cuadro 1 (Halliwell y Gutteridge, 2007; Miranda, 2008).

**Cuadro 1.** Especies reactivas en sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

<b>Radicales libres</b>	<b>No radicales</b>
<b>Especies reactivas de oxígeno (ERO's)</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno (ERO)</b>
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ )	Oxígeno singulete ( $O_2^1$ )
Peroxilo ( $RO_2^{\cdot}$ )	Peróxidos orgánicos (ROOH)
Alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
<b>Especies reactivas del cloro (ERC)</b>	<b>Especies reactivas del cloro (ERC)</b>
Cloro atómico ( $Cl^{\cdot}$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Cloro nitrito ( $NO_2Cl$ )
	Cloro gaseoso ( $Cl_2$ )
	Cloraminas
	Dióxido de cloro ( $ClO_2$ )
	Cloruro de bromo (BrCl)
<b>Especies reactivas del bromo (ERB)</b>	<b>Especies reactivas del bromo (ERB)</b>
Bromo atómico ( $Br^{\cdot}$ )	Ácido hipobromoso (HOBr)
	Bromo gaseoso ( $Br_2$ )
<b>Especies reactivas de nitrógeno (ERN)</b>	<b>Especies reactivas de nitrógeno (ERN)</b>
Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	Ácido nitroso ( $HNO_2$ )
Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ )	Nitrosil catión ( $NO^+$ )
Nitrato ( $NO_3^{\cdot}$ )	Nitroxil anión ( $NO^-$ )
	Tetróxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ )
	Trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ )
	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
	Peroxinitrato ( $O_2NOO^-$ )
	Ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ )
	Alquil peroxinitritos (ROONO)
	Alquil peroxinitratos ( $RO_2ONO$ )

### **II.1.1.1 Producción de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ERO's)**

Konigsberg, 2008 señala que las especies reactivas de oxígeno son producidas en el organismo a través de diversos procesos normales, presentándose como subproductos dañinos del metabolismo, productos alternos de la reducción incompleta del oxígeno molecular durante el transporte de electrones en la mitocondria y en el retículo endoplásmico; siendo en otros casos productos benéficos, como las enzimas nicotiamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH-Ox) que intervienen en la formación de radicales libres por las células inflamatorias dentro del sistema inmunitario como defensa contra agentes patógenos; además de esto, las ERO's pueden ser generados por otros factores ajenos al organismo, como la exposición a diversos agentes químicos y físicos (pesticidas y otros compuestos contaminantes como el ozono, incremento en la temperatura y radiaciones ionizantes).

#### **II.1.1.1.1 Cadena respiratoria mitocondrial**

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales y es uno de los principales sitios generadores de ERO's; donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, proceso mediante el cual los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras de electrones dispuestas en complejos enzimáticos multiproteínicos llamados cadena de transporte de electrones, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno ( $O_2$ ) que es transportado por la hemoglobina de la sangre hasta las células y los electrones provienen de la nicotinamida adenina dinucleótido reducida, NADH (Konigsberg, 2008).

La cadena de transporte de electrones está formada por complejos respiratorios que se encuentran en la membrana interna mitocondrial y dos transportadores de electrones (ubiquinona y citocromo c); el ambiente semiaislado que provee la membrana lipídica permite la transferencia de un solo electrón ( $e^-$ ) a través de los grupos prostéticos. Este tipo de compuestos generalmente contienen metales de transición como el hierro (Fe) o el cobre

(Cu), que pueden cambiar su estado redox y recibir o donar  $e^-$  sin alterarse ( $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$  a  $Cu^{2+}$ ); el hecho de que la cadena respiratoria este constantemente transfiriendo electrones de uno en uno, sugiere que de existir una fuga en el sistema, los electrones desapareados podrían generar radicales libres, ya que el  $O_2$  es un gas que difunde libremente a través de las membranas, es muy factible que su forma activada, oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), se encuentre alrededor de la cadena respiratoria, por lo que de existir fugas, se favorecería la reducción monovalente del oxígeno singulete, generando así el radical superóxido,  $O_2^{*-}$  (Konigsberg, 2008).

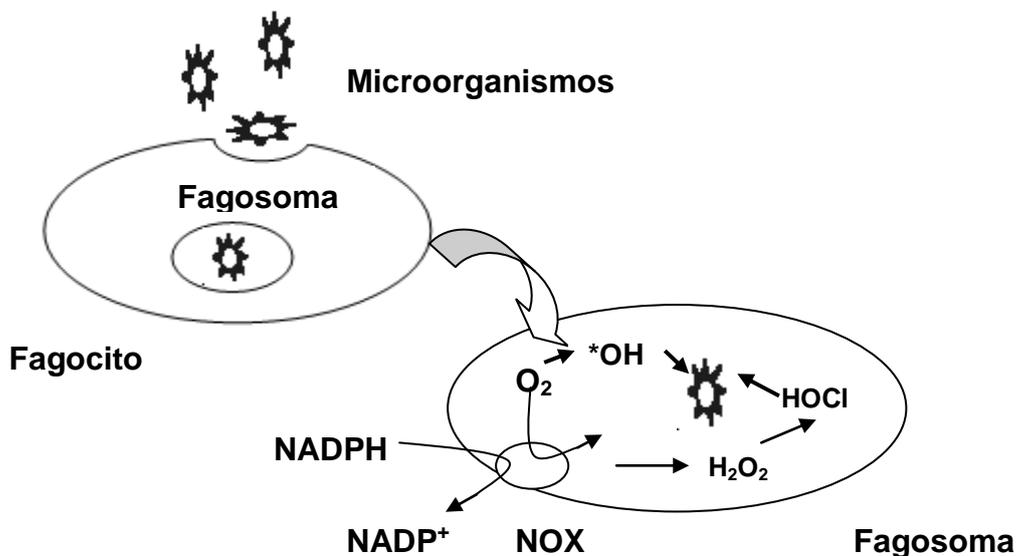
La mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y a la glutatión peroxidasa (GPx) que transforman al superóxido ( $O_2^{*-}$ ) en  $H_2O$ ; se ha estimado que las concentraciones normales de estas especies reactivas son de alrededor de  $1 \times 10^{-10}$  y  $5 \times 10^{-9}$  M respectivamente; si estas concentraciones se rebasan o las enzimas antioxidantes son insuficientes, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) podría convertirse en el radical hidroxilo ( $^*OH$ ) mediante la reacción de Fenton, catalizada por el hierro (Fe) o cobre (Cu) presentes en las enzimas mitocondriales. Este mecanismo se puede repetir, ya que la cadena respiratoria alterada aumenta la fuga de electrones, generando un mayor número de ERO's perpetuando así este fenómeno y desestabilizando el equilibrio energético de la célula; la producción de ERO's puede generar tanto daños en las enzimas de la cadena respiratoria, la membrana y ADN mitocondrial, así como el deterioro energético de la misma (Konigsberg, 2008; Ruíz, 2007).

#### **II.1.1.1.2 Nicotinamida adenina dinucleótido fostato oxidasa (NOX) y el sistema inmunológico como generadores de radicales libres**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) además de presentarse como subproductos dañinos del metabolismo aeróbico, actúan en otros casos mediante un papel benéfico. Esto se ha comprobado al encontrarse que existen enzimas cuya función es la de producir radicales libres y otras ERO's; de esta manera, se encuentra la familia de enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fostato oxidasa presentes en varios tejidos, de las cuales la más estudiada es

la que se encuentra en las células fagocíticas. Este tipo de NOX se activa cuando hay una amenaza por agentes patógenos, produciendo radicales libres para aniquilar a estos agentes (Konigsberg, 2008).

Las células fagocíticas constituyen una de las defensas más poderosas del sistema inmunitario. Estas células circulan por la sangre y migran a través de los capilares hacia los tejidos en donde avanzan lentamente en busca de agentes externos que posteriormente digieren; la generación de ERO's, mediada por la nicotinamida adenina dinucleótido fostato (NADPH) y catalizada por la NOX, así como la participación de proteasas, conllevan a la destrucción y muerte celular del patógeno; donde la NOX recibe un electrón de la NADPH y lo dona al oxígeno molecular, generando el radical superóxido; este a su vez puede convertirse en otras ERO's, principalmente peróxido de hidrogeno, que actúa oxidando compuestos aromáticos, dando como resultado la formación de radicales libres; oxidando a los iones cloruro para convertirlos en el ácido hipocloroso (bactericida potente) o convirtiéndose en el radical hidroxilo, mediante la reacción de Fenton; Figura 2. La inactivación de la NOX es un proceso tan importante como la activación, debido a que la generación excesiva de especies reactivas o bien su localización en un sitio inadecuado, puede ser la causa de deterioro del organismo (Konigsberg, 2008).



**Figura 2.** Defensa del organismo en contra de agentes externos (Konigsberg, 2008).

### II.1.1.1.3 Factores externos asociados con la formación de radicales libres

**Reacción de Fenton.** La producción de oxi-radicales vía reacción de Fenton se lleva a cabo en presencia de hierro, dando lugar al radical hidroxilo, debido a que esta reacción implica la oxidación de hierro, Fe (II) a Fe (III) mediada por peróxido de hidrógeno; es una de las reacciones de oxidación más poderosas que se han descubierto (Konigsberg, 2008; Ruíz, 2007).

**Radiaciones iónicas.** Se presentan cuando la energía de un fotón excede la energía necesaria para remover un electrón de una molécula, provocando una coalición molecular que genera la formación de iones. Los rayos gamma ( $\gamma$ ), rayos x, los electrones de alta energía (partículas  $\beta$ ), los iones  $\text{He}^{2+}$  (partículas  $\alpha$ ), los neutrones de alta energía y los fragmentos de fisión nuclear pueden producir radiación ionizante y tienen la energía suficiente para ionizar a la mayoría de la biomoléculas. Estas radiaciones determinan efectos nocivos sobre las estructuras celulares, resultando particularmente peligrosas para sujetos expuestos profesionalmente como personal sanitario, encargados de la extracción y elaboración de minerales radioactivos (Zollo *et al.*, 2004).

La contaminación debida a radiaciones ionizantes esta conectada a fenómenos como explosiones atómicas, contaminaciones de la cadena alimentaria, y por fines diagnósticos y terapéuticos. Cuando atraviesa un sistema biológico, esta energía no es depositada uniformemente sino en paquetes, los cuales varían en tamaño y pueden contener moléculas excitadas, iones y electrones, favoreciendo la formación de radicales libres, el más abundante el radical hidroxilo ( $\text{*OH}$ ), capaz de interactuar con la mayoría de los componentes celulares. En el ADN, las consecuencias químicas y biológicas de este tipo de radiaciones conducen a la manifestación de efectos inmediatos y efectos tardíos. Los primeros están caracterizados por las alteraciones de las membranas celulares, formación de radicales libres, oxidación de proteínas de membrana y enzimas. Los efectos tardíos generan rompimientos en el ADN de cadenas simples y dobles, daño de desoxirribosas, modificaciones de bases nucleicas y retraso de la mitosis (Konigsberg, 2008; Zollo *et al.*, 2004).

**Exposición a compuestos químicos.** Los óxidos de nitrógeno, presentes en el humo de cigarrillo, de carnes ahumadas y a la parrilla, se asocian con la formación de radicales libres y otras especies reactivas; también se encuentran los metales, que son sustancias naturales, presentes en el ambiente y muchos de estos, como el hierro (Fe), son esenciales para la salud y a menudo son componentes importantes de enzimas y otros compuestos como la hemoglobina, los cuales tienen funciones fisiológicas. Los metales y metaloides más importantes que participan en reacciones de transferencia electrónica en las que el oxígeno está presente y que favorecen la formación de ERO's, se encuentra el plomo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), cadmio (Cd) y arsénico (As) ya que perturban la integridad estructural de la membrana interna mitocondrial, esto altera el potencial de membrana, favoreciendo la producción de ERO's como el superóxido y el peróxido de hidrógeno (Konigsberg, 2008; Montero, 1996).

Los plaguicidas, se agrupan en general como insecticidas organoclorados y organofosforados, herbicidas, fungicidas, fumigantes y rodenticidas. Por su parte, los sistemas enzimáticos interactúan con estos, convirtiéndolos en intermediarios altamente reactivos, como las ERO's y otros radicales libres; el ozono, dióxido de nitrógeno y de azufre son contaminantes conocidos por inducir daño oxidativo y la generación de radicales libres (Konigsberg, 2008).

### **II.1.1.2 Reacciones de los radicales libres**

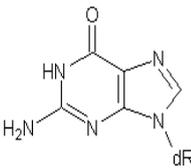
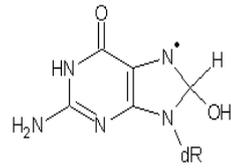
Una característica esencial de los radicales libres es que cuando estos se encuentran, unen sus electrones desapareados para formar un enlace covalente, reaccionando entre ellos, haciéndolo mediante la reacción de dimerización, donde dos radicales ( $R^*$ ) idénticos reaccionan entre ellos generando compuestos simétricos; otra reacción es la desproporción, en cuyo proceso dos radicales reaccionan para generar un alcano y una olefina. Sin embargo, muchas moléculas biológicas no son radicales, por lo que cuando estas reaccionan con un radical libre, una cadena de reacciones puede ocurrir, Cuadro 2 (Halliwell y Gutteridge, 2007).

## II.1.2 Oxido reducción

Oxidante, es aquel que recibe electrones y se reduce, un reductor, tiende a ceder electrones ( $e^-$ ) fácilmente y a oxidarse, en conjunto se le conoce como un sistema o par redox (Konigsberg, 2008; Scheffer, 1992).

La oxidación de una sustancia va ligada a la reducción de otra; participan en una multitud de procesos químicos y biológicos; implican la transferencia de  $e^-$  de uno en uno, lo cual implica que el  $e^-$  que forma parte del par electrónico en el orbital de un átomo quede desapareado, generando así radicales libres (Scheffer, 1992).

**Cuadro 2.** Reacciones de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Reacción	Ejemplo
<p><b>Adición</b></p> <p>Un radical se puede adicionar a otra molécula, y el producto formado seguirá teniendo un electrón desapareado.</p> $X^* + Y \longrightarrow (X-Y)^*$	<p>Cuando el <math>OH^*</math> se adiciona en la posición 8 del anillo de la estructura de la guanina en el ADN, el producto inicial es el <b>radical 8-hidroxiguanina</b>.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Guanina</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <math>\xrightarrow{HO^*}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <p>8-Hidroxiguanina</p>  </div> </div>
<p><b>Reducción y oxidación</b></p> <p>Un radical puede ser un agente reductor, donando electrones a una molécula no radical. También puede actuar como oxidante, tomando un electrón de la molécula no radical.</p>	<p>El radical dióxido de carbono (<math>CO_2^*</math>) cuando reduce el cobre (<math>Cu^{1+}</math>) a Cobre (Cu).</p> $CO_2^* + Cu^+ \longrightarrow CO_2 + Cu$
<p><b>Abstracción</b></p> <p>Un radical puede abstraer un átomo de hidrógeno de un enlace carbono-hidrógeno (C-H).</p>	<p>Cuando el radical hidroxilo abstrae un átomo de hidrógeno de la parte hidrocarbonada de la cadena de los ácidos grasos.</p> $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} CH + OH^* \longrightarrow \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} C^* + H_2O$

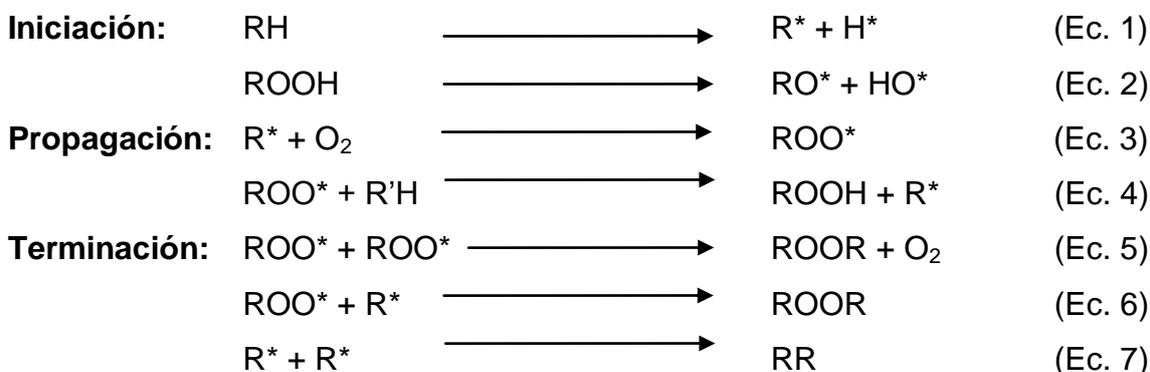
### II.1.3 Oxidación celular

En contraste con el oxígeno atmosférico, que en su estado basal es relativamente poco reactivo, las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son altamente reactivas, tóxicas y capaces de oxidar diversas biomoléculas, lípidos de membranas, proteínas y al ácido desoxirribo nucleico (Konigsberg, 2008).

En condiciones fisiológicas normales existe un balance entre la formación de especies reactivas (ER's) y antioxidantes endógenos. El estrés oxidativo sucede cuando el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se pierde en favor de los primeros, desencadenándose procesos dañinos que se asocian al envejecimiento celular y como consecuencia la aparición de diversas patologías y lesiones en los tejidos (Katalinic *et al.*, 2006).

La mayor parte de las reacciones de los radicales libres se llevan a cabo a través de un proceso en cadena, el cual se compone de tres etapas principalmente, Figura 3 (Madhavi *et al.*, 1996). El primer paso es la iniciación, en la cual se forman los primeros radicales libres ( $R^*$ ,  $H^*$ ,  $RO^*$ ,  $HO^*$ ) a partir de moléculas estables (RH, ROOH). Puede ser inducido mediante la acción térmica, fotoquímica, radioquímica o por oxidorreducción; los radicales libres formados son altamente reactivos con el oxígeno molecular, formando radicales peróxido e hidroperóxidos, los cuales inician una reacción en cadena (Ec.1). La sustracción de un átomo de hidrogeno por una especie reactiva, tal como un radical hidroxilo, provoca la iniciación de la oxidación (Ec. 2). La formación de un radical ( $R^*$ ) es mediado usualmente por trazas de metales, luz y altas temperaturas. Tras la iniciación, las reacciones de propagación consisten en la generación de nuevos radicales a expensas de otros, de tal manera que no se pierde el carácter radical y el proceso continua; puede haber más de una etapa de propagación (Ec. 3 y 4). En estas reacciones se lleva a cabo la sustracción de un átomo de hidrogeno de una molécula lipídica o la adición de un radical alquilo. La entalpía de la reacción es normalmente baja comparada con la de las reacciones de iniciación. La terminación es el estado donde los radicales libres reaccionan entre sí combinándose y formando compuestos estables no radicales (Ec. 5 a 7), mediante estas reacciones se consumen radicales y no se

generan nuevos, por lo que se pierde el carácter radical del proceso; así las reacciones de terminación permiten la interrupción de la secuencia repetitiva de los pasos de propagación de la cadena de reacción (Konigsberg, 2008; Madhavi *et al.*, 1996).



**Figura 3.** Mecanismo de oxidación (Madhavi *et al.*, 1996).

#### **II.1.4 Lesiones provocados por las especies reactivas (ER) a moléculas esenciales del organismo**

##### **II.1.4.1 Lesiones sobre las moléculas protéicas**

Las proteínas son las moléculas mas abundantes en las células y los tejidos, el daño provocado por la reacción con especies reactivas produce la oxidación, que se acompaña de un cambio en la estructura, función y actividad de la proteína, pudiendo ser el daño reversible o no. Los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína son los más susceptibles a ser oxidados por los radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El daño a proteínas por estrés oxidativo puede afectar tanto a las cadenas laterales de los aminoácidos que la integran como a los residuos azufrados específicos de aminoácidos (-SH y -S-CH<sub>3</sub>), fragmentando la cadena peptídica, alteraciones de la carga eléctrica o incremento de la susceptibilidad a la proteólisis (Dean *et al.*, 1997; Shacter, 2000).

#### **II.1.4.2 Lesiones sobre el ácido desoxirribo nucléico**

El ácido desoxirribo nucléico (ADN) es una molécula con apariencia de doble hélice constituida por dos cadenas que se mantienen unidas gracias a la formación de puentes de hidrogeno entre los pares de bases, cada cadena esta formada por desoxirribonucleótidos, compuestos de tres diferentes subunidades: una base nitrogenada, una molécula de azúcar (ribosa) y un grupo fosfato, siendo la secuencia de sus bases la parte variable de la molécula, contiene cuatro tipos de pares de bases, dos bases púricas: adenina y guanina, y dos bases pirimídicas: citosina y timina. La secuencia que tienen las bases es lo que confiere la información genética y puede ser traducido para sintetizar proteínas, o puede copiarse o replicarse para heredarse a la siguiente generación celular (Medeiros, 2008).

Las ERO's también pueden inducir daño al ADN, causando la ruptura de cadenas, entrecruzamientos y modificación de las bases; siendo los radicales hidroxilo y el oxígeno singulete, especies con capacidad de abstraer átomos de hidrogeno de estas moléculas, así como pegarse a las bases generando una diversidad de lesiones sobre la estructura química de estas moléculas. Las lesiones en el ADN se han relacionado con los procesos de cáncer, envejecimiento y muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2007; Medeiros, 2008).

#### **II.1.4.3 Lesiones sobre moléculas lipídicas**

Los lípidos forman parte de prácticamente todas las materias primas de los alimentos, estos después de ser digeridos y absorbidos, son transportados como lipoproteínas para desempeñar distintas funciones en el organismo, una función muy importante es la formación de las membranas. Los triglicéridos son los grupos principales de lípidos, se encuentran en las células encargadas del almacenamiento de las grasas en plantas y animales, así como los fosfolípidos, que también forman parte de la membrana biológica (Gordon, 2004; Zenteno y Saldaña, 2008).

El estudio del mecanismo de la oxidación de los lípidos ha sido de los más estudiados, donde la peroxidación de estos es una de las principales razones del daño celular, que induce a la célula a la pérdida de sus funciones y con ello a una gran variedad de patologías; así mismo, la rancidez de las grasas y aceites es un fenómeno que preocupa desde la antigüedad, debido a que gracias a la oxidación, se presentan alteraciones en el sabor, olor, color, viscosidad y solubilidad de estos alimentos, fenómeno que se acentúa en productos con elevado contenido lipídico como la leche y sus derivados (Zenteno y Saldaña, 2008).

### **II.1.5 Oxidación en los alimentos**

Los fosfolípidos y triglicéridos de la estructura celular, forman parte de las grasas o aceites presentes en una gran variedad de alimentos. Durante el procesamiento de estos, se pueden añadir grasas como parte de su formulación y pueden ser el principal componente de muchos productos como la mayonesa y aceites de fritura; estas grasas están compuestas casi exclusivamente por triglicéridos y constituyen la fuente potencial del sabor desagradable producto del enranciamiento oxidativo (Gordon, 2004).

En este fenómeno intervienen factores como la temperatura, exposición a la luz, presencia de radicales libres, enzimas catalíticas y metales quelantes, así como el almacenamiento prolongado, además del incremento en la presión de oxígeno; acentuando el deterioro nutricional y sensorial, con la consecuente formación de compuestos tóxicos. Estos cambios pueden disminuirse, controlando estos factores además de la incorporación de compuestos antioxidantes sintéticos o naturales (Pokorny, 2004).

Por otra parte, existen antecedentes acerca de la velocidad de oxidación de los lípidos, fenómeno que se incrementa con el grado de insaturación de los ácidos grasos. Otros estudios señalan que los ácidos grasos dispersos en sistemas acuosos coloidales muestran una tendencia opuesta y que cuando más insaturados están sus ácidos grasos, más estabilidad oxidativa poseen. (Mc Clements y Decker, 2000; Romero y Judis, 2005).

La reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos, conocida como autooxidación, es el proceso más común que provoca el deterioro oxidativo. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden descomponerse a través de este proceso, ya sea que estén presentes en forma de ácidos grasos libres o de triglicéridos o fosfolípidos. La luz y un agente sensibilizante como la clorofila pueden desencadenar la formación de oxígeno singlete a partir de oxígeno atmosférico iniciando así el deterioro oxidativo. Por otra parte, los metales como el oro y el cobre o la enzima lipooxigenasa pueden catalizar este proceso. La lipooxigenasa se encuentra presente en tejidos vegetales del tipo de la semilla de soya, la pera y el tomate, pudiendo provocar el deterioro oxidativo de los lípidos durante la obtención de aceite a partir de semillas oleaginosas, pero también interviene en el desarrollo de sabores agradables en los vegetales durante la masticación (Gordon, 2004).

#### **II.1.5.1 Productos de la oxidación lipídica en los alimentos**

Durante la autooxidación de los lípidos, así como por la oxidación de los productos de la lipooxigenasa, se forman hidroperóxidos, los cuales no son volátiles y son inodoros e inestables, se descomponen bien de manera espontánea o por reacciones catalizadas, formando sustancias aromáticas como los aldehídos que son percibidos como sabores desagradables, como el sabor a pescado que se desarrolla en los aceites y el sabor a nata o metálico que puede aparecer en la grasa de la leche; además de estos sabores, el deterioro oxidativo de los lípidos puede provocar la pérdida de color de los alimentos, especialmente por los carotenoides, y además pueden provocar la pérdida del valor nutritivo al reaccionar con algunas vitaminas como la vitamina E; en los aceites para fritura, la concentración de radicales libres aumenta rápidamente, más que en los alimentos almacenados o procesados a temperaturas moderadas, debido a altas temperaturas de proceso (180°C); elevada concentración de radicales libres, propicia la formación de dímeros provocando un incremento en la viscosidad del aceite, así como su oscurecimiento y la atenuada formación de espuma y humo (Gordon, 2004).

## II.2 ANTIOXIDANTES

Debido a los efectos adversos que desencadena el estrés oxidativo, es importante la aportación benéfica que presentan los antioxidantes, cuya eficacia depende de la adecuada ingesta de alimentos ricos en estos compuestos, además de la presencia de ciertos micronutrientes que actúan a manera de cofactores, como el ácido ascórbico (Shahidi, 1996).

Son sustancias que al encontrarse presentes en el organismo o en los alimentos, aplazan, retardan o previenen la oxidación de sustratos como las moléculas lipídicas. Los antioxidantes se emplean para prevenir el deterioro y pérdida de calidad de los alimentos, preservando su valor nutricional, así como sus efectos positivos en la salud (Shahidi, 1996).

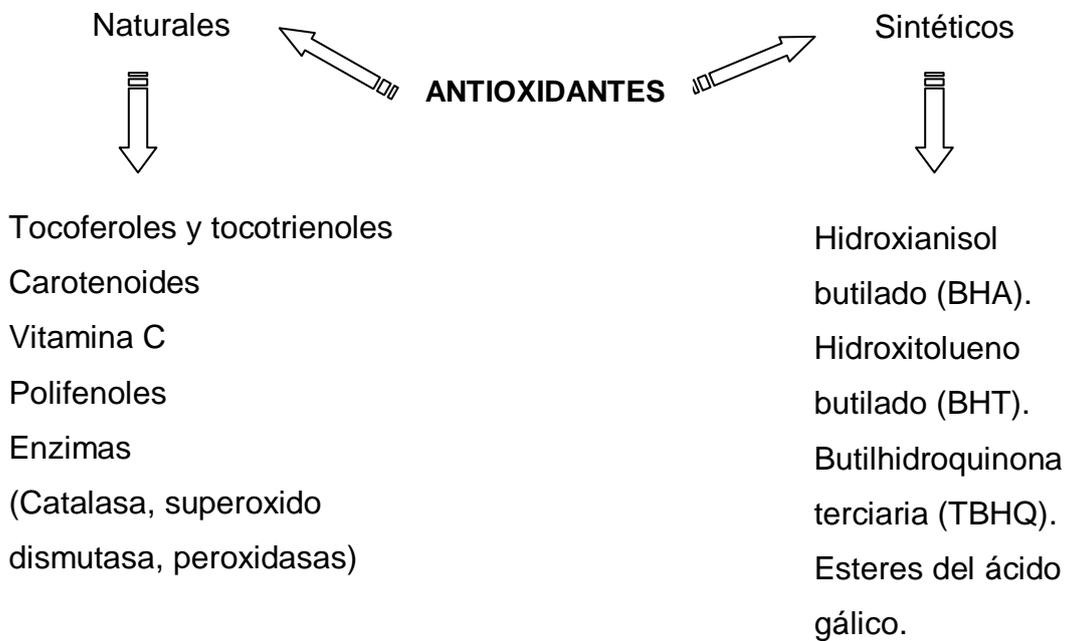
Por su parte, el organismo cuenta con un mecanismo antioxidante endógeno, el cual consiste en una serie de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, glutatión peroxidasa y compuestos no enzimáticos: carotenoides, vitaminas y polifenoles, entre otros (Konigsberg, 2008).

Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden provenir de su propia estructura, formando parte de su composición o bien siendo añadidos en forma de aditivos para su conservación; encontrándose así dos grupos importantes, los antioxidantes naturales y los sintéticos, Figura 4.

### II.2.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes

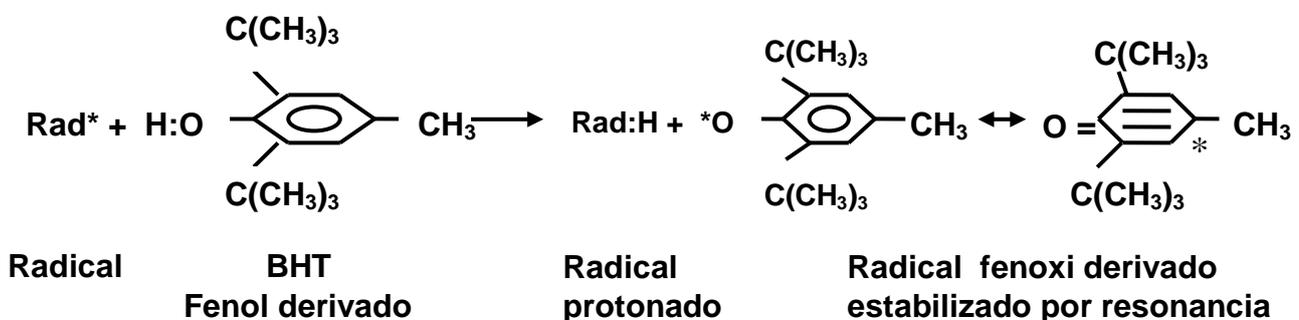
Los organismos aeróbicos se protegen del ataque de radicales libres mediante sistemas de defensa, incluyendo la unión a metales pesados, captación de oxígeno, absorción de la radiación UV y desactivación del oxígeno singulete (Madhavi *et al.*, 1996; Pokorny, 2004). Los antioxidantes secundarios actúan inactivando especies reactivas y posibles precursores de radicales libres, reduciendo la iniciación de la oxidación; se incluyen las proteínas de transporte y almacenaje (la transferrina, lactoferrina, albumina, etc.); las cuales secuestran iones metálicos evitando que actúen como catalizadores de la

oxidación, pertenecen a este grupo los agentes quelantes, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y el ácido cítrico; enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Giese, 1996; Niki, 1987).



**Figura 4.** Clasificación de los antioxidantes Shahidi, 1996.

Los antioxidantes primarios, rompen la cadena de propagación de la oxidación, eliminando radicales libres y suprimiendo la reacción en cadena; son hidrosolubles (ácido ascórbico) y liposolubles (vitamina E y β-caroteno); actúan cediendo un protón al radical libre, Figura 5 (Giese, 1996; Niki, 1987)



**Figura 5.** Mecanismo de acción de los antioxidantes (Giese, 1996).

## **II.2.2 ANTIOXIDANTES NATURALES**

El organismo cuenta con su propio sistema de defensa contra el daño oxidativo, antioxidantes endógenos (catalasa y otros compuestos no enzimáticos como la vitamina C), que no previenen completamente del daño provocado por las especies reactivas, siendo necesario la participación de antioxidantes a partir de la dieta para reforzar dicho sistema (Pokorny, 2004).

Por su parte, los recursos vegetales proporcionan una rica e importante cantidad de antioxidantes naturales, incluyendo tocoferoles, vitamina C, carotenoides y compuestos polifenólicos. Cuadro 3 (Shahidi, 1996).

Los compuestos fotosintéticos pueden producir altos niveles radicales libres y ERO's. En este sentido, las plantas sintetizan compuestos antioxidantes como defensa; particularmente los compuestos polifenólicos, que oxidan a los radicales libres (Shahidi, 1996).

### **II.2.2.1 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

Los compuestos polifenólicos (CP) tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo, incluyendo derivados funcionales de ésteres, metil ésteres y glucósidos; su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno, puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado; la naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, Cuadro 4 (Konigsberg, 2008).

Los CP forman parte de un grupo muy diverso de fitoquímicos, derivan de la fenilalanina y la tirosina; la biosíntesis de compuestos fenólicos sencillos se inicia a través de un precursor común, el ácido siquímico (Figura 6). Entre sus principales funciones se encuentran el actuar como metabolitos esenciales

para el crecimiento y reproducción de las plantas, así como agentes protectores frente a la acción de patógenos y en respuesta a condiciones de estrés como infecciones y radiaciones ultravioleta (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Naczk y Shahidi, 2004).

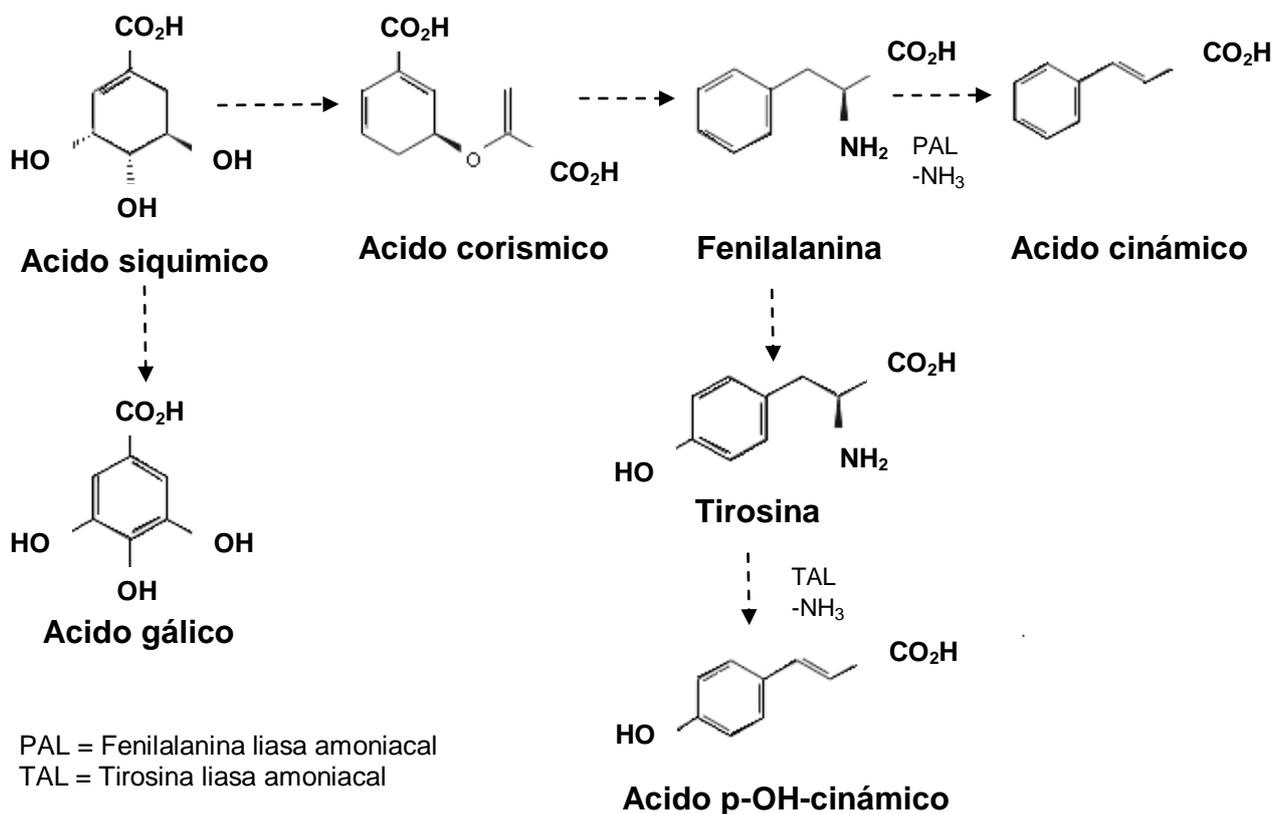
Actualmente se ha demostrado que los compuestos fenólicos poseen múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres, además de sus efectos antiinflamatorios, antivirales y antialérgicos. Sobre los alimentos, estos compuestos contribuyen con la astringencia, color, olor y su estabilidad oxidativa (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

**Cuadro 3.** Recursos naturales ricos en antioxidantes (Shahidi, 1996).

<b>Compuestos</b>	<b>Recursos alimenticios</b>
Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles)	Oleaginosas, aceite de palma y otros vegetales comestibles, nuez, germen de trigo, alfalfa, lechuga, levadura, carnes, leche, etc.
Vitamina C	Frutos cítricos, papas, pimientos, etc.
Carotenoides	Verduras de hoja oscura, zanahorias, papas, tomates, frutos cítricos, aceite de palma, albaricoques, etc.
Flavonoides/Isoflavonoides	Oleaginosas, bayas, pimienta, frutos cítricos, tomate, cebolla, etc.
Catequinas	Te verde y leguminosas.
Ácidos fenólicos y otros compuestos fenólicos	Te verde, romero, salvia, tomillo, orégano, cáscara de cacao, avena, salvado de arroz, oleaginosas, etc.

**Cuadro 4.** Clasificación de los polifenoles (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Compuestos fenólicos	Algunos ejemplos
Fenoles	Cresol y resorcinol
Ácidos fenólicos	Ácido gálico, vainillínico, ácido hidroxibenzóico e hidroxicinámico
Ácidos fenilacéticos	2-hidroxi-acetofenona, ácido 2-hidroxi-fenilacetico, diclofenaco, bromofenaco
Ácidos cinámicos	Ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico
Lignanos	Arctigenina, arctina y matairesinosida
Flavonoides	Flavonoles (caempferol, quercetina y miricetina) Flavonas (luteonina, epigenina y tricetina) Flavanonas (naringenina, butina y eriodictiol) Flavanoles (catequinas y galatocatequina) Antocianidinas (cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina, malvidina y pelargonidina) Auronas (sulfuretina y auresidina) Chalconas (buteina, floretina y hidroxifloretina)
Taninos	Taninos hidrolizables y condensados



**Figura 6.** Biosíntesis de los compuestos fenólicos (Tenorio *et al.*, 2006).

### II.2.2.1.1 Métodos de extracción de los compuestos polifenólicos.

La extracción de los compuestos fenólicos está influenciada por su naturaleza química, el método, tiempo y condiciones de almacenamiento, así como la presencia de otras sustancias que puedan interferir con su extracción y manejo como lo son las grasas. Los compuestos polifenólicos presentan desde formas simples hasta compuestos altamente polimerizados, entre los que se encuentran los ácidos fenólicos, taninos, entre otros y pueden formar complejos con carbohidratos y proteínas (Naczki y Shahidi, 2004).

Los extractos fenólicos se presentan como una mezcla de diferentes compuestos, los cuales generalmente son solubles en solventes orgánicos (Robbins, 2003). No existe un procedimiento completamente satisfactorio para la extracción de todos los fenoles o tipos específicos de fenoles. Frecuentemente se ha trabajado con metanol, etanol, acetato de etilo, acetona,

cloroformo, propanol, agua y sus combinaciones; encontrándose que el metanol es mejor disolvente (Naczk y Shahidi, 2004; Palma y Taylor, 1999).

Con respecto a los ácidos fenólicos, para la extracción tanto de los compuestos libres como los esterificados, se han empleado mezclas de metanol-acetona-agua (7:7:6) a temperatura ambiente. Para los compuestos libres, soluciones ácidas o alcalinas; la liberación de aquellos que se encuentran esterificados con dietil éter y nitrógeno, no obstante se reporta que bajo estas condiciones existe una pérdida significativa de algunos derivados de los ácidos hidroxicinámicos, que se previene con la incorporación del ácido ascórbico y ácido etilendiamino tetraacético, EDTA (Krygier *et al.*, 1982). Por su parte, los flavonoides son comúnmente extraídos con metanol, etanol y agua y tratados con ácido clorhídrico (HCl) bajo condiciones atmosféricas controladas empleando nitrógeno, para hidrolizar los flavonoides esterificados con carbohidratos (Naczk y Shahidi, 2004).

### II.2.2.2 Ácidos hidroxicinámicos

Entre los CP, destacan los ácidos hidroxicinámicos por tener un amplio poder antioxidante, presentes en numerosos recursos vegetales, donde se encuentran los ácidos caféico, ferúlico y p-cumárico, que rara vez se encuentran libres, y por lo general están presentes en forma de derivados, Figura 7 (Konigsberg, 2008; Shahidi, 1996).



**Figura 7.** Estructura molecular de los ácidos ferúlico, caféico y cumárico (Cadenas y Packer, 2002).

La contribución de los derivados fenólicos a la actividad antioxidante esta asociada con su efectividad como donadores de hidrógeno, lo cual depende del número y arreglo de los grupos hidroxilos y su conjugación (Rice-Evans *et al.*, 1996).

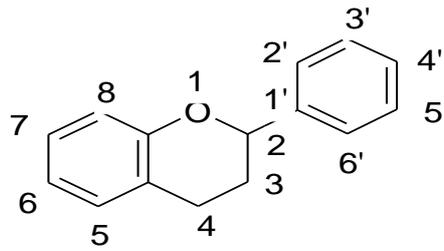
### II.2.2.3 Flavonoides

Otro grupo de CP con importante actividad antioxidante lo constituyen los flavonoides y son difenilpropanos que frecuentemente forman parte de las plantas; la principal fuente de estos son las cebollas, manzanas, uvas, cerezas, especias, jugo de cítricos, vino y te (Madhavi *et al.*, 1996).

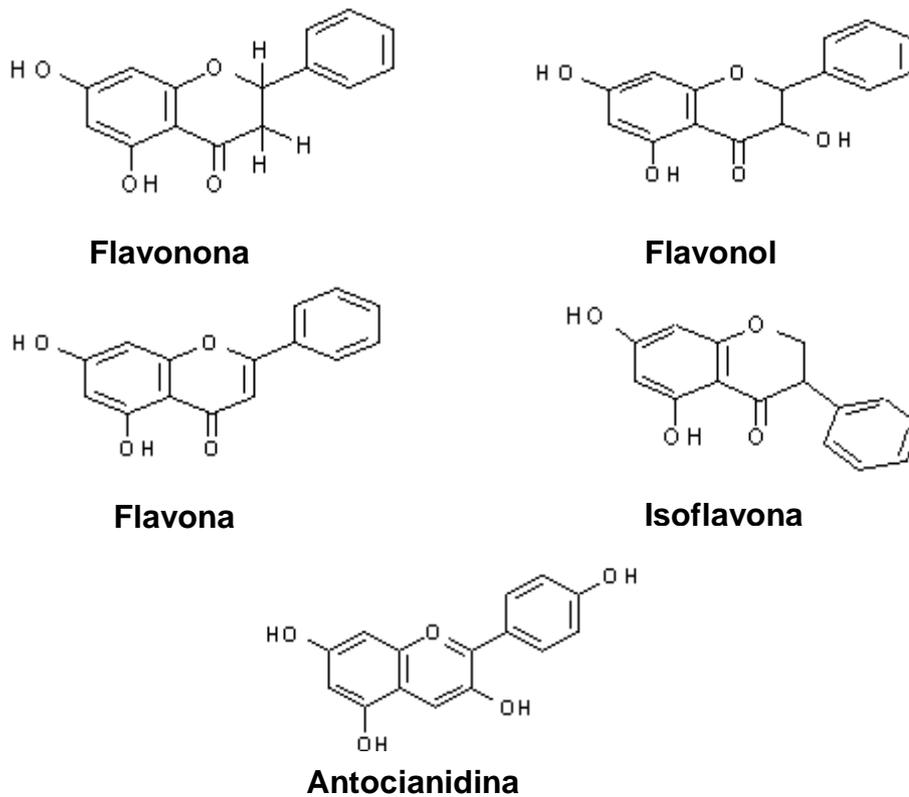
Son compuestos que comparten una estructura común de difenilpiranos, constituido por dos anillos de fenilos, Figura 8; la formación de los flavonoides es a partir de la fenilalanina y la tirosina (Rice-Evans *et al.*, 1996).

La estructura básica de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, Figura 9. Así mismo se clasifican en función de sus características estructurales en (Konigsberg, 2008):

1. **Flavonol:** Representados por la catequina, los ésteres gálicos, llamados epicatequinas, galato de epicatequina y el galato de epigalocatequinas, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
2. **Flavonoles:** Representados por la quercetina, la cual posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
3. **Flavonas:** Representados por la diosmetina, la cual posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C<sub>3</sub>
4. **Antocianidinas:** Tienen unido el grupo –OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.



**Figura 8.** Estructura básica de los flavonoides (Tenorio *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Clasificación estructural de los flavonoides (Konigsberg, 2008).

La actividad antioxidante de los flavonoides depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química; ejercen su poder antioxidante, inhibiendo la actividad de algunas enzimas como la xantina oxidasa y lipooxigenasa; desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos oxidativos al poseer en su estructura química un número variable

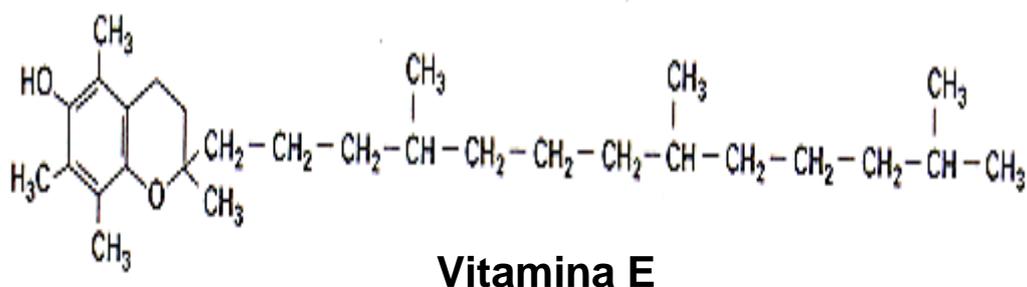
de grupos hidroxilo fenólicos con propiedades de quelación del hierro y otros metales que catalizan las reacciones de oxidación (Tenorio *et al.*, 2006).

La quercetina es el antioxidante más potente de los flavonoides; misma que muestra efectos sinérgicos con las vitaminas C y E (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Middleton *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996).

#### II.2.2.4 Tocoferoles y tocotrienoles

La vitamina E es un conjunto de derivados tocoferoles y tocotrienoles. Todos los componentes de este grupo poseen un núcleo heterocíclico oxigenado, con un grupo hidroxilo (OH), además de poseer grupos metilo y una cadena lateral fitil de origen terpénico. Los distintos tocoferoles y tocotrienoles son designados por las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y sólo difieren entre si por la cantidad y posición de los grupos metilo del cromano, siendo el  $\alpha$ -tocoferol el de mayor actividad biológica. Los tocoferoles y tocotrienoles poseen estructuras similares, la diferencia entre ellos radica en que los primeros poseen una cadena lateral saturada (Figura 10) y en los segundos ésta es insaturada. Presentan un carácter lipofílico, por tal razón se acumulan en lipoproteínas, membranas celulares y en depósitos de grasa (Konigsberg, 2008; Paker *et al.*, 2002).

El  $\alpha$ -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble que protege a la célula de los radicales libres y es considerado la primera línea de defensa contra la oxidación lipídica. (Konigsberg, 2008; Paker *et al.*, 2002).



**Vitamina E**

**Figura 10.** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol (Konigsberg, 2008).

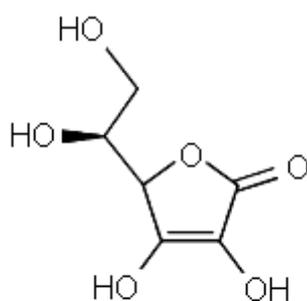
### II.2.2.5 Ácido ascórbico

La vitamina C, esta altamente distribuida en plantas y frutas como: fresas, papaya, naranjas, kiwi, guayaba, brócoli; además de otros recursos vegetales no convencionales que generalmente no son consumidos por el hombre, a diferencia de los animales en pastoreo libre; se debe de tener en cuenta que es termolábil, por lo que se pierde fácilmente en aquellos alimentos que sufren de cocción (Padayatty, *et al.*, 2002).

Conocida como ácido ascórbico ( $C_6H_{12}O_6$ ); presenta en su estructura dos grupos hidroxilo (-OH) ionizables, Figura 11, que le confiere carácter ácido y la denominación ascorbato por la predominancia de la forma aniónica a pH fisiológico (6.8). Los seres humanos necesitan ingerir esta vitamina a través de la dieta ya que no la pueden sintetizar (Konigsberg, 2008).

Las funciones fisiológicas del ácido ascórbico dependen en gran medida de su potencial de oxidorreducción, siendo su acción antioxidante complejo debido a sus múltiples funciones, ya que por un lado tiene la capacidad de reducir al hierro y a su vez, puede descomponer hidroperóxidos lipídicos (LOOH) o peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), generando radicales libres alcoxilo ( $LO^*$ ) e hidroxilo ( $OH^*$ ), por lo tanto el ácido ascórbico puede actuar como prooxidante en presencia de hierro, peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno; la acción antioxidante del ácido ascórbico se basa en la anulación de radicales libres a través de la donación de un electrón seguido de un protón, dando lugar a un producto no radical reducido, convertido en ascorbato y ácido dehidroascórbico, ambos son reducidos para mantener la biodisponibilidad de la vitamina C (Kitts, 1997; Niki, 1987).

Se considera el antioxidante hidrosoluble más importante en los fluidos extracelulares, reacciona de forma directa con los radicales superóxido, hidroxilo e hidroperóxidos lipídicos; se le atribuye la capacidad de regenerar antioxidantes de bajo peso molecular como el  $\alpha$ -tocoferol, glutatión y  $\beta$ -caroteno (Kitts, 1997; Niki, 1987).



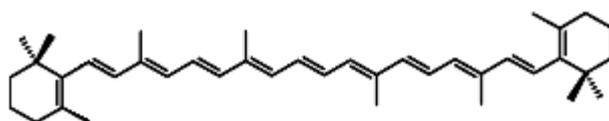
**Vitamina C**

**Figura 11.** Estructura química del ácido ascórbico (Konigsberg, 2008).

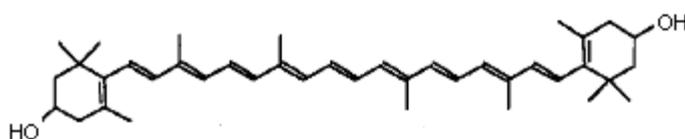
### II.2.2.6 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles. Actúan también como la protectores frente al daño oxidativo. Son sintetizados en los aparatos fotosintéticos de las plantas superiores; los animales y humanos los obtienen a través de la dieta (Olmedilla, 2002).

Su estructura básica consiste en un esqueleto tetraterpeno que puede estar ciclado en uno o los dos extremos de la molécula: Los carotenoides compuestos sólo por átomos de carbono e hidrógeno reciben el nombre de carotenos mientras que los que contienen algún grupo funcional con oxígeno se conocen como xantofilas. Ambos cuentan con un extenso sistema de dobles enlaces conjugados, Figura 12 (Burton, 1989).



**β-Caroteno**



**Zeaxantina**

**Figura 12.** Estructura química de los carotenoides (Konigsberg, 2008).

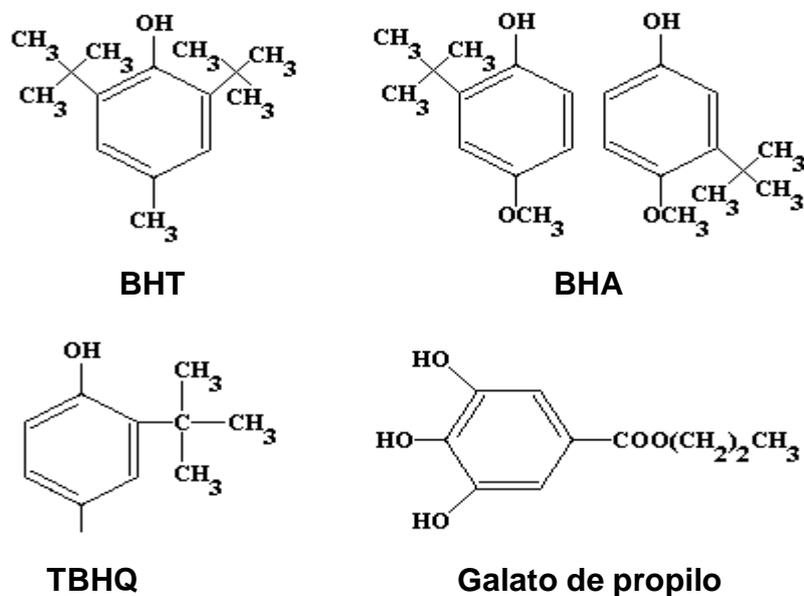
El  $\beta$ -caroteno (Figura 12) se compone por una larga cadena de dobles enlaces conjugados, y no tiene las características estructurales comunes de los antioxidantes capaces de romper la cadena de propagación de la oxidación lipídica, incluso este extenso sistema de dobles enlaces conjugados le da un carácter prooxidante y lo hace muy susceptible al ataque por parte de radicales peroxilo; por otro lado se tiene que la tasa de oxidación es dependiente de la presión parcial de oxígeno; así, cuando la presión parcial de oxígeno es baja, disminuye la concentración de radicales y con esto la oxidación del sistema (Burton, 1989).

### **II.2.2.7 Péptidos y aminoácidos**

Algunos péptidos generados de la digestión de varias proteínas, como la caseína en la leche y las proteínas de soya, presentan actividad antioxidante, la cuál se debe a los aminoácidos que forman parte de la secuencia de los péptidos, se sabe que los que contienen serina fosforilada, tienen la capacidad de actuar como quelantes del hierro, zinc y calcio, impidiendo así que estos metales catalicen la reacción de oxidación lipídica en los alimentos; por su parte, otros aminoácidos como la tirosina y el triptófano poseen actividad antioxidante al contar con grupos fenólicos e indólicos, mismos que sirven como donadores de hidrógeno (Hernández-Ledezma *et al.*, 2005; Pihlanto, 2006).

### **II.2.3 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS**

Los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimenticia son los compuestos fenólicos: Hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), butilhidroquinona terciaria (TBHQ) y esteres del ácido gálico (galato de propilo), Figura 13. Estos compuestos contienen sustituciones alquílicas para mejorar su solubilidad en grasas y aceites; su actividad antioxidante es dependiente de su composición química, que a su vez influye sobre sus propiedades físicas como solubilidad y estabilidad térmica (Pokorny, 2004).



**Figura 13.** Estructura química de algunos antioxidantes sintéticos (Madhavi *et al.*, 1996).

El uso de antioxidantes sintéticos como aditivos en los alimentos, incluye aspectos negativos debido a sus probables efectos tóxicos, ya que son compuestos altamente lipofílicos, requieren ser solubilizados en solventes orgánicos o aceites vegetales. Es un hecho reconocido que los solventes orgánicos apolares son altamente tóxicos para los mamíferos, lo cual limita el uso de estos compuestos como protectores antioxidantes en alimentos, y su incorporación debe ser limitada y normalizada (Madhavi *et al.*, 1996).

### 2.2.3.1 Hidroxianisol butilado

El hidroxianisol butilado (BHA), formado por una mezcla de isómeros 3-terbutil-4-hidroxianisol y 2-terbutil-4-hidroxianisol (Figura 13), de fórmula molecular C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, olor característico y es un sólido blanco o amarillento, altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Es uno de los antioxidantes sintéticos más utilizados comercialmente debido a su alta eficacia, su estabilidad a las variaciones de pH y su acentuado sinergismo con otros antioxidantes. No tiene acción mutagénica, pero es capaz de modular el

efecto de ciertos carcinógenos sobre animales de experimentación, potenciando o inhibiendo su acción, de acuerdo al carcinógeno de que se trate (Carreras, 2004; Madhavi *et al.*, 1996).

### **II.2.3.2 Butil hidroxi tolueno**

El butilhidroxi tolueno (BHT), es un compuesto con propiedades similares al BHA; es también conocido como 3,5-di-terbutil-4-hidroxitolueno, metil-di-terbutilfenol o 2,6-di-terbutil-para-cresol (Figura 13); con una fórmula molecular:  $C_{15}H_{24}O$ , presenta alta solubilidad en grasas y aceites, además de ser insoluble en agua, es relativamente débil si no se combina con otros antioxidantes y se considera más efectivo para aplicaciones en grasas animales que en aceites vegetales, posee una acción sinergista con otros antioxidantes sintéticos como el BHA y la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), pero no con el galato de propilo (Carreras, 2004; Madhavi *et al.*, 1996).

### **II.2.3.3 Butilhidroquinona terciaria (TBHQ)**

La butilhidroquinona terciaria (TBHQ) es el antioxidante sintético más potente y efectivo para la mayoría de las grasas y aceites; se utiliza para estabilizar aceites vegetales altamente insaturados. Se trata de un sólido blanco, cristalino, moderadamente soluble en aceite e insoluble en agua; su estructura química se muestra en la Figura 13 (Carreras, 2004).

### **II.2.3.4 Esteres del ácido gálico**

Los ésteres del ácido gálico se basan en la estructura trihidroxil de este ácido (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Tienen una potencia antioxidante relativamente alta, pero su uso es limitado debido a su tendencia a unirse al hierro y por su sensibilidad al calor. Suelen aplicarse con compuestos sinérgicos como el ácido cítrico, que actúa como quelante del hierro; compuesto poco soluble en agua, es un antioxidante poco útil para la

preservación de los aceites de fritura o alimentos y grasas sometidas a altas temperaturas durante su procesamiento y fabricación, debido a su poca resistencia al calentamiento, por lo que se utiliza con BHA para una mayor efectividad (Madhavi *et al.*, 1996).

## **II.2.4 ANTIOXIDANTES ENDOGENOS**

De acuerdo con Konigsberg (2008), los antioxidantes endógenos con los que cuenta el organismo pueden funcionar a través de varios mecanismos, previniendo la formación de radicales o catalizando la síntesis o regeneración de antioxidantes no enzimáticos; dentro de este sistema antioxidante, se encuentran principalmente las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSHPx)

### **II.2.4.1 Super óxido dismutasa**

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloproteína presente en las células y fluidos extracelulares. Elimina el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), acelerando su conversión a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), al encontrarse presente en todos los organismos aeróbicos y en la mayoría de los compartimentos subcelulares, además de inactivarse a temperaturas superiores al resto de las enzimas antioxidantes, tiene un papel importante de defensa frente al daño oxidativo (Yu, 1994).

### **II.2.4.2 Glutatión peroxidasa**

La glutatión peroxidasa (GSHPx) es una selenoproteína, se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol de las células. Se considera la enzima con mayor capacidad para eliminar peróxidos; actúa catalizando las reacciones de reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los peróxidos lipídicos, ROOH (Halliwell *et al.*, 1995).

### **II.2.4.3 Catalasa (CAT)**

La catalasa (CAT) es una hemoproteína de amplia distribución intracelular, se encuentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias; descompone el peróxido de hidrogeno principalmente en agua y oxígeno; desde el punto de vista cinético, la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx) posee mucha más afinidad por el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que la catalasa, pero esta última tiene la ventaja de no depender de la regeneración del glutatión (GS), ni de consumo de la nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasa como la GSHPx, mientras que la catalasa actúa a concentraciones mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yu, 1994).

## **II.3 PRUEBAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

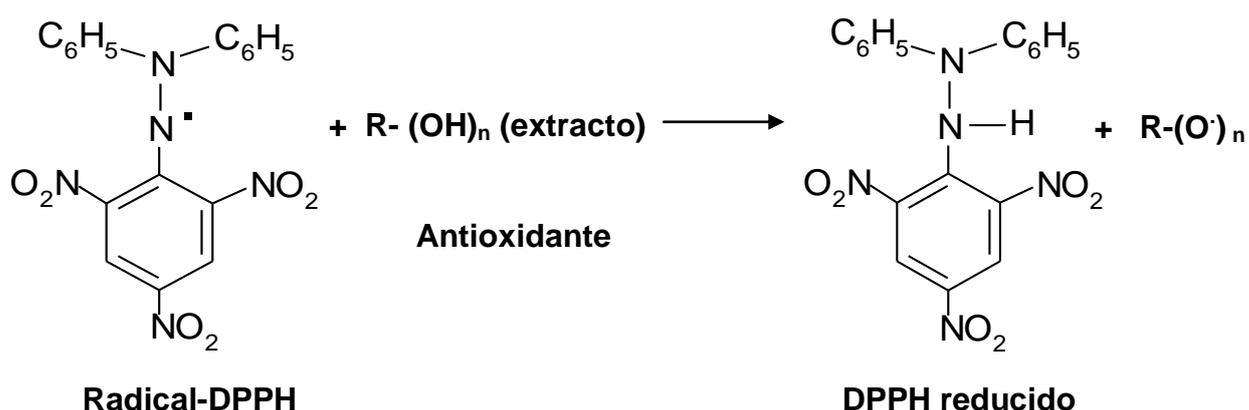
Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante; una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la evaluación de la actividad antioxidante se basan en la generación de radicales libres cromóforos para simular especies reactivas de oxígeno y son estabilizados por la presencia de un antioxidante; ofrecen información muy diversa y en general permiten obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo tienen ligeras aproximaciones a los efectos protectores de la salud, contrario a los métodos *in vivo* como el que determina la capacidad de absorción de radicales oxígeno, ORAC (Cadenas y Packer, 2002).

### **II.3.1 Capacidad secuestrante frente a radicales cromógenos**

Existen diferentes métodos analíticos para la cuantificación de la actividad antioxidante; usualmente se emplean ensayos basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres; el uso de sustancias cromógenas de naturaleza radical son de los ensayos mas utilizados debido a la rapidez, sensibilidad, estabilidad del radical, reproducibilidad y bajo costo. El ensayo consiste en evaluar la capacidad de los compuestos antioxidantes de

secuestrar al radical, al reducirlo mediante la donación de átomos de hidrógeno; determinando el decremento de absorción que esta en función de esta reducción; uno de, Figura 14 (Blois, 1958; Hansmann *et al.*, 1997; Re *et al.*, 1999).

Los radicales más frecuentemente utilizados son el DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo), DMPD (diclorato de N,N,-dimetil-p-fenilendiamina) y ABTS<sup>+</sup>(ácido2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina- bencinosulfónico-6)); la diferencia radica en la solubilidad y los espectros de máxima absorción, donde el radical DPPH es soluble en medios orgánicos y presenta una pico de absorbancia a 515nm, el DMPD es soluble en medios acuosos con un máximo de absorción a 505nm, mientras que el ABTS<sup>+</sup>, es soluble en ambos medios y puntos de máxima absorción en 414, 654, 734 y 815 (Blois, 1958; 1997; Re *et al.*, 1999).



**Figura 14.** Reacción del radical 2,2-difenilpicrilhidracilo (Taga *et al.*, 1984).

### II.3.2 Voltamperometría.

Alternativamente, se ha empleado el uso de la voltamperometría cíclica como herramienta instrumental para la evaluación de la capacidad antioxidante de aquellos compuestos de bajo peso molecular. Los voltamperogramas cíclicos proveen de información que describe la capacidad antioxidante, la cual surge en gran parte de la habilidad del compuesto de donar electrones a través del potencial de la onda anódica (Wellington *et al.*, 2004).

### **II.3.3 Método de capacidad de reducción del hierro, FRAP**

Otro método para cuantificar el potencial antioxidante, es el ensayo conocido como FRAP (ferric reducing ability of plasma), el cual inicialmente fue desarrollado para determinar la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo, pero actualmente se emplea para cuantificar la capacidad antioxidante en una gran variedad de muestras biológicas y compuestos puros de frutas, vinos y tejidos animales. Este método es rápido y simple, además de que se trata de una reacción reproducible y lineal que consiste en evaluar el cambio en la absorbancia a 593 nm que presenta la formación de un compuesto azul debida a la reducción del hierro (III) al hierro (II) por la actividad donadora de electrones de los antioxidantes (Benzie *et al.*, 1999; Ghiselli *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2002).

### **II.3.4 Blanqueo con $\beta$ -caroteno**

Este ensayo consiste en evaluar la capacidad de los compuestos que actúan como antioxidantes para impedir la oxidación del  $\beta$ -caroteno; es una técnica rápida, sencilla y reproducible, donde se induce la formación de los radicales libres, al exponer el  $\beta$ -caroteno a diversos factores como la luz, temperaturas altas y el peróxido de hidrógeno, una vez formados los radicales, dependerá de la eficiencia del extracto para estabilizarlos y prevenir la oxidación (Cadenas y Packer, 2002).

### **II.3.5 Capacidad de absorción de radicales oxígeno, ORAC**

El ensayo conocido como ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) es una evaluación *in vivo* que determina la capacidad antioxidante hidrofílica frente a los radicales libres. Se basa en el uso de la proteína fluorescente (R-ficoeritrina) como sustrato oxidable y 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), como generador de radicales peróxido y el sistema cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ )-peróxido de hidrógeno, como generador del radical hidroxilo. Este método es el único que registra la acción de la especie radical hasta el final,

usando el decremento de la fluorescencia para realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante. De esta manera, la técnica considera tanto el porcentaje de inhibición como la extensión del tiempo de ésta en un solo valor. (Glazer, 1990; Winston *et al.*, 1998).

## II.4 ALIMENTOS FUNCIONALES

Para los humanos, el alimento es más que la necesidad biológica de supervivencia, sirve de gran variedad de funciones fisiológicas; como afrodisíaco, estimulante, anestésico y de consuelo, excepto durante una larga privación de este (Andlauer y Furst, 2002).

El concepto tradicional de que la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales para el mantenimiento de una salud óptima ha cambiado en los últimos años; los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función de beneficio y contribuyen a una vida saludable. (Caragay, 1992; Chasquibol *et al.*, 2003).

No existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son los alimentos funcionales, se trata de un concepto aun en desarrollo. En general son cualquier alimento o parte de un alimento que además de sus componentes nutritivos contiene componentes bioactivos, de forma natural o añadida, que favorecen la salud, capacidad física y mental, ayudando a la prevención, reducción y tratamiento de enfermedades (Chasquibol *et al.*, 2003).

En cada alimento existen diversos compuestos bioactivos que en cantidades adecuadas aportan beneficios a la salud; pudiendo ser probióticos, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroles, fitoestrogenos, fibra dietética y resveratrol, entre otros, Cuadro 5 (Chasquibol *et al.*, 2003).

**Cuadro 5.** Compuestos bioactivos y sus fuentes naturales (Drago *et al.*, 2006; Valencia y Román, 2004).

Compuestos bioactivos	Definición y función	Recurso natural
Fibra dietética	Son las partes comestibles de los carbohidratos, resistentes a la digestión; incluye polisacáridos (celulosa, $\beta$ -glucanos, hemicelulosas, pectinas, gomas y mucilagos), oligosacáridos (fructooligosacaridos, inulina, etc.) ligninas, entre otros. Mejora la salud intestinal mediante su interacción y modificación del ecosistema microbiano en el intestino.	Frutas secas, miel, salvado de trigo, avena, algas, flores de malva, cítricos, manzana, harina de maíz, plátano, papas crudas, nopal, entre otros.
Probióticos y prebióticos	Microorganismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal, restituyendo la población del medio interno y protegiendo la integridad intestinal. Formas comunes son Lactobacillus y Bifido Bacterium	Yogurth y productos lácteos fermentados, entre otros.
Antioxidantes	Son sustancias que aplazan, retardan o previenen la oxidación celular; algunos compuestos con actividad antioxidante son los polifenoles, ácidos cinámicos, flavonoides, estilbenos, tocoferoles, Vit. C, $\alpha$ -tocoferol, entre otros.	Uva, vino tinto, pasas, cereza, arándano, ajo, almendra, aceite de oliva, leche de cabra y derivados.
Resveratrol	Disminuye la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol, tiene actividad antioxidante	Uva, vino tinto, cacahuates
Fitoesteroles	Son esteroides de origen vegetal y cuya estructura química es muy similar a la del colesterol; con propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas y principalmente disminuyen los niveles de colesterol en sangre.	Maíz, soya, aceites, verduras

Ácidos grasos poliinsaturados	Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga $\omega$ -6, ácido araquidónico, y $\omega$ -3, ácido docosahexaenoico, son fundamentales en la estructura y funcionalidad del sistema nervioso y visual de los humanos, mejoran la composición de la grasa corporal y disminuye el riesgo de ciertos tipos de cáncer y de enfermedades cardiovasculares	Pescados, aceite de atún, quesos de leche de cabra, entre otros
Compuestos organosulfurados	Disminuyen el colesterol total, colesterol LDL y los triglicéridos.	Ajo, cebolla, entre otros.
Fitoestrógenos: isoflavonas, lignanos (enterodiol y enterolactona) y los cumestanos (coumestrol).	Los fitoestrógenos poseen importantes propiedades farmacológicas, destacando su actividad estrogénica, aplicada en el alivio de los síntomas asociados a la menopausia y la osteoporosis; efectos benéficos contra el cáncer de próstata, obesidad y diabetes, así como inflamación, artritis, infarto miocárdico, neurodegeneración y cáncer de mama.	Isoflavonas: soya, lentejas, garbanzos y otras legumbres; lignanos: frutas y cereales; coumestanos: semillas de girasol

## II.5 PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL DE CAPRINOS

Las cabras han acompañado al hombre desde los albores de la humanidad proporcionándole abrigo y alimento, siendo un factor determinante en la estructura socioeconómica de los pueblos primitivos, tal es el caso de Irán, 8000 a.C. donde el primer animal que fue domesticado y del cual se obtuvieron productos de consumo fue la cabra. La incidencia geográfica de la domesticación de la cabra, coincide con la ubicación de la cuna de la primera civilización conocida: Mesopotamia. Convirtiéndose posteriormente en la base de la economía de lugares como África, Asia, España, Australia, etc. (Hatzimaoglou y Boyazoglu, 2004).

La cabra domestica se encuentra distribuida en prácticamente todo el mundo con excepción de las zonas polares y trópicos muy húmedos, Cuadro 6. Desde su lugar de origen que es la cuenca del Mediterráneo se expandieron a todo el mundo. Las cabras ingresaron a América con los españoles en el siglo XVI, quienes las trajeron para abastecerse de leche y carne. La amplia producción de los caprinos se explica, en parte, por su habilidad para sobrevivir y prosperar en ambientes particularmente difíciles, donde la vegetación es escasa; sus cualidades de rusticidad le permiten resistir más que el ganado vacuno u ovino en condiciones de sequía prolongada, lo cual hace de la cabra un animal de gran valor (Rodríguez y Valencia, 2006).

En diferentes partes del mundo la producción de las cabras se da en tres categorías: extensivo, semiextensivo e intensivo; cada uno de ellos tiene múltiples subdivisiones según el continente, la zona agroclimática, la cultura y la problemática socioeconómica de cada país (Wilkinson y Stara, 1989).

El sistema extensivo se caracteriza por bajos niveles de producción del rebaño, donde la cabra recorre extensas áreas para alimentarse de arbustos y pastos. La cabra se ordeña una vez al día con producciones de leche de 80-100 litros, donde los cabritos son criados por la madre (Wilkinson y Stara, 1989).

En el sistema semiextensivo la cabra es alimentada con pastos de mejor calidad, muchas veces con praderas artificiales. Durante la lactancia las hembras pueden ser suplementadas con subproductos de molinería y heno. Las cabras se ordeñan 1-2 veces al día con producciones de leche 120-180 litros por lactancia (Wilkinson y Stara, 1989).

El sistema intensivo, la cabra es alimentada en praderas de buena calidad, forrajes conservados y alimentos balanceados; existe la modalidad de estabulación completa, donde la cabra es mantenida y alimentada permanentemente en establos. Se ordeñan dos veces al día con producciones de leche de 200-400 ó más litros por lactancia (Wilkinson y Stara, 1989).

**Cuadro 6.** Población mundial de cabras (FAOSTAT, 2004).

<b>Continente y país</b>	<b>Cabras (en miles cabezas)</b>
África	219,736
Asia	487,588
Europa	18,425
América	36,713
<b>México</b>	<b>9,500</b>
Oceanía	816,940
<b>TOTAL MUNDIAL</b>	<b>764,510,558</b>

En países occidentales los caprinos son reconocidos por su aptitud lechera, sin embargo, su importancia mundial radica principalmente como productor de carne; en México, el cabrito al pastor, el queso y dulce de leche de cabra, han jugado un papel importante en la economía (Romero, 2004).

De acuerdo con FAOSTAT (2004) en México hay 9,5 millones de caprinos de los cuales 20%, 58% y 22% se encuentran en el norte, centro y sur del país, respectivamente. Los caprinos son mayoritariamente criollos; sin embargo, se introducen cruzamientos con razas puras como la Nubian, Alpino y Saanen. Los caprinos para leche están concentrados en el norte de México; dos estados del norte y un estado de centro-oeste (Coahuila, Durango y Guanajuato) concentran el 75% de la producción; la mayoría de la leche en esas regiones es adquirida por compañías para elaborar queso y dulces. Algunas empresas especializadas en leche de cabra, mantienen estabulados a los animales de alto valor genético, alimentados con forrajes henificados y concentrados de cereales. El resto de la producción caprina se lleva a cabo bajo condiciones extensivas, la mayoría de estos animales son mantenidos para el consumo doméstico de carne de animales adultos y ocasionalmente para el ordeño. Su alimentación está basada en el pastoreo y ramoneo de la vegetación nativa y de las orillas de los caminos; pastoreado durante 6 a 10 horas al día (Amendola y Castillo, 2002)

## **II.6 LECHE CAPRINA**

### **II.6.1 Definición y generalidades**

Se entiende como leche para consumo humano, al producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro (NOM-155-SCFI-2003).

La leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias: lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas y enzimas, entre otras, que se encuentran en emulsión como las grasas y sustancias asociadas; otras sustancias se encuentran en suspensión como las caseínas ligadas a sales minerales y en disolución verdadera como la lactosa, vitaminas hidrosolubles, proteínas del suero y sales minerales, Cuadro 7 (Alais, 1990).

Asimismo, la leche contiene microcomponentes como vitaminas, iones metálicos, enzimas y anticuerpos; así mismo, su composición, aún dentro de la misma especie, puede variar en función de diversos factores como:

- a) Factores genéticos; especie, raza e individuo.
- b) Fase de lactación, edad del animal, número de lactaciones y la gestación (factores fisiológicos).
- c) Estados patológicos.
- d) Factores externos como el clima, alimentación y el sistema de ordeño

A pesar de que la leche vacuna, ovina y caprina contienen el mismo tipo de nutrientes; difieren en la capacidad en la que el ser humano puede asimilarse; registrándose casos de sensibilidad o intolerancia. Un ejemplo son las proteínas, muchos infantes son sensibles a las proteínas de la leche vacuna causando cólicos; característica que puede ser menos impactante al ingerir

leche caprina. Las proteínas de la leche de cabra difieren de las de otras especies en su composición de aminoácidos y en la proporción relativa de sus proteínas lácteas y su polimorfismo genético. En relación a la leche vacuna las proteínas de la leche caprina poseen menor resistencia a calor térmico y un mayor pH. Estas propiedades favorecen su asimilación y hacen de la leche caprina el sustituto ideal (Klinger y Rosenthal, 1997).

**Cuadro 7.** Composición de leche de diferentes especies, g/100g (Alais, 1990).

Especie	Agua	ST	SNG	Proteína total	Caseína	Grasa	Lactosa	Cenizas
Humana	87.1	12.9	8.8	1.3	0.5	4.1	7.2	0.3
Vaca	87.6	12.4	8.7	3.3	2.8	3.7	4.7	0.6
<b>Cabra</b>	<b>87.0</b>	<b>13.0</b>	<b>8.5</b>	<b>3.6</b>	<b>2.7</b>	<b>4.5</b>	<b>4.6</b>	<b>0.6</b>
Borrega	81.6	12.9	8.8	5.8	4.9	7.5	4.4	0.9

ST = Sólidos totales

SNG= Sólidos no grasos.

## II.6.2 Producción de leche caprina

La producción lechera mundial de cabra se estima en 8,000,000 de toneladas al año. Teniendo una composición físico-química muy parecida a la de vaca, lo que permite elaborar variados productos lácteos: leche de consumo, diferentes tipos de quesos, yogurt y leches fermentadas, además de diversos dulces de leche. Por su color blanco, su sabor y las características de sus proteínas, la leche caprina es una materia prima muy apreciada para elaborar quesos de diferentes tipos y texturas (Klinger y Rosenthal, 1997).

Contrario a la creencia popular de que la producción de leche de cabra es propia de países en vías de desarrollo, actualmente dicha producción tiene

importancia económica en países industrializados, sobretodo los localizados en el área del Mar Mediterráneo como España, Grecia, Francia, e Italia. Sin embargo, expresado como porcentaje de la producción nacional de leche de todas las especies, representa la mayor proporción en países asiáticos y africanos como Blangadesh y Somalia. En Latinoamérica, se ha popularizado la producción de leche caprina como sustituto de la vacuna y como materia prima para la elaboración de lácteos, cosméticos y dulces; en esta región, los principales países productores de leche de cabra son Brasil y México, sin embargo la importancia económica en este sector es muy baja, en comparación con el sector de la leche de vaca (Manterola, 1999).

## **II.7 EL QUESO**

### **II.7.1 Definición y generalidades**

De acuerdo a la NOM 121-SSA1-1994, los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado; los quesos son clasificados por esta norma de acuerdo a su proceso en:

- a) Quesos frescos:** Productos que se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.
  
- b) Quesos madurados:** Alimentos que se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos

cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

- c) Quesos procesados:** Productos que se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

## II.7.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

La fabricación del queso consiste básicamente en la coagulación de la leche y su conversión en una dispersión coloidal, en un gel conocido como cuajada, con la subsiguiente separación del suero; distinguiéndose cuatro operaciones fundamentales comunes a la fabricación de quesos: la preparación de la leche, la coagulación, el desuerado y la maduración (Fox, 2004):

La primera fase en la elaboración general del queso es la preparación de la leche; indispensable para obtener productos de buena calidad microbiológica, nutricional y sensorial, además de permitir reducir los defectos de fabricación. La leche puede sufrir un fuerte deterioro por contaminación y desarrollo microbiano, por ello se aplican tratamientos térmicos para reducir el número de bacterias indeseables tales como: termización o pasteurización.

La coagulación es la segunda etapa en la elaboración del queso, la cual resulta del cambio irreversible de la leche del estado líquido al estado semisólido denominado gel o coágulo, formándose por acidificación y/o por la acción del cuajo añadido. Sin embargo, este estado físico es inestable y el lactosuero, compuesto de agua, lactosa, sales minerales, proteínas y muy poca materia grasa se separa del coágulo formado. Esta fase de exudación corresponde al desuerado, que tiene por tanto, un papel de deshidratación, deslactosado y desmineralización.

La maduración es la última fase de la elaboración de los quesos, donde ocurre la pérdida de humedad y en la que suceden tres grandes fenómenos bioquímicos: la fermentación de la lactosa a ácido láctico, la degradación de las proteínas en elementos más simples (péptidos, aminoácidos, amoníaco) y la hidrólisis de la materia grasa (lipólisis); estas transformaciones consiguen desarrollar el sabor, el aroma y la textura finales.

### **II.7.3 Producción mundial y nacional de queso de leche de cabra**

Los principales países productores de queso de leche de cabra son: Francia, Grecia, España, Italia y Sudán, siendo este último el mayor productor. La producción mundial total se estima en aproximadamente 417 mil toneladas al año (Cuadro 8).

En México se producen 13 mil 861 toneladas de queso de leche de cabra al año; sin embargo, no se conocen datos del consumo *per cápita*; sólo se encontraron valores para el consumo de queso en general, los cuales alcanzan los 5 kg/año (Sagarpa, 2005). En la Unión Europea existe un consumo *per cápita* de 15.2 kg/año. Grecia es el país más alto con 23.5 kg/año, donde el 40% del queso consumido es del tipo Feta; el consumo en Francia es de 22 kg/año. Por su parte, Estados Unidos de Norteamérica registra un consumo de aproximadamente 15 kg/año, contrastando con el consumo de este producto en Chile el cual apenas alcanza los 270 g por persona al año (FAO, 2006).

### **II.7.4 Componentes químicos y nutrimentales del queso de leche de cabra**

El queso destaca por ser una fuente concentrada de proteínas, principalmente caseína, con un alto valor biológico al contener los aminoácidos esenciales leucina, isoleucina, lisina, triptófano, fenilalanina y valina, así como nitrógeno inorgánico que compensa la deficiencia de aminoácidos sulfurados de la caseína (Varnam, 1995).

**Cuadro 8.** Producción mundial de queso de cabra, toneladas (FAO, 2006).

País	Producción de queso	
	2000	2003
<b>África</b>	<b>122,010</b>	<b>122,950</b>
Níger	10,800	11,340
Sudan	06,250	106,750
<b>América</b>	<b>17,685</b>	<b>18,096</b>
México	13,694	13,861
<b>Asia</b>	<b>76,902</b>	<b>77,905</b>
Irán	44,837	45,090
<b>Europa</b>	<b>184,064</b>	<b>182,545</b>
Francia	59,930	68,000
Grecia	48,000	48,000
España	36,000	37,000
<b>Oceanía</b>	<b>S/P</b>	<b>S/P</b>
<b>TOTAL MUNDIAL</b>	<b>414,228</b>	<b>417,216</b>

S/P sin producción registrada

Diversos estudios demuestran que el queso de leche de cabra contiene en promedio por cada 100 g: 230 kcal, 15.5 g de proteínas, así como 19.9 g de grasa y 1.7 g de cenizas (Cuadro 9). Este subproducto lácteo es también fuente de ácidos grasos esenciales y aporte energético, que varía de acuerdo a su contenido graso; mientras que el contenido de lactosa en el queso es despreciable ya que ésta se pierde en el lactosuero o se convierte en ácido láctico o lactatos durante su elaboración y maduración, lo que se convierte en un producto adecuado para ser consumido por personas intolerantes a la lactosa; es también una fuente de calcio de fácil asimilación, fósforo, magnesio, hierro, vitaminas del grupo B, así como vitaminas liposolubles (Davis, 1976; Varnam, 1995).

**Cuadro 9.** Valores nutrimentales del queso fresco de leche de cabra (g/100g).

	Bonilla,	Cuchillo,	Fuentes, 2009		
	2005	2007	Sainté-Mauré	Panela	Feta
Humedad	57.48	51.17	55.3	60.6	45
Proteína (N*6.38)	15.50	15.17	20.6	17.4	19.1
Grasa	13.58	22.72	20.9	15.4	23.9
Energía (Kcal)	232	260	270	210	310
Colesterol (mg/100g)	87.79	92.37	63.6	51.1	92

Asímismo, en el queso de leche de cabra se ha reportado la presencia de otras moléculas bioactivas (Cuadro 10) como polifenoles, vitaminas liposolubles y ácidos grasos poliinsaturados (Alfaro, 2008; Cuchillo, 2007 y Fuentes, 2009).

## **II.8 ASPECTOS QUE MODIFICAN LA CALIDAD NUTRIMENTAL Y FUNCIONAL DE LA LECHE Y EL QUESO DE CABRA.**

Las características nutricionales de la leche utilizada para hacer queso, pueden variar de acuerdo a las características de la producción de leche y sobre todo por los factores nutricionales, genéticos, raza, clima, el entorno y las prácticas de manufactura y fisiológicos; encontrándose que las mayores diferencias hacen referencia a la producción total de leche así como al porcentaje graso, mientras que las menores diferencias se aprecian en el contenido de lactosa y minerales como el calcio (Chilliard *et al.*, 2003).

**Cuadro 10.** Compuestos bioactivos en queso de leche de cabra (Alfaro, 2008; Cuchillo, 2007 y Fuentes, 2009).

Componente	Cantidad								
	QLP	QLC	QLPC	QLPP	QLEC	QLEP	SM	P	F
<b>Fenoles totales</b>									
(mg ác. gálico/100g)	NR	NR	78	30	5	6	NR	NR	NR
<b>Flavonoides</b>									
(mg/100g)									
Catequina	NR	NR	0.02	0.009	0.016	0.016	NR	NR	NR
Quercetina	NR	NR	0.42	0.24	NR	0.3	NR	NR	NR
<b>Ácidos</b>									
<b>Hidroxicinámicos</b>									
(mg/100g)									
Ác. caféico	NR	NR	1.4	0.65	NR	NR	NR	NR	NR
Ác. clorogénico	NR	NR	11.9	1.1	5.3	9.7	NR	NR	NR
Ác. ferúlico	NR	NR	6.1	NR	16.5	1	NR	NR	NR
<b>Vitamina A</b>									
(UI/100 g)	942.8	1365.6	784.8	729.7	740.4	558.2	NR	NR	NR
<b>Vitamina E</b>									
(UI/100 g)	0.39	0.57	0.33	0.36	0.39	0.35	NR	NR	NR
<b>ALC</b>									
(mg/100g)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	43	48	58
<b><math>\omega</math>-3</b>									
(mg/100g)	NR	NR	180	180	130	130	80	67	120
<b><math>\omega</math>-6</b>									
(mg/100g)	NR	NR	400	400	340	350	240	203	355

Queso de leche cruda de cabra: QLC

Queso de leche pasteurizada: QLP

Queso de leche cruda proveniente de pastoreo:QLPC

Queso de leche pasteurizada proveniente de pastoreo: QLPP

Queso de leche cruda proveniente de alimentación estabulado: QLEC

Queso de leche pasteurizada proveniente de alimentación estabulado: QLEP

Queso de leche de cabra tipo: Sainte-Maure (SM), panela (P) y feta (F)

ALC=Acido linoléico conjugado

NR = No reportado

La producción de leche diaria y composición de la misma no permanecen constantes en el curso de la lactación, la cantidad y la composición de la leche se ve modificada, generalmente los sólidos totales, la grasa y las proteínas contenidos son mayores en el primer mes después del parto, decreciendo gradualmente entre las 20 y 25 semanas postparto (Arbiza, 2001).

## **II.9 PRESENCIA DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA LECHE Y EL QUESO DE LECHE DE CABRA**

La presencia de los compuestos polifenólicos en productos lácteos está relacionada con diversos factores como la ingesta y sistema de alimentación del animal, así, el hecho de que la cabra padezca o no, determinará no sólo la calidad de vida de la misma, sino la calidad de la; otro factor es el catabolismo de las proteínas por las bacterias. Dado que la acción oxidativa es el principal determinante en el deterioro de los alimentos, el grado de protección antioxidante debe ser alto para mejorar la calidad, estabilidad y seguridad del producto. Por otro lado se han reportado concentraciones de flavonoides y terpenoides en la leche de cabra en relación con la ingestión de forraje, probando que la glándula mamaria es una de las vías de excreción de estos compuestos (De Feo *et al.*, 2006).

Por su parte, Cuchillo en el 2007, en su estudio sobre el contenido de compuestos polifenólicos en quesos de leche de cabra, demostró que la concentración de compuestos fenólicos está influenciada por el tipo de alimentación de los rumiantes así como el tratamiento térmico que sufre la leche de cabra con la que se elaboraron los quesos.

## 2.10 FACTORES ANTIOXIDANTES EN LECHE Y QUESO

Los lípidos de la leche pueden someterse a una autooxidación, la cual puede producir cambios importantes en la calidad del alimento. Los mecanismos de acción involucran una compleja interacción entre pro y antioxidantes; la leche y los productos lácteos son una buena fuente de proteínas de calidad y antioxidantes liposolubles como las vitaminas A y E (Lindmark-Månsson y Åkersson, 2000; Balestrieri, *et al*, 2001).

Se ha encontrado la presencia de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa y catalasa en la leche. También se encuentran los antioxidantes no enzimáticos, formados en el organismo u obtenidos de la dieta como nutrientes esenciales; muchos de estos compuestos actúan como secuestradores de radicales en la fase lipídica, como la vitamina E, carotenoides y ubiquinol, otras como la vitamina C actúan en la fase acuosa y además de estos compuestos, existen también aquellos que pueden encontrarse tanto en la fase lipídica como en la fase acuosa como son los flavonoides, los cuales actúan principalmente como secuestradores de radicales (Lindmark-Månsson y Åkersson, 2000).

De Feo *et al.* (2006) reportaron concentraciones de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante como los flavonoides y terpenoides en la leche de cabra en relación con la ingestión de forraje y con esto probaron que la glándula mamaria es una de las rutas de excreción de este tipo de compuestos, asimismo, Cuchillo *et al.* en el 2005 reportó, en quesos de leche de cabra, la presencia de otro grupo de polifenoles con importante actividad antioxidante, los ácidos hidroxicinámicos (caféico, cumárico, ferúlico y clorogénico).

Por su parte, el contenido de retinol en leche de cabra ha sido demostrado (Alfaro, 2008) y está influenciado por el nivel de suplemento de vitamina A en la dieta; además de esta vitamina, se ha reportado la presencia de otras con actividad antioxidante como el  $\alpha$ -tocoferol (Cuchillo, 2007).

Asímismo, se ha reportado la presencia de péptidos con actividad antioxidante en la leche, dicha actividad se debe principalmente a ciertos aminoácidos como: tirosina, cisteína y triptófano, que forman parte de péptidos derivados de la digestión de proteínas de la leche; la capacidad especial de los grupos fenólicos e indólicos de la tirosina y el triptófano al actuar como donadores de hidrógeno es responsable de la actividad secuestrante de radicales. La caseína de la leche cuenta con dominios polares que contienen residuos de serina fosforilada (SerP) y su secuencia característica (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) son efectivos cationes quelantes que forman complejos con calcio, hierro y zinc; así, las caseínas fosforiladas y sus péptidos en la fase acuosa pueden ser una buena fuente de quelantes naturales para controlar la oxidación lipídica (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Pihlanto, 2006); Cuchillo en el 2007 y Alfaro en el 2008 reportaron la presencia de los aminoácidos tirosina y cisteína, en quesos de leche de cabra, que pudieran presentar actividad antioxidante, como lo indican otros estudios como el de Hernandez-Ledesma, 2005.

Algunos cambios de la actividad antioxidante y pro-oxidante de la leche han sido estudiados en diferentes tratamientos térmicos. Donde los resultados indican que tratamientos de corto calentamiento pueden ser potencialmente responsables de la depleción de las características antioxidantes de la leche y por el contrario, la aplicación de tratamientos a la leche de temperaturas severas esta asociada con la formación de melanoidinas, que permite la recuperación y el incremento de las propiedades antioxidantes de la leche. Tomando en consideración estos estudios, las características de actividad antioxidante de los derivados lácteos es un reflejo de la concentración de compuestos presentes inicialmente en la leche y el efecto del tratamiento térmico al que es sometido (Calligaris *et al.*, 2004; Saher *et al.*, 2004).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

- Determinar la actividad antioxidante en diferentes tipos de quesos comerciales de leche de cabra manufacturados en México (Sainte Maure, Panela y Feta).

#### 3.2 Objetivos particulares.

- Extraer y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes en las muestras comerciales de quesos de leche de cabra.
- Cuantificar mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los flavonoides (catequina y epicatequina) y ácidos hidroxicinámicos (cafeico, cumárico y cinámico) presentes en los extractos metanólicos de las muestras en estudio.
- Determinar cualitativamente la actividad antioxidante en los extractos alcohólicos de las muestras, mediante el uso de cromatografía en capa fina, utilizando como reveladores al sulfato cérico y DPPH<sup>+</sup> (2,2-difenil picrilhidracilo).
- Determinar cuantitativamente, la capacidad antioxidante presente en los extractos alcohólicos, utilizando los ensayos de capacidad secuestrante de los radicales DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)); y compararla con el estándar  $\alpha$ -tocoferol.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

El uso de aditivos, particularmente de antioxidantes, es fundamental para la industria alimentaria, preservando así la calidad sensorial y nutricional de los alimentos; así mismo se encuentra el interés por la aplicación de antioxidantes provenientes de fuentes naturales con la finalidad de descartar la adición de compuestos sintéticos, los cuáles generalmente implican un riesgo para la seguridad de los alimentos así como una mayor restricción por parte de la legislación del país donde se distribuyen; por otra parte, se observa la importancia de los alimentos funcionales, donde el consumidor busca la presencia de compuestos bioactivos como un valor agregado en los alimentos y que aporten beneficios a la salud; por lo tanto, el estudio de la actividad antioxidante en quesos de leche de cabra manufacturados en México permitirá reconocer la presencia de esta actividad como un valor agregado, además de contribuir al estudio e interés por este tipo de quesos.

## **V. MATERIALES Y METODOS.**

### **V.1 MUESTRAS EXPERIMENTALES**

Se trabajó con 23 marcas comerciales de queso de leche de cabra que fueron manufacturados en México, 17 del tipo Sainte-Maure, uno tipo Panela y cinco del tipo Feta. Estos productos fueron adquiridos en diversos establecimientos comerciales del área metropolitana de la ciudad de México, incluyendo tiendas tipo gourmet, mayoristas y proveedores independientes, las muestras fueron clasificadas asignándoles una identidad que facilitó el análisis (Q1 al Q23) y fueron almacenadas dentro de un contenedor protegiéndolas de la luz y manteniéndolas en congelación (-18°C). En el Cuadro 11 se muestra la identidad de las muestras así como algunas características comerciales.

### **V.2 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES**

Se realizó una extracción alcohólica, aprovechando las características particulares de los compuestos fenólicos, los cuales, debido a su polaridad pueden ser extraídos en una infinidad de disolventes, donde el metanol es el compuesto en el que la gran mayoría de estos compuestos se extraen.

Para llevar a cabo la extracción de los compuestos fenólicos se pesaron 20 g de las muestras experimentales, previamente descongeladas, en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 100 mL de metanol/agua (80:20 v/v) manteniéndose en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se filtraron empleando un papel filtro (0.22  $\mu\text{m}$ , millipore), el sobrenadante se guardó y el residuo se sometió a una extracción sucesiva con 100 mL de acetona/agua (70:30 v/v) agitándose por 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró utilizando sulfato de sodio anhidro, los sobrenadantes de ambas filtraciones se juntaron y se concentraron empleando un rotavapor (Büchi, R-205) a 40 °C y 150 rpm, una vez concentrados fueron redisoluertos en 5 mL de metanol, y se almacenaron a 4 °C antes y durante su análisis. A estas soluciones se les denominó extractos metanólicos.

**Cuadro 11.** Aspectos comerciales de los quesos de leche de cabra manufacturados en México empleados en este estudio.

Identidad	Marca	Descripción	Lugar de origen	Distribuidor	Tipo	Presentación (g)	\$/Kg
Q1	Montchevere	Producto fino elaborado a partir de leche pasteurizada de cabra, emplea cultivos lácticos, cloruro de calcio, cuajo y sal. Queso en forma de rollo, empacado al vacío.	Linares, Nvo. León.	Caprico	Sainte Maure	250	160.0
Q2	Notre Dame	Elaborado con leche pasteurizada 100% de cabra, fermentos lácteos y sal yodatada. Forma de rollo.	México, D.F.	Delipasta		200	135.0
Q3	Rancho Vistalegre	Producto elaborado a partir de leche entera de cabra pasteurizada, emplea fermentos lácticos, cloruro de calcio y cuajo. Queso en forma de rollo.	Malinalco Edo. de México.	Algil		200	180.0
Q4	La Parroquia de Xico	Producto en rollo, elaborado con leche entera de cabra pasteurizada, cultivo lácteo, cuajo y sal común.	Xico, Veracruz.	Xico		180	166.7
Q5	Lanzarote	Producto elaborado a partir de leche entera de cabra pasteurizada, cultivos lácticos, sal refinada yodatada y cuajo, con forma de rollo, hay de varios sabores.	Malinalco Edo. de México.	Algil		200	195.0
Q6	Chateau Blanc	Producto con forma de rollo alargado, elaborado de leche entera de cabra pasteurizada, emplea fermentos lácticos, cloruro de calcio y cuajo.	México.	NR		200	190.0
Q7	Sainte Maure	Producto elaborado a partir de leche de cabra, fermentos lácteos, sal cloruro de calcio y cuajo, en forma de rollo.	México.	Laclette		260	165.4

NR = No Reportado

**Cuadro 11. Continuación...**

Q8	La Texana	Producto elaborado a partir de leche de cabra, fermentos lácticos, cuajo y sal. Rollo empacado al vacío.	México, D.F.	NR	300	90.0
Q9	Queso Caprina	Producto en rollo, elaborado a partir de leche de cabra pasteurizada, cultivos lácticos, cuajo y sal.	Atotonilco, Jalisco.	Caprina	250	196.0
Q10	El Queso de Cabra	Producto elaborado a partir de leche de cabra pasteurizada, cultivos lácticos, cuajo y sal.	Guanajuato	Eurolac	230	226.1
Q11	Bon Rennés	Producto elaborado a partir de leche entera pasteurizada, cuajo animal, cultivo láctico y sal.	Atotonilco, Jalisco.	Rancho el Chapingo	250	210.0
Q12	Castellvell	Producto elaborado a partir de leche entera pasteurizada de cabra, cultivos lácteos y sal.	Guanajuato.	Simantov Maissy	400	182.5
Q13	Mikonos light	Producto elaborado a partir de leche entera pasteurizada de cabra, cuajo, cultivos lácticos y sal.	Guanajuato.	Pic-Nic Delicatessen	150	180.0
Q14	LeBlanc	Elaborado a partir de leche entera pasteurizada de cabra, sal, cultivos lácticos, cloruro de calcio, cuajo y <u>natamicina</u> como conservador.	Xalapa, Veracruz.	Yesenia Prieto Carnero	200	211.0
Q15	Laclette	Elaborado de leche de cabra, fermentos lácteos, sal, cloruro de calcio y cuajo. Producto en forma de rollo, empacado al vacío.	Carretera México-Qro.	Laclette	230	183.9
Q16	Gourmand Artesanal	Elaborado de leche de cabra pasteurizada, cultivos lácticos, cloruro de calcio, cuajo y sal.	Guadalajara Jal.	Marcial. P.	260	184.6
Q17	Diane	Elaborado de leche de cabra parcialmente descremada y pasteurizada.	Jorge Miranda	NR	135	200.0

**Cuadro 11.** Continuación...

Q18	Cabrero	Elaborado con leche pasteurizada de cabra pasteurizada, cloruro de calcio, sal y cuajo.	Linaires, Nvo. León	Caprico	Panela	400	140.0
Q19	Bon Rennés	Producto de forma discoidal, elaborado a partir de leche entera pasteurizada, cuajo animal, cultivo láctico y sal.	Atotonilco Jalisco.	Rancho el Chapingo	Feta	250	244.0
Q20	Laclette Gourmet	Elaborado de leche de cabra, fermentos lácteos, sal, cloruro de calcio y cuajo. Producto en forma de disco.	México-Querétaro	Laclette		200	229.5
Q21	Rancho Vistalegre	Producto en forma de disco elaborado a partir de leche entera de cabra pasteurizada, emplea fermentos lácticos, cloruro de calcio y cuajo.	Malinalco Edo. de México.	Algil		200	195.0
Q22	Lanzarote	Producto en forma de disco, elaborado a partir de leche entera de cabra pasteurizada, cultivos lácticos, sal refinada yodatada y cuajo.	Malinalco Edo. de México.	Algil		200	201.0
Q23	Castellvell	Producto en forma de tabique, elaborado a partir de leche entera pasteurizada de cabra, cultivos lácteos y sal.	Guanajuato.	Simantov Maissy		400	182.5

## **V.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

### **V.3.1 Fenoles totales**

La concentración de fenoles totales presentes en los extractos metanólicos de las muestras, se determinó por el método Folin-Ciocalteu descrito por Katalinic *et al.* (2006) y consistió en tomar 2 ml del extracto el cual se llevó a un volumen de 5 ml con HCL al 0.3 %, de la solución resultante se tomó una alícuota de 100 µl y se le adicionó 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 %, transcurridos 2 minutos se agregó 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido en agua 1:1). Transcurridos 30 minutos, se determinó la absorbancia a 750 nm empleando un espectrofotómetro (CINTRA 101, UV-VIS No. 3834), realizándose por triplicado para cada extracto. La concentración de fenoles totales se calculó al realizar una curva patrón (Anexo IX.1.1) utilizando ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/g de muestra.

### **V.3.2 Flavonoides**

Para la identificación y cuantificación de los flavonoides mediante cromatografía de líquidos de alta resolución se ocuparon los siguientes reactivos: epicatequina y galato de catequina grado HPLC de SIGMA, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, ácido acético glacial 99.90%, grado HPLC de J.T. Baker, agua desionizada obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (USA).

En la preparación de estándares epicatequina y galato de catequina se pesaron 10 mg de cada uno de los estándares y se colocaron por separado en matraces aforados de 10 mL de color ámbar, aforando con metanol (1mg/mL); se tomó 1 mL de cada uno y se colocarán en un vial de modo tal que se tendrá una mezcla de los mismos; por separado se tomó 1 mL para tener un vial de cada estándar; las curvas patrón se presentan en el Anexo IX.1.2 y Anexo IX.1.3, así como un ejemplo de los cromatogramas obtenidos de la mezcla de estos flavonoides (Anexo IX.2.2) utilizados para la realización de las respectivas curvas patrón.

Para la preparación de las muestras, se tomó 1 mL de extracto metanólico y se filtró con un filtro jeringa (25mm, 0.45 mm, Marca: Corning Incorporated), el filtrado recuperado se inyectó directamente en el equipo de análisis.

Las condiciones de HPLC fueron: columna symmetry C18 (250 x 4.6mm) de Waters (USA), fase móvil H<sub>2</sub>O/acetonitrilo/metanol/acetato de etilo/ácido acético glacial (89:6:1:3:1 v/v/v/v/v), con un flujo de 1 mL/min, temperatura de 25°C; sistema de detección UV 280 nm, con inyecciones de 30 µL y un tiempo de corrida de 30 minutos.

### **V.3.3 Ácidos hidroxicinámicos**

Para la identificación y cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se utilizaron los siguientes reactivos: ácido caféico grado HPLC de SIGMA (USA), ácido cinámico, grado HPLC de ALDRICH (Germany) y ácido p-cumárico, grado HPLC de FLUKA (Switzerland); metanol y ácido fosfórico, grado HPLC de J.T. Baker (Holanda), agua desionizada obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (USA).

Se prepararon los estándares para la identificación de ácidos hidroxicinámicos (ácido caféico, ácido cinámico y ácido p-cumárico), pesando 10 mg de cada uno y se colocaron por separado en matraces aforados de 10 mL de color ámbar, aforando con metanol (1mg/mL). De estas soluciones, se tomó 1 mL de cada una y se colocaron en un vial de modo tal que se obtuvo una mezcla de los estándares; por separado se tomó 1 mL para tener un vial de cada uno de estos; las curvas patrón se presentan en los Anexos IX.1.4, IX.1.5 y IX.1.6; además se presenta uno de los cromatogramas obtenidos de la mezcla de ácidos hidroxicinámicos (Anexo IX.2.1) utilizados para la realización de las respectivas curvas patrón.

En el caso de la preparación de las muestras, se tomó 1mL de extracto metanólico y se filtró con un filtro jeringa (25mm, 0.45µm, Marca: Corning Incorporated), el filtrado recuperado se inyectó directamente en el equipo de análisis.

Las condiciones de HPLC para la identificación de ácidos hidroxicinámicos fueron: columna symmetry C18 (250 x 4.6mm) de Waters (USA), fase móvil: metanol-ácido fosfórico 0.001M (23:77 v/v), con un flujo de 1 mL/min, temperatura 25°C; sistema de detección UV 280 nm, con inyecciones de 30 µL y un tiempo de corrida de 30 minutos.

## **V.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### **V.4.1 Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante (AAO) fue evaluada en primera instancia de manera cualitativa, mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), técnica que nos brindó una idea generalizada de la actividad que presentan las muestras en estudio, es rápida, de bajos costos de operación, sencilla y tiene la posibilidad de analizar varias muestras simultáneamente. Para la realización de esta técnica se utilizaron placas de sílice con un espesor de 0.2mm (60 F<sub>245</sub> Merck). Se elaboró fase móvil, una solución de cloroformo-metanol-agua (3.5:1.3:0.2) donde se eluyeron los extractos junto con diferentes estándares enlistados en el Cuadro 12 y posteriormente se revelaron dos cromatoplasmas con una solución de sulfato cérico y otra con DPPH (2,2-difenil picrilhidracilo, SIGMA D9132-5G) y cuya composición se presenta en el Cuadro 13, donde además fue necesario calentar las placas durante 3 minutos a 110° C, para tener una mejor apreciación de la forma en que eluyeron los compuestos presentes en los extractos metanólicos de los quesos.

**Cuadro 12.** Soluciones estándar utilizadas en la evaluación cualitativa de la actividad antioxidante

Estándar (1 mg/mL)	Marca	Catálogo	Lote
Catequina	Sigma	C1251-5G	036K1604
Quercetina	Sigma	Q0125-10G	08K0720
Epicatequina	Sigma	E1753-5G	125K1450
Ácido caféico	Sigma	C0625-5G	065K1060
Ácido clorogénico	Sigma	150618	3520J
Ácido cumárico	Sigma	150618	3520J
Ácido gálico	Sigma	C9008-25G	095K134J
Ácido ferúlico	Fluka	1182362	
Ácido cinámico	Aldrich	07226JD	128708-5G

**Cuadro 13.** Reveladores empleados en el análisis de cromatografía en capa fina (Prakash *et al.*, 1998).

Agente revelador	Composición
Radical-DPPH (0.2%)	0.2 g (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) + 100 ml de metanol
Sulfato cerico Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	12 g de sulfato cerico + 22.5 g de ácido sulfúrico

## V.4.2 EVALUCION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las técnicas para evaluar la capacidad secuestrante de un compuesto son de los ensayos cuantitativos más utilizados y destacan por su fácil uso, velocidad y sensibilidad aquellos que comprenden radicales cromóforos y que se basan en la presencia de un antioxidante y su capacidad de secuestrar radicales, donando átomos de hidrógeno (H), desapareciendo así el radical; entre estos compuestos destacan los radicales 2,2-difenilpicrilhidracilo (DPPH<sup>+</sup>) y el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6, ABTS<sup>+</sup> (Gülcin, 2006).

### V.4.2.1 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH (2,2-difenil picrilhidracilo)

La prueba cuantitativa consistió en hacer reaccionar 2.25 mL de una solución  $3 \times 10^{-5}$  M de radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidracil, SIGMA D9132-5G), con 0.25 mL del extracto metanólico de las muestras experimentales (200 ppm), y se monitoreó el cambio de absorbancia, registrando las lecturas espectrofotométricas (Espectro CINTRA 101, UV-VIS No. 3834) a una absorbancia de 517 nm cada 5 minutos durante 30 minutos, estas lecturas se presentan en las gráficas del anexo IX.3.1. Previamente se realizó un blanco para hacer el ajuste de la absorbancia a cero, adicionando 2 mL de metanol. Se usó como patrón de referencia  $\alpha$ -tocoferol (Sigma, T32515G 038K3738). El procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto. Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de actividad secuestrante de radical DPPH de acuerdo a la ecuación propuesta por Taga *et al.*, 1984:

$$\text{Porcentaje de actividad secuestrante del radical DPPH} = \frac{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}} - \text{Abs}_{\text{tiempo final}}}{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}}} * 100$$

$\text{Abs}_{\text{tiempo cero}}$  = Absorbancia inicial del DPPH.

$\text{Abs}_{\text{tiempo final}}$  = Absorbancia del DPPH mas el extracto transcurridos 30 min.

#### V.4.2.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS (Ácido-2,2'-azino-bis-(3-etiazolina-bencinosulfónico-6))

Esta prueba es muy parecida a la anterior, consistió en hacer reaccionar a los extractos metanólicos de las muestras experimentales con el radical ABTS y registrar su absorbancia durante 15 minutos.

Primero se preparó el radical, mediante la solución de ABTS 7mM (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencinosulfónico-6)), Sigma A-1888, Lot. 28H0800) con persulfato de potasio 2.45 mM (Sigma P-5592, Lot. SOK0920). Se mezcló y se incubó en la oscuridad por 16 horas a temperatura ambiente. Ya formado el radical, se diluyó con metanol (1:15) para obtener una absorbancia de 0.7 a 734 nm, medido en un espectro (Espectro CINTRA 101, UV-VIS No. 3834). Posteriormente, se tomaron 250  $\mu$ L del extracto de la muestra (200 ppm) y se le adicionó 2 mL de la solución diluida de ABTS. Se monitoreo el efecto secuestrante durante 15 min. Se utilizó como patrón de referencia  $\alpha$ -tocoferol (Sigma, T32515G 038K3738), el procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto; en el Anexo IX.3.2 se presentan las gráficas obtenidas del seguimiento de la capacidad secuestrante de cada uno de los quesos en estudio, durante el tiempo, frente a este radical.

Con el cambio de absorción, se calculó la capacidad secuestrante mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de actividad secuestrante por el radical ABTS} = \frac{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}} - \text{Abs}_{\text{tiempo final}}}{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}}} * 100$$

$\text{Abs}_{\text{tiempo cero}}$  = Absorbancia inicial del ABTS.

$\text{Abs}_{\text{tiempo final}}$  = Absorbancia del ABTS mas el extracto metanólico transcurridos 15 min.

## 5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de las determinaciones de polifenoles totales, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, así como la capacidad secuestrante por los radicales DPPH y ABTS, en las diferentes muestras de quesos de leche cabra, fueron procesados con el paquete estadístico Statistical Analysis System (2003) donde se probó la significancia de los tratamientos (marcas), utilizando la prueba de Tukey con un nivel de  $\alpha$  0.05. Donde se estableció la siguiente hipótesis para quesos tipo Saite-Maure (SM) y Feta;  $H_0: \mu_{\text{Montchevré}} = \mu_{\text{Notre Dame}} = \mu_{\text{Rancho Vistalegra}} = \dots = \mu_{\text{Diane}}$ , en el caso de los quesos SM. Asimismo, se realizó una prueba de correlación entre los resultados de este estudio, utilizando el análisis de Pearson.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

#### VI.1.1 Polifenoles totales

En la Gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de compuestos polifenólicos totales (PT) expresados en porcentaje de ácido gálico (AG) por cada 100 gramos de queso.

Donde, las 23 muestras de queso analizadas registraron una concentración promedio de PT de 3.04 mg de ácido galico/100 g de queso, con un intervalo de 1.40 a 4.23 mg de AG/100 g; éste último correspondió al producto tipo Sainte-Maure (SM) denominado como Queso Caprina. Siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) al resto de los muestras.

Por su parte, los quesos de leche de cabra denominados como: La Texana y Parroquia de Xico registraron una concentración de 3.78 y 3.75 mg de AG/100 g respectivamente; siendo estos valores estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos por los productos: Lanzarote, Chateu Blanc, Mikonos lighth, Laclette, LeBlanc, Gourmand, Notre Dame, Diane, Queso de Cabra, Bon, Rennés, Castellvell, Rancho Vistalegre y Montchevre. Sin embargo; entre ellos no se registró diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

Para los quesos Sainte Maure, Lanzarote, Chateau Blanc, Mikonos Ligth y Laclette se obtuvieron valores de polifenoles totales de 3.51, 3.36, 3.35, 3.35 y 3.33 mg de AG/100 g respectivamente; concentraciones que fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) respecto a las obtenidos en los quesos LeBlanc, Gourmand, Notre Dame, Diane, Queso de cabra, Bon Rennés, Castellvell, Rancho Vistalegre y Montchevre. Sin embargo, cabe señalar que los valores registrados para Sainte Maure, Lanzarote, Chateau Blanc, Mikonos lighth y Laclette fueron iguales estadísticamente ( $P > 0.05$ ) entre ellos (Grafica 1).

En el caso de los productos identificados como: LeBlanc y Gourmand, se registraron concentraciones de 3.15 y 3.09 mg de AG/100 g respectivamente. Valores diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos por los productos: Notre Dame, Diane, Queso de Cabra, Bon Rennés, Castellvell, Rancho Vistalegre y Montchevre. Sin embargo, cabe mencionar que entre ellos no se registró diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

Por su parte, los productos denominados como: Notre Dame y Diane, registraron una concentración de polifenoles totales de 2.88 y 2.78 mg de AG/100 g respectivamente. Concentraciones diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos por los productos: Queso de Cabra, Bon Rennés, Castellvell, Rancho Vistalegre y Montchevre. Sin embargo, entre Notre Dame y Diane, se registró una similitud estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

Por su parte, los quesos identificados como Queso de Cabra y Bon Rennés, registraron una concentración de PT de 2.71 mg de AG/100 g; siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) respecto a los productos Castellvell, Rancho Vistalgre y Montchevre (Grafica 1).

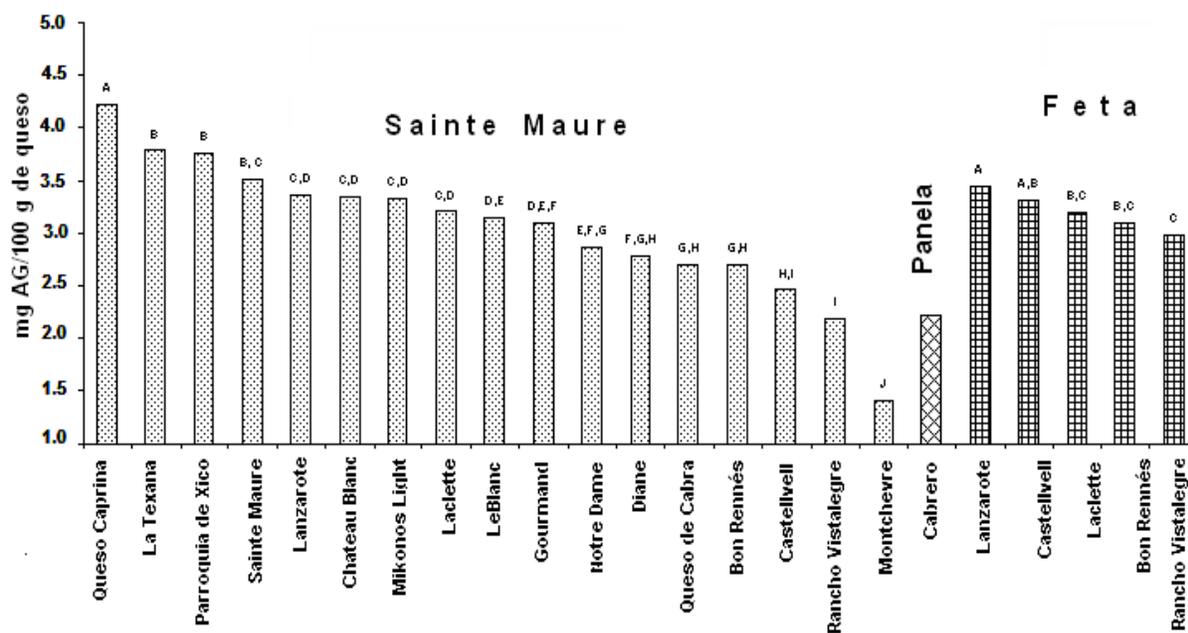
Asimismo, los productos Castellvell y Rancho Vistalegre, registraron concentraciones de polifenoles de 2.46 y 2.19 mg de AG/100 g respectivamente; estos valores fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) al que registró el queso Montchevre con 1.40 mg de AG/100g. Mientras que los valores registrados en Castellvell y Rancho Vistalegre fueron iguales estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

Para el queso tipo Panela denominado Cabrero, se registró un valor de 2.22 mg de AG/100 g (Grafica 1).

En el caso de los productos tipo Feta identificados como Lanzarote y Castellvell, se registraron concentraciones de PT de 3.31 y 3.19 mg de AG/100g respectivamente; valores que fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) a los registrados por Laclette, Bon Rennés y Rancho Vistalegre. Sin embargo, cabe señalar que los valores de PT de los quesos Lanzarote y Castellvell, no presentaron diferencia estadística ( $P > 0.05$ ).

Por su parte, los quesos identificados como Laclette, Bon Rennés y Rancho Vistalegre, registraron concentraciones de polifenoles de 3.19, 3.10 y 2.98 mg de AG/100g respectivamente; valores que fueron similares estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

**Gráfica 1.** Contenido de polifenoles totales (PT) en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.



### Quesos comerciales de leche de cabra manufacturados en México

A,B,C,D,E,F,G,H,I,J Literales distintas indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ )

#### VI.1.2 Flavonoides

De acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas; se registraron diferentes áreas y tiempos de retención para éstos compuestos estándares. Ubicándose en 5.66 y 6.86 minutos para catequina y epicatequina, respectivamente (Anexo IX.2.2). Así mismo, se realizaron cuatro ensayos cromatográficos más por cada estándar, para establecer su curva patrón de referencia (Anexos IX.1.2 y IX.1.3). Estas curvas fueron empleadas para determinar su concentración en las muestras experimentales, considerándose los tiempos y áreas cromatográficas expresadas en cada una.

Los resultados obtenidos de catequina y epicatequina, se presentan en la Gráfica 2. Donde se registró, para catequina, una concentración promedio de 0.19 mg/100 g de queso, con un intervalo de 0.02 a 0.88 mg/100 g.

De las 23 muestras analizadas, los quesos tipo Sainte-Maure (SM) identificados como Castellvell, Bon Rennés y Queso Caprina, presentaron la mayor concentración de catequina con 0.88, 0.59 y 0.40 mg/100 g, respectivamente, valores que fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) ente sí. Extendiéndose este comportamiento a los quesos identificados como LeBlanc, Parroquia de Xico, Queso de Cabra, Chateau Blanc, La Texana, Notre Dame, Mikonos Light, Gourmand, Lanzarote, Diane, Rancho Vistalegre, Sainte-Maure, Laclette y Montchevre (Grafica 2).

En relación a la presencia de catequina en los quesos identificados como LeBlanc y Parroquia de Xico, se obtuvieron valores de 0.26 y 0.23 mg/100g respectivamente, siendo estadísticamente similares ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, estos resultados fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos en los productos Queso de Cabra, Chateau Blanc, La Texana, Notre Dame, Mikonos Light, Gourmand, Lanzarote, Diane, Rancho Vistalegre, Sainte-Maure, Laclette y Montchevre (Grafica 2).

Para los productos identificados como Queso de Cabra y Chateau Blanc, se registraron concentraciones de 0.22 y 0.21 mg de catequina/100g respectivamente, sin presentar diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre ellas. Mientras que estos valores fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos en los quesos La Texana, Notre Dame, Mikonos Light, Gourmand, Lanzarote, Diane, Rancho Vistalegre, Sainte-Maure, Laclette y Montchevre.

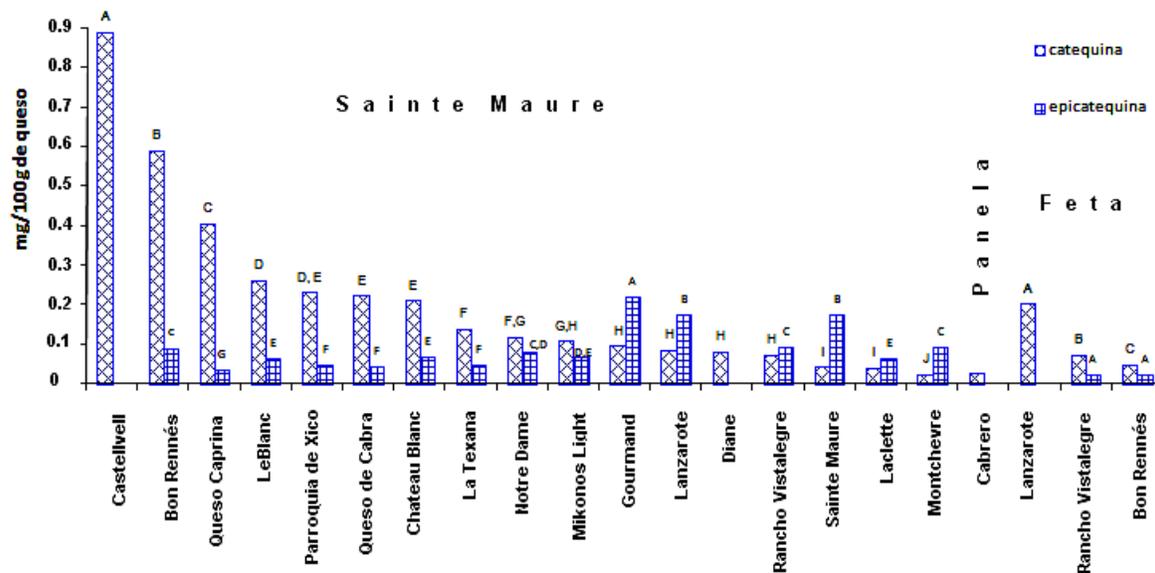
Para los quesos La Texana y Notre Dame, las concentraciones de catequina fueron de 0.14 y 0.12 mg/100g respectivamente, siendo similares estadísticamente ( $P>0.05$ ). Sin embargo, con respecto a las concentraciones obtenidas en los quesos Mikonos Light, Gourmand, Lanzarote, Diane, Rancho Vistalegre, Sainte-Maure, Laclette y Montchevre fueron diferentes estadísticamente ( $P<0.05$ ).

Para el caso de los quesos identificados como: Mikonos Light, Gourmand, Lanzarote, Diane y Rancho Vistalegre, no se presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ) entre los valores de catequina con 0.11, 0.094, 0.083, 0.078 y 0.07 mg/100 g respectivamente. Sin embargo estos valores fueron superiores a los obtenidos en los quesos Sainte-Maure (0.041 mg/100g), Laclette (0.037 mg/100g) y Montchevre (0.021 mg/100g), siendo estadísticamente diferentes ( $P<0.05$ ). Es importante señalar que los resultados para Sainte-Maure y Laclette, fueron similares estadísticamente ( $P>0.05$ ). Sin embargo, ambos fueron superiores estadísticamente ( $P<0.05$ ) a los obtenidos en el queso Montchevre (Grafica 2).

Para el caso del queso de leche de cabra tipo Panela llamado Cabrero, se obtuvo una concentración de 0.024 mg de catequina/100 g.

Por su parte, los productos tipo feta identificados como Lanzarote, Rancho Vistalegre y Bon Rennés, registraron concentraciones de 0.20, 0.07 y 0.045 mg de catequina/100g. Valores que fueron estadísticamente diferentes ( $P<0.05$ ). Mientras que en los quesos Laclette y Castellvell, no registraron la presencia de este compuesto.

**Gráfica 2.** Flavonoides presentes en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.



### Quesos comerciales de leche de cabra manufacturados en México

A,B,C,D,E,F,G,H,I,J Literales distintas indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ )

Para el caso de epicatequina, se registró una concentración promedio de 0.08 mg/100 g de queso, con un intervalo de 0 a 0.21 mg/100g.

Es importante mencionar que en los quesos Castellvell (tipo SM y Feta), Diane, Lanzarote (tipo Feta), Laclette Gourmet y Cabrero no se registro la presencia de epicatequina (Grafica 2).

Por su parte, el queso Gourmand, registró la mayor concentración de epicatequina con 0.21 mg/100g, siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) respecto al resto de las muestras.

En este sentido, los quesos Lanzarote y Sainte-Maure, registraron una concentración de 0.172 mg de epicatequina/100 g. Valor que fue diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) respecto a los obtenidos para Bon Rennés, Rancho Vistalegre, Montchevre, Notre Dame, Leblanc, Chateau Blanc, Mikonos Light, Laclette, Parroquia de Xico, La Texana, Queso de Cabra y Queso Caprina.

Los valores de epicatequina en Bon Rennés (0.085 mg/100g), Rancho Vistalegre (0.088 mg/100g), Montchevre (0.088 mg/100g) y Notre Dame (0.076 mg/100g) fueron similares estadísticamente ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) respecto a los obtenidos en los quesos LeBlanc, Chateau Blanc, Mikonos Light, Laclette, Parroquia de Xico, La Texana, Queso de Cabra y Queso Caprina (Grafica 2).

Las concentraciones de epicatequina registradas en los productos LeBlanc (0.061 mg/100g), Chateau Blanc (0.067 mg/100g), Mikonos Light (0.065 mg/100g) y Laclette (0.061 mg/100g) fueron similares estadísticamente ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, fueron superiores estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a las concentraciones obtenidas en los quesos Parroquia de Xico (0.043 mg/100g), La Texana (0.045 mg/100g), Queso de Cabra (0.040 mg/100g); las cuales no registraron diferencia estadística entre sí ( $P > 0.05$ ), no obstante estos valores fueron superiores ( $P < 0.05$ ) al registrado en Queso Caprina (0.033 mg/100 g).

Mientras que los quesos tipo Feta Rancho Vistalegre y Bon Rennés, registraron 0.021 y 0.022 mg de epicatequina/100 g, sin presentar diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

### VI.1.3 Ácidos hidroxicinámicos

De acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas; se registraron diferentes áreas y tiempos de retención de éstos estándares. Ubicándose en 6.47, 12.36 y 15.0 minutos para los ácidos caféico, cumárico y cinámico, respectivamente (Anexo IX.2.1). Así mismo, se realizaron cuatro ensayos cromatográficos más por cada estándar, para establecer su curva patrón de referencia (Anexos IX.1.4, IX.1.5 y IX.1.6). Estas curvas fueron empleadas para determinar su concentración sobre las muestras experimentales, considerándose los tiempos y áreas cromatográficas expresadas en cada una.

En lo que concierne a las 23 muestras experimentales evaluadas; los ácidos hidroxicinámicos registraron una concentración promedio de 0.32 y 1.37 mg/100 g de queso para los ácidos caféico y cumárico, respectivamente. Cabe señalar que no se registró la presencia del ácido cinámico en ninguna de las muestras (Gráfica 3).

Respecto al ácido caféico, cabe señalar que en solo dos de los productos analizados (Castellvell (tipo Sainte-Maure) y Cabrero) no se registró la presencia de este compuesto. En el resto de los productos se registró una concentración que oscilo entre 0.060 y 2.3 mg/100 g.

Para los productos clasificados como tipo Sainte-Maure; la concentración de ácido caféico mas elevada la registró el queso Notre Dame con un valor de 0.57 mg/100 g. Siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) a los valores del restos de los quesos de esta categoría.

Por su parte, los quesos tipo SM: Lanzarote y Parroquia de Xico, registraron concentraciones de 0.36 y 0.37 mg de ácido caféico/100g, valores que fueron estadísticamente similares ( $P>0.05$ ); sin embargo, fueron diferentes estadísticamente ( $P<0.05$ ) respecto a los obtenidos por las muestras denominadas: Bon Rennés, Chateau Blanc, LeBlanc, Rancho Vistalegre, Queso de Cabra, Queso Caprina, Laclette, Gourmand, Mikonos Light, Diane, La Texana, Sainte Maure y Montchevre.

En el caso de los productos identificados como: Bon Rennés y Chateau Blanc, se registraron concentraciones estadísticamente similares ( $P>0.05$ ), con 0.30 y 0.31 mg ácido caféico/100 g; siendo estos valores diferentes estadísticamente ( $P<0.05$ ) respecto a los obtenidos por las muestras denominadas: LeBlanc, Rancho Vistalegre, Queso de Cabra, Queso Caprina, Laclette, Gourmand, Mikonos Light, Diane, La Texana, Sainte Maure y Montchevre.

En este sentido, para las muestras denominadas: LeBlanc, Rancho Vistalegre y Queso de Cabra, se obtuvieron concentraciones de 0.25, 0.24 y 0.22 mg de ácido caféico/100 g respectivamente; valores que fueron iguales estadísticamente ( $P>0.05$ ); Sin embargo fueron diferentes respecto a los valores registrados en el Queso Caprina, Laclette, Gourmand, Mikonos Light, Diane, La Texana, Sainte Maure y Montchevre (Grafica 3).

Los productos identificados como: Queso Caprina y Laclette, registraron concentraciones de 0.20 mg ácido caféico/100 g; valor que fue estadísticamente diferente ( $P<0.05$ ) respecto a los reportados en Gourmand, Mikonos Light, Diane, La Texana, Sainte Maure y Montchevre.

Por su parte, las muestras denominadas Gourmand y Mikonos Light, reportaron concentraciones de 0.17 mg de ácido caféico/100 g; valor diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) en relación con los registrados en los productos: Diane, La Texana, Sainte Maure y Montchevre. Para estos últimos las concentraciones fueron de 0.14, 0.12 y 0.11 mg/100 g, respectivamente; siendo diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ) respecto al valor reportado en el queso Montchevre (0.075 mg/100 g).

Para los productos tipo Feta, el queso conocido como Bon Rennés registró la concentración más elevada con 2.28 mg de ácido caféico/100g; siendo estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ), al resto de las muestras de su categoría. Donde, los productos Castellvell, Laclette Gourmet, Lanzarote y Rancho Vistalegre, reportaron concentraciones de 0.26, 0.16, 0.10 y 0.060 mg de ácido caféico/100g siendo estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

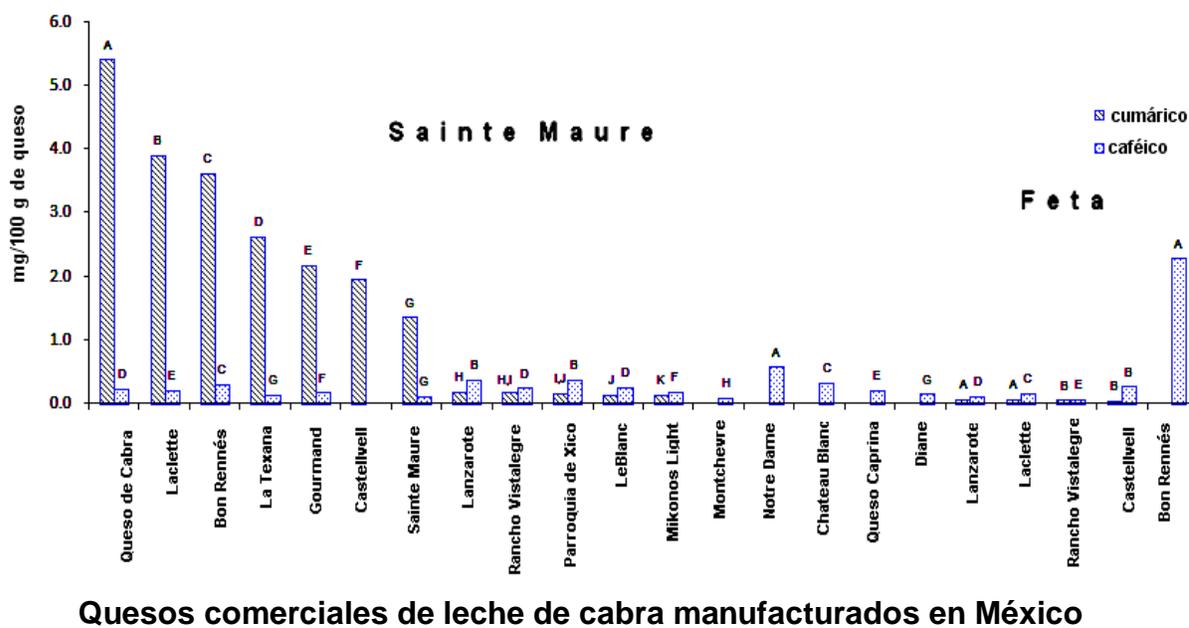
En 16 productos se identificó la presencia del ácido cumárico, donde las concentraciones oscilaron entre 0.042 y 5.41 mg/100 g de queso. El resto de los productos (Quesos tipo Sainte-Maure: Diane, Queso Caprina, Chateau Blanc, Notre Dame y Montchevre; así como los queso tipo Feta (Bon Rennés) y Panela (Cabrero)), no registraron la presencia de este compuesto.

En los quesos tipo Sainte-Maure: Queso de Cabra, Laclette, Bon Rennés, La Texana, Gourmand, Castellvell y Sainte Maure, registraron concentraciones de 5.41, 3.90, 3.61, 2.63, 2.17, 1.94 y 1.35 mg de ácido cumárico/100g, respectivamente. Valores estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre ellos; así como en relación a los obtenidos por las muestras identificadas como: Lanzarote, Rancho Vistalegre, Parroquia de Xico, LeBlanc y Mikonos Light.

Por su parte, las muestras denominadas: Lanzarote, Rancho Vistalegre, Parroquia de Xico y LeBlanc, registraron concentraciones de 0.17, 0.16, 0.15 y 0.14 mg ácido cumárico/100 g; valores que fueron similares estadísticamente ( $P>0.05$ ), sin embargo, presentaron diferencia estadística con respecto a la concentración registrada por el queso identificado como: Mikonos Light con 0.12 mg de ácido cumárico/100 g.

En los quesos tipo Feta: Lanzarote y Lactette Gourmet se registraron concentraciones de 0.069 y 0.068 mg de ácido cumárico/100 g para cada una, sin presentar diferencia significativa ( $P>0.05$ ); sin embargo, estos valores fueron estadísticamente diferentes ( $P<0.05$ ) respecto a las muestras identificadas como: Rancho Vistalegre (0.046 mg/100g) y Castellvell (0.042 mg/100 g).

**Gráfica 3.** Ácidos hidroxicinámicos presentes en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra analizados.



A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativa ( $P<0.05$ )

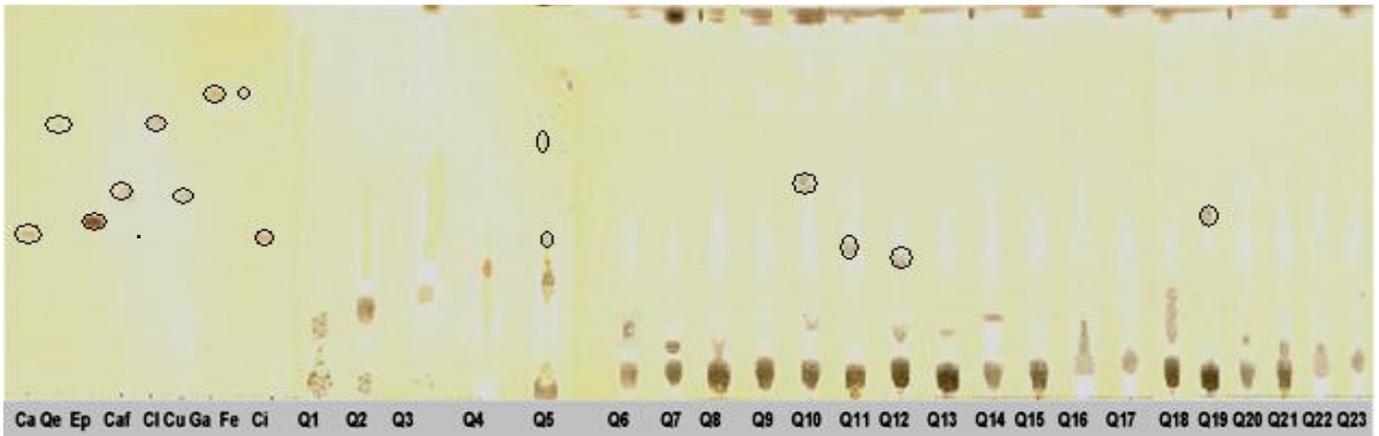
## **VI.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### **VI.2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante**

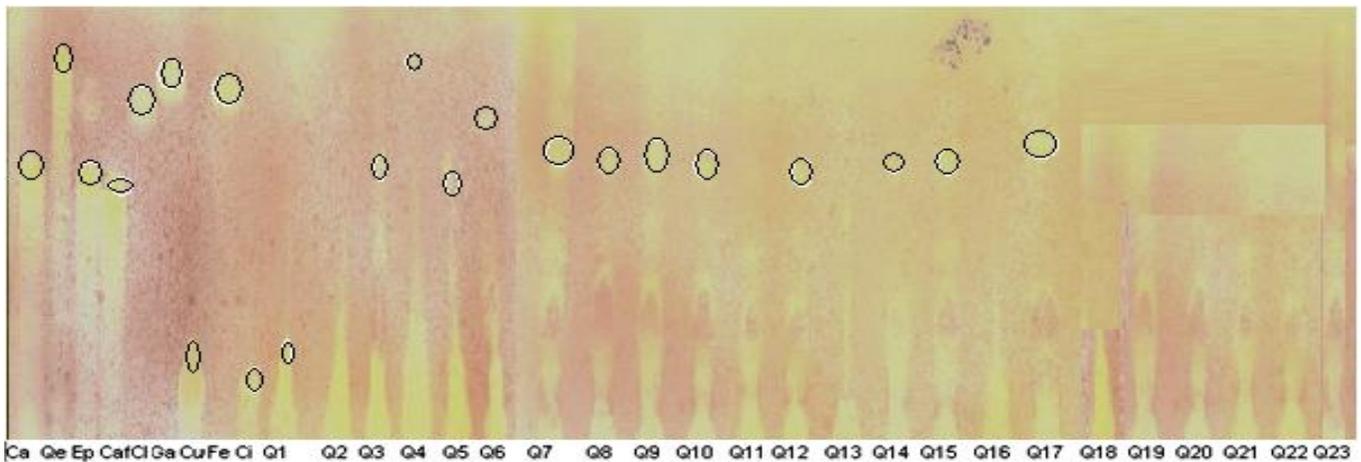
A través del procedimiento cromatográfico de capa fina (CCF); se demostró la presencia de compuestos polifenólicos (CP) en las muestras estudiadas; apoyándose la interpretación con el empleo de la solución reveladora de sulfato cérico; la cuál es específica para estos compuestos. De manera particular, al realizar el revelado de diversos estándares; se pudo observar que el nivel de elusión de los extractos alcohólicos de los quesos tipo Sainte Maure identificados como Lanzarote, Queso de Cabra, Bon Rennés y Castellvell; mostraron una importante similitud al registrado por quercetina, catequina, epicatequina además de los ácidos cinámico, caféico y cumárico. Por su parte, el extracto del queso tipo Feta identificado como Bon Rennés registro un nivel de elusión similar al observado para catequina y epicatequina (Figura 15).

Para ilustrar la capacidad de reducción de los compuestos presentes en los extractos alcohólicos de las muestras experimentales, se administró una solución reveladora de DPPH<sup>+</sup>; misma que fue reducida por la alta capacidad de donación de iones hidrogeno presente en los diversos quesos y estándares. Este comportamiento se observo, a través de la decoloración del radical (de purpura a amarillo). Cabe señalar que el nivel de elusión de los extractos alcohólicos de las muestras tipo Sainte Maure identificadas como Montchevre, Rancho Vistalegre, La Parroquia de Xico, Lanzarote, Chateu Blanc, Sainte Maure, La Texana, Queso caprina, Castellvell, Le Blanc, Laclette y Diane, mostraron similitud con el de los ácidos cumárico, caféico, gálico; así como catequina, quercetina y epicatequina (Figura 16).

**Figura 15.** Cromatoplaca revelada con sulfato cérico



**Figura 16.** Cromatoplaca revelada con DPPH



Ca: Catequina	Fe: Ác. Ferúlico	Q6: Chateau Blanc	Q12: Castellvell	Q18: Cabrero
Qe: Quercetina	Ci: Ác. Cinámico	Q7: Sainte Maure	Q13: Mikonos light	Q19: Bon Rennés
Ep: Epicatequina	Q1: Montchevere	Q8: La Texana	Q14: Le Blanc	Q20: Laclette Gourmet
Caf: Ácido caféico	Q2: Notre Dame	Q9: Queso caprina	Q15: Laclette	Q21: Rancho vistalegre
Cl: Ác. Clorogénico	Q3: Rancho Vistalegre	Q10: Queso de cabra	Q16: Gourmand artesanal	Q22: Lanzarote
Cu: Ác. Cumárico	Q4: La parroquia de Xico	Q11: Bon Rennés	Q17: Diane	Q23: Castellvell
Ga: Ác. Gálico	Q5: Lanzarote			

## **VI.2.2 Evaluación cuantitativa de la capacidad antioxidante**

### **VI.2.2.1 Capacidad secuestrante del radical DPPH**

En la Gráfica 4, se presentan los resultados del porcentaje de capacidad secuestrante (CS) sobre el radical DPPH, de los extractos metanólicos de las 23 muestras de queso estudiadas, datos estadísticamente confiables, con un coeficiente de variación menor a 5.

Se registró una capacidad secuestrante promedio de 21.7%, con un intervalo que osciló entre 3.0 y 49.3%, donde el queso tipo Sainte-Maure del mismo nombre, obtuvo el mayor porcentaje con 49.3%; presentando diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) respecto a los valores obtenidos en el resto de las 22 muestras.

En este sentido, los productos de la misma categoría Queso de Cabra, Queso Caprina y Rancho Vistalegre, registraron valores de 34.7, 33.8 y 32.3%; los cuales fueron estadísticamente similares entre sí ( $P > 0.05$ ). Sin embargo la capacidad secuestrante de los extractos alcohólicos de estos productos frente al radical libre DPPH fueron superiores ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos en las muestras Castellvell, Diane, Gourmand, LeBlanc, Notre Dame, Mikonos Light, La Texana, Lanzarote, Chateau Blanc, Bon Rennés, Lactette, Montchevre y Parroquia de Xico. Donde; la capacidad antioxidante de los primeros cinco productos se ubicó en 28.6, 26.0, 24.2, 24.1 y 23.1%, respectivamente, sin registrar variaciones estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, estos valores fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) en relación a los obtenidos en Mikonos Light, La Texana, Lanzarote, Chateau Blanc, Bon Rennés, Lactette, Montchevre y Parroquia de Xico (Gráfica 4).

Por su parte, las muestras Mikonos Light, La Texana y Lanzarote, registraron valores de capacidad antioxidante de 19.2, 18.2 y 17.2% siendo estadísticamente similares ( $P>0.05$ ); no obstante, fueron superiores ( $P<0.05$ ) a los valores reportados para Chateau Blanc, Bon Rennés, Laclette, Montchevre y Parroquia de Xico todos pertenecientes a la clasificación Sainte-Maure.

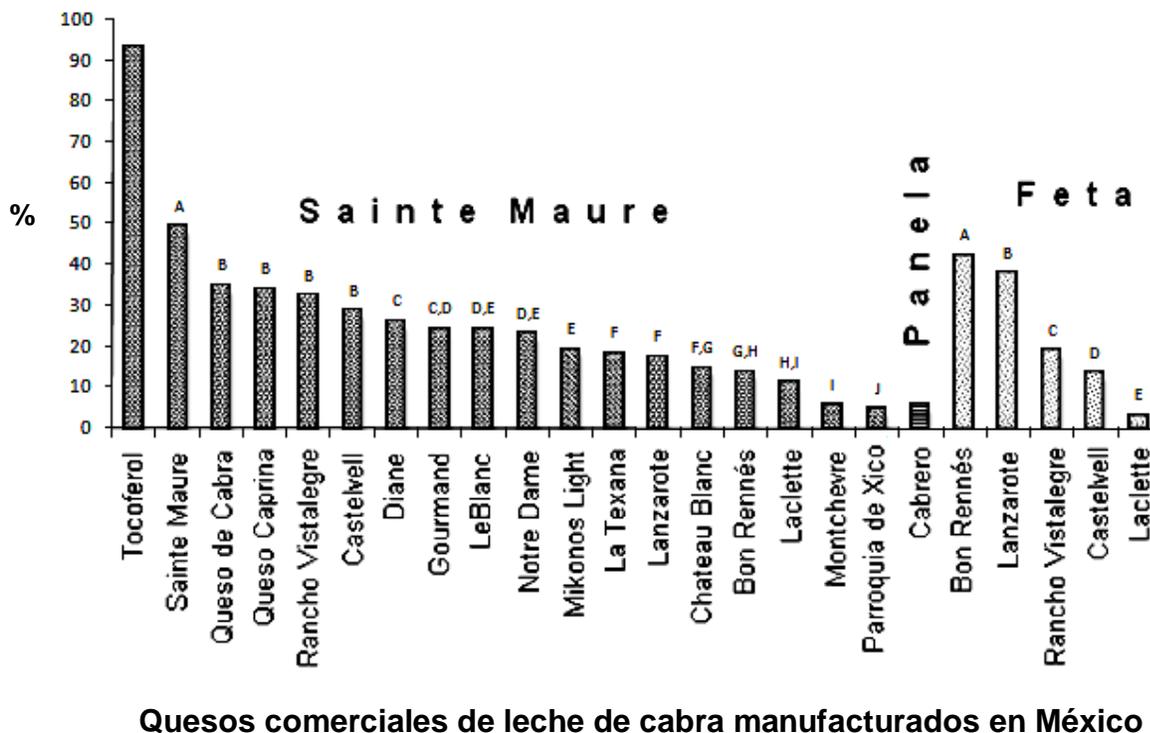
Para el caso de los productos: Chateau Blanc y Bon Rennés, se reportaron valores de 14.6 y 13.7%, los cuales no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ); mientras que sí fueron diferentes con respecto a los obtenidos por las muestras denominadas: Laclette, Montchevre y Parroquia de Xico.

En lo que concierne a la muestra identificada como Laclette, ésta obtuvo 11.1%; valor superior ( $P<0.05$ ) a los obtenidos en los productos Montchevre y Parroquia de Xico con 5.5 y 4.6% de capacidad secuestrante, respectivamente.

La actividad antioxidante frente al radical libre DPPH, de los quesos de la categoría Feta registraron un valor promedio de 23.02%; donde Bon Rennes, y Lanzarote obtuvieron los valores más elevados con 42.2 y 37.8%, respectivamente. Asimismo, en las muestras denominadas como Rancho Vistalegre, Castellvell y Laclette los valores se ubicaron en 18.8, 13.4 y 2.9% respectivamente; cabe mencionar que estas variaciones mostraron un comportamiento estadísticamente significativo ( $P<0.05$ ).

En el caso del producto tipo Panela identificado como Cabrero, se reportó un porcentaje de capacidad secuestrante de 5.7 (Grafica 4)

**Gráfica 4.** Porcentaje de capacidad secuestrante (CS) del DPPH<sup>+</sup> en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra.



A,B,C,D,E,F,G,H,I,J Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ )

### VI.2.2.2 Capacidad secuestrante (CS) del radical ABTS

En la Gráfica 5, se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de capacidad secuestrante (CS) frente otro radical libre, conocido como ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencino sulfanico-6) y abreviado como ABTS. Donde; de los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra en estudio, obtuvieron valores estadísticamente confiables, con un coeficiente de variación menor a 5 y un valor promedio de 26.7%, con un intervalo que osciló entre 7.0 y 48%.

En este sentido, las muestras de tipo Sainte-Maure, identificados como Sainte Maure, Queso Caprina, Queso de Cabra y Rancho Vistalegre presentaron los valores de capacidad antioxidante más elevados con 48.02, 48.01, 45.4 y 40.0%, respectivamente. Sin registrar diferencias estadísticamente significativas ( $P>0.05$ ) entre ellos. No obstante, estos valores fueron diferentes estadísticamente ( $P<0.05$ ), respecto a los encontrados en los extractos alcohólicos de los quesos Castellvell, Gourmand, Laclette, Chateau Blanc, Lanzarote, Bon Rennés, Diane, Notre Dame, Mikonos Light, Parroquia de Xico, LeBlanc, Montchevre y La Texana.

Ahora bien, para Castellvell se obtuvo un valor de 35.6% de actividad antioxidante, siendo diferente estadísticamente ( $P<0.05$ ) respecto a las muestras mencionadas anteriormente. Por su parte, las muestras Gourmand y Laclette, registraron 34.8 y 30.7%, valores estadísticamente similares ( $P>0.05$ ); mientras que dichos porcentajes, presentaron diferencia estadística ( $P<0.05$ ) respecto a los obtenidos por las muestras: Chateau Blanc, Lanzarote, Bon Rennés, Diane, Notre Dame, Mikonos Light, Parroquia de Xico, LeBlanc, Montchevre y La Texana.

Por su parte, las muestras identificadas como Chateau Blanc, Lanzarote y Bon Rennés, registraron valores de 30.2, 28.2, 24.1%; mismos que fueron estadísticamente similares ( $P>0.05$ ) y que a su vez fueron diferentes estadísticamente ( $P<0.05$ ) respecto a los porcentajes reportados por los productos Diane, Notre Dame, Mikonos Light, Parroquia de Xico, LeBlanc, Montchevre y La Texana.

Con respecto a las muestras Diane y Notre Dame, se obtuvieron valores de 21.5 y 18.8% que no presentaron diferentes estadísticamente ( $P>0.05$ ). No obstante, fueron diferentes ( $P<0.05$ ) a los porcentajes obtenidos en Mikonos Light, Parroquia de Xico, LeBlanc, Montchevre y La Texana.

Mikonos Light se alcanzó un valor de 17.8%, el cual fue diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) respecto a los porcentajes de capacidad antioxidante registrados en las muestras Parroquia de Xico, LeBlanc, Montchevre y La Texana; mismas que obtuvieron valores de 11.3, 10.8, 10.7 y 7.6% respectivamente; éstos últimos valores no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre sí.

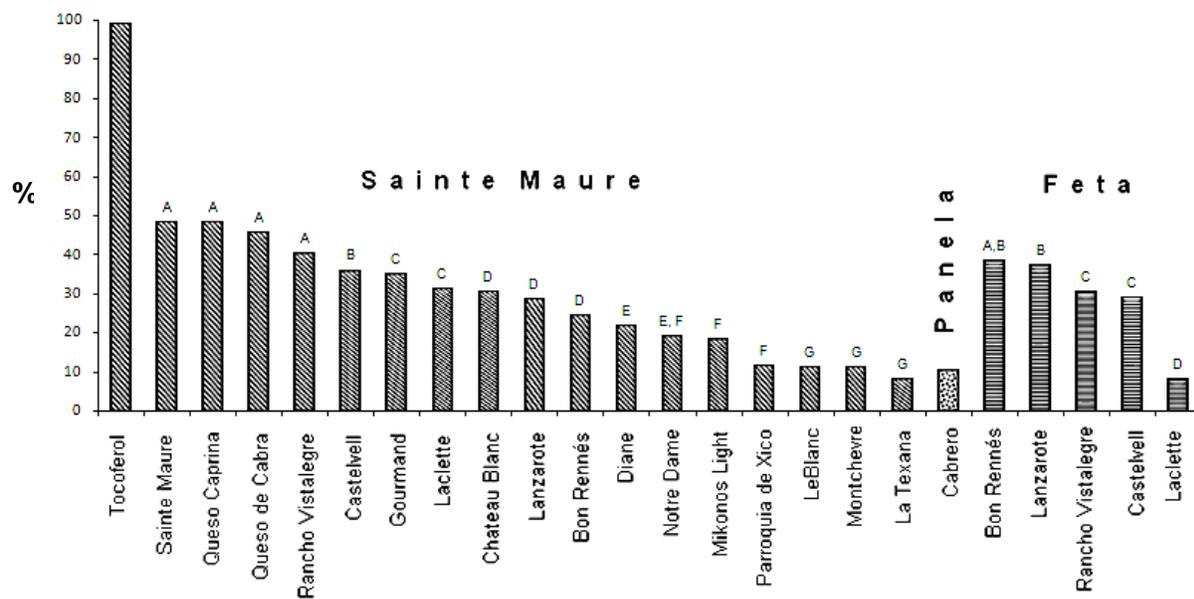
En lo que respecta a los productos tipo Feta, los identificados como Bon Rennés y Lanzarote, registraron valores de capacidad secuestrante de 38.2 y 36.9% respectivamente; sin presentar diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, estos porcentajes fueron diferentes ( $P < 0.05$ ), respecto a los obtenidos por las muestras Rancho Vistalegre, Castellvell y Laclette (Gráfica 5).

En el caso de las muestras Rancho Vistalegre y Castellvell, registraron un porcentaje de 30.0 y 28.7, respectivamente; siendo similares estadísticamente ( $P > 0.05$ ); mientras que fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) al registrado en el producto denominado Laclette con 7.8%.

Por otra parte, en el Cuadro 14 se presentan los resultados de la correlación entre el contenido de compuestos polifenólicos y la capacidad secuestrante de los extractos metanólicos frente a los radicales libres DPPH y ABTS. Donde, en este análisis estadístico no se registro ninguna relación entre los compuestos polifenólicos (fenoles, catequina epicatequina, ácido cumárico y caféico) y la capacidad secuestrante de todas las muestras; donde se observan

coeficientes muy pequeños e incluso negativos, como en el caso de catequina, ácido cumárico y caféico, que no registraron correlación.

**Gráfica 5.** Porcentaje de capacidad secuestrante (CS) del radical ABTS en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra.



### Quesos comerciales de leche de cabra manufacturados en México

A,B,C,D,E,F,G Distinta letra indica diferencias estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ )

Cuadro 14. Análisis de correlación entre los compuestos polifenólicos y la capacidad secuestrante de los extractos metanólicos frente a los radicales libres DPPH y ABTS.

	polifenoles totales (mg ác. galico/100 g)	Catequina (mg/100g)	Epicatequina (mg/100g)	Ác. Cumárico (mg/100g)	Ác. Caféico (mg/100g)
DPPH (%CS)	0.0055	-0.1171	0.0124	-0.1695	-0.094
ABTS (%CS)	0.0284	-0.1730	0.1362	-0.1498	0.0252

\*Los coeficientes presentes van de -1 a 1; donde un coeficiente cercano a 1 indicara una relación directamente proporcional, mientras que cercano a -1, mostrará una relación indirectamente proporcional.

Por su parte, observando los resultados obtenidos en las gráficas del anexo IX.3.1, de manera particular, durante la evaluación de la absorbancia registrada por los extractos metanólicos frente al radical DPPH, las muestras identificadas como Queso Caprina (tipo SM), Rancho Vistalegre y Castellvell (ambos tipo Feta) presentaron el mayor decremento en su absorbancia durante los primeros cinco minutos, con respecto al resto de las muestras; este decremento fue menos evidente en relación al estándar ( $\alpha$ -tocoferol), el cuál registro un decremento súbito en la absorbancia, característica que se puede observar en el anexo IX.3.1; y que se extendió hasta alcanzar valores de cero durante el resto de la evaluación.

Por su parte, los productos identificados como: Sainte-Maure y el tipo Feta: Bon Rennés fueron los que registraron un decremento mayor en la absorbancia, respecto a los primeras muestras mencionadas; Sin embargo para alcanzar este comportamiento fue necesitaron de mayor tiempo (20 minutos de iniciada la

reacción). Este comportamiento se vio reflejado sobre la capacidad secuestrante acumulada de estas muestras (Grafica 4).

Lo que respecta a los productos tipo SM identificados como Parroquia de Xico, Montchevre y el tipo Feta Laclette Gourmet, fueron los que registraron absorbancias con escasas variaciones, registrando descensos en la absorbancia muy pequeños, ubicándose en intervalos de entre 0.58 a 0.56;, lo que dio como resultado un porcentaje de capacidad secuestrante reducido.

Por su parte, al evaluar la capacidad secuestrante frente al radical ABTS, se pudo observar que la mayoría de las muestras, registraron un comportamiento similar al de la solución estándar; donde, alrededor de los cinco minutos, se presentó una importante pérdida de absorbancia, indicada por la decoloración de la solución (Anexo IX.3.2.)

En este sentido, los productos tipo SM identificados como: Queso de Cabra, Gourmand, Bon Rennés y Castellvell, fueron en los que la pérdida de color de la reacción fue más evidente, con el consiguiente decremento de la absorbancia; lo que les permitió situarse dentro de los compuestos con mayor capacidad secuestrante frente al radical ABTS (Grafica 5). Característica que se extendió de manera similar para el último producto, en su versión tipo Feta.

Por otra parte, se observa gráficamente que los productos La Texana y Laclette Gourmet presentan un efecto de inhibición del radical menor al resto de las muestras, con una pérdida de absorbancia lenta y reducida (anexo IX.3.2)

## VII. DISCUSIÓN

La presencia de compuestos con actividad antioxidante es de suma importancia; sobre todo en alimentos con alto contenido de grasas. Debido a que los lípidos son blanco importante para la acción de las especies reactivas de oxígeno y radicales libres; lo que trae como consecuencia alteraciones en el sabor, olor y color de los alimentos (Zenteno y Saldaña, 2008); desencadenándose la pérdida gradual del valor nutricional.

Por otra parte, el queso destaca por ser una fuente concentrada de ácidos grasos y proteínas. De estas últimas, destaca la caseína por su alto valor nutrimental, al contener aminoácidos esenciales; siendo susceptibles al ataque de los radicales libres y la afectación de su función biológica (Halliwell y Gutteridge, 2007; Varnam, 1995). Por otro lado, diversos factores acentúan el proceso oxidativo, como las altas temperaturas, exposición a la luz, presencia de enzimas catalíticas y metales quelantes, así como el almacenamiento prolongado, mismos que son difíciles de controlar en este tipo de derivados lácteos. En este sentido, surge la necesidad de analizar la presencia de compuestos con actividad antioxidante en este tipo de alimento.

Donde, se evaluó la actividad antioxidante (AAO) de manera cualitativa, mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), procedimiento ampliamente utilizado en diversos estudios como lo señala Prakash *et al.* (1998); quienes emplean reveladores como sulfato cérico y DPPH; comprobando la sensibilidad de estos compuestos como indicadores de la actividad antioxidante.

Así mismo, se emplearon dos procedimientos de evaluación cuantitativos, para determinar la capacidad secuestrante (CS) de los radicales libres 2,2-difenilpicrilhidracilo (DPPH<sup>+</sup>) y el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-

bencinosulfónico-6 (ABTS<sup>+</sup>) por los extractos alcohólicos de las muestras en estudio. Las variaciones en los resultados de este estudio (Gráficas 4 y 5) pudieron estar vinculadas a variables propias de la leche (enzimas, carga microbiana y tratamiento térmico etc.); además de los factores que intervienen en la elaboración del queso (coagulación, maduración, almacenamiento, etc.); además de factores relacionados con el animal (raza, edad, etapa de lactación) y el sistema de alimentación (pastoreo, estabulación y el empleo de aditivos, entre otros). En relación a la alimentación, se han realizado algunos estudios, para determinar la relación entre la dieta y la concentración de compuestos con actividad antioxidante en quesos, como lo demostraron Hernández (2007) y Cuchillo (2007).

Cuchillo en 2007, determinó la presencia de componentes funcionales, nutrimentales y capacidad antioxidante del queso fresco de leche de cabra. Donde, reportó un porcentaje de capacidad secuestrante de los radicales libres DPPH y ABTS de 26.9% y 33.3% respectivamente, para el queso elaborado con leche cruda de animales de pastoreo (PC); y de 24.1% y 24.9% para DPPH<sup>+</sup> y ABTS<sup>+</sup>, respectivamente, en el queso de leche pasteurizada de animales alimentados en pastoreo (PP).

En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio se ubicaron en valores similares a los reportados por Cuchillo (2007) para los quesos PC y PP; donde la capacidad secuestrante frente a los radicales DPPH y ABTS, en los quesos Castellvell, Diane y Gourmand fue de 28.6, 26.0 y 24.2% para el primero y de 35.6, 21.5 y 34.8%, para el segundo. Cabe señalar que estos productos se clasifican como tipo Sainte-Maure. Para los productos clasificados como tipo Feta, el queso Lanzarote, registro una CS de 36.9% frente al radical ABTS. Esta información puede contribuir a la posible relación entre la calidad de producto y el sistema de alimentación de los animales; sobre todo durante el pastoreo, ya que la cabra realiza una amplia selección de material vegetal; característica que según Prache *et al.* (2005) impacta positivamente sobre el contenido de ácidos grasos, fenoles y tocoferoles entre otros compuestos; lo

que incrementa la calidad nutrimental, funcional y sensorial de la leche y sus derivados.

Así mismo Cuchillo (2007) contrastó la alimentación en pastoreo, estabulando a un grupo de cabras en lactación y ofreciéndoles una dieta basada en heno de forraje y concentrado de cereales; donde elaboró dos tipos de quesos, que fueron identificados como EC (queso elaborado de leche cruda de animales en estabulación) y EP (queso elaborado de leche pasteurizada de animales en estabulación); a los cuales se les determinó la capacidad secuestrante frente a los radicales libre DPPH y ABTS, registrando valores de 16.5:16.5% y 15.2:15.2% respectivamente.

Con respecto a la capacidad secuestrante frente a los radicales DPPH y ABTS obtenida en este estudio (Graficas 4 y 5); los resultados mostraron una importante similitud con los valores obtenidos por Cuchillo (2007) para los quesos EC y EP; particularmente el queso Mikonos Light registró valores de 19.2 y 17.8% respectivamente. Esta característica puede quizás ayudar a inferir el manejo alimenticio de los animales de los que proviene este producto.

En este sentido, Hernández en el 2007, reportó para el queso cotija una CS de 44.7% frente al DPPH<sup>+</sup> y de 64.7% por ABTS<sup>+</sup>; además para la leche proveniente de un sistema de libre pastoreo registró una CS de 50.3% y 52.1% para el caso del DPPH<sup>+</sup> y ABTS respectivamente, así como 32.5% (DPPH<sup>+</sup>) y 34.6% (ABTS<sup>+</sup>) para el caso de leche de vaca proveniente de establo.

Ambos estudios hacen evidente la importancia del tipo de alimentación que reciben los rumiantes, así como el proceso de elaboración y tratamiento térmico que recibe la leche, frente a la presencia de compuestos con actividad antioxidante.

Los porcentajes de capacidad secuestrante obtenidos en este estudio, fueron inferiores a los reportados en los estudios de Mathew y Abraham (2006), en el extracto metanólico de la planta *C. verum*, quienes reportaron una CS de 82% utilizando el radical ABTS<sup>+</sup> a una concentración de 12.5 µg/ml, sin embargo se tiene que tomar en cuenta que los vegetales y la matriz de estudio guardan diferentes proporciones de compuestos con actividad antioxidante ya que al ser el rumiante un intermediario por participar en el metabolismo de estos compuestos, su concentración final puede disminuir.

Es importante mencionar que en los resultados se observaron valores alentadores ya que todas las muestras presentaron una actividad antioxidante, donde más de la cuarta parte de las muestras en estudio, registraron porcentajes de CS elevados, por encima del 30%, valores importantes al compararlos con el 98% de la referencia  $\alpha$ -tocoferol, compuesto con alto poder antioxidante, el cuál ha sido ampliamente utilizado como aditivo para desarrollar esta función; estos resultados se consideran de gran relevancia debido a los múltiples impactos que los compuestos antioxidantes ejercen sobre el queso y la salud del consumidor como lo señala O'Connel y Fox (2001).

Por su parte, los compuestos fenólicos poseen múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres, asimismo, contribuyen con la astringencia, color y olor en los alimentos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002); razón por la cual se analizó el contenido de polifenoles totales (PT) en los extractos metanólicos de los quesos de leche de cabra en estudio, donde se registró una concentración promedio de 3.04 mg de ácido gálico/100 g de muestra. En este sentido, Cuchillo en 2007 reportó valores superiores, para el caso de quesos de leche de cabra identificados como pastoreo-crudo (PC) y pastoreo-pasteurizado (PP), con concentraciones de 78 y 30 mg ácido gálico/100 g respectivamente; mientras que para el caso de los quesos de leche de cabra elaborados con leche de animales estabulados y conocidos como estabulado-crudo (EC) y estabulado-

pasteurizado (EP), encontró valores de 5 y 6 mg de ácido gálico/100g respectivamente, concentraciones cercanas a las reportadas en este estudio. De igual manera, Hernández (2007) evaluó el contenido de PT en el queso Cotija región de origen, reportando una concentración de 1.3 mg de ácido gálico/100g de queso. Mientras que en estudios sobre la concentración de estos compuestos, en bebidas como el vino tinto, se registran valores de hasta 257 mg/100 mL (Martínez-Flores *et al.*, 2002); la gran variación de las concentraciones de los compuestos polifenólicos entre fuentes primarias (vegetales como el caso de la uva para la producción del vino) y los derivados lácteos (quesos de leche de cabra y vaca) se presenta debido a que los organismos autótrofos sintetizan estos compuestos bioactivos y su presencia en el queso se justifica principalmente debido a la ingesta de estos compuestos por el animal (De Feo *et al.*, 2006).

Dentro de los compuestos fenólicos, se encuentran los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, dos importantes grupos químicos considerados como compuestos bioactivos y que fueron analizados en este estudio; reportándose concentraciones promedio de 0.29 mg de ácido caféico y 0.96 mg de ácido cumárico; además de 0.17 mg de catequina y 0.06 mg de epicatequina, todos por 100 g de muestra. Por su parte, Cuchillo (2007) reportó en el queso PC un valor de 1.4 mg de ácido caféico y 0.023 mg de catequina, para el queso PP 0.65 mg de ácido caféico y 0.009 mg de catequina por cada 100g, mientras que en los quesos EC y EP no se registró el ácido caféico pero si catequina (0.016 mg/100 g); cabe señalar que estos valores fueron inferiores a los obtenidos en este estudio (Graficas 2 y 3).

Cabe mencionar que en algunos trabajos como en el de Rice-Evans *et al.* (1996) se relaciona la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales; sin embargo en trabajos como el de Heinonen *et al.* (1998) encontraron correlaciones bajas y en una publicación reciente (Hassimoto *et al.*, 2005) verificaron la actividad antioxidante de pulpas congeladas de frutas consumidas

en Brasil, sin encontrar relación alguna entre el contenido total de fenoles y el de vitamina C.

Para el caso de los extractos de las muestras lácteas analizadas en este estudio, no se halló una correlación directa entre la concentración de los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante, por lo que es necesario considerar que cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente; esta relación no solo depende de la concentración y calidad de los compuestos con actividad antioxidante, sino también de la interacción de los polifenoles con otros componentes, así como la metodología empleada.

Al analizar los resultados obtenidos en este estudio, la capacidad antioxidante en los quesos no fue influenciada por su contenido de polifenólicos; ya que en muestras que presentaron una menor CS, la cantidad de compuestos fenólicos (incluyendo flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) fue igual o mayor a las concentraciones registradas por los productos con mayor CS; por lo cual, cabe la posibilidad de que se encuentren un sinnúmero de compuestos de la misma naturaleza que los aquí estudiados, entre los que se encuentran enzimas antioxidantes y algunas vitaminas (tocoferoles y tocotrienoles) puedan actuar como antioxidantes.

En este sentido, se sabe de la presencia de las vitaminas A y E, poseen actividad antioxidante. Estos compuestos fueron cuantificados en leche y queso de cabra por Alfaro (2009) y Cuchillo (2007); así como la presencia de aminoácidos como tirosina y cisteína, a los que se les ha reconocido por contribuir a la estabilización de los radicales libres (Hernández-Ledezma, 2005)

Por otra parte, Pihlanto (2006) reportó la presencia de ciertos tripéptidos (Tir-His-Tir, Trp-Tir-Cis(SH)) que forman parte de la caseína en la leche de cabra, y que contienen los aminoácidos tirosina y triptófano que poseen actividad antioxidante; además Hernández-Ledezma, 2005, identificó varios péptidos provenientes de la  $\beta$ -lactoglobulina, como Trp-Tir-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile, Met-His-Ile-Arg-Leu y Tir-Val-Glu-Glu-Leu, los cuales mostraron una actividad secuestrante de radicales, que fue atribuida a la presencia de metionina, triptofano y tirosina, debido a su alta actividad antioxidante.

Asimismo, se ha reportado la presencia de enzimas como la catalasa y glutatión peroxidasa en la leche de cabra (Lindmark-Månsson y Åkersson, 2000), estos y otros metabolitos, así como su posible interacción, podrían ser responsables de la actividad antioxidante registrada en este estudio; y no solo a la presencia de los compuestos polifenólicos. En este sentido, es imperativo reconocer que hasta el momento no se pudo identificar cuales compuestos estuvieron vinculados con la respuesta antioxidante.

## VIII. CONCLUSIONES

- VIII.1 Se extrajeron y cuantificaron los compuestos polifenólicos en los quesos de leche de cabra estudiados, registrando un valor promedio de 3.04 mg por cada 100 g de muestra.
- VIII.2 Los extractos metanólicos de las muestras lácteas estudiadas, registraron en promedio una concentración de 0.19 mg de catequina y 0.08 mg de epicatequina; 0.32 mg de ácido caféico y 1.37 mg de ácido cumárico por cada 100 g de muestra, sin registrarse la presencia del ácido cinámico.
- VIII.3 Los extractos metanólicos de los quesos comerciales analizados registraron en promedio un porcentaje de capacidad secuestrante de 21.7 y 26.7, frente a los radicales DPPH y ABTS.
- VIII.4 El queso de leche de cabra tipo feta identificado como Laclette gourmet, registró un porcentaje de capacidad secuestrante de 2.9 y 7.8, frente a los radicales DPPH y ABTS.
- VIII.5 El queso de leche de cabra tipo Sainte Maure identificado como Sainte Maure, registró un porcentaje de capacidad secuestrante de 49.3 y 48, frente a los radicales DPPH y ABTS.
- VIII.6 La actividad antioxidante no presentó una correlación directa con los compuestos polifenólicos presentes en las muestras.

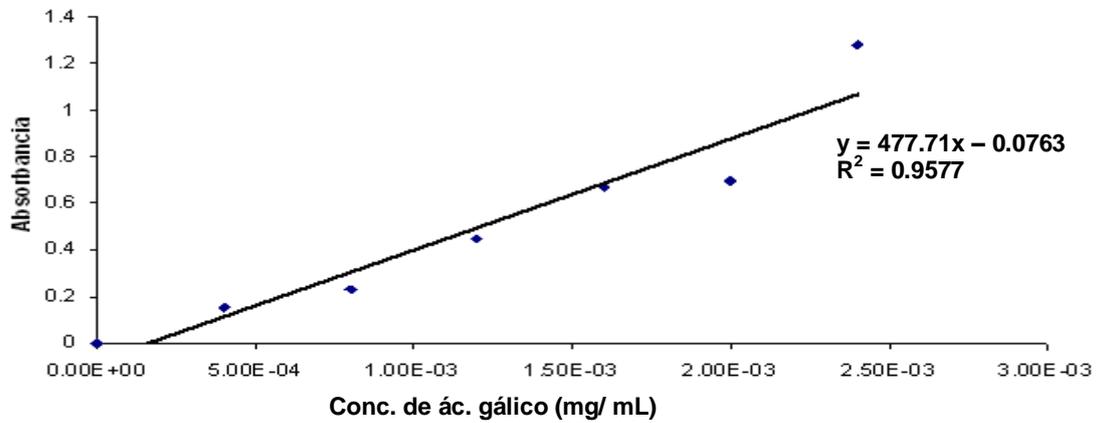
## VIII.1 SUGERENCIAS

- ★ Es posible que la actividad antioxidante en este tipo de productos lácteos, favorezca la calidad, beneficiando la vida de anaquel, además de satisfacer la demanda del consumidor hacia alimentos funcionales.
  
- ★ Mediante éste y estudios futuros sobre otro tipo de metabolitos con actividad antioxidante, que pudieran estar presentes en estos productos, como los tocoferoles, péptidos y enzimas endógenas, se podrá enriquecer la información nacional generada alrededor de los productos lácteos caprinos, despertando un mayor interés hacia su investigación y consumo.

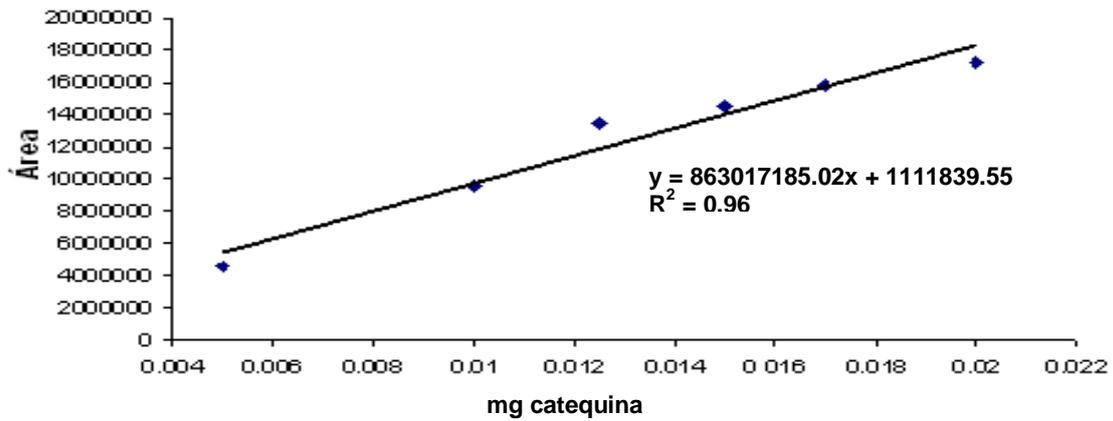
## IX. ANEXOS

### IX.1 CURVAS PATRÓN

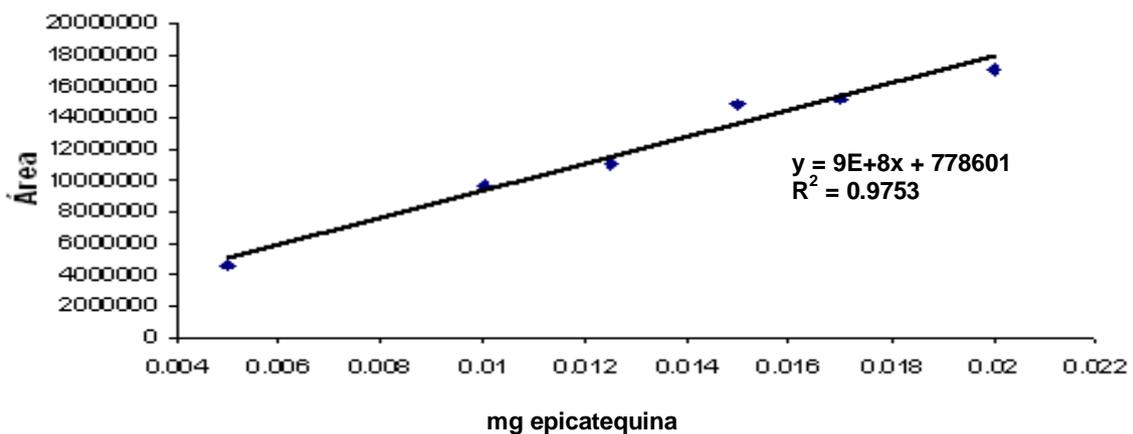
#### IX.1.1 Fenoles totales



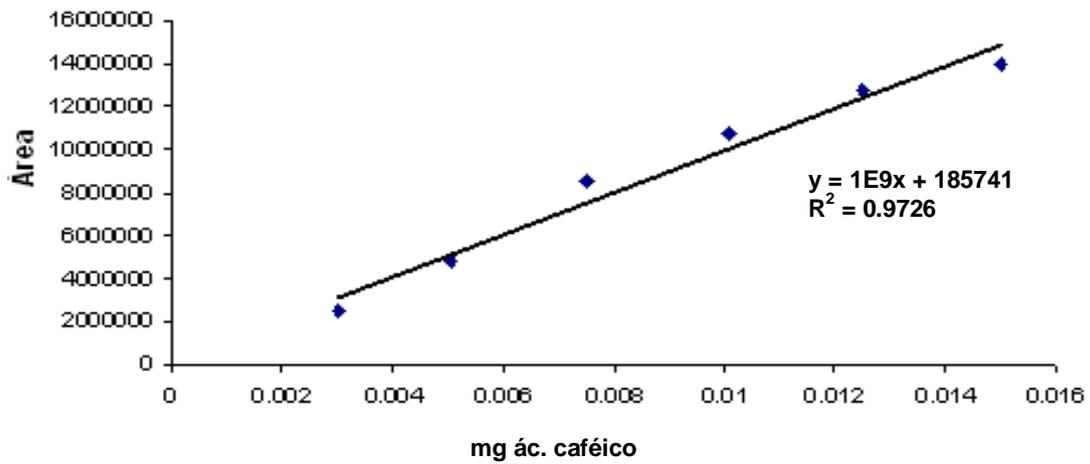
#### IX.1.2 Catequina



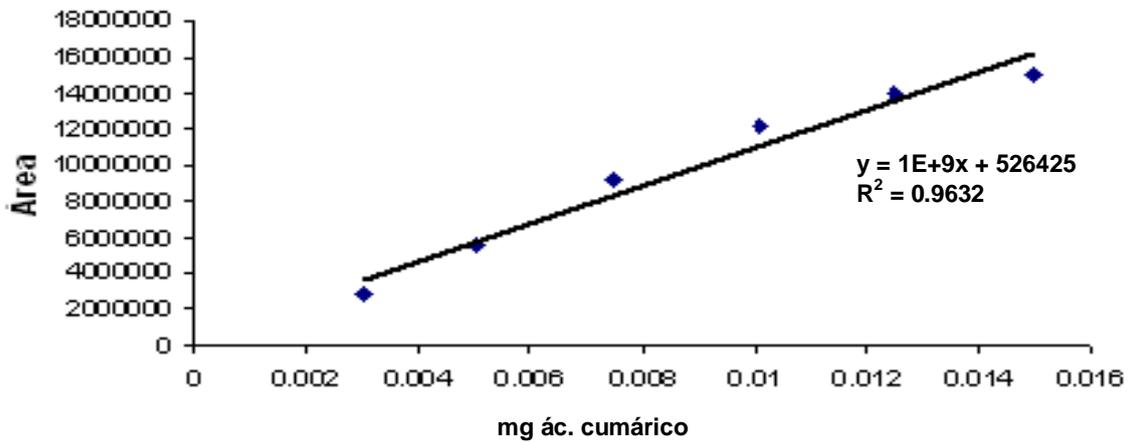
#### IX.1.3 Epicatequina



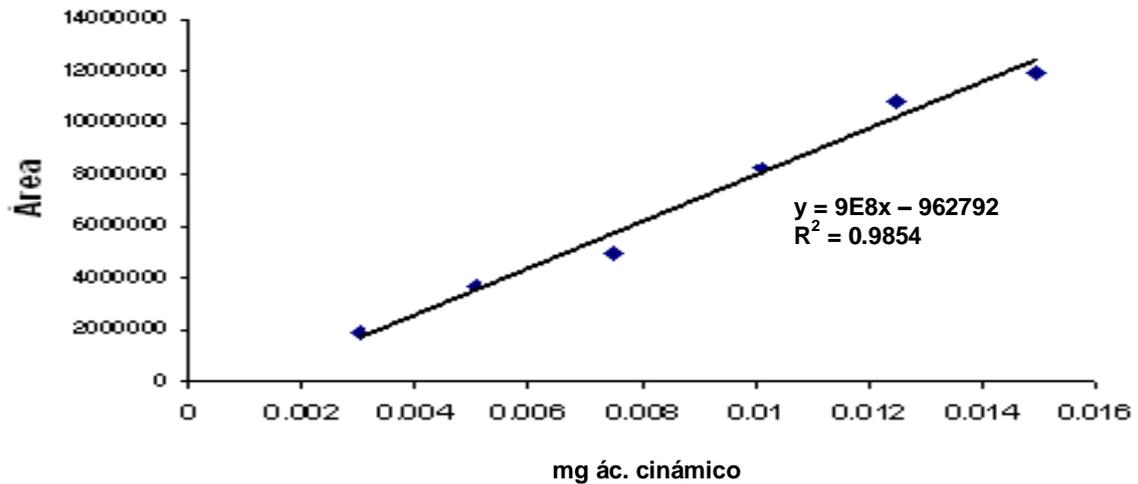
### IX.1.4 Ácido caféico



### IX.1.5 Ácido cumárico



### IX.1.6 Ácido cinámico



## IX.2 CROMATOGRAMAS HPLC

IX.2.1 Cromatograma obtenido del análisis de ácidos hidroxicinámicos por cromatografía de líquidos de alta resolución.

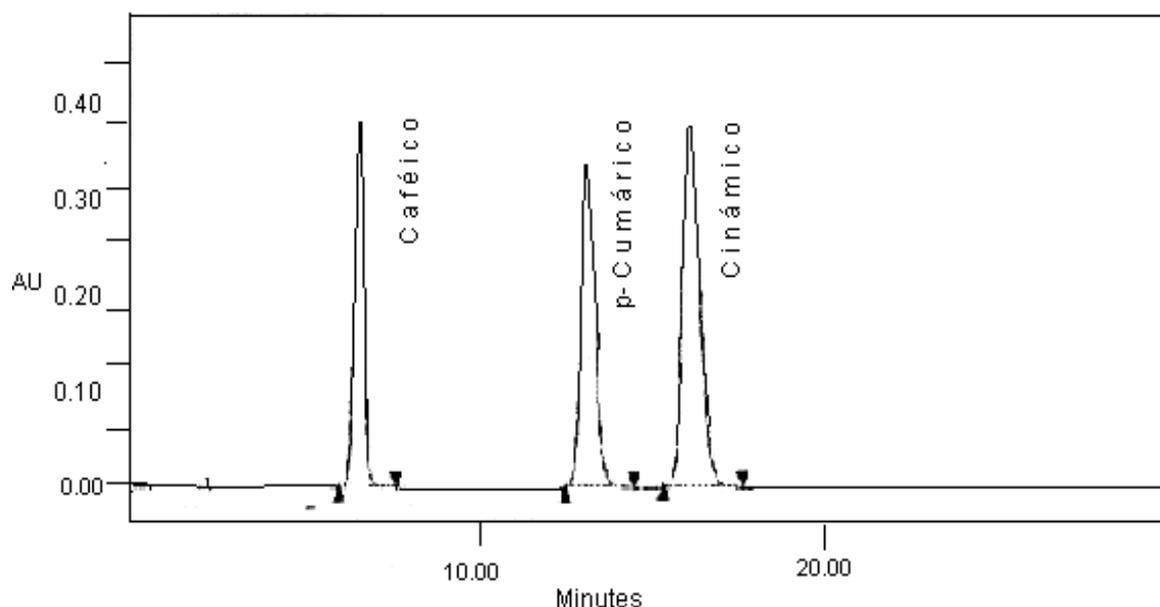
---

### Millennium Sample Information

---

Project Name: HIDROXICINAMICOS  
Sample Name: MEZCLA  
Vial: 1  
Injection: 2  
Channel: 486  
State Acquired: 10/21/92 01:07 PM  
Scale Factor: 1.00  
Acq Meth Set: HIDROXICINAMICOS  
Processing Method: MEZCLA

Sample Type: Standard  
Volume: 5.00  
Run Time: 30.0 min  
Date processed: 10/21/02  
Dilution: 1.00000



#	Name	Ret. Time (min)	Area (Au*sec)
1	CAFEICO	6.467	6316088
2	p-CUMARICO	12.367	8246896
3	CINAMICO	15.000	11525374

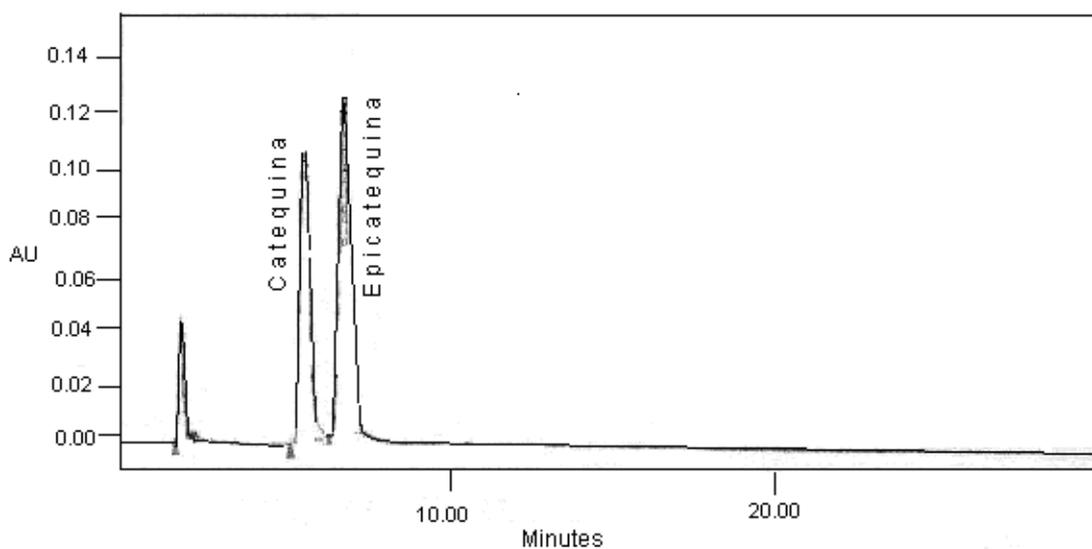
**IX.2.2** Cromatograma obtenido del análisis de flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución.

---

**Millennium Sample Information**

---

Project Name:	CHOLSARA	Sample Type:	Standard
Sample Name:	MEZCLA-EPI-CAT	Volume:	5.00
Vial:	3	Run Time:	30.0 min
Injection:	1	Date processed:	10/21/04
Channel:	486	Dilution:	1.00000
State Acquired:	10/21/92		
Scale Factor:	1.00		
Acq Neth Set:	CHOLSARA		
Processing Method:	CATEPI		

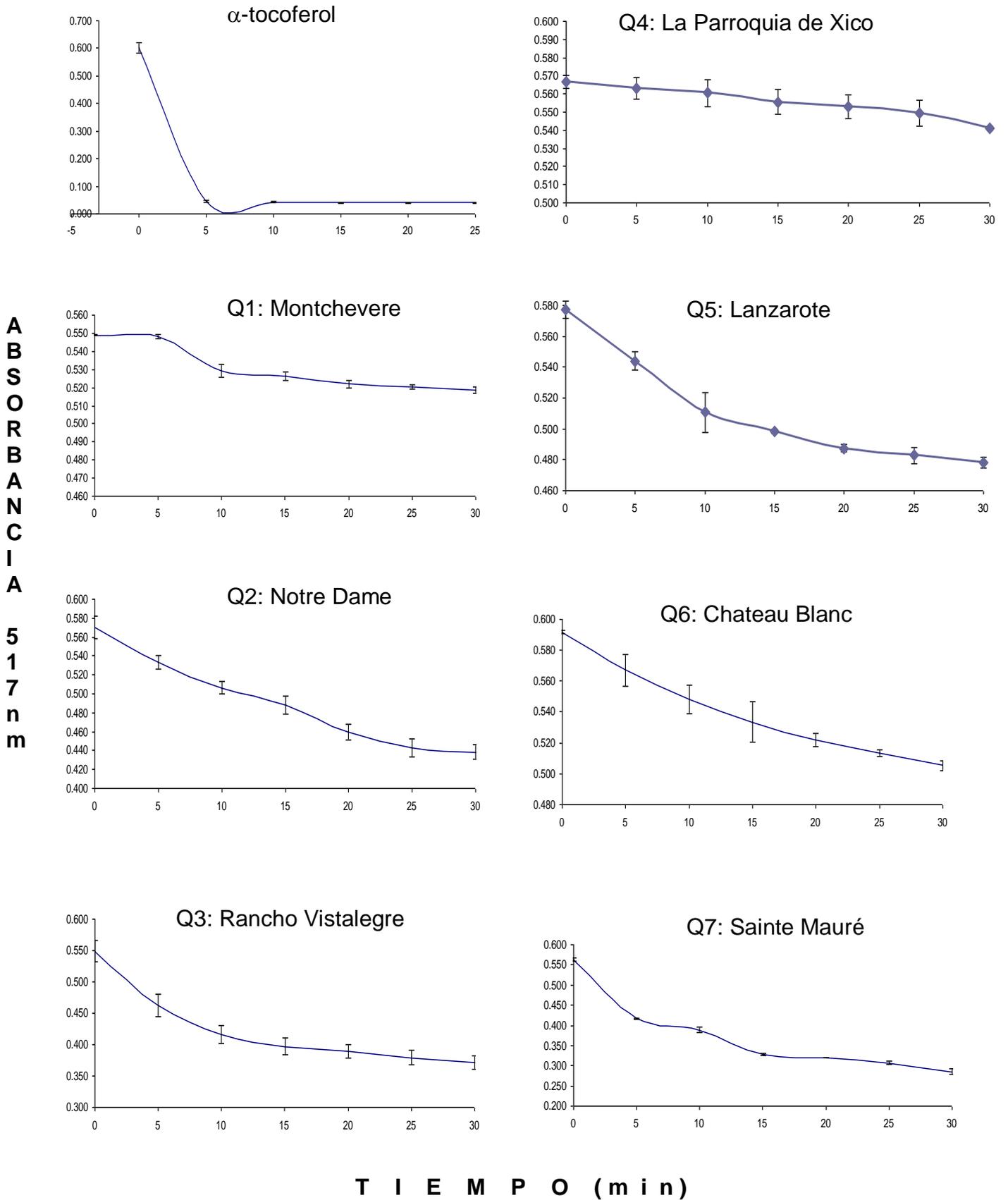


Peak Results

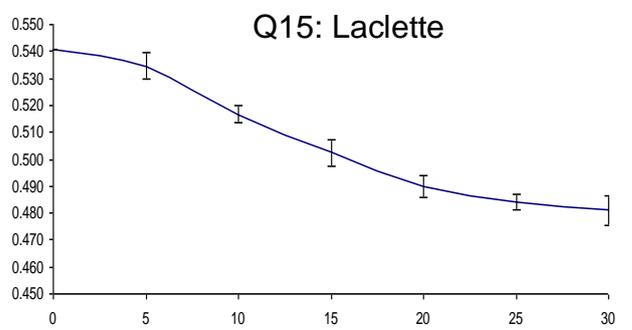
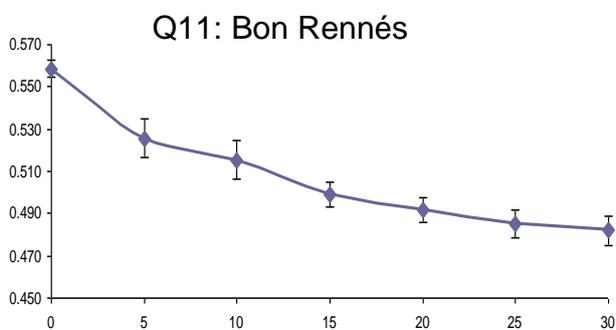
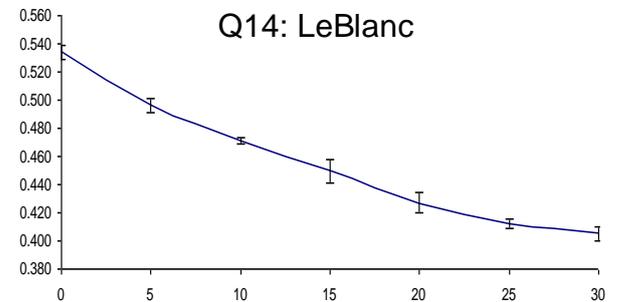
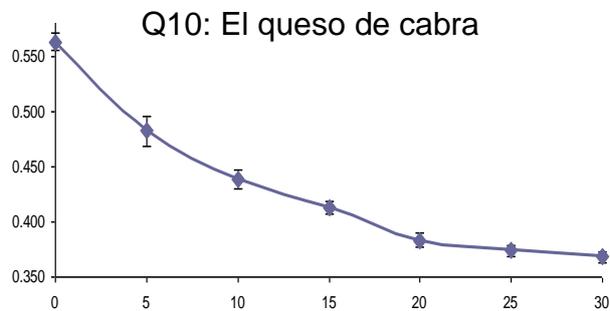
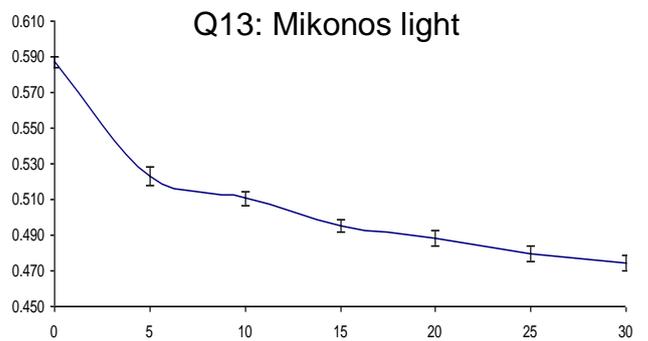
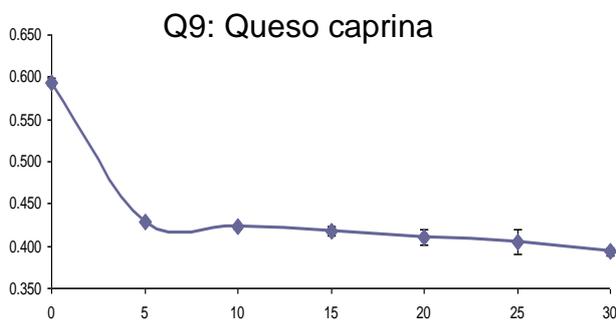
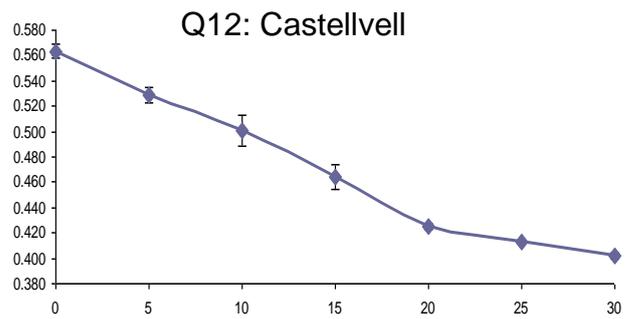
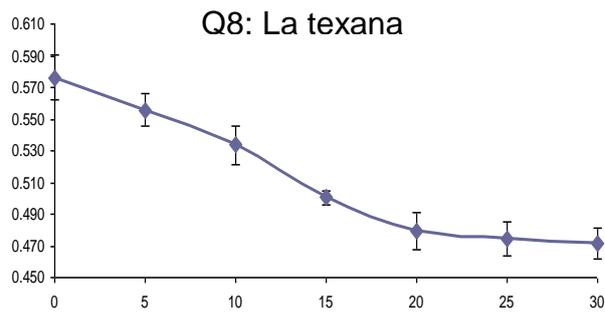
#	Name	Ret Time (min)	Area (Au*sec)
1	Peak 1	1.950	455472
2	CATEQUINA	5.667	2387280
3	EPICATEQUINA	6.863	2248480

### IX.3 ESPECTROFOTOMETRIA

#### IX.3.1 Seguimiento de la actividad secuestrante de los extractos metanólicos de quesos de leche de cabra frente al radical DPPH durante el tiempo.

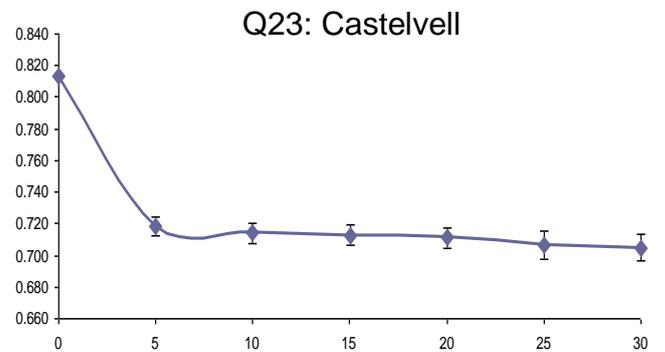
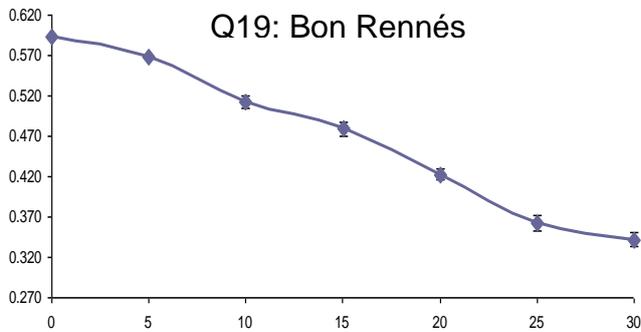
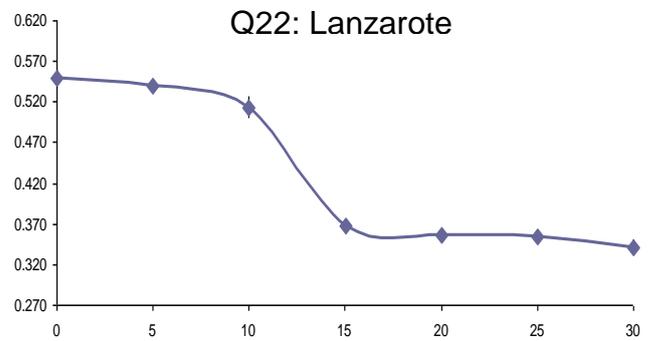
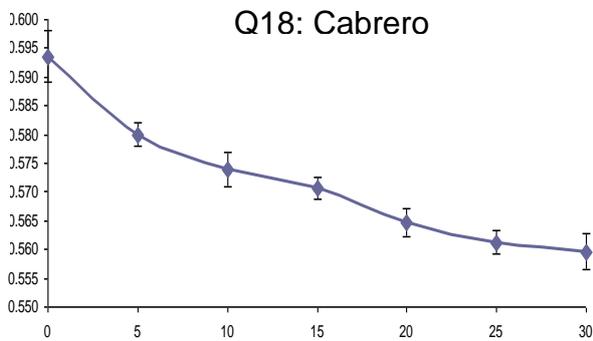
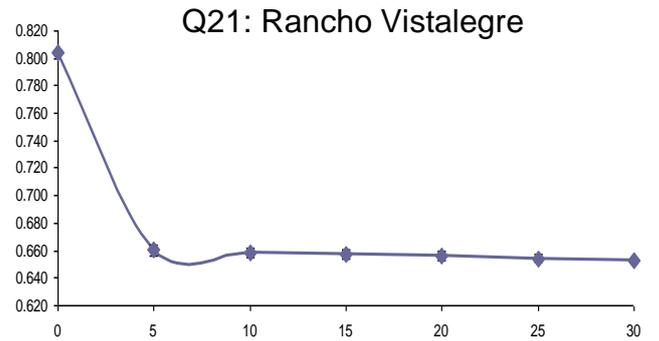
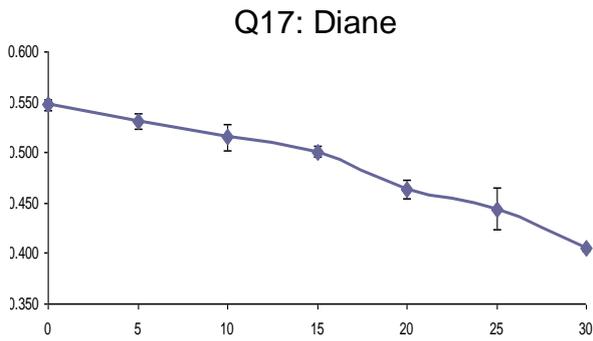
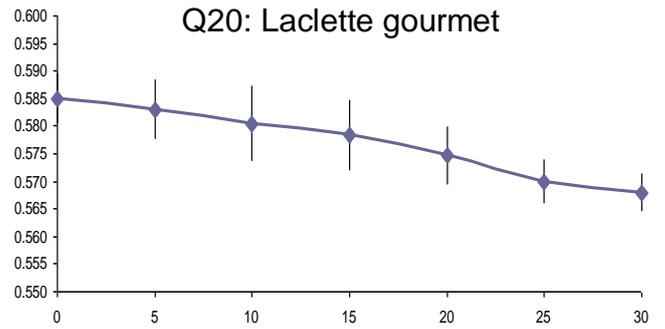
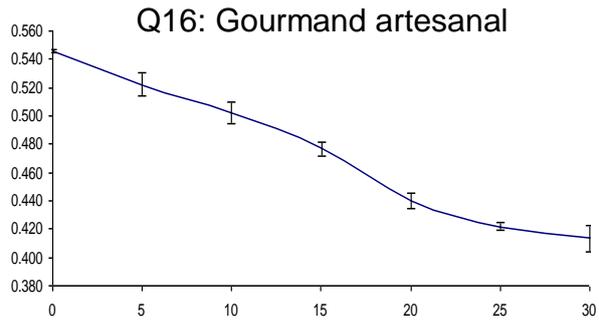


A  
B  
S  
O  
R  
B  
A  
N  
C  
I  
A  
  
5  
1  
7  
n  
m



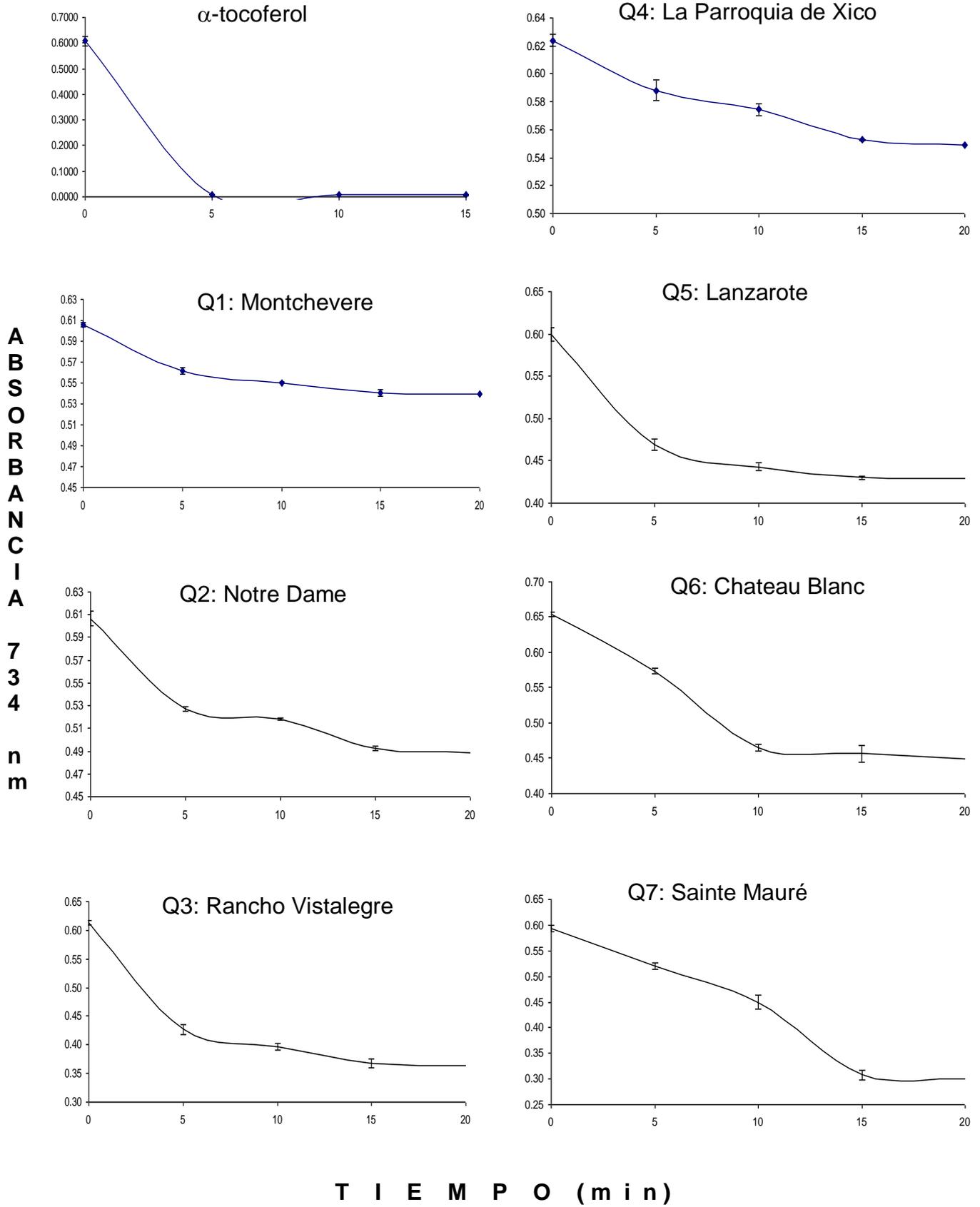
T I E M P O ( m i n )

A  
B  
S  
O  
R  
B  
A  
N  
C  
I  
A  
  
5  
1  
7  
n  
m

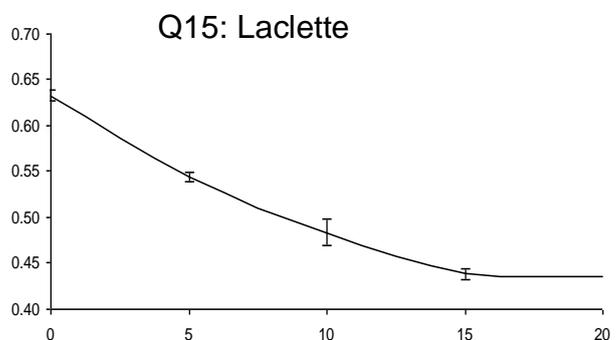
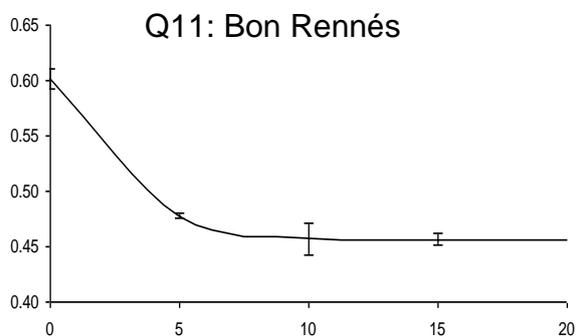
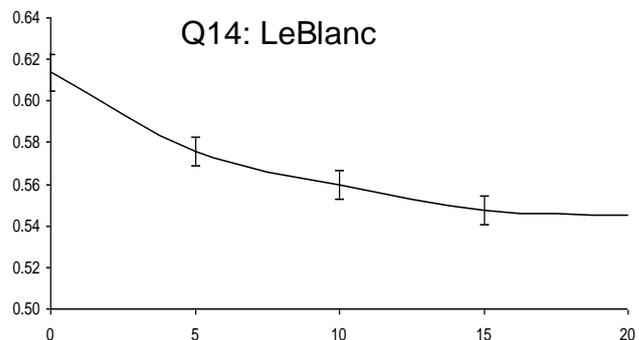
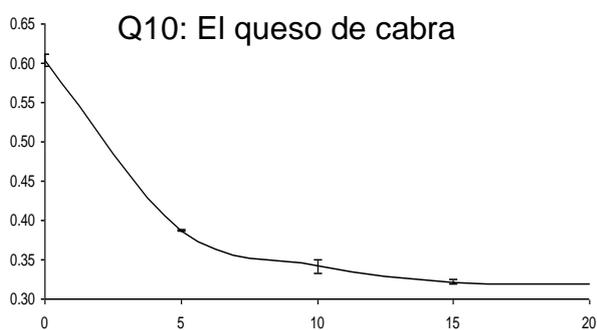
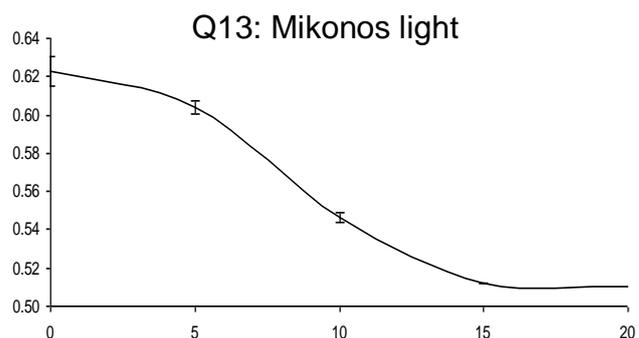
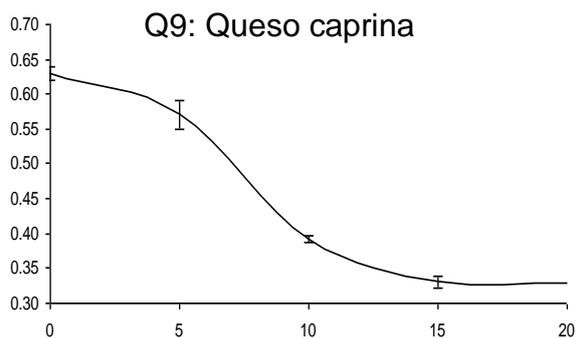
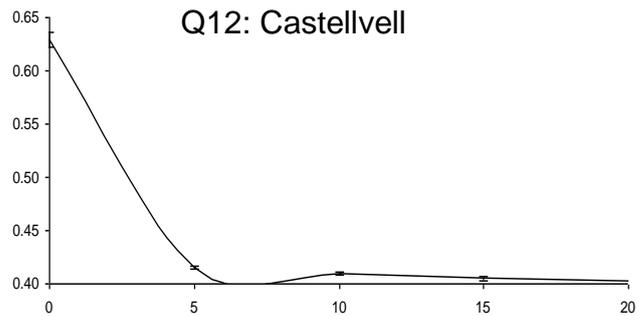
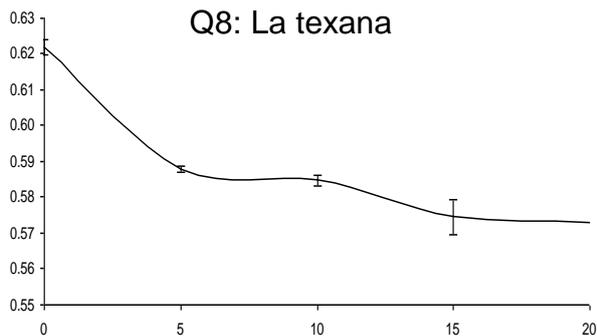


T I E M P O ( m i n )

**IX.3.2** Seguimiento de la actividad secuestrante de los extractos metanólicos de quesos de leche de cabra frente al radical ABTS durante el tiempo.

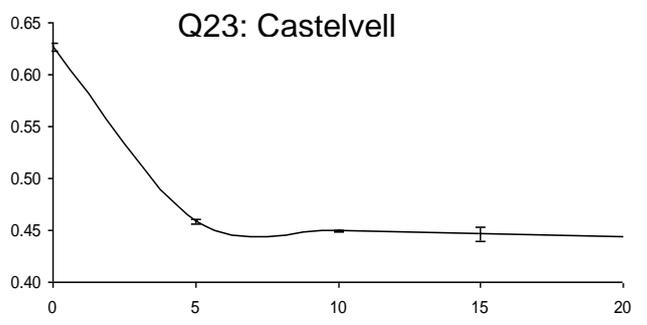
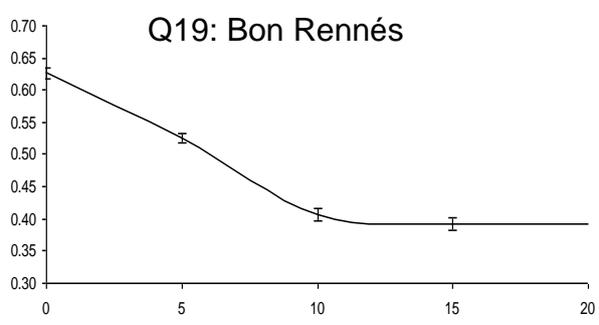
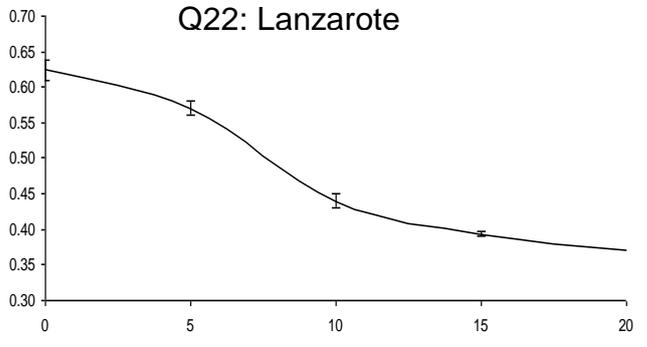
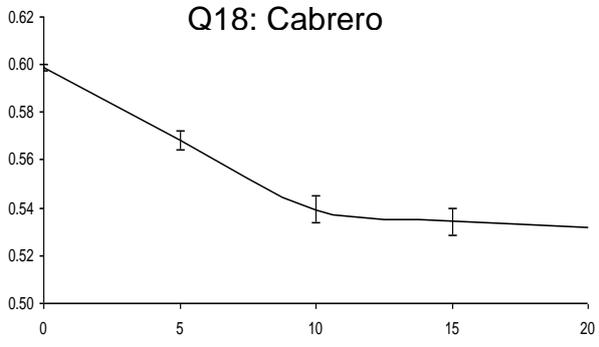
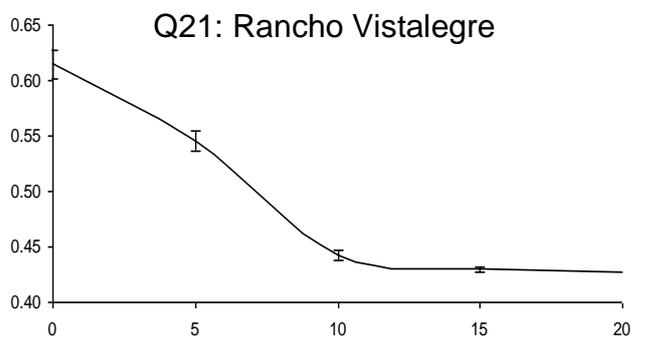
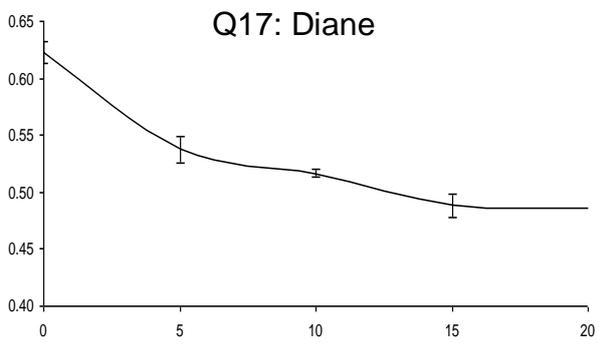
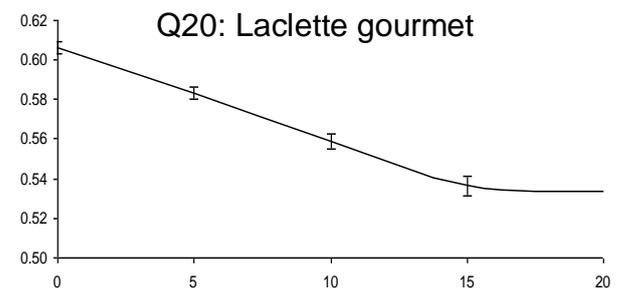
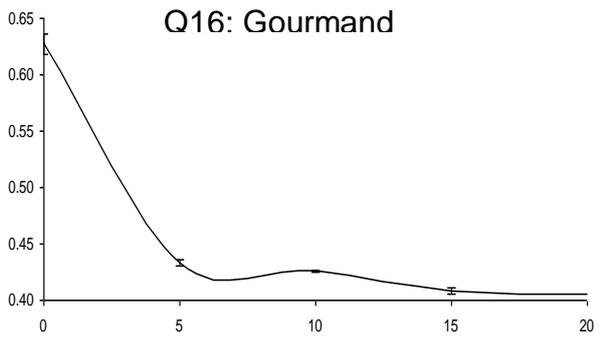


**A  
B  
S  
O  
R  
B  
A  
N  
C  
I  
A  
  
7  
3  
4  
  
n  
m**



**T I E M P O ( m i n )**

**A  
B  
S  
O  
R  
B  
A  
N  
C  
I  
A**  
**7  
3  
4**  
**n  
m**



**T I E M P O ( m i n )**

## X. BIBLIOGRAFIA

- Alais C. 1990. Ciencia de la leche. Reverte, S.A. España, pp 21-105
- Alfaro, J. 2008. Efecto de la conservación y el tiempo de almacenamiento sobre los aminoácidos y vitaminas liposolubles del queso suave de leche de cabra, cruda y pasteurizada. Tesis de licenciatura, UNAM, pp 57-66.
- Amendola R y Castillo E. 2002. Perfiles por país del recurso pastura/forraje. México.
- Andlauer, W. y Furst, P. 2002. Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. 35: 171–176.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Washington. D.C. USA, 1997.
- Arbiza, A. S. 2001. La leche caprina y su producción. Editores Mexicanos Unidos, S. A. México, pp 10-15.
- Balestrieri, M., Spagnuolo, M., Cigliano, L., Storti, G., Ferrara, L., Abrescia, P. y Fedele, E. 2001. Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. *Food Chemistry*. 77: 293-299.
- Benzie, I. F. F., Wai, Y., y Strain, J. J. 1999. Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 10:146–150.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 191: 1199-1200.
- Bonilla, C. C. A. 2005. Evaluación nutrimental del queso de leche de cabra, cruda y pasteurizada por efecto del sistema de alimentación. Tesis de Licenciatura. FMVZ, UNAM. pp 58-70.
- Burton, G. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition*. 119: 109-111.
- Cadenas E. y Packer, L. 2002. Handbook of antioxidants. Second edition, Marcel Dekker, Nueva York, USA.
- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M. y Nicoli, M.C. 2004. Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*. 14: 421–427.
- Caragay, A. B. 1992. Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technology*. 46(4): 65-68.

- Carreras I. 2004. Influencia de la suplementación de antioxidantes y de la administración de endrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave. Universidad de Girona, Departamento de Química.
- Chasquibol N., Lengua L., Delmás I., Rivera D., Bazan D., Aguirre R. y Bravo M. 2003. Alimentos funcionales o fotoquímicos, clasificación e importancia. Revista peruana de Ingeniería Química. 5: 9-20.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. y Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. Journal of Dairy Science. 86: 1751- 1770.
- Cuchillo, M. 2007. Componentes funcionales y nutrimentales del queso fresco de leche de cabra, cruda y pasteurizada, por efecto del sistema de alimentación. Tesis Maestría, FES-Cuautitlán, UNAM, pp 67-73.
- Cuchillo, H.M., Puga. D.C., Galina, M.A., Pérez-Gil, F., Montañó, B. S. y Navarro-Ocaña, A., 2005. Efecto del sistema de alimentación sobre la actividad antioxidante del queso de leche de cabra en México. XIX Reunión de la asociación Latinoamericana de Producción Animal. IV congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. Tampico, Tamaulipas, México. 586-587
- Davis J.G. 1976. Cheese 2, Vol. III Editorial Churchill Livingstone. London, England: pp 25-53
- De Feo, V., Quaranta, E., Fedele, V., Claps, S., Rubino, R. y Pizza, C. 2006. Flavonoids and terpenoids in goat milk in relation to forage intake. Italian Journal of Food Science.18:85-92.
- Dean, R., Fu, S., Stocker, R. y Davies, M. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochemistry Journal. 324: 1-18.
- Drago, M., López, M. y Saíenz, T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37:58-68.
- FAO. 2006. Production Yearbook. FAO Pub. Homepage: [www.fao.org/statistics/](http://www.fao.org/statistics/)
- FAOSTAT. Statistical Databases. 2004. FAO Homepage: <http://apps.fao.org/>
- Fox, P.F. 2004. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. Aspen publication. New York, USA: pp. 583-585.

- Fuentes, A. 2009. Composición de ácidos grasos y contenido de ácido linoleico conjugado en quesos de leche de cabra manufacturados en México. Tesis de licenciatura, UNAM, México: pp 63-74.
- Gallardo, C., Jiménez, L., y García-Conesa, M.T. 2006. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*. 99 (3): 455-463.
- Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., y Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 361-367.
- Giese, J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology*. 50:73-81.
- Glazer, A. 1990. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods enzymologic*. 186:161-168.
- Gordon, M., 2004. El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. 7-19. En Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon M. 2001. Antioxidantes en los alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia, pp 364.
- Gülcin, I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 217(2-3): 213-220.
- Halliwell, B., Murcia, M., Chirico, S. y Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Food Science and Nutrition*. 35: 7-20.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. 2007. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 4 Edición, Nueva York, USA, pp 320-340.
- Hansmann, C.F., Gadow, A. y Joubert, E. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45: 632-638.
- Hassimoto, N., Genovese, M.I. y Lajolo, F.M. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 2928-2935.

- Hatzimaoglou, J. y Boyazoglu. 2004. The role of the goat in society: the past and present – perspectives for the future. Department of animal production, school of agriculture, Aristotle University, Thessaloniki, Greece.
- Heinonen, A., Meyer, A.S. y Frankel, E.N. 1998. Antioxidant activity of berry phenols on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4107- 4112.
- Hernández-Ledezma, B., Quirós, A., Amigo, L. y Recio, I. 2005. Identification of bioactive peptides after digestión of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*. 17:42-49.
- Hernández, V., 2007. Queso cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante, UNAM, México, D.F. Tesis de licenciatura, pp 58-80.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisis, T. y Jukic, M. 2006. Screening of 70 medical plant extracts for antioxidants capacity and total phenols. *Food Chemistry*. 94: 550-557
- Kitts, D. 1997. An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins. *Trends Food Science and Technology*. 8: 198-203.
- Klinger I. y Rosenthal I. 1997. Public health and safety of milk and milk products from sheep and goats. *Scientific and Technical Review*. 16 (2): 482-488.
- Konigsberg, 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno, México, D.F. pp 1-14, 49-58, 73-82.
- Krygier K., Sosulski F. y Hogge L. 1982. Free, sterified and insoluble-bound phenolic acids. Extraction and purification. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 30 (2): 330-334.
- Laranjinha, J. 2002. Caffeic acid and related antioxidant compounds: Biochemical and cellular effects. En Cadenas E. y Packer L. 2002. *Handbook of antioxidants*. Second edition, Marcel Dekker. Nueva York, USA.
- Lindmark-Månsson, H. y Åkersson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (1):103-110
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. y Salunkhe, D.K. 1996. *Food antioxidants*. Marcel Dekker. New York, USA. pp 1-25, 67-82.
- Manterola H. 1999. Situación actual y perspectivas de la producción de leche y quesos con rumiantes menores en Chile. *Publicación Técnico-ganadera*. 25: 43-71

- Martínez-Flórez, J., González-Gallego, J. M., Culebras y Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6): 271-278.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.A. y Gaspar, R. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50(1):5-18.
- Matthaus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3444-3452.
- Matthew, S.T. y Abraham, E. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*. 94:520-528.
- Mc Clements, D.J. y Decker, E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsion: Impact of molecular environment on chemical reaction in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*. 65 (8): 1270- 1282.
- Medeiros, M. 2008. Daño al ADN. En Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. Manual moderno*, México, D.F. 119-132.
- Middleton, E., Kandaswami, C., y Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Review*. 52:673-751.
- Miranda, L. 2008. Química de los radicales libres. En Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. Manual moderno*. México, D.F. pp 3-20.
- Montero, M. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. ISSN 1025-5583, 57 (4) [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/Anales/v57\\_n4/radicales.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/Anales/v57_n4/radicales.htm)
- Nacz M. y Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*. 1054 (1-2): 95-111.
- Niki, E. 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry Physics of Lipids*. 44: 227-253.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias, México: Diario Oficial de la Federación.

- Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- O'Connell, J. E. y Fox, P.F. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *Dairy Journal*. 11:103-120.
- Olmedilla, B. 2002. Beneficios derivados del consumo de frutas y verduras, perspectivas del futuro. *Alimentaria*, 11-19.
- Padayatty, S., Daruwala, R., Wang Y., Eck, P., Song J., Koh W. y Levine M. 2002 Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. En Cadenas E. y Packer L. 2002. *Handbook of antioxidants*. Second edition, Marcel Dekker. Nueva York, USA: pp 712.
- Packer, L., Diplock, A. y Landvik, S. 2002. Efficacy of vitamin E in human health and disease. En Cadenas E. y Packer L. 2002. *Handbook of antioxidants*. Second edition, Marcel Dekker. Nueva York, USA.
- Palma M. y Taylor L.T., 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography*. 849 (1): 117-124.
- Pihlanto, A. 2006 Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16: 1306-1314.
- Pokorny, J. 2004. Antioxidantes en alimentos aplicaciones prácticas. España, Acribia, pp 110-140.
- Prache, S., Cornu, A., Berdagué, J.L. y Priolo, A. Traceability of animal feeding diet in the meat and milk of small ruminants. *Small Ruminant Research*. 59 (2-3): 157-168.
- Prakash, S. O., Krishan, B. T. y Bhupinder, S. 1998. Thin layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hidroquinone, cetequine, epicatequine, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tanic acid. *Journal of Chromatography*. 822:167-171.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9/10): 1231-1237.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., y Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20: 933–956.
- Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2866-2887.
- Rodríguez A. y Valencia E. 2006. Los pequeños rumiantes, una vieja crianza para el futuro. *Ruminantia*. Puerto Rico. 2: 1-4.
- Romero, A., M. y Judis, M. A. 2005. Ajuste de modelos cinéticos a la etapa de iniciación de la oxidación lipídica. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Facultad de Agroindustrias. Universidad Nacional de Argentina. [www.unne.edu.ar/com2005/](http://www.unne.edu.ar/com2005/)
- Romero, J. 2004. Programa de investigación e innovación tecnológica de la cadena alimentaria de carne y leche de caprinos. *Memorias de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Acapulco, Guerrero, INIFAP.
- Ruíz, C. 2007. Parámetros de estrés oxidativo en trasplante renal y efecto modulador de atorvastatina y N-acetilcisteína. Facultad de medicina, Universidad de granada. Tesis doctoral, pp 58-70.
- Sagarpa. 2005. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/CNAcap.htm](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/CNAcap.htm).
- Saher, M., Arvola, A., Lindeman, M. y Lähteenmäki, L. 2004. Impressions of functional food consumers. *Appetite*. 42: 79–89
- Shacter. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drugs Metabolism Reviews*. 32: 307-326.
- Shahidi, F. 1996. Natural antioxidants. Chemistry, health effects and applications. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 1-6, 9, 18, 19.
- Scheffer, F. 1992. Oxide reduction system. *Lehrbuch der Bodenkunde* 13a Ed. Ed Enke, Stuttgart, Alemania. Traducido por: Stechauner R. 72-79.
- Taga, M. S., Miller, E. E. y Pratt, D. E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 61: 928-931.
- Tenorio, F., Valle, L. y Pastelín, G. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Archivos de Cardiología de México*. 76: 33-45.

- Tsai P. J., Pearce P., Cambden B. y Jordan B.R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscussabdariffa L.*) extract. Food Research International. 35: 351–356.
- Valencia, E. y Román, M. 2004. La fibra dietaria como alimento funcional. Revista de la facultad de química farmacéutica de la universidad de Medellín, Colombia. Vol. 11, número 2, 12-17.
- Varnam, A. 1995. Leche y productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Acribia. Zaragoza, España.
- Wellington R. Sousa, Cléber da Rocha, Cardoso, C., Silva S. y Valnice B. 2004. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. Journal of Food Composition and Analysis, 17. 619-633.
- Wilkinson, M. J. y Stara A. B. 1989. Producción comercial de cabras. Acribia, España: [www.OIE - Revue E-160219.mht](http://www.OIE - Revue E-160219.mht)
- Winston, G., Regoli, F., Dugas, A., Fong, J. y Blanchard, K. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Radical and Biological Medicine. 24:480-493.
- Yu, B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiology Review. 74: 139-162.
- Zenteno, T. y Saldaña, Y. 2008. Daño a lípidos. En Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno, México, D.F. pp 135-145
- Zollo, A., Furno, F., Grandola, G., Totaro, M. y Aloj, E. 2004. Factores ambientales generadores de radicales libres y factores clínico-sanitarios y ocupacionales de riesgo de irradiaciones: prevención y protección. Higiene y Sanidad Ambiental. 4:65-71.