



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**Extracción e identificación de polifenoles provenientes del orujo de
uva roja y su aplicación en una bebida hidratante**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JESSICA SEMIRAMIS REYES BALBUENA

ASESORA:

DRA. MARÍA ANDREA TREJO MÁRQUEZ

COASESORAS:

DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

M. EN C. SELENE PASCUAL BUSTAMANTE

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Extracción e identificación de polifenoles provenientes del orujo de uva roja y su aplicación en una bebida hidratante.

Que presenta la pasante: Jessica Semiramis Reyes Balbuena

Con número de cuenta: 309278708 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
VOCAL	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
SECRETARIO	M. en C. Araceli Ulloa Saavedra	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT:
“Desarrollo Tecnológico para el Aprovechamiento Integral de Frutas y Hortalizas” (IT201216), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Este fue un trabajo logrado gracias al esfuerzo, compromiso y apoyo de muchas personas a lo largo de casi 5 años.

Agradezco a mis padres, Blanca y Salvador, por apoyar mis decisiones, por estar conmigo en las noches de desvelo y todas y cada una de las mañanas. También agradezco a mi hermano Daniel, por ser mi cómplice y compañero de aventuras por excelencia. La vida siempre es más divertida cuando estoy con mi familia.

Gracias a mis amigos por hacer de mi estancia en la UNAM algo inigualable. Todos sus consejos me han ayudado a seguir adelante. No es posible nombrarlos aquí por cuestiones de espacio, pero tengo la certeza de que ellas y ellos comprenderán perfectamente.

Gracias a Alma Cárdenas, Marce Contreras, Ángel Rangel y Christian Maza, por ser parte de mi primera experiencia en una empresa de clase mundial y por compartir sus conocimientos conmigo.

Gracias también a la UNAM, por enseñarme a ser autodidacta y por acercarme a la ciencia y la tecnología, pero también a la cultura y a la sociedad. En esta institución forjé amistades que durarán para toda mi vida, y encontré mentores que recordaré con cariño y admiración siempre.

Me quedo con las horas de calidad, con los exámenes que me pusieron a prueba, y con las clases fuera de lo común, que me exhortaron a indagar, a seguir aprendiendo. Gracias a mis profesores por tantas horas de aprendizaje, por la confianza que pusieron en mí y por todos los retos.

Porque este es el primer gran logro de mi vida, y no hubiese sido posible sin ustedes:

¡Mil gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
1 ANTECEDENTES	3
1.1 Generalidades sobre la vid	3
1.1.1 Taxonomía, morfología y compuestos principales	3
1.1.2 Importancia económica	6
1.1.3 Variedades de uva	7
1.1.4 Productos a partir de la uva	8
1.1.5 Subproductos de la uva	10
1.2 Antioxidantes	12
1.2.1 Oxidación	12
1.2.2 Radicales libres	13
1.2.3 Mecanismos de oxidación	14
1.2.4 Normatividad	15
1.2.5 Compuestos antioxidantes	16
1.3 Compuestos fenólicos	19
1.3.1 Características de los polifenoles	19
1.3.2 Mecanismo de acción y efectos benéficos	23
1.3.3 Métodos de extracción	25
1.3.4 Variables de extracción	27
1.3.5 Identificación de polifenoles	28
1.3.6 Fundamento de la electroforesis capilar	28
1.3.7 Identificación de los componentes en electroforesis capilar	30
1.4 Alimentos funcionales	31
1.4.1 Alimentación y nutrientes	31
1.4.2 Definición de alimento funcional	31
1.4.3 Bebidas hidratantes	33
2 OBJETIVOS	39
3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	40
3.1 Cuadro metodológico	40
3.2 Material de estudio	41
3.3 Acondicionamiento del orujo	41
3.4 Obtención de extractos etanólicos	43

3.5	Identificación de compuestos polifenólicos mediante electroforesis capilar.....	43
3.5.1	Preparación de la muestra.....	44
3.5.2	Identificación de polifenoles.....	44
3.5.3	Hidrólisis del extracto para identificación de otros compuestos.....	45
3.6	Formulación de la bebida hidratante.....	46
3.7	Análisis sensorial de las formulaciones.....	47
3.7.1	Protocolo de evaluación sensorial.....	48
3.8	Medición de propiedades de la bebida hidratante.....	49
3.9	Técnicas analíticas.....	49
3.9.1	Determinación de propiedades fisicoquímicas.....	49
3.9.2	Determinación de propiedades químicas.....	50
3.9.3	Análisis microbiológicos.....	50
3.10	Tratamiento estadístico.....	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1	Evaluación de propiedades en el orujo fresco y deshidratado.....	52
4.1.1	Propiedades físicas y fisicoquímicas de orujos.....	52
4.1.2	Fenoles totales y actividad antioxidante de orujos.....	54
4.1.3	Calidad microbiológica de orujos.....	58
4.2	Efecto del tipo de extracción en las propiedades del extracto de orujo.....	61
4.3	Compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico.....	63
4.4	Evaluación sensorial de la bebida hidratante.....	69
4.5	Evaluación de propiedades en la bebida hidratante.....	69
5	CONCLUSIONES.....	72
6	RECOMENDACIONES.....	73
	ANEXO 1.....	74
	ANEXO 2.....	76
	ANEXO 3.....	78
7	REFERENCIAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes que conforman la uva	3
Figura 2. Corte esquemático de un grano de uva.....	3
Figura 3. Zonas de la pulpa. Distribución de azúcares y ácidos	5
Figura 4. Diagrama de flujo de la producción de vinos tintos y blancos.....	10
Figura 5. Diagrama de flujo de los subproductos obtenidos a partir del orujo de uva	11
Figura 6. Estructuras químicas del BHT, 3-BHA y 2-BHA y TBHQ	18
Figura 7. Estructura del L-ácido ascórbico	18
Figura 8. Estructura de los tocoferoles	19
Figura 9. Mecanismo de acción de un antioxidante fenólico	20
Figura 10. Clasificación de compuestos polifenólicos de la dieta	21
Figura 11. Estructura básica de los principales compuestos polifenoles	22
Figura 12. Diagrama esquemático de la electroforesis capilar	29
Figura 13. Corte transversal del capilar utilizado en electroforesis	29
Figura 14. Diagrama de bloques para fabricación de bebidas deportivas.....	37
Figura 15. Orujos deshidratados y molidos.....	41
Figura 16. Diagrama de bloques para acondicionamiento de orujo	42
Figura 17. Extractos obtenidos para cada uno de los orujos	43
Figura 18. Equipo de electroforesis capilar utilizado para este proyecto.....	44
Figura 19. Diagrama de proceso para las 3 formulaciones de bebida hidratante.....	46
Figura 20. Boleta para evaluación sensorial de la bebida hidratante	48
Figura 21. Sólidos solubles de orujos frescos y deshidratados, procedentes de diferentes variedades de uva.:.....	52
Figura 22. (A) Acidez y (B) pH de orujos frescos y deshidratados, procedentes de diferentes variedades de uva.:.....	53
Figura 23. Contenido de fenoles totales para diferentes variedades de orujo fresco y deshidratado procedentes de diferentes variedades de uva.:.....	55
Figura 24. Actividad antioxidante para diferentes variedades de orujo fresco y deshidratado procedentes de diferentes variedades de uva.:.....	56
Figura 25. (A) Contenido de fenoles totales y (B) Actividad antioxidante para orujo fresco (OF) Cabernet Sauvignon.....	58

Figura 26. Contenido de fenoles totales (A) y actividad antioxidante (B) de extractos etanólicos de orujo Cabernet Sauvignon utilizando diferentes condiciones de extracción (tiempo de extracción: 1 hora).	62
Figura 27. Electroferograma del extracto de orujo Cabernet Sauvignon fresco y deshidratado.....	64
Figura 28. Electroferograma de orujo de uva roja variedad Cabernet Sauvignon deshidratado. Cada pico representa un compuesto identificado.....	65
Figura 29. Estructuras de los compuestos identificados.....	66
Figura 30. Electroferograma de extracto de orujo de uva roja, obtenido con (A) 70%etanol-30%H ₂ O y (B) H ₂ O.....	67
Figura 31. Electroferograma de extracto etanólico de orujo de uva (A) Sin hidrolizar (B) Hidrolizado con HCl	67
Figura 32. Compuestos identificados (monómeros) en extracto hidrolizado	68
Figura 33. Arreglo de viales dentro del sistema de electroforesis capilar.....	74
Figura 34. Electroferogramas de la identificación de cada polifenol por el método de adición de estándar (A-D).	76
Figura 35. Electroferogramas de la identificación de cada polifenol por el método de adición de estándar (E-H).	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales productores de uva a nivel mundial durante el periodo 2013-2014.....	6
Tabla 2. Principales productores de vino a nivel mundial durante el periodo 2013-2014	7
Tabla 3. Variedades de uva utilizadas en la producción de vino tinto	8
Tabla 4. Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	13
Tabla 5. Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres.....	14
Tabla 6. Etapas de la oxidación de lípidos y factores que intervienen	14
Tabla 7. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción.....	17
Tabla 8. Principales variables del proceso de extracción.....	27
Tabla 9. Compuestos encontrados en hollejo, semilla y orujo de uva roja mediante electroforesis capilar	28
Tabla 10. Declaraciones aprobadas por la FDA para diversos alimentos funcionales	32
Tabla 11. Clasificación de las bebidas deportivas según su osmolalidad.....	33
Tabla 12. Límites establecidos para bebidas hidratantes	38
Tabla 13. Códigos asignados para cada tipo de orujo.....	41
Tabla 14. Condiciones de proceso para la obtención de extractos etanólicos	43
Tabla 15. Componentes del sistema de electroforesis capilar.....	44
Tabla 16. Condiciones de prueba de identificación de polifenoles	45
Tabla 17. Información de los estándares empleados para identificación de polifenoles	45
Tabla 18. Condiciones de prueba para identificación de polifenoles en extracto hidrolizado	46
Tabla 19. Formulaciones de la bebida hidratante	47
Tabla 20. Resultados para análisis microbiológicos de orujo fresco y deshidratado	59
Tabla 21. Resultados obtenidos para las pruebas llevadas a cabo para el modelo de bebida hidratante	70
Tabla 22. Condiciones de lavado del equipo	75
Tabla 23. Cálculos para definir la cantidad de sales adicionadas a la bebida.....	78

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO	SÍMBOLO	SIGNIFICADO
°C	Grado centígrado	μm	Micrometro
ABTS*	Radical	V	Volt
EC	Electroforesis capilar	μA	Microampere
mg	miligramo	kV	Kilovolt
g	gramo	W	Watt
kg	kilogramo	nm	Nanometro
AG	Ácido gálico	h	Hora
mol	mol	M	Molar
mmol	milimol	HCl	Ácido Clorhídrico
TE	Equivalente de trolox	m/v	Relación masa volumen
ml	mililitro	rpm	Revolución por minuto
l	litro	mm	Milímetro
%	Por ciento	L _T	Longitud total entrada - salida
°N	Grados norte	L _D	Longitud al detector
Ton	Tonelada	I _D	Diámetro interno
A°	Antioxidante	mM	Milimolar
ROS	Especies reactivas del oxígeno	psi	Libra sobre pulgada cuadrada
ADN	Ácido desoxirribonucleico	fem	Fuerza electromotriz
UV	Ultravioleta	NaOH	Hidróxido de Sodio
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Fe	Hierro	OF	Orujo fresco
FDA	Food and Drug Administration	eqOD	Equivalente de orujo deshidratado
IDR	Ingesta Dietética de Referencia	UFC	Unidad Formadora de Colonias
mOsmol	miliosmol	kHz	Kilohertz
kcal	kilocaloría	US	Ultrasonido
pH	Potencial hidrógeno	AU	Unidades de absorbancia
s	Segundo	n	Número de muestras
PET	Polietileno tereftalato	CV%	Coefficiente de variación
Pt	Platino	N	Normalidad (eq/l)
cm	Centímetro	E	Campo eléctrico (kV/cm)
nL	Nanolitro	μl	Microlitro

RESUMEN

El orujo de uva es el principal subproducto de la industria vitivinícola, y que contiene compuestos fenólicos que pueden ser aprovechados en el desarrollo de diferentes productos alimenticios con propiedades funcionales. Estos compuestos tienen una estructura que consta de grupos aromáticos derivados del fenol, con grupos hidroxilo, responsables de las propiedades antioxidantes de estas moléculas. El objetivo de este trabajo es realizar una propuesta tecnológica que contribuya al aprovechamiento de los residuos de la industria vitivinícola a partir de los extractos etanólicos obtenidos del orujo de uva roja (Cabernet Sauvignon-Malbec, Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc) por diferentes métodos (maceración a 20 y 60°C; sonicación a 25°C), evaluando la concentración de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y perfil de polifenoles, para su posterior aplicación en una bebida hidratante. El contenido de fenoles totales se determinó a través del método de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante por medio del radical ABTS⁺ y la identificación de los compuestos presentes se llevó a cabo por electroforesis capilar (EC). De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que las propiedades químicas de los orujos dependen de factores tales como: la variedad de uva utilizada, así como las condiciones del proceso de maceración/fermentación, siendo la variedad Cabernet Sauvignon la de mayor concentración de fenoles (232.21 mg AG/g orujo deshidratado) y actividad antioxidante (0.25 mmol TE/g orujo deshidratado). Además, debido al origen de la materia prima, debe tomarse en cuenta también la calidad microbiológica del producto para su aplicación en alimentos para consumo humano. El orujo Cabernet Sauvignon presentó cuenta en placa <10 para todos los indicadores.

A partir de la selección del orujo Cabernet Sauvignon, se encontró que el método de extracción también influye en las propiedades químicas del concentrado, siendo el extracto correspondiente a la maceración a 60°C el que obtuvo el mayor contenido de fenoles totales (76.84 mg AG/ml extracto) y actividad antioxidante (0.0897 mmol TE/ml extracto). Los compuestos encontrados en este extracto fueron principalmente epicatequina, catequina, rutina, vainillina, ácido trans-cinámico, ácido coumárico, quercetina y ácido gálico. Se obtuvo un concentrado seco y se adicionó a una bebida hidratante, demostrando que este producto es una posible alternativa para el aprovechamiento de los compuestos fenólicos del orujo de uva, con un contenido de fenoles totales de 443.28 mg AG/600 ml y actividad antioxidante de 0.3053 mmol TE/600 ml de bebida.

INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta perteneciente a la familia *Vitaceae*, formada por tronco, hojas, flores y frutos. El fruto, conocido como grano de uva, tiene una extraordinaria importancia económica a nivel mundial (SAGARPA, 2014), debido a la cantidad de productos que se pueden obtener a partir de él. Un ejemplo de esto es el vino. Según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), la producción mundial de esta bebida en 2015 fue de 275.7 millones de hectolitros (excluyendo zumos y mostos), en ligera alza de un 2% con respecto a 2014 (OIV, 2015).

El vino es una bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de mostos de uva en contacto o no de sus orujos. En el caso del vino tinto, el jugo es fermentado junto con el hollejo y las semillas de la uva, para extraer los pigmentos y compuestos responsables del aroma y sabor del producto final (Panda, 2011). La fermentación se lleva a cabo en tanques que cuentan con sistemas de recirculación y agitación para extraer los compuestos importantes del hollejo (Cabello, 2012). Una vez que concluye la etapa de fermentación, se prensan los hollejos, semillas y pulpa para separarlos del mosto, y se obtiene un residuo conocido como orujo. Éste es el subproducto más importante de la industria vitivinícola y cuenta con una concentración de compuestos fenólicos considerable. Desde el punto de vista de su actividad biológica, muchos compuestos fenólicos tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. Existen también sustancias con actividad estrogénica, como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros, como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos (por ejemplo, antimicrobianos) o prevención de enfermedades neurodegenerativas (Barberán, 2003).

Actualmente, con el orujo de uva se puede obtener pectina, alimento para animales en forma de harina, así como aceite a partir de la pepita (Togores, 2003); sin embargo, se puede aprovechar este subproducto para obtener extractos con usos potenciales en la industria de los alimentos, por ejemplo, como antimicrobianos, antioxidantes naturales

(Pazos, 2005) o como parte de la formulación de un alimento funcional, adicionándolos en alimentos o bebidas.

Debido al crecimiento en ventas de bebidas como agua embotellada y bebidas deportivas en los últimos años, es importante diversificar el mercado ofreciendo alternativas más saludables o con múltiples beneficios. Para esto, se pueden adicionar compuestos bioactivos a bebidas diversas, como puede ser una bebida isotónica, definida por la Secretaría de Salud (2011) como “una bebida saborizada no alcohólica que es elaborada por la disolución de sales minerales, edulcorantes u otros ingredientes con el fin de reponer el agua, energía y electrolitos perdidos por el cuerpo humano durante el ejercicio” (SS, NOM-218-SSA1, 2011).

En este proyecto se realizará una propuesta tecnológica para el aprovechamiento de los polifenoles provenientes del orujo de uva roja, a partir de la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos por diferentes métodos, así como la identificación de los polifenoles por el método de electroforesis capilar, para realizar una propuesta de aplicación en una bebida hidratante.

1 ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre la vid

1.1.1 Taxonomía, morfología y compuestos principales

La vid es una planta perteneciente a la familia *Vitaceae*, género *Vitis* y especie *vinífera L.* (Wilson, 2004), conformada principalmente por el tronco, las hojas, flores y frutos. Otras partes secundarias son los zarcillos, los sarmientos y los raspones. La floración y crecimiento ocurren entre los meses de abril y mayo, con una duración de 15-20 días, y posteriormente ocurre el cuajado del fruto, que varía entre 7-12 días.

Los frutos de la uva crecen agrupados en forma de racimo (Figura 1), sujetos al raspón por medio de un pequeño fragmento conocido como pedicelo, que soporta las bayas.

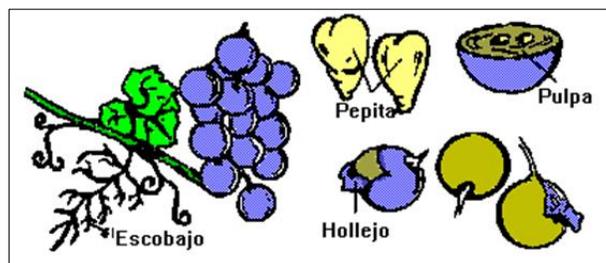


Figura 1. Partes que conforman la uva
Fuente: Togoeres (2003)

El grano de uva presenta una estructura formada por una película exterior u hollejo, una masa que rellena interiormente la baya (pulpa) y en el centro, un número variable de semillas o pepitas (Figura 2).

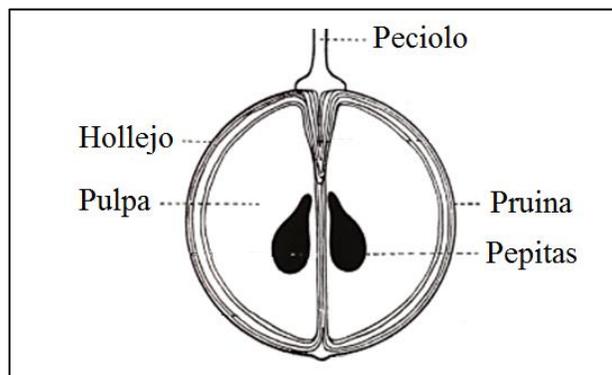


Figura 2. Corte esquemático de un grano de uva
Fuente: Togoeres (2003)

La uva está compuesta por dos paredes celulares: Paredes primarias (pulpa y hollejo), principalmente compuestas de celulosa, pectinas, hemicelulosa, xiloglucanos y arabinosilanos, y paredes secundarias, formadas a partir de las primarias por acumulación de xilanos, celulosa y sobre todo lignina. El hollejo es la parte exterior del grano de uva, que encierra los tejidos vegetales que contienen las sustancias de reserva, protege las semillas y defiende a los tejidos de las agresiones externas. Representa una fracción variable del grano de uva, que puede ir desde el 8 hasta el 20%.

La zona más externa del hollejo se llama cutícula, y está cubierta de una capa de pruina, que le confiere al racimo un aspecto exterior mate, y posteriormente se presentan la epidermis y la hipodermis, donde se ubican la mayor parte de los polifenoles y sustancias aromáticas que contiene la uva. Los antocianos y taninos se sitúan en las vacuolas o en estructuras especializadas de las células del hollejo. La riqueza en polifenoles del hollejo es muy variable, dependiendo de la variedad de uva y de su grado de maduración, pudiendo contener valores del 12 al 61% de los polifenoles totales de la uva.

La distribución de los polifenoles en el hollejo y especialmente los taninos, se adopta como un mecanismo de defensa de la vid frente a posibles ataques de enfermedades. El nivel de estas sustancias en los granos de uva, depende del momento de desarrollo de los mismos, siendo más elevado antes de la fase de maduración. El hollejo está considerado como la fracción de la uva que contiene los elementos que realmente caracterizan a un vino, a pesar de que estos se encuentran en pequeñas cantidades (Togores, 2003).

Las pepitas representan respecto del peso de uva, hasta un máximo del 6%. En cuanto a su composición, las pepitas contienen agua (25-45%), materias glucídicas (34-36%), aceite (13-20%), taninos (4-6%), materias nitrogenadas (4-6.5%) y ácidos grasos (1%) (Togores, 2003).

Las semillas de uva tienen dos compuestos de interés, uno es el aceite compuesto especialmente de ácidos oleico (13-28%) y linoleico (70-75%) de excelentes propiedades dietéticas para el ser humano por su bajo contenido en colesterol. El otro son los taninos, conteniendo de un 22 a 56% de los polifenoles totales del grano de uva, de los que un 28 a 56% son leucoantocianos o procianidinas y el otro 67 a 86% son catequinas y además una fracción importante de pequeñas cantidades de ácido gálico, entre otros (Barberán, 2003).

La pulpa representa un 75 a 85% del peso del grano de uva, formada por un tejido parenquimatoso vegetal típico, del cual, las pectinas representan de un 25 a un 50% de su peso seco. Sus proteínas estructurales se deben mayoritariamente a la hidroxiprolina, conteniendo además de un 15 a 25% de hemicelulosa y de un 20 a 30% de celulosa. El agua es el compuesto mayoritario que contiene la pulpa, representando más de un 80% de ésta, seguida por los azúcares, con concentraciones variables medias entre 150 y 250 gramos por litro, en función de la zona (Figura 3), mayormente glucosa y fructosa (Togores, 2003).

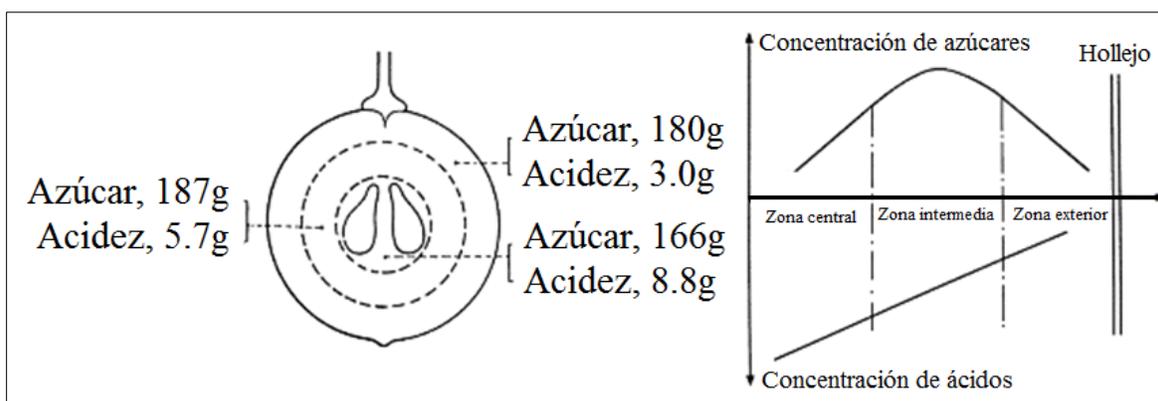


Figura 3. Zonas de la pulpa. Distribución de azúcares y ácidos
Fuente: Togores (2003)

Los ácidos orgánicos son compuestos importantes que están contenidos en la pulpa. En plena madurez del racimo se alcanza una acidez del orden de 3 a 7 gramos por litro expresada en ácido sulfúrico. Los ácidos más importantes son el tartárico, málico y en menor cantidad, el cítrico. Las materias minerales son las mismas que aparecen en otros órganos vegetales de la vid. El potasio es el catión más abundante, representando más del 50% de las cenizas. Le sigue en orden de importancia el calcio, magnesio, sodio, hierro y otros.

Los polifenoles que contiene la pulpa, son fundamentalmente del tipo no flavonoides, siendo los ácidos cinámicos los más abundantes. Los ácidos benzoicos también se encuentran en la pulpa, principalmente el ácido gálico. Los polifenoles de tipo flavonoide no suelen encontrarse en la pulpa. Finalmente, el raspón o escobajo es el elemento del racimo de uva que sirve de soporte de las bayas, así como también de alimentación mediante los vasos conductores situados en su interior. Representa del 3 al 7% del peso del racimo (Barberán, 2003).

1.1.2 Importancia económica

1.1.2.1 Producción mundial

Los países donde se produce uva en el mundo se encuentran entre las latitudes 50°N y 30°N sobre la línea ecuatorial y 30°N y 50°N por debajo de la línea ecuatorial. Elementos climáticos importantes para el crecimiento de esta planta son las temperaturas, las precipitaciones, la humedad de la zona y el viento (Club Planeta, 2014).

Según la FAO, los tres países con mayor producción de uva en el periodo 2013-2014 fueron China, Italia y Estados Unidos de América con el 15.1, 10.4 y 10% respectivamente de la producción mundial la cual está estimada en 77, 281,122 Toneladas (FAO, 2015). Los 10 primeros lugares juntos suman el 71.3% de la producción mundial, y se muestran en la Tabla 1. De la producción total de uva durante el 2014, 55% se destinó a la elaboración de vinos, 35% al consumo de uvas de mesa, 8% en uvas pasas y el resto para zumos u otros procesos intermedios (2%) (Vinetur, 2015).

Tabla 1. Principales productores de uva a nivel mundial durante el periodo 2013-2014

LUGAR	PAÍS	PRODUCCIÓN (TON)	%	LUGAR	PAÍS	PRODUCCIÓN (TON)	%
1	China	11,650,024	15.1	6	Turquía	4,011,409	5.2
2	Italia	8,010,364	10.4	7	Chile	3,297,981	4.3
3	Estados Unidos	7,744,997	10.0	8	Argentina	2,881,346	3.7
4	España	7,480,000	9.7	9	India	2,483,000	3.2
5	Francia	5,518,371	7.1	10	Irán	2,046,420	2.6

Fuente: FAO (2015)

La producción de vino para este mismo periodo (2013-2014) fue de 27, 421,931 toneladas, y los principales países productores fueron Francia, Italia y Estados Unidos con el 16, 15 y 12% (FAO, 2015). Los 10 primeros países productores de vino se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales productores de vino a nivel mundial durante el periodo 2013-2014

LUGAR	PAÍS	PRODUCCIÓN (TON)	%	LUGAR	PAÍS	PRODUCCIÓN (TON)	%
1	Francia	4,293,466	16	6	China	1,700,000	6
2	Italia	4,107,370	15	7	Argentina	1,498,400	5
3	Estados Unidos	3,217,000	12	8	Australia	1,231,000	4
4	España	3,200,000	12	9	Sudáfrica	1,097,200	4
5	Chile	1,832,000	7	10	Alemania	840,900	3

Fuente: FAO (2015)

1.1.2.2 Producción nacional

La importancia de la producción de uva en México se debe a su alto valor de producción. Es una actividad económica que genera gran cantidad de empleos, así como ganancias debido a la exportación tanto de uvas frescas como de productos derivados. Es importante destacar que aproximadamente el 50% de la producción mundial de uva roja se utiliza a la producción de vino tinto. Entre las variedades utilizadas con mayor frecuencia están: Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Grenache, Merlot, Nebbiolo, Sirah, Tempranillo, Pinot Noir, Zinfandel, entre otros (Mejía, 2015).

En México se producen vinos tintos de excelente calidad, y la demanda de este producto rebasa la oferta del país, por lo cual, se importan vinos de otros países.

1.1.3 Variedades de uva

La distinción entre las variedades de uva de mesa, de pasificación y de elaboración de vino se realiza a través de sus características morfológicas: el tamaño y forma de los racimos y bayas, el grosor del hollejo o el número de pepitas.

Existen variedades de uva destinadas específicamente a la pasificación, como la Sultanina, Corinto o Rosaki; y finalmente, se encuentran las uvas que son utilizadas en vinificación, debido a la presencia de compuestos fenólicos en concentraciones mayores a las uvas de mesa (Comerge, 2016).

Algunas de las variedades de uva para producción de vino tinto se muestran en la Tabla 3. En función de las variedades de uva utilizadas, así como del estado de madurez, se obtendrán vinos con distintas propiedades organolépticas.

Tabla 3. Variedades de uva utilizadas en la producción de vino tinto

VARIEDAD	CARACTERÍSTICAS	
CABERNET SAUVIGNON	Es la variedad tinta que ha tenido más éxito en todo el mundo. Esta cepa se desarrolló en Burdeos. Sus frutos son muy oscuros, pequeños y con una piel gruesa. Produce un vino austero, tánico y coloreado, con un aroma penetrante a violetas y bayas.	 CABERNET SAUVIGNON
CABERNET FRANC	Da lugar a vinos más suaves y afrutados que Cabernet Sauvignon. Se cultiva en Burdeos para la producción de vinos tintos, pero todavía es minoritaria en las mezclas con Cabernet Sauvignon y Merlot.	 CABERNET FRANC
TEMPRANILLO	Su tejido tánico le permite un envejecimiento más prolongado en bodega. Sus características generales se aprecian en un aroma y sabor afrutado, con unos taninos más suaves.	 TEMPRANILLO
MERLOT	De origen francés, posee un color oscuro azulado y una piel muy gruesa. Es aceptada por sus taninos menos secos que los de Cabernet Sauvignon y proporciona un sabor más dulce y afrutado.	 MERLOT
MALBEC	Originario del sudoeste de Francia, esta cepa encontró la tierra y el clima ideales para su desarrollo en Argentina, dando excelentes vinos de buen color y cuerpo, de notable intensidad y concentración.	 MALBEC
PINOT NOIR	Clásica de Borgoña y Champagne. Su fruto es pequeño, de piel oscura violácea y muy colorante. Sin embargo, el color en el vino se va perdiendo más deprisa que en el caso de otras cepas y se torna más anaranjado.	 PINOT NOIR
SYRAH	Es por excelencia la cepa del Ródano y Australia. Idónea para cultivar en zonas cálidas. Las uvas son ovoides y pequeñas con un sabor muy agradable. Sus vinos tienen un aroma característico a violeta y frutos negros muy maduros.	 SYRAH

Fuente: PlantVid (2015)

1.1.4 Productos a partir de la uva

Las uvas y productos derivados de las mismas contienen compuestos fenólicos, que son metabolitos secundarios de las plantas y que contribuyen en gran medida al sabor y color de las uvas, zumos de uva y vinos (Mazza & Girard, 1998).

1.1.4.1 Uva de mesa

La uva de mesa es el fruto comestible de la planta del género *Vitis vinifera L.* perteneciente a la familia de las ampelidáceas para su consumo fresco (SS, NOM-120-SCFI, 1996).

Las uvas de mesa es una fruta carnosa que nace de unos racimos largos, sueltos, formados por bayas redondas u ovaladas. Su piel es más rústica y persistente y puede presentar colores verdosos, amarillentos, púrpuras, rosados o negros. La pulpa es jugosa y dulce (Comerge, 2016).

Existen distintas variedades de uva de mesa, clasificadas en uvas finas y comunes. Las uvas de mesa comunes tienen menores costos de producción y precios ventajosos. Entre éstas, las principales variedades corresponden a la Niágara Blanca y la Niágara Rosada, cuyo destino es, casi exclusivamente, para la venta en el mercado interno. También tiene importancia, en algunos segmentos de consumidores, la uva común de mesa de variedad Isabel, mientras que en los cultivos de la uva fina, se destacan las variedades Italia y Rubí. La uva fina se puede clasificar también en función de si contiene o no semillas (BID, 2000).

1.1.4.2 Uva pasa

Las uvas pasas son el producto preparado con uvas secas sanas de variedades que se ajustan a las características de *Vitis vinífera L.*, elaboradas en una forma apropiada para obtener un producto comercializable, con o sin recubrimiento con ingredientes facultativos adecuados (CODEX, 1981).

1.1.4.3 Zumo

El zumo de uva (extraído por presión de uvas maduras) tiene una composición muy similar a la de las uvas excepto en cuanto al contenido de fibra bruta y aceites, los cuales se encuentran principalmente en la pepita. Las uvas maduras producen zumos de mejores características organolépticas y de mejor color que las uvas inmaduras (Mazza & Girard, 1998).

El zumo de la uva se extrae mediante prensado en caliente. Tras el desrasponado/estrujado de las uvas, el mosto se calienta a 60°C mediante un intercambiador de calor, y posteriormente se añade pectinasa para reducir la turbidez del producto. Se puede utilizar metabisulfito potásico para impedir el pardeamiento. El zumo se pasteuriza a 85°C y se almacena. Al final, el zumo se despectiniza, filtra y concentra (Mazza & Girard, 1998).

1.1.4.4 Vino

El vino es una bebida con contenido moderado de alcohol producida mediante la fermentación del zumo extraído de uvas frescas y maduras. Los vinos se pueden clasificar según los nombres de las variedades de uvas o con nombres genéricos correspondientes a las regiones de Europa donde se produjeron los primeros vinos de ese tipo (Mazza & Girard, 1998).

Los vinos tintos, que se producen mediante fermentación con maceración, contienen entre 2 y 3 veces más compuestos fenólicos que los vinos blancos. Los vinos blancos son

generalmente de sabor más delicado que los tintos, debido a la ausencia de antocianinas y el muy bajo contenido de taninos (Mazza & Girard, 1998).

La principal diferencia entre vinos tintos y blancos se encuentra en las operaciones previas a la fermentación (Figura 4): Mientras que el vino blanco se produce mediante la fermentación del mosto extraído de la uva mediante prensado, el vino tinto se produce mediante la fermentación del mosto mezclado con el hollejo de la uva, con el objeto de extraer los compuestos que aportan color al vino (Mazza & Girard, 1998).

Para aumentar la extracción de pigmentos rojos y de otros compuestos fenólicos y aromáticos que contribuyen al carácter de los vinos tintos, se puede aumentar la temperatura del mosto hasta 50-60°C antes de la fermentación, o hasta 30-40°C después de la fermentación alcohólica (Mazza & Girard, 1998).

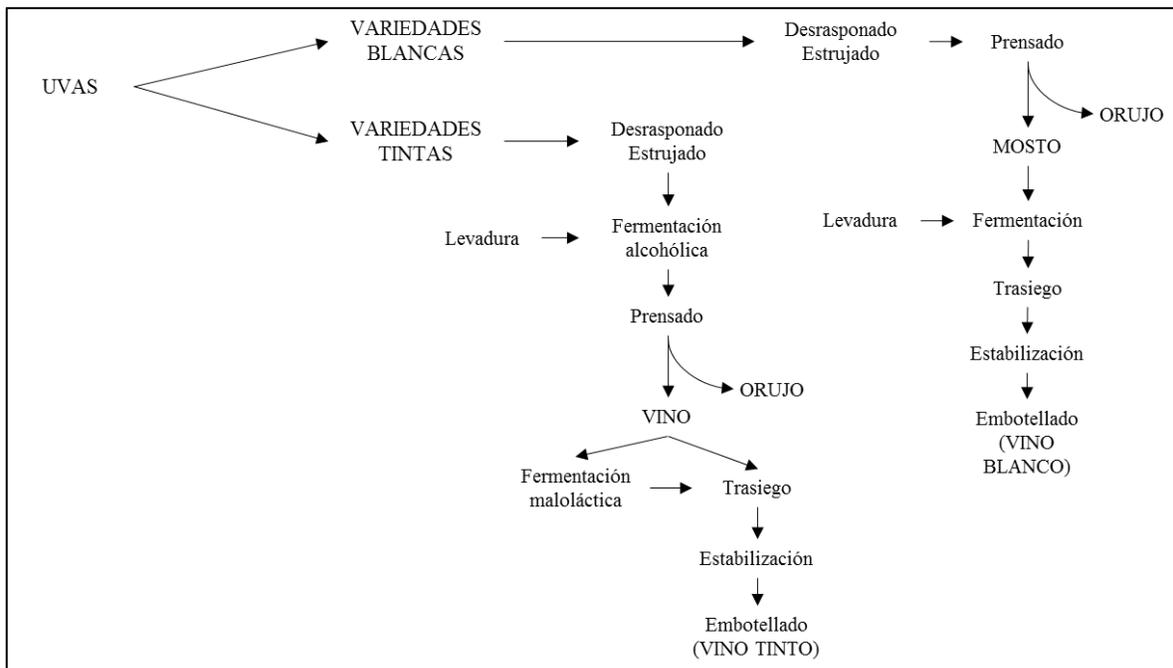


Figura 4. Diagrama de flujo de la producción de vinos tintos y blancos
Fuente: Mazza & Girard (1998)

1.1.5 Subproductos de la uva

A partir de la uva se han desarrollado una gran cantidad de productos, además de subproductos que han ayudado a disminuir el impacto ambiental de los desechos producidos por esta industria, todos estos a partir del subproducto principal: El orujo.

El orujo o bagazo de uva se compone de los hollejos, pepitas y raspones prensados, y puede representar hasta el 20% del peso de las uvas destinadas a vino o zumo (Mazza & Girard, 1998).

En el pasado, el orujo se eliminaba de diversas formas. En la actualidad, los viticultores lo han esparcido por los viñedos para mejorar el suelo, pero, a pesar de que a veces se paga a los viticultores para que se lleven el orujo de las bodegas, esta práctica es cada vez menos frecuente. En consecuencia, se transportan grandes cantidades a vertederos y cada vez se está haciendo más difícil encontrar terreno para ello y los vertederos se están haciendo más difíciles de mantener (Mazza & Girard, 1998).

A partir del orujo se pueden obtener diversos productos, siendo los más importantes el aceite de semilla de uva, taninos y antocianinas, como se observa en la Figura 5.

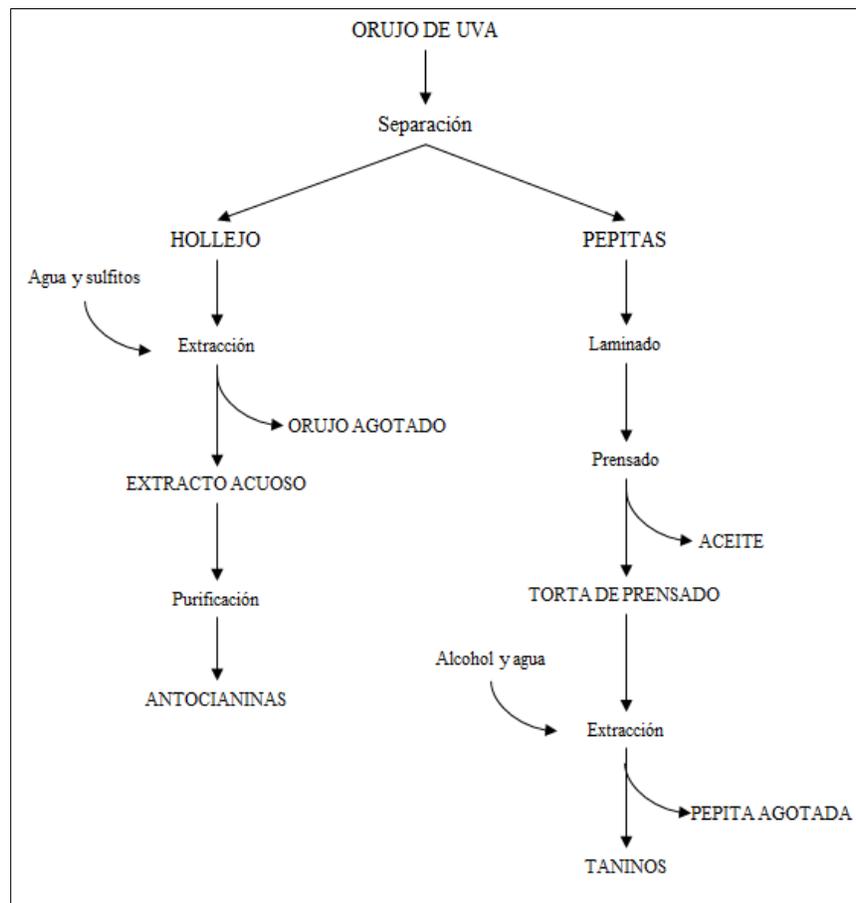


Figura 5. Diagrama de flujo de los subproductos obtenidos a partir del orujo de uva
Fuente: Mazza & Girard (1998)

El orujo puede ser utilizado como pienso para animales, una vez que ha sido prensado, despepitado, secado y triturado, en forma de harina, mezclada con otros alimentos o formando parte de un pienso compuesto. También las hojas y racimos pueden ser usados como pienso (Togores, 2003).

El aceite de pepita de uva es obtenido por el prensado o extracción de las pepitas de uva, que refinado se emplea para el consumo humano, especialmente en dietética por su elevado contenido en ácidos grasos no saturados y notable contenido en tocoferol (vitamina E). De uso también en la industria cosmética, especialmente en la preparación de cremas.

Las hojas rojas de otoño de variedades de uvas tintas, ricas en antocianos y otros flavonoides, se utilizan en farmacéutica para la elaboración de medicamentos contra problemas vasculares, mientras que los raspones, una vez desecados, pueden emplearse como combustible de bajo poder calorífico (Togores, 2003).

Muchos de los subproductos generados a partir del procesamiento de la uva presentan compuestos bioactivos como los polifenoles, que pueden ser utilizados para el desarrollo de alimentos funcionales y que contribuyen al aporte de nutrientes con beneficios en la salud (Alzate, 2011).

1.2 Antioxidantes

Diversos compuestos pueden ejercer un efecto antioxidante. Entre ellos se encuentran los antioxidantes fenólicos de origen natural, divididos en flavonoides y ácidos fenólicos, que se caracterizan por contener más de un grupo fenol en su estructura. Para aprovechar las ventajas de estos compuestos, se debe estudiar el fenómeno de la oxidación, que afecta tanto a sistemas biológicos dentro del cuerpo humano como a diversos alimentos. Conociendo los mecanismos que imperan sobre estas reacciones, se pueden encontrar alternativas para retrasar estos procesos y preservar el valor nutritivo de los alimentos (Quiñones, 2012).

1.2.1 Oxidación

La oxidación es una de las reacciones metabólicas que ocurren en el cuerpo humano y en los alimentos, y es esencial para la supervivencia de las células (Guo, 2009).

Sin embargo, detrás de muchas enfermedades crónicas, cuya aparición es retrasada y su gravedad disminuida por el consumo de alimentos de origen vegetal se encuentran procesos

de estrés oxidativo mediados por radicales libres, que conducen progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células. Este estrés se podría definir como un desequilibrio entre los pro-oxidantes y/o radicales libres por una parte y los sistemas antioxidantes del organismo por otra (Barberán, 2003).

1.2.2 Radicales libres

Los radicales libres son moléculas con electrones desapareados, los cuales son altamente reactivos. Estas moléculas participan en reacciones catalizadas por enzimas, transporte de electrones en la mitocondria, traducción de señales y expresión genética, así como activación de factores de transcripción nuclear (Guo, 2009).

Cuando se forma un exceso de radicales libres, éstos pueden alterar el funcionamiento de enzimas protectoras (superóxido-dismutasa, catalasa y peroxidasa) mediante la auto oxidación, que es una reacción de oxidación en cadena que degrada diversas moléculas orgánicas en organismos vivos, promovida por diversos agentes y mecanismos como altas tensiones de oxígeno, radiación y metabolismo xenobiótico (Guo, 2009). Esto propicia la formación de especies reactivas del oxígeno o ROS por sus siglas en inglés (Tabla 4).

Tabla 4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

ESPECIE	NOMBRE COMÚN
O_2	Oxígeno
$^{\circ}O_2^{-}$	Anión superóxido
$^{\circ}O_2^{-2}$	Peróxido
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HO°	Hidroxilo
$ROOH^{\circ}$	Hidroperoxilo
$^1O_2^{\circ}$	Radical oxígeno singlete
RO°	Radical alcoxi
ROO°	Radical peroxi

Fuente: Guo (2009)

La auto oxidación puede causar efectos letales en la célula (daño oxidativo, envejecimiento y enfermedades) a través de la oxidación de componentes como ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos de la membrana lipídica, colesterol libre, ADN y proteínas (incluyendo enzimas), deteniendo la respiración celular. Los lípidos son uno de los constituyentes mayoritarios de los sistemas biológicos, y pueden sufrir reacciones de oxidación que provocan su deterioro (Guo, 2009).

Los radicales libres provienen de diferentes fuentes, que pueden ser clasificadas de manera general en endógenas y exógenas, como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5. Fuentes endógenas y exógenas de radicales libres

FUENTES ENDÓGENAS	FUENTES EXÓGENAS
<ul style="list-style-type: none"> • RESPIRACIÓN AERÓBICA: LA MITOCONDRIA CONSUME OXÍGENO MOLECULAR, REDUCIÉNDOLO POR UNA SERIE DE PASOS PARA PRODUCIR AGUA. • PEROXISOMAS: SON ORGÁNULOS RESPONSABLES DE DEGRADAR LOS ÁCIDOS GRASOS EN OTRAS MOLÉCULAS, PRODUCIENDO H₂O₂ COMO PRODUCTO SECUNDARIO, QUE RESULTA EN SU LIBERACIÓN EN OTROS COMPARTIMIENTOS DE LA CÉLULA Y EN UN INCREMENTO DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL ADN. • ENZIMA CITOCROMO P-450: LA INDUCCIÓN DE ESTAS ENZIMAS PREVIENE EFECTOS TÓXICOS DE COMPUESTOS EXTERNOS, PERO TAMBIÉN RESULTA EN PRODUCTOS SECUNDARIOS OXIDANTES QUE DAÑAN EL ADN. • CÉLULAS FAGOCITOS: DESTRUYEN BACTERIAS O CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS MEDIANTE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS OXIDANTES. ESTO PROVOCA INFLAMACIÓN CRÓNICA, UN FACTOR DE RIESGO DE CÁNCER. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fumar: Los óxidos de nitrógeno en el cigarrillo causan oxidación de macromoléculas y disminuyen los niveles de antioxidantes. • Factores nutricionales: La dieta común incluye vegetales que contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos naturales, que pueden generar oxidantes a partir de ciclo redox. • Radiación/luz UV • Ejercicio vigoroso

Fuente: Guo (2009)

1.2.3 Mecanismos de oxidación

La oxidación puede ocurrir en todos los sistemas biológicos, ya sean alimentos o en el cuerpo humano. El mecanismo básico de oxidación de lípidos consta de tres fases, descritas en la Tabla 6. La iniciación ocurre cuando, en contacto con el oxígeno, un lípido insaturado da lugar a un radical libre.

Tabla 6. Etapas de la oxidación de lípidos y factores que intervienen

ETAPAS	REACCIONES	FACTORES DE CONTROL DE LA VELOCIDAD
Iniciación	$RH + H_2O \rightarrow R^\circ + OOH^\circ$ $RH \rightarrow R^\circ + H^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> • Radiaciones: Luz ultravioleta, radiaciones ionizantes • Calor • Pigmentos: Clorofila, citocromo C, mioglobina, hemoglobina • Enzimas: Lipasas, lipooxigenasas • Metales de transición: Trazas de cobre y de hierro • Actividad de agua
Propagación	$R^\circ + O_2 \rightarrow RO_2^\circ$ $RO_2^\circ + RH \rightarrow RO_2H + R^\circ$	<ul style="list-style-type: none"> • Insaturación de los lípidos • Concentración de oxígeno
Finalización	$R^\circ + R^\circ \rightarrow R - R$ $RO_2^\circ + R^\circ \rightarrow RO_2R$	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración de antioxidantes

Fuente: Martel & Pascal (2000)

Las reacciones de iniciación se llevan a cabo por la remoción de un radical hidrógeno del grupo metilén alílico de un ácido graso insaturado o por la adición de un radical al doble enlace. También puede formarse hidroperóxido, producto inicial de la oxidación, que se descompone para formar compuestos responsables de sabores y aromas anormales, como el hexanal, pentanal y malonaldehído.

En la propagación, los radicales libres se convierten en otros radicales, procediendo como reacciones en cadena, esto es, un radical da lugar a otro y así sucesivamente. La formación inicial de un radical es la responsable de las transformaciones subsecuentes de innumerables moléculas debido a la cadena de eventos.

La última fase es la terminación, que ocurre cuando hay una reducción en la cantidad de lípidos insaturados (o ácidos grasos) presentes, y como resultado, los radicales forman enlaces entre ellos, y posteriormente, compuestos estables no radicales. Así pues, la reacción de terminación interrumpe las reacciones en cadena y, por lo tanto, detiene la propagación de estas reacciones de oxidación (Guo, 2009).

En lípidos de membranas biológicas, el mecanismo básico de oxidación es un proceso normal por medio del cual se obtiene energía. Cuando la oxidación de estos compuestos es dañina, se conoce como peroxidación. La oxidación descontrolada de lípidos en las membranas biológicas es la responsable de una gran cantidad de enfermedades.

Los hidroperóxidos de ácidos grasos son los productos primarios de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Los niveles elevados de estos compuestos observados durante instancias de daño celular han sido correlacionados con la degradación de membranas biológicas, inactivación de enzimas y daño a proteínas y ADN.

La iniciación y propagación de la peroxidación lipídica es catalizada por el Hierro y NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal. Esta enzima es responsable de la formación del anión superóxido, formado por la adición de un electrón en la molécula de oxígeno diatómico, que cataliza la reducción de los iones Fe (Guo, 2009).

1.2.4 Normatividad

Los productos alimenticios y en especial, los alimentos funcionales, pueden estar expuestos a la manipulación de sus efectos benéficos declarados en la etiqueta, así como falsas

aseveraciones sin sustento científico, por lo cual, es necesaria la creación de normas y leyes que regulen y estos comportamientos por parte de las empresas.

En el caso de antioxidantes, ha habido problemas debido a que, actualmente, la FDA permite declaraciones tales como “buena fuente de antioxidantes” en productos que contienen una cantidad significativa de nutrientes con propiedades antioxidantes bien establecidas (Vitamina C y E) para las cuales la Ingesta Dietética de Referencia (IDR o DRI por sus siglas en inglés “Dietary Reference Intake”) ha sido establecida (Para ser “buena fuente de antioxidantes, un producto debe contener por lo menos 10% de DRI del antioxidante en cuestión) (Watson, 2014).

La situación es que no todos los antioxidantes que contienen los alimentos tienen una IDR establecida, y, por lo tanto, no se pueden seguir los criterios legales establecidos para hacer la declaración de nutrientes antioxidantes en la etiqueta (Watson, 2014). Productos como bebidas a base de café, así como té (Jorstad, 2015), han tenido problemas con la declaración de antioxidantes.

1.2.5 Compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes cumplen varias funciones, entre las cuales, la más importante en la industria de los alimentos es el retraso de la oxidación de compuestos lipídicos contenidos en diferentes productos. Gracias a la adición de antioxidantes, se puede prevenir la aparición de sabores extraños y rancidez (fenómenos relacionados con la peroxidación de los lípidos), así como mantener el valor nutricional de los alimentos.

Es así que los antioxidantes se definen como sustancias que al estar presentes en los alimentos en bajas concentraciones comparadas con las de una sustancia susceptible de oxidación, disminuye notoriamente o previene la oxidación de dicha sustancia.

En sistemas biológicos, el daño oxidativo al ADN y proteínas es de gran importancia en las células de todo el cuerpo y puede ser un gran riesgo que propicia el desarrollo de cáncer, así como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, por lo cual se esperaría que los antioxidantes capaces de disminuir este daño *in vivo* tuviesen efectos anticancerígenos. A pesar de esto, un antioxidante puede ser capaz de proteger un sistema alimenticio o biológico, pero puede no funcionar en otro (Guo, 2009).

Los compuestos antioxidantes pueden clasificarse de acuerdo a su función en primarios, secundarios y terciarios (Tabla 7), y en función a su origen en antioxidantes naturales y sintéticos.

Tabla 7. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción

NOMBRE	MECANISMO
PRIMARIO O RUPTURA DE CADENA	Estos antioxidantes pueden neutralizar los radicales libres al donar uno de sus propios electrones, deteniendo la reacción en cadena. Los antioxidantes resultantes que se conviertan en radicales libres son relativamente seguros, estables en circunstancias normales insuficientemente reactivos para iniciar algún efecto tóxico.
SECUNDARIOS O PREVENTIVOS	Actúan a través de diferentes mecanismos como: Secuestradores de iones metálicos de transición que no deben participar como catalizadores en las reacciones. Remoción de peróxidos por catalasas y glutatión peroxidasa, que pueden reaccionar con iones metálicos de transición y producir radicales libres. Remoción de radicales libres. Se clasifican a su vez en quelantes y secuestradores de oxígeno, “oxygen scavengers”.
TERCIARIOS	Remueven biomoléculas dañadas antes de que éstas se acumulen y de que su presencia resulte en viabilidad y metabolismo alterado de las células.

Fuente: Guo (2009)

Numerosas moléculas naturales o de síntesis están dotadas de propiedades antioxidantes; sin embargo, para su utilización en alimentación, la elección se basa en los productos que presentan al máximo posible, ausencia de toxicidad, sabor, olor y color, además de eficacia a baja concentración, fácil adición, resistencia a tratamientos térmicos y precio bajo (Martel & Pascal, 2000).

Entre los antioxidantes obtenidos por síntesis que se utilizan en la actualidad se encuentra el 3, 5, di-terbutil-4-hidroxitolueno o BHT, la mezcla de 2-terbutil-p-hidroxianisol y 3-terbutil-p-hidroxianisol o BHA, galatos de propilo, de octilo y de dodecilo, y el 2-terbutilhidroquinona o TBHQ. El uso de estas moléculas obtenidas por síntesis es, sin embargo, regulado por las autoridades sanitarias del país en cuestión. Las estructuras químicas de estos antioxidantes están representadas en la Figura 6.

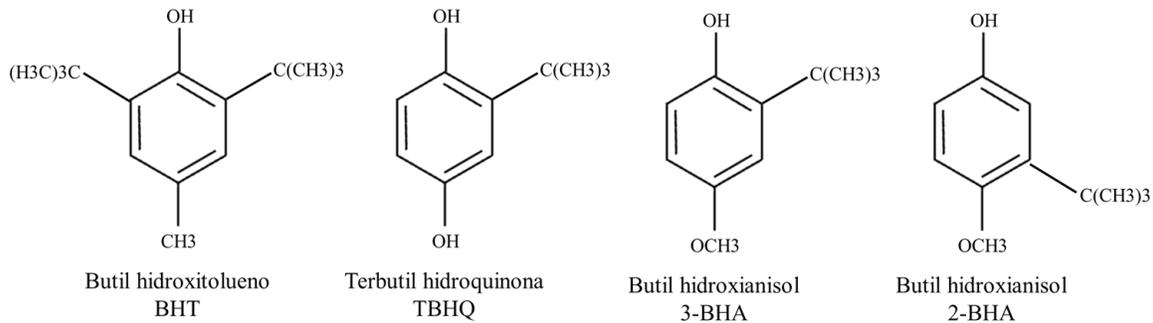


Figura 6. Estructuras químicas del BHT, 3-BHA y 2-BHA y TBHQ
Fuente: Berdahl (2010)

Además de los antioxidantes sintéticos, existen otros compuestos que han tenido un desarrollo en el ámbito alimentario, estos son los antioxidantes de origen natural.

Los antioxidantes naturales, presentes en las plantas, presentan varias ventajas, entre las cuales se encuentran la protección de componentes de los alimentos contra daño oxidativo, su absorción en el cuerpo humano que puede ofrecer efectos benéficos y finalmente, su uso en tratamientos terapéuticos (Guo, 2009).

El ácido ascórbico (Figura 7), los ascorbatos de sodio o de calcio y el ácido-palmitoil-6-L-ascórbico son considerados a menudo como sinérgicos, aunque ellos mismos tienen propiedades antioxidantes, son de origen natural y se utilizan también en alimentos (Martel & Pascal, 2000).

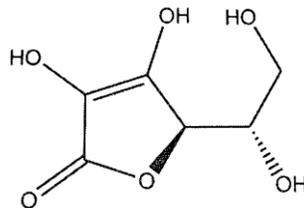


Figura 7. Estructura del L-ácido ascórbico
Fuente: Berdahl (2010)

Otro grupo importante es el de los tocoferoles, una familia formada por 4 compuestos importantes: α -tocoferol (Vitamina E), β -tocoferol, δ -tocoferol y γ -tocoferol (Figura 8) (Berdahl, 2010).

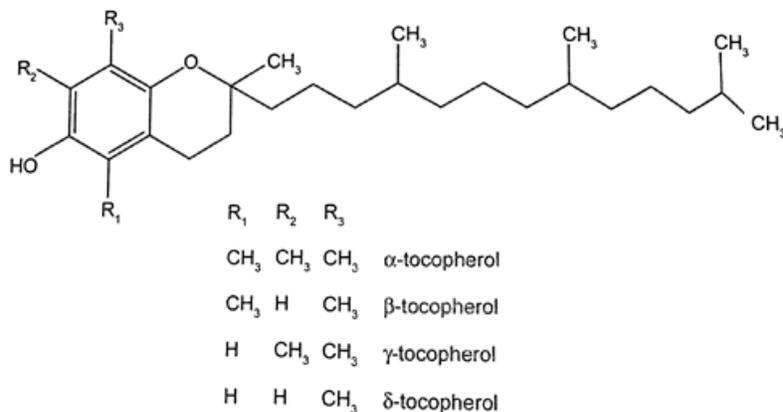


Figura 8. Estructura de los tocoferoles
Fuente: Berdahl (2010)

Además, existen los antioxidantes fenólicos de origen natural, que se presentan en varias formas, como ácidos fenólicos (ácido rosmarínico y carnósico), ácidos hidroxibenzoicos (ácido vanílico), ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico y clorogénico), flavonoides (quercetina, catequina y rutina), antocianinas (delfinidina), taninos (prociandinas, ácido elágico y ácido tánico), estilbenos (resveratrol), coumarinas (o-coumarina) y aceites esenciales (carvacol, eugenol). Muchos de ellos contienen más de un grupo fenol en su estructura (Berdahl, 2010).

Otros compuestos que presentan propiedades antioxidantes y su origen es natural son los carotenoides y el ácido cítrico, además de los fosfolípidos, y algunas proteínas y péptidos.

1.3 Compuestos fenólicos

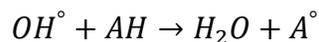
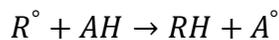
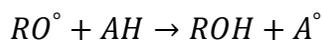
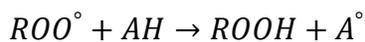
1.3.1 Características de los polifenoles

Las frutas no sólo proporcionan nutrientes necesarios para la vida, sino también compuestos bioactivos que promueven estados saludables y prevención de enfermedades. Entre estos compuestos se encuentran los polifenoles, sustancias que desempeñan un papel importante, tanto en las plantas como en los alimentos. Estos compuestos han sido objeto de numerosos estudios debido a su capacidad antioxidante y su efecto benéfico en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, como cardiovasculares y cáncer (García, 2009).

En la industria de alimentos, la presencia de polifenoles puede limitar el deterioro por reacciones de oxidación, y, por tanto, extender su vida comercial. Esto también tiene un

impacto en la salud del consumidor ya que es conocido el papel de los radicales libres en la génesis de numerosas enfermedades (García, 2009).

Los antioxidantes fenólicos (AH) bloquean la propagación de la reacción en cadena por su capacidad de reaccionar con diferentes tipos de radicales (Martel & Pascal, 2000):



El radical antioxidante formado (A°), estabilizado por resonancia, confiere al antioxidante fenólico su eficacia (Figura 9).

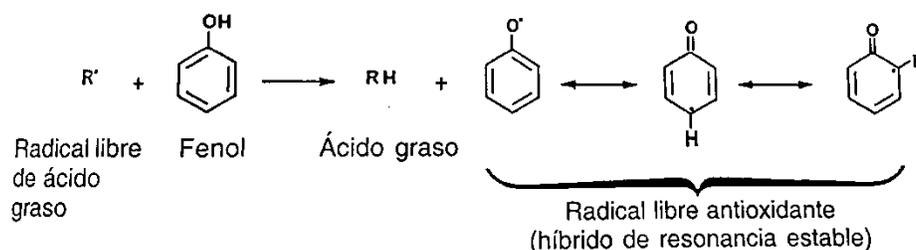


Figura 9. Mecanismo de acción de un antioxidante fenólico
Fuente: Martel & Pascal (2000)

Estos fotoquímicos son compuestos con uno o más anillos aromáticos y con una cantidad variable de grupos hidroxilos que, por lo general, se clasifican de acuerdo al número de carbonos y grupos funcionales que los constituyen, como se muestra en la Figura 10.

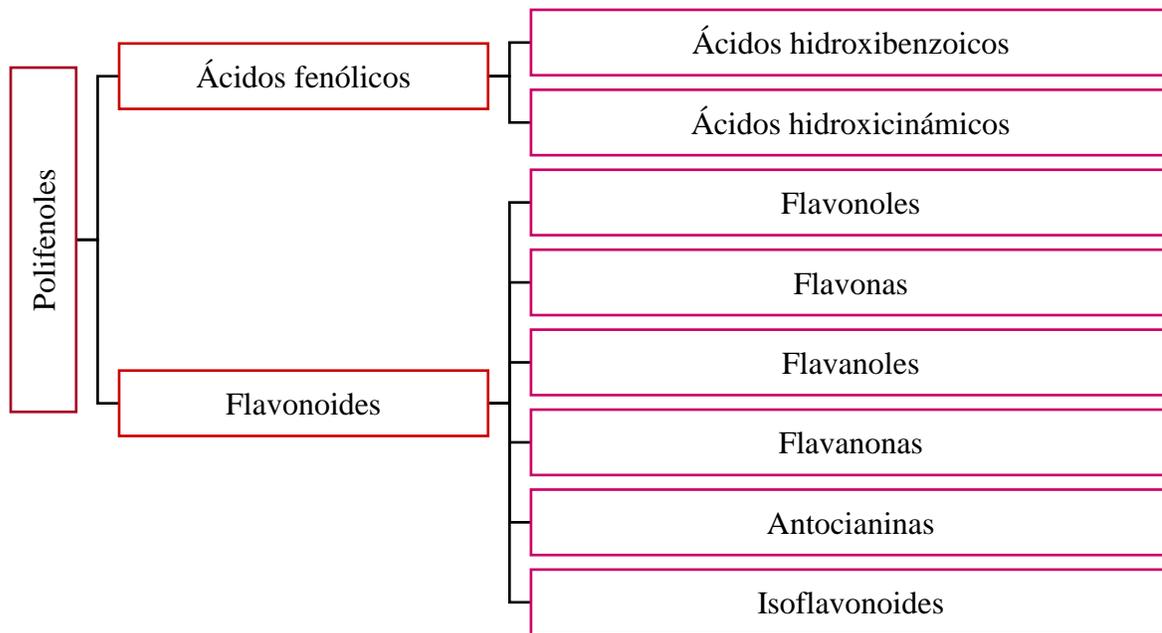


Figura 10. Clasificación de compuestos polifenólicos de la dieta
Fuente: García (2009)

De forma general, los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y flavonoides (García, 2009). Los flavonoides tienen dos anillos aromáticos (A y B), como estructura genérica, unidos por tres carbonos, generalmente formando parte de un anillo oxigenado heterocíclico, o anillo C. Por las diferencias en la estructura general del anillo C se clasifican en flavonoles, flavonas, flavanoles y antocianinas, como se muestra en la Figura 11 (Liu & Felice, 2007).

Los flavonoides se encuentran de forma natural en las frutas y vegetales (Wach & Pyrzyńska, 2005), normalmente como conjugados en formas glicosiladas o bien esterificadas, pero también pueden aparecer en su forma libre (agliconas), especialmente como resultado del procesamiento de las frutas. Se pueden encontrar muchas formas glicosiladas en la naturaleza ya que se han descubierto más de 80 azúcares unidos a los flavonoides (Hollman, 2000).

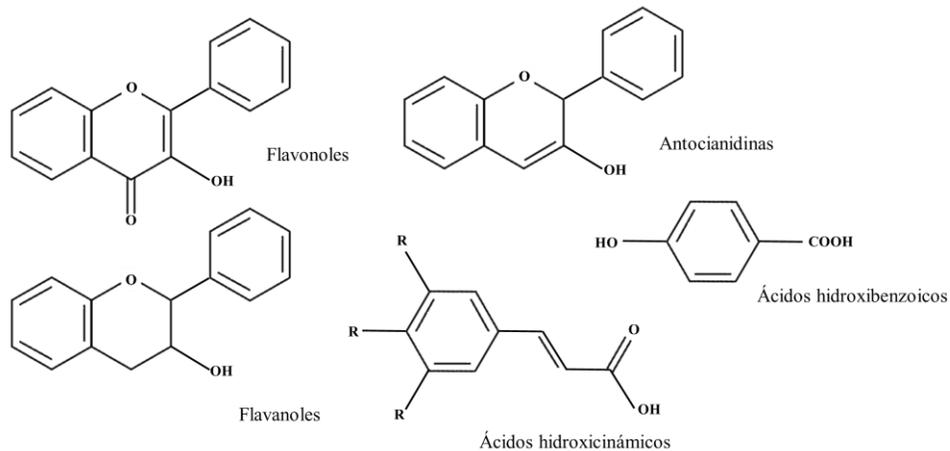


Figura 11. Estructura básica de los principales compuestos polifenoles
Fuente: García (2009)

Las antocianinas, los glucósidos o formas unidas a azúcares de las antocianidinas, son los pigmentos responsables de los colores azulados, rojos y púrpura en frutas. En su forma aglicona (antocianidina) se caracterizan por poseer dos dobles enlaces en el anillo heterocíclico, dando lugar a compuestos conocidos como taninos que a su vez se clasifican en taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos) (Seeram & Heber, 2007). Las posiciones más importantes de hidroxilación son 3, 5 y 7 en el anillo A, y 3 y 5 en el B.

Dentro de las antocianidinas más frecuentes en las frutas se encuentran la cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina, todas ellas hidroxiladas en las posiciones 3, 5 y 7. Por lo general, las antocianidinas aparecen unidas a un mono, di o trisacárido en posición 3, o unidas a dos monosacáridos en posiciones 3 y 5, o bien 3 y 7. Los carbohidratos que se encuentran unidos en las posiciones 3, 5, 7 son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa (García, 2009).

Los flavanoles son flavonoides estructuralmente similares a las antocianidinas, poseen un hidroxilo en posición 3, pero ningún doble enlace en el anillo heterocíclico. También se les puede encontrar formando parte de las proantocianidinas o taninos condensados. Existen cuatro flavanoles de importancia en las frutas: dos ortodifenoles hidroxilados en las posiciones 3 y 4 del anillo B (+catequina y -epicatequina) y dos trihidroxilados en las posiciones 3, 4 y 5 (+galocatequina y -epigalocatequina). En las frutas, al contrario de otras clases de flavonoides, los flavanoles monoméricos se encuentran, por lo general, más en forma libre que en forma glicosilada o esterificada (Murkovic, 2003).

Las flavonas y los flavonoles son flavonoides caracterizados por poseer un grupo cetónico en posición 4 y un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo heterocíclico. La diferencia entre estos flavonoides es que los flavonoles poseen un grupo hidroxilo en posición 3, lo cual parece tener importantes consecuencias en la biogénesis, y en los papeles fisiológicos y farmacológicos que desempeñan (García, 2009).

Las flavonas están ampliamente distribuidas entre las plantas superiores tanto en forma aglicona como glicosiladas. Los flavonoles son los flavonoides más distribuidos entre las frutas y vegetales, y la quercetina es uno de los más comunes. La concentración media de quercetina en frutas varía en un rango de 15 a 70 mg/kg (Manach & Scalbert, 2004).

Los ácidos hidroxibenzoicos pueden aparecer en forma libre en las frutas, pero normalmente se encuentran formando parte estructural de otros polifenoles. Estos ácidos presentan una estructura general derivada del ácido benzoico. Las variaciones de la estructura están basadas en la hidroxilación y metilación del anillo aromático. Los principales son: ácido p-hidroxibenzoico, vainílico, siríngico y gálico. Los ácidos hidroxibenzoicos están presentes, por lo general, en forma ligada, y son componentes de estructuras complejas, como las ligninas y los taninos hidrolizables.

Los ácidos hidroxicinámicos desempeñan un papel importante debido a su abundancia y diversidad. Existen cuatro estructuras derivadas del ácido cinámico: Ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Sin embargo, las formas libres de estos ácidos son muy raras, por lo que se encuentran normalmente formando derivados glicosilados o esterificados a los ácidos fenólicos: quínico, shikímico y tartárico. Dentro de los derivados esterificados, el ácido clorogénico, que ha sido identificado en numerosas frutas, es el éster de los ácidos cafeico y quínico. Dentro de los ácidos hidroxicinámicos, el ácido cafeico (y sus derivados esterificados) es el que predomina en muchas frutas con más de 75% del total de ácidos hidroxicinámicos encontrados. Sin embargo, el ácido p-cumárico es el predominante en los cítricos. El procesamiento de las frutas contribuye a la formación de ácidos hidroxicinámicos en forma libre (García, 2009).

1.3.2 Mecanismo de acción y efectos benéficos

La inducción del daño oxidativo mediada por radicales libres es la teoría más aceptada como factor de desarrollo de diferentes enfermedades crónico-degenerativas. La protección

frente al daño inducido por estos ROS puede lograrse mediante diferentes vías (Murkovic, 2003):

- a) Eliminar la formación de radicales libres mediante antioxidantes
- b) Neutralizar los radicales libres por medio de antioxidantes para evitar las reacciones en cadena y disminuir su propagación
- c) Mecanismo de reparación
- d) Secuestro de metales de transición

La capacidad antioxidante de los polifenoles se debe a su capacidad de donar hidrógenos y aceptar electrones de los radicales libres, debido a la presencia de los grupos aromáticos y oxígenos en su estructura. Debido a la reordenación de los electrones el radical resultante no tiene suficiente energía como para generar más reacciones (Murkovic, 2003).

En el hombre y otros organismos, las células están expuestas de forma continua a diferentes agentes oxidantes, algunos de los cuales son necesarios para la vida. Estos agentes pueden venir del ambiente, alimentos, o bien, del metabolismo normal dentro de la célula. El factor clave es mantener un equilibrio entre los oxidantes y antioxidantes para conservar las condiciones fisiológicas óptimas en el cuerpo. La sobreproducción de agentes oxidantes puede causar un desajuste que conlleva a estrés oxidativo. Una forma de prevenir o disminuir el estrés oxidativo inducido por los radicales libres es consumir suficientes cantidades de antioxidantes provenientes de la dieta. Las frutas contienen una amplia variedad de antioxidantes (fitoquímicos) que pueden ayudar a proteger los sistemas celulares del daño oxidativo, y así disminuir el riesgo de enfermedades crónicas (Liu & Felice, 2007).

En el caso de la uva, las semillas, así como el hollejo y el raspón son una fuente rica de flavonoides, tales como: proantocianidinas, flavonoles y flavan-3-oles. Las proantocianidinas son los compuestos principales, siendo las procianidinas predominantes en las semillas y prodelfinidinas en la piel y raspones. Aproximadamente el 55% de las procianidinas contenidas en las semillas de uva son del tipo polimérico. Estos compuestos pueden estar en concentraciones de 1.68 a 3.19 g/kg de uva. Otros compuestos fenólicos detectados en uvas enteras, piel y raspones incluyen ácidos fenólicos y flavonoles (García, 2009).

Debido a los posibles beneficios de los polifenoles en la salud, muchas industrias farmacéuticas y de suplementos han elaborado productos para enriquecer la dieta con estos fitoquímicos. Sin embargo, los compuestos puros de forma aislada pierden bioactividad o no se comportan de la misma forma que en el alimento completo. Existen numerosos estudios que demuestran la relación inversa del riesgo de cáncer con el consumo de alimentos ricos en fitoquímicos antioxidantes (García, 2009).

Se ha demostrado que la combinación de extractos de diversas frutas presenta un efecto sinérgico en cuanto a su actividad antioxidante, lo cual se debe a la mezcla compleja de los diferentes fitoquímicos presentes en las frutas completas que son responsables de la acción antitumoral. Es por esto que un antioxidante aislado y purificado no puede reemplazar la combinación natural de los más de 8000 fitoquímicos presentes en frutas, con diferencias en tamaño, polaridad, biodisponibilidad, entre otros factores. Además, el consumo de suplementos de fitoquímicos purificados puede ocasionar concentraciones tóxicas en plasma (Liu & Felice, 2007).

Es necesario recordar también que aún no existe una dosis diaria de fitoquímicos y que no es aconsejable tomarlos en grandes cantidades antes de tener una evidencia científica que demuestre su inocuidad. Altas dosis de estos compuestos pueden provocar que el fitoquímico actúe como un prooxidante (García, 2009).

1.3.3 Métodos de extracción

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales es una operación común en la industria de alimentos, llevada a cabo mediante procedimientos tales como: la extracción con disolventes, la destilación a vapor, con alta presión hidrostática elevada y a contracorriente, maceración y ultrasonido, principalmente. Dependiendo del método utilizado, pueden emplearse cantidades variables tanto de disolvente como de energía, obteniéndose diferentes rendimientos (Rodríguez-Riera, 2014).

Las distintas metodologías propuestas para llevar a cabo la extracción de polifenoles difieren en cuanto a variables de operación tales como: la temperatura, el tipo de disolvente, el tiempo de extracción y la relación soluto-disolvente. La combinación más apropiada de estos parámetros es fundamental para lograr los mejores resultados en cuanto al contenido de polifenoles, flavonoides y otras sustancias antioxidantes (Cruz, 2012).

Los métodos para la separación de componentes valiosos toman ventaja de la variación de la solubilidad de las fracciones en función del solvente y de la temperatura, por lo cual, ésta última debe controlarse durante todo el proceso. Además, algunos de los componentes importantes pueden presentar propiedades termo-sensibles (Fernaroli, 1975).

1.3.3.1 Extracción por maceración

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Fernaroli, 1975):

- **Maceración en frío:** Se sumerge por tiempos largos el producto a macerar, dependiendo de la materia prima. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura, sin embargo se necesitan periodos mucho más extensos para lograr una extracción adecuada.
- **Maceración con calor:** El proceso consiste en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente, con la aplicación de temperaturas que van desde los 30 °C hasta los 70 °C. Al utilizar calor se acelera el proceso. La desventaja de la maceración a altas temperaturas es el daño producido a los compuestos al final del proceso, que la mayoría de las veces, éstos son termolábiles. Aunado a esto, se requieren equipos sofisticados para el control de la temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica. No obstante, los períodos de tiempo de extracción se reducen favorablemente.

1.3.3.2 Extracción por sonicación

En años recientes, se han desarrollado tecnologías limpias de extracción de gran eficiencia de componentes biológicamente activos provenientes de fuentes naturales, sin que ocurra pérdida de la actividad biológica, con buen rendimiento y una elevada pureza. La extracción asistida por ultrasonido tiene requerimientos instrumentales bajos y su

aplicación resulta oportuna cuando la estabilidad del componente activo a extraer se afecta con las temperaturas elevadas de los procesos convencionales.

El ultrasonido se basa en el fenómeno de cavitación dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de la burbuja es del orden de los microsegundos, su implosión violenta genera, de manera localizada y transitoria, temperaturas elevadas en el interior de la burbuja, presiones y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilos, hidroxiperoxilo y el peróxido de hidrógeno.

La extracción asistida por ultrasonido utiliza ondas de una frecuencia determinada que facilitan la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas del medio vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. La intensificación en la eficacia de la extracción de productos naturales ha sido atribuida a la propagación de la onda de presión ultrasónica a través del disolvente, lo que genera la cavitación, así como efectos térmicos y mecánicos (Rodríguez-Riera, 2014).

1.3.4 Variables de extracción

La velocidad y eficiencia de la extracción son afectadas por diversos factores, principalmente por aquellos que tienen relación directa con la solubilidad de los componentes que se desean extraer. Otros factores importantes son la temperatura, la concentración del soluto y solvente, tamaño de las partículas, porosidad y agitación (Tabla 8). El estudio de dichas variables es importante para determinar un proceso óptimo de extracción (Cruz, 2012).

Tabla 8. Principales variables del proceso de extracción

VARIABLE	EFECTO
Disolvente	Un incremento en el contenido de polifenoles es reportado para el caso de extractos alcohólicos.
Temperatura	La temperatura máxima para cada sistema está limitada por el punto de ebullición del solvente, el punto de degradación del producto y la solubilidad de impurezas.
Concentración del soluto y solvente	La concentración del solvente es importante para soluciones acuosas, debido a la saturación y a la existencia de reacciones químicas.
Tamaño de partícula y porosidad	La reducción de partículas aumenta el área de contacto y disminuye el tiempo de extracción.
Agitación	La agitación otorga mayor eficiencia en la extracción, ya que disminuye la resistencia a la difusión.

Fuente: Cruz (2012)

1.3.5 Identificación de polifenoles

Debido a que los polifenoles son compuestos polares que pueden ionizarse a alto pH (por poseer varios grupos hidroxilo), la electroforesis capilar es una técnica ideal para la separación de éstos compuestos en muestras complejas. Como se puede ver en la Tabla 9, existen innumerables reportes en la literatura donde se ha utilizado esta técnica para la identificación de los polifenoles.

Tabla 9. Compuestos encontrados en hollejo, semilla y orujo de uva roja mediante electroforesis capilar

AUTOR	MATERIAL	POLIFENOLES ENCONTRADOS
(Kammerer, 2004)	Hollejo	Antocianinas, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, y flavonol-glucósidos
(Kammerer, 2004)	Semilla	Catequina (189 mg/100 g), 49.8% del contenido total de polifenoles Epicatequina (98.6 mg/ 100 g), 26.0% Epicatequingalato (35.5 mg/100 g), 9.3% Procianidina B1 (22.1 mg/100 g), 5.8% Procianidina B2 (19.3 mg/100 g), 5.1%
(Thorsten, 2009)	Aceite de semilla	Flavonoides como catequina, epicatequina, epicatequingalato y procianidinas B1 y B2 (188.7 a 1165 mg/kg materia seca) Ácidos fenólicos (5.34 a 18.78 g/kg materia seca) como ácido gálico
(Mildner, 2010)	Orujo de uva	Procianidina B2 y catequina, conformando un 76.98% de los fenoles totales para la mezcla agua etanol 70% Ácido gálico Ácido coumárico

Debido a esto, y a que la electroforesis capilar es una técnica barata, rápida y de bajo costo por análisis, se decidió utilizarla para la identificación de los polifenoles del orujo de uva razón de estudio de esta tesis.

1.3.6 Fundamento de la electroforesis capilar

Esta técnica se basa en la migración de las especies cargadas de una muestra en disolución, bajo el efecto de un campo eléctrico (Rouessac, 2003).

Durante la separación, el capilar de sílice es recorrido por un electrolito (un medio tamponado) y debido a las cargas negativas de los grupos silanol, se crea un flujo de disolvente conocido como flujo electroosmótico, el cual se incrementa con el pH del medio, ya que a alto pH hay un aumento de cargas negativas de los grupos silanol de la pared del capilar. Esta técnica es conocida como electroforesis capilar de zona (Rouessac, 2003).

El equipo básico para electroforesis capilar, como se muestra en la Figura 12, consiste en una fuente de corriente directa de alto voltaje para aplicar el campo eléctrico, compartimientos anódico y catódico que contengan depósitos de la disolución tampón, un vial de muestra en el que se introduce ésta, un detector y un tubo capilar (Harvey, 2002).

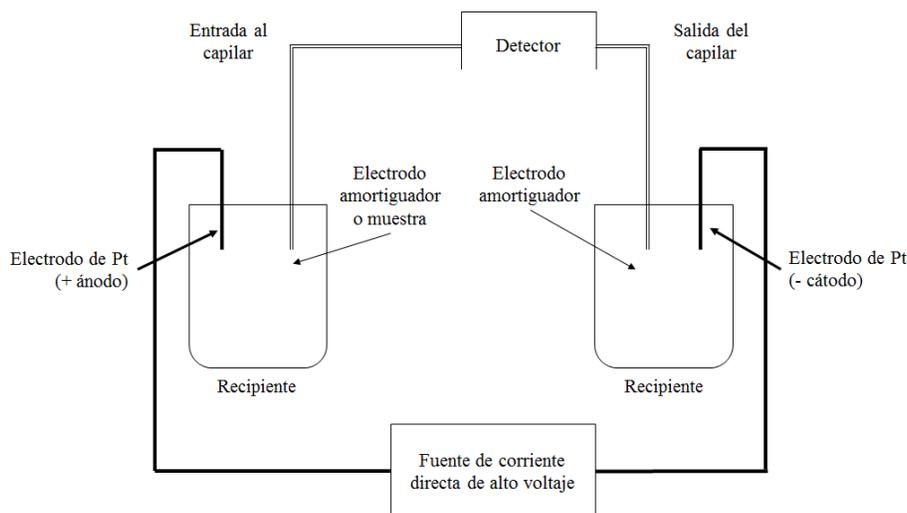


Figura 12. Diagrama esquemático de la electroforesis capilar
Fuente: Christian (2009)

El tubo capilar es un medio de separación abierto en sus extremos, cuya longitud oscila entre 20 y 80 cm (Rouessac, 2003). El tubo se encuentra lleno de disolución con un electrolito apropiado, y la muestra es inyectada por uno de los extremos del capilar en volúmenes desde 1 nl hasta varios μl (Christian, 2009).

La mayoría de los tubos capilares se fabrican de sílice fundida cubierta por una capa de 20-35 μm de poliimida que le proporciona fuerza mecánica, como se ilustra en la Figura 13. El diámetro interno típico es de 25-75 μm , mientras que el externo es de 200-375 μm (Harvey, 2002).

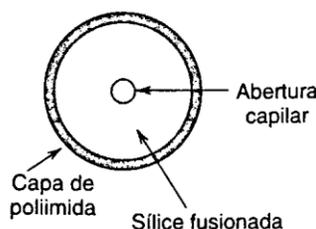


Figura 13. Corte transversal del capilar utilizado en electroforesis
Fuente: Christian (2009)

El sistema cuenta también con dos electrodos de platino que se sumergen en la solución conectados a la fuente de corriente eléctrica de alto voltaje (Christian, 2009). La diferencia de potencial aplicada puede llegar a los 600 V/cm (Rouessac, 2003), alcanzarse corrientes de 250 μ A y voltajes de 1 a 30 kV (Christian, 2009). Cabe hacer mención que ya en los experimentos la intensidad de corriente no debe sobrepasar los 100 μ A, con el fin de que la energía disipada se mantenga inferior a 3 W. Para limitar el calentamiento del capilar es preferible situarlo dentro de un recinto con regulación de temperatura (Rouessac, 2003).

El detector se ubica cerca de un extremo del capilar, a través del cual pasa la solución. Se hace pasar un haz enfocado por el capilar y se puede recolectar el haz transmitido con una fibra óptica acoplada a un tubo fotomultiplicador. Se puede detectar en longitudes de onda de 190 a 800 nm (Christian, 2009).

El detector se encuentra ubicado a una distancia específica del extremo anterior del capilar, y cerca del compartimiento catódico. La señal obtenida es la base de la obtención del electroferograma, que muestra el registro de la composición de la muestra. Sólo se detectarán las especies que se dirigen hacia el cátodo (carga negativa) (Rouessac, 2003) a alto pH (condiciones utilizadas en este proyecto).

A medida que la muestra migra a lo largo del capilar, sus componentes se separan y eluyen de la columna a diferentes tiempos obteniéndose un gráfico que conocemos como electroferograma (Harvey, 2002).

1.3.7 Identificación de los componentes en electroforesis capilar

La identificación de un componente se lleva a cabo en 3 etapas:

1. Se compara el tiempo de migración del analito desconocido presente en el extracto problema, con el del estándar del compuesto se sospecha es.
2. Al extracto del problema se le adiciona una pequeña alícuota del estándar que se sospecha. Si el pico del compuesto desconocido en el extracto crece, entonces queda identificada su composición.
3. Por último, también puede confirmarse su identidad al comparar el espectro de absorción del pico desconocido del extracto, con el espectro del estándar que se sospecha.

1.4 Alimentos funcionales

1.4.1 Alimentación y nutrientes

El término nutrición se refiere al conjunto de procesos mediante los cuales el organismo utiliza, transforma, incorpora y, finalmente, elimina una serie de sustancias químicas llamadas nutrientes, que forman parte de la alimentación diaria (Menéndez, 2013).

Vernon Young definió el nutriente como un constituyente de la dieta completamente caracterizado (física, química y fisiológicamente), natural o diseñado, que sirva como sustrato energético, precursor de la síntesis de moléculas u otros componentes necesarios en la diferenciación, crecimiento, renovación, reparación, defensa y/o mantenimiento de la célula, o bien todo aquel que funcione como molécula de señalización, cofactor, determinante de alguna función, estructura molecular y/o promotor de la integridad de las células y de los órganos (Young, 2002)

1.4.2 Definición de alimento funcional

Un alimento es un constituyente de la dieta con múltiples funciones, como son proveer energía en forma de carbohidratos, proteínas y/o lípidos, producir placer a través de aromas, colores, sabores, entre otras propiedades organolépticas y tener beneficios a la salud. De ahí que no todos los alimentos tienen la capacidad de nutrir a las personas o de mejorar la salud de aquellas, con excepción de los alimentos funcionales (Guo, 2009).

El concepto de alimento funcional está siendo cada vez más identificado por las personas, y la mayoría de ellas cree que estos productos pueden tener efectos benéficos en la salud. Esta creación de conciencia proviene de distintas fuentes tales como: los medios de comunicación (72%), proveedores de servicios de salud (44%), amigos y familia (20%), así como de libros sobre salud y dietas (13%) (Guo, 2009).

Los alimentos funcionales han surgido gracias a los avances científicos alcanzados en campos como la nutrición, la biotecnología o la ingeniería genética. Dichos progresos son utilizados por la industria alimentaria para el desarrollo de nuevos alimentos orientados hacia una población cada vez más envejecida y consciente de los problemas de salud, y la potencial influencia de la alimentación en los mismos (Menéndez, 2013).

Un alimento funcional puede ser similar a o incluso un alimento común, que se consume de manera normal en la dieta, y que tiene beneficios fisiológicos y/o previene riesgos relacionados con enfermedades crónicas (Guo, 2009).

Actualmente el índice de mortalidad está asociado a enfermedades no infecciosas, como: obesidad, diabetes, enfermedades del corazón, cáncer, desórdenes mentales, hipertensión, enfermedades gastrointestinales, anemia, enfermedades bucales, etcétera, mismas que están relacionadas con lo que se consume (Guo, 2009). Así pues, la clave para mantener una buena salud en la población está directamente relacionada con una dieta balanceada.

La industria de los alimentos ha mostrado gran interés en satisfacer la demanda de estos productos, apoyada por las organizaciones gubernamentales y autoridades en materia de salud, que han impulsado el desarrollo de este sector por medio de la investigación de los beneficios de estos productos, así como la creación de normas.

Una de estas autoridades es la FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés), que ha establecido los criterios bajo los cuales se pueden hacer declaraciones relacionadas con alimentos funcionales, respaldadas por una gran cantidad de estudios en laboratorios. Entre las declaraciones o “claims” aprobados (bajo ciertas condiciones estipuladas por la FDA) se encuentran los indicados en la

Tabla 10:

Tabla 10 Declaraciones aprobadas por la FDA para diversos alimentos funcionales

ALIMENTO FUNCIONAL	AYUDA EN LA PREVENCIÓN DE
CALCIO	Osteoporosis
LÍPIDOS EN LA DIETA	Cáncer
GRASAS SATURADAS Y COLESTEROL	Enfermedades coronarias
SODIO	Hipertensión
GRANOS, FRUTAS Y HORTALIZAS CON CONTENIDO DE FIBRA	Cáncer
CARBOHIDRATOS ENDULZANTES NO CARCINOGENICOS	Caries
ÁCIDO FÓLICO	Defectos en tubos neuronales
FIBRA SOLUBLE PROVENIENTE DE VARIOS ALIMENTOS	Enfermedades coronarias
PROTEÍNA DE SOYA	Enfermedades cardiovasculares

Fuente: Guo (2009)

Los alimentos que se ingieren, no solamente proveen al cuerpo de energía y nutrientes, sino que también pueden tener un gran impacto en la salud. Una de las formas en las cuales se puede mejorar la salud es realizando ejercicio, ya que ayuda a la circulación, liberar el estrés, entre otros beneficios.

El ejercicio resulta en la producción de calor dentro del cuerpo, que a menos que se elimine, puede llevar a un aumento significativo de la temperatura corporal. El sudor es el

método principal del cuerpo para eliminar el calor. Sin embargo, si el agua perdida como sudor no se reemplaza, entonces la deshidratación ocurre y la temperatura del cuerpo aumentará de cualquier manera. De esto se entiende que la ingesta de fluidos es un punto crítico para el aseguramiento del correcto funcionamiento del organismo (LUCOZADE, 2015).

1.4.3 Bebidas hidratantes

Las bebidas para deportistas están formuladas para proporcionar cantidades recomendadas de energía para mantener un rendimiento óptimo durante la actividad física prolongada y para ayudar a mantener el equilibrio de fluidos mediante la sustitución de los electrolitos perdidos a través del sudor, mismo que regula la temperatura corporal dentro de rangos normales. Sin embargo, ocurre un proceso de deshidratación, en el que inicialmente se pierde agua, pero también electrolitos mientras se consume energía (Maughan, 2009).

Una persona deshidratada puede experimentar desde fatiga temprana y sed hasta desmayos y golpes de calor, pasando por dolores, calambres y mareos. Al perder incluso una pequeña cantidad de líquidos (por ejemplo, el 1% de peso corporal) se puede reducir el rendimiento físico (PROFECO, 2011).

Aunque una dieta bien balanceada provee los mismos ingredientes, los carbohidratos, agua y sodio en las bebidas deportivas son una ventaja durante actividades de resistencia (cuando la cantidad de sudor excede 8 litros por día, ejercicios extenuantes que duren más de 60 minutos, o una deficiencia de sodio o carbohidratos) (Popkin, 2009).

1.4.3.1 Clasificación de las bebidas hidratantes

Las bebidas deportivas están clasificadas de acuerdo a su osmolalidad, que es un índice del número de partículas en solución. Este índice depende del tipo y concentración de los carbohidratos presentes, así como del sodio en solución. El plasma de la sangre tiene una osmolalidad de 280-300 mOsmol/kg (LUCOZADE, 2015), y con base en este valor, se clasifican las diferentes bebidas deportivas, como se indica en la Tabla 11:

Tabla 11. Clasificación de las bebidas deportivas según su osmolalidad

TIPO	CARACTERÍSTICAS
HIPOTÓNICA	Osmolalidad menor que la de la sangre. Contienen de 2-4 g/100 ml de carbohidratos y < 50 mg/100 ml de sodio.
ISOTÓNICA	Misma osmolalidad de la sangre, en equilibrio con los fluidos del cuerpo. Contienen de 6-8 g/100 ml de carbohidratos y 46-69 mg/100 ml de sodio.

HIPERTÓNICA	Osmolalidad mayor que la de la sangre. Contienen cantidades mayores o iguales a 10 g/100 ml de carbohidratos.
--------------------	--

Fuente: LUCOZADE (2015)

1.4.3.2 *Ingredientes y formulaciones*

La mayor parte de las formulaciones comerciales para bebidas hidratantes contienen cantidades similares de cada ingrediente. En general, estas bebidas son isotónicas, con una osmolalidad que comúnmente se encuentra entre 280 y 340 mOsmol/kg. El contenido de carbohidratos normalmente se encuentra entre el 6-7% e incluye combinaciones de glucosa, fructosa, sacarosa y maltodextrina. La concentración de sodio se encuentra entre 20-30 mmol/l, mientras que el potasio se encuentra aproximadamente en 5 mmol/l (Maughan, 2009). Además, la bebida combina otros ingredientes, tales como: saborizantes, colorantes, conservadores, etcétera.

- ***Electrolitos***

Los electrolitos son minerales que se mantienen en parámetros estables cuando una persona se encuentra bien hidratada. Con el inicio de la actividad física, estos electrolitos se van alterando por deshidratación y cuando se alteran vienen los problemas en el cuerpo. Aquí es donde intervienen las bebidas hidratantes.

El sodio es el electrolito principal que se pierde al sudar. Aproximadamente 60% del sodio en el organismo rodea las células y ayuda a mantener la cantidad correcta de agua dentro y fuera de ellas, así como en la sangre. Si una gran cantidad de sodio se deshecha en el sudor y no se repone, entonces la concentración de sodio en la sangre es reducida, aumentando el movimiento del fluido dentro de las células. Consecuentemente, reemplazar el sodio perdido en el sudor es importante para asegurar el perfecto balance de agua (LUCOZADE, 2015).

El sodio es el único electrolito que ha demostrado su eficacia en estudios de reposición de líquidos, ya que proporciona beneficios fisiológicos, estimula la llegada máxima de agua y carbohidratos al intestino delgado y ayuda a mantener el volumen del líquido extracelular (PROFECO, 2011).

Las pérdidas del potasio son mucho menores durante el ejercicio, así que su reposición es menos necesaria que la del sodio; sin embargo, es conveniente incluirlo para reponer las pérdidas cuando finaliza la actividad física. Finalmente, se encuentran los electrolitos como

magnesio o calcio, que no son tan relevantes porque las pérdidas son pequeñas y no son prioridad reponerlas en el ejercicio (PROFECO, 2011).

- ***Carbohidratos***

Los carbohidratos son una importante fuente de energía durante actividades de intensidad media a alta. Desafortunadamente solamente hay una cantidad limitada de carbohidratos (~2000 kcal) almacenadas en el cuerpo, las cuales, al ser gastadas por encima de un punto crítico, provocan una disminución en el rendimiento (LUCOZADE, 2015).

Los carbohidratos ingeridos durante el ejercicio entran en el torrente sanguíneo y funcionan como fuente de energía para los músculos y el cerebro, además, promueven la absorción de agua en el intestino delgado (Maughan, 2009).

En la mayoría de los estudios realizados, el carbohidrato estudiado ha sido la glucosa, sin embargo, el tipo de carbohidrato no parece ser un factor crítico, y, además de glucosa, se ha utilizado sacarosa, fructosa, jarabes de alta fructosa, maltodextrina, polidextrosa, entre otros. Todos ellos han demostrado su efectividad en mantener la concentración de glucosa en la sangre, y mejorar el rendimiento. Las mezclas de glucosa y fructosa en cantidades iguales tienen algunas ventajas, ya que hay un incremento en la cantidad de carbohidratos totales exógenos oxidados (Maughan, 2009).

Puede ser beneficioso agregar diferentes carbohidratos en la formulación, ya que esto tiene implicaciones en el sabor, que a su vez influye en la cantidad consumida, y, limitando la osmolalidad, puede maximizar la velocidad de absorción de azúcares y agua en el intestino delgado (Shi, 1995).

- ***Saborizantes, acidulantes y colorantes***

Muchos factores influyen en la palatabilidad de las bebidas hidratantes, y la adición de una variedad de sabores ha mostrado un aumento en la ingesta con respecto al agua pura (Maughan, 2009). La incorporación de acidulantes es considerada importante en bebidas hidratantes, debido a que los electrolitos se estabilizan a su forma iónica en presencia de estos compuestos. Se permite una gran cantidad de acidulantes en estas bebidas, entre las cuales el ácido cítrico es el más popular, seguido del ácido málico y la vitamina C (Guo, 2009).

Por último, los colorantes ayudan a reforzar la percepción del sabor del producto, especialmente cuando se encuentra embotellado. En algunas ocasiones, el color es incluso

más importante que la impresión general para el consumidor. Los colorantes seleccionados deben funcionar bien en el pH del sistema, además de mantener sus propiedades a pesar del tiempo, la temperatura o la luz (Guo, 2009).

- ***Otros ingredientes***

Existe una tendencia creciente para modificar las formulaciones de bebidas hidratantes, incluyendo otros componentes que pueden afectar las características funcionales de la bebida, como, por ejemplo, vitaminas y minerales, taurina, ginseng, cafeína, glicerol, proteínas y aminoácidos, entre otros (Maughan, 2009).

Aunque existe evidencia de que el daño a los músculos después del ejercicio puede ser mediado al menos en parte por los radicales libres, es poco claro que la ingesta de antioxidantes en la bebida tenga un efecto en estos procesos (Maughan, 2009).

1.4.3.3 Proceso de fabricación

El agua potable es el ingrediente mayoritario en la fabricación de bebidas deportivas, conformando más del 90% de la formulación. También se adicionan carbohidratos, electrolitos, acidulantes, saborizantes y colorantes. Todos estos ingredientes se mezclan en tanques de acero inoxidable con sistemas de agitación. Posteriormente, la mezcla se pasteuriza para evitar riesgos sanitarios, utilizando intercambiadores de calor de placas en las etapas finales del proceso. El producto final se envasa y almacena, algunas veces, adicionado de conservadores (Figura 14).

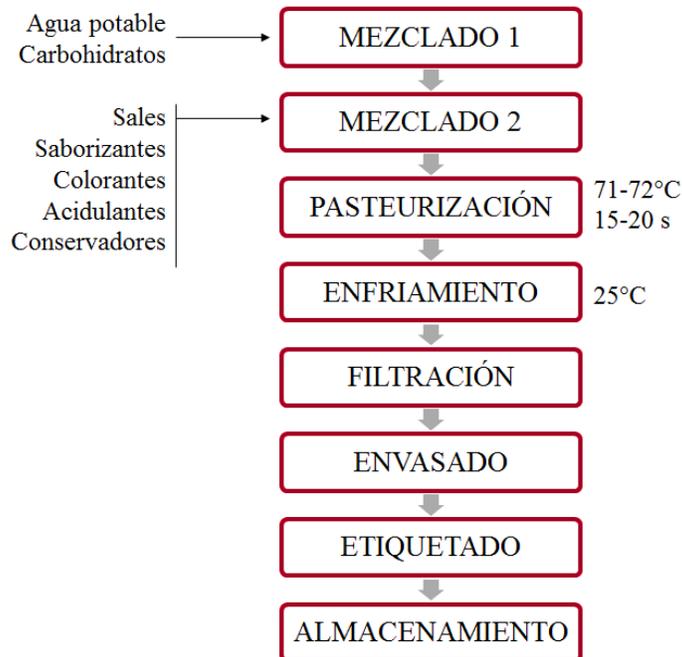


Figura 14. Diagrama de bloques para fabricación de bebidas deportivas
Fuente: Guy & Wood (1974)

A continuación, se describe el proceso de fabricación (González, 2001):

- *Recepción de la materia prima:* Se reciben los ingredientes de los distintos proveedores con el certificado de calidad correspondiente.
- *Evaluación de la materia prima:* Se revisa que los ingredientes cumplan con los parámetros establecidos de acuerdo a sus especificaciones.
- *Tratamiento de agua:* El agua debe tener la calidad adecuada para poder ser consumida. El tratamiento de agua debe asegurar que todo microorganismo sea eliminado, eliminar aquellas sustancias que afecten la apariencia, sabor y estabilidad del producto final y ajustar el pH del agua al valor requerido.
- *Formación del jarabe simple.* Aquí se disuelven en cierta cantidad de agua los hidratos de carbono.
- *Formación de jarabe terminado:* Se mezclan el jarabe simple, las sales, los acidulantes, conservadores, saborizantes y colorantes.
- *Pasteurización:* La solución preparada es sometida a una temperatura de 71-72 °C durante 15-20 segundos, en un sistema continuo de intercambiadores de calor de placas, para asegurar que el producto esté libre de microorganismos patógenos.
- *Enfriamiento.* Se enfría el producto a una temperatura de 25 °C.

- *Filtración.* El producto es filtrado a través de un filtro de determinado diámetro de poro, para eliminar cualquier partícula que se encuentre sin disolver.
- *Envasado.* Este se realiza en botellas de PET de diferentes capacidades.
- *Etiquetado.* Indicar la información de acuerdo a la NOM-051-SCFI/SSA1-2010.
- *Almacenamiento.* Los productos se almacenan a temperatura ambiente.

Se realiza un control de calidad del producto durante diferentes etapas de su producción, así como al obtenerse el producto final envasado, para de esa manera asegurar un producto de buena calidad. Durante estos muestreos se le realizan al producto análisis microbiológicos, pruebas de pH, turbidez, determinación de cloro y organolépticas (Guy & Wood, 1974).

1.4.3.4 Normatividad para bebidas hidratantes

En febrero de 2001, la Dirección General de Salud y Protección del Consumidor de La Comisión Europea redactó un documento que indica que las bebidas deportivas deben suministrar hidratos de carbono como fuente fundamental de energía y deben ser eficaces para mantener una óptima hidratación. Dicho documento recomienda los márgenes indicados en la Tabla 12 en la composición de las bebidas para tomar durante la práctica deportiva (considerando una porción como 240 mL) (PROFECO, 2011):

Tabla 12. Límites establecidos para bebidas hidratantes

COMPONENTE	LÍMITE
ENERGÍA	19.2-84 kcal por porción (no más de 21.6 g por cada 240 ml)
SODIO	110-276 mg por cada 240 ml
POTASIO	No más de 93.8 mg en 240 ml

Fuente: PROFECO (2011)

En México, no existía documento alguno que regulara la comercialización de bebidas deportivas, hasta el año 2011, cuando se creó la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011: Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. En esta norma se establecen las disposiciones y especificaciones sanitarias que deben cumplir las bebidas deportivas, además de indicar que el contenido de carbohidratos debe ser máximo 80 g/l y el de sodio entre 230 y 575 mg/l (SS, NOM-218-SSA1, 2011).

2 OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una propuesta tecnológica que contribuya al aprovechamiento de los residuos de la industria vitivinícola en México a partir de los extractos etanólicos obtenidos del orujo de uva roja por diferentes métodos, evaluando la actividad antioxidante, concentración y perfil de polifenoles, para su posterior aplicación en una bebida hidratante.

Objetivos particulares

Objetivo Particular 1: Seleccionar el orujo deshidratado procedente de diferentes tipos de uva mediante comparación de sus propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, que permita contar con la materia prima de mejor calidad para la obtención de los extractos etanólicos.

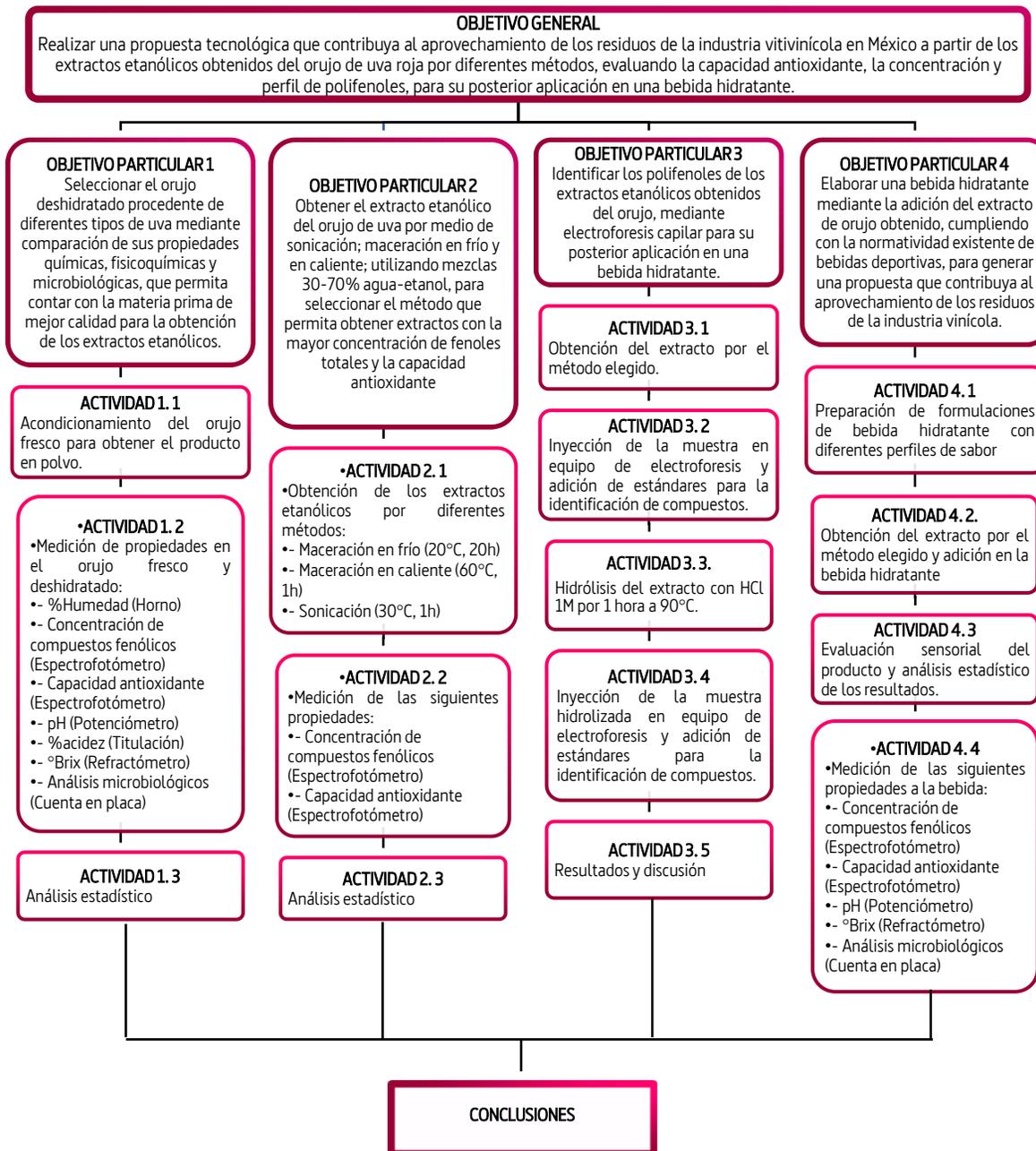
Objetivo Particular 2: Obtener el extracto etanólico del orujo de por medio de sonicación; maceración en frío y en caliente; utilizando mezclas 30-70% agua-etanol, para seleccionar el método que permita obtener extractos con la mayor concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante.

Objetivo Particular 3: Identificar los polifenoles de los extractos etanólicos obtenidos del orujo, mediante electroforesis capilar para su posterior aplicación en una bebida hidratante.

Objetivo Particular 4: Elaborar una bebida hidratante mediante la adición del extracto de orujo obtenido, cumpliendo con la normatividad existente de bebidas deportivas, para generar una propuesta que contribuya al aprovechamiento de los residuos de la industria vinícola.

3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Cuadro metodológico



3.2 Material de estudio

Los orujos empleados en este proyecto fueron de uva roja, resultante de la producción de vino tinto, donado por 4 casas vinícolas: de Freixenet de México, ubicado en el estado de Querétaro una mezcla de Cabernet Sauvignon y Malbec, de Casa Xecue, Cabernet Sauvignon, de la Escuela de Enología Cabernet Franc y del Club de Bacchus Tempranillo, las últimas tres casas se encuentran en el estado de Baja California.

El orujo fue almacenado en bolsas de polietileno a -20°C hasta el momento de llevar a cabo los análisis químicos propuestos en el cuadro metodológico. Las muestras fueron analizadas en un tiempo máximo de 48 horas después de la descongelación.

Para cada orujo se asignó un código para su identificación durante la etapa experimental y el análisis de los resultados, conformado por dos letras, como se muestra en la Tabla 13:

Tabla 13. Códigos asignados para cada tipo de orujo

CASA VINÍCOLA	VARIEDAD(ES) DE UVA	CÓDIGO
FREIXENET DE MÉXICO	Cabernet Sauvignon y Malbec	SM
CASA XECUE	Cabernet Sauvignon	CS
ESCUELA DE ENOLOGÍA	Cabernet Franc	CF
CLUB DE BACCHUS	Tempranillo	TP



Figura 15. Orujos deshidratados y molidos

3.3 Acondicionamiento del orujo

El orujo fue sometido a un acondicionamiento previo a la extracción y análisis físicos, químicos, fisicoquímicos y microbiológicos, que consistió en secado, molienda y tamizado.

En la

Figura 16, se pueden observar las condiciones del proceso de acondicionamiento:

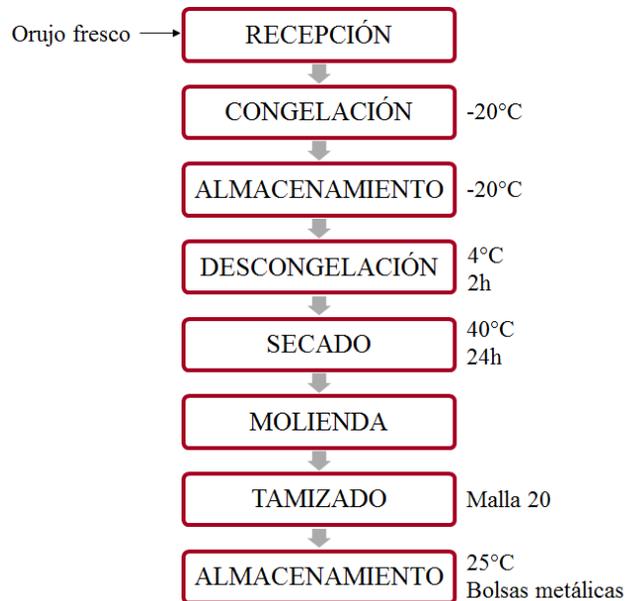


Figura 16. Diagrama de bloques para acondicionamiento de orujo

Al momento de la recepción del material de estudio, éste se muestreó para determinar sus propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y microbiológicas. El orujo restante se colocó en bolsas de plástico y se congeló a -20°C , para su posterior almacenamiento hasta el momento del secado.

El orujo que se requirió para secado en los días posteriores, se descongeló en refrigeración por 2 horas, y se distribuyó en charolas de acero inoxidable con papel encerado para su secado a 40°C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiraron las charolas de la estufa y se redujo el tamaño de partícula hasta pasar por malla 20. Finalmente, se almacenó el orujo deshidratado en bolsas metálicas a temperatura $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$, en un ambiente seco.

3.4 Obtención de extractos etanólicos

El orujo deshidratado se pesó (0.375 g) en tubos para centrifuga y se adicionaron 1.5 ml de etanol 70%, para obtener una relación 1:4 m/v. La extracción se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 14. El extracto obtenido se centrifugó por 15 minutos a 10,000 rpm, y finalmente, se filtró el extracto con biodiscos de 13 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm (Fig. 17).

Tabla 14. Condiciones de proceso para la obtención de extractos etanólicos

TRATAMIENTO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (H)
MACERACIÓN EN CALIENTE	60	1
MACERACIÓN EN FRÍO	25	20
SONICACIÓN	25	1

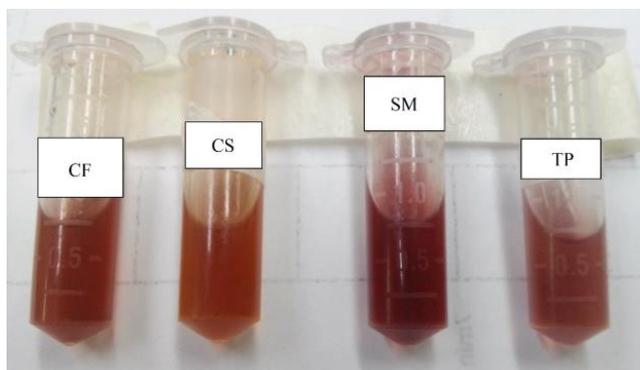


Figura 17. Extractos obtenidos para cada uno de los orujos

3.5 Identificación de compuestos polifenólicos mediante electroforesis capilar

Los compuestos fenólicos presentes en el extracto de orujo de uva roja fueron identificados empleando la técnica de electroforesis capilar, mediante un sistema de electroforesis capilar (marca Beckman Coulter, modelo P/ACE™ MDQ) (Figura 18).



Figura 18. Equipo de electroforesis capilar utilizado para este proyecto

En la Tabla 15 se muestran los componentes del equipo:

Tabla 15. Componentes del sistema de electroforesis capilar

COMPONENTE	ESPECIFICACIONES
CAPILAR	Sílice fundida con cobertura de poliamida Longitud total Entrada-Salida (L_T) de 53.4 cm Longitud al detector (L_D) de 43.4 cm Diámetro interno del capilar de sílice (I_D) de 50 μ m
DETECTOR	Arreglo de diodos
ELECTRODOS	Electrodos de platino
REFRIGERANTE	Fluorinert™ FC-77, marca 3M
SOFTWARE	32 Karat Software, Versión 5.0, Build 1021 Copyright 1998-2001 Beckman Coulter, Inc.
SOLUCIÓN BUFFER	Tetraborato de Sodio 50mM, pH 9.4
LONGITUD DE ONDA	200 nm

3.5.1 Preparación de la muestra

Se preparó de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.4. En esta ocasión, la extracción se llevó a cabo a 60°C por una hora.

3.5.2 Identificación de polifenoles

La identificación de compuestos se llevó a cabo en el equipo de electroforesis capilar, según las etapas descritas en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de prueba de identificación de polifenoles

ETAPA	PRESIÓN (PSI)	DURACIÓN (S)
ENJUAGUE	30	300
INYECCIÓN	0.5	3
SEPARACIÓN	0	2400

En la etapa de separación, el voltaje fue de 30 kV, la corriente de 80-100 μ A y la potencia de 3-3.5 W. Para identificar los compuestos presentes, se utilizaron estándares concentrados Sigma Aldrich®, enlistados en la Tabla 17:

Tabla 17. Información de los estándares empleados para identificación de polifenoles

NOMBRE	PUREZA
RESVERATROL	$\geq 99.0\%$
ÁCIDO GÁLICO	97.0%
CATEQUINA HIDRATO	$\geq 98.0\%$
ÁCIDO COUMÁRICO	$\geq 98.0\%$
ÁCIDO VANÍLICO	$\geq 97.0\%$
ÁCIDO CAFEICO	$\geq 99.0\%$
ÁCIDO CLOROGÉNICO	$\geq 95.0\%$
RUTIN HIDRATO	$\geq 94.0\%$
VAINILLINA	$\geq 99.0\%$
TIROSOL	$\geq 95.0\%$
KAEMPFEROL	$\geq 90.0\%$
ÁCIDO TRANS-CINÁMICO	$\geq 99.0\%$
ÁCIDO FERÚLICO	$\geq 99.0\%$
EPICATEQUINA	$\geq 90.0\%$
QUERCETIN HIDRATO	$\geq 95.0\%$
ÁCIDO GENTÍSICO	$\geq 98.0\%$

3.5.3 Hidrólisis del extracto para identificación de otros compuestos

Para identificar otros compuestos que suelen encontrarse unidos a azúcares o polimerizados (taninos) se llevó a cabo la hidrólisis del extracto etanólico a 90°C por 1 hora, mezclando 400 μ L de extracto, 100 μ L de HCl 7 M y 300 μ L de etanol 100%, para llegar a una concentración final de 0.875 M.

Las condiciones de análisis en el equipo de electroforesis capilar fueron las mostradas en la Tabla 18:

Tabla 18. Condiciones de prueba para identificación de polifenoles en extracto hidrolizado

ETAPA	PRESIÓN (PSI)	DURACIÓN (S)
ENJUAGUE	30	1800
INYECCIÓN	0.3	3
SEPARACIÓN	0	2400

3.6 Formulación de la bebida hidratante

Las 3 muestras fueron formuladas utilizando los criterios de la Norma Oficial Mexicana 218 (NOM-218-SSA1, 2011), donde se indica que, para bebidas deportivas, se permite entre 230 y 575 mg de sodio por cada litro de bebida, y un máximo de 80 g de carbohidratos (azúcares) por litro (SS, NOM-218-SSA1, 2011). El diagrama de proceso se observa en la Figura 19.

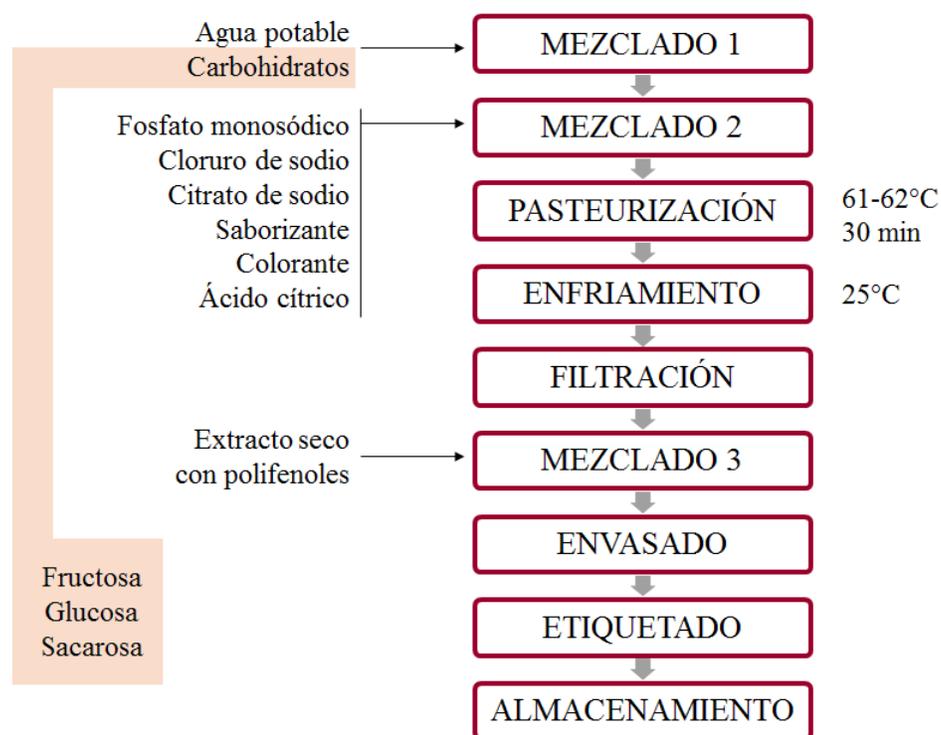


Figura 19. Diagrama de proceso para las 3 formulaciones de bebida hidratante

Siguiendo estos límites como referencia, se calculó la cantidad de sales y azúcares tomando como base de cálculo 1 litro, y las bebidas se formularon de acuerdo a la Tabla 19.

La formulación se preparó con agua y se adicionó 0.15% de ácido cítrico, siguiendo las buenas prácticas de manufactura, que indican una dosis de entre 0.1-0.5% para bebidas (SS,

NOM-086-SSA1, 1994); en el caso del colorante y el saborizante, se siguieron las recomendaciones de los proveedores, utilizándose 2.5 mL de colorante artificial de uva (Marca DEIMAN®) y 4 mL de saborizante artificial de uva (Marca Firmenich®) por cada litro de bebida. Finalmente, se adicionó el extracto seco obtenido por evaporación del disolvente a la bebida.

Tabla 19. Formulaciones de la bebida hidratante

INGREDIENTE	FORMULACIÓN 1	FORMULACIÓN 2	FORMULACIÓN 3
FOSFATO MONOSÓDICO		1 g	
CLORURO DE SODIO		0.5 g	
CITRATO DE SODIO		0.5 g	
FRUCTOSA	35 g	30 g	0 g
GLUCOSA	35 g	30 g	35 g
SACAROSA	0 g	10 g	35 g
ÁCIDO CÍTRICO		1.5 g	
COLORANTE		2.5 mL	
SABORIZANTE		4 mL	
POLIFENOLES	3.5 mL (solamente extracto seco)		

3.7 Análisis sensorial de las formulaciones

La formulación de la bebida refrescante con mayor aceptabilidad fue elegida mediante una evaluación sensorial, con una prueba orientada al consumidor, conocida como prueba de ranking u ordenamiento.

La prueba se llevó a cabo a 30 personas, considerando como consumidores a estudiantes entre 20-25 años de la carrera de Ingeniería en Alimentos, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Durante la evaluación sensorial, pueden cometerse 4 tipos de errores que, de no revisarse y prevenirse, afectarán irremediablemente los resultados del análisis sensorial. Para evitar cometer estos errores, se tomaron en cuenta las siguientes recomendaciones (Watts, 1992):

- Cada muestra se codificó empleando un número aleatorio de tres dígitos.
- Las muestras se presentaron al azar, de manera que éstas se encontraran en diferentes posiciones para cada panelista, reduciendo al mínimo los errores por posición.

- Para reducir al mínimo los errores de estímulo, las muestras presentadas fueron iguales en todas las características, excepto en las características que se evaluaron.
- Cada panelista recibió muestras en distinto orden.

3.7.1 Protocolo de evaluación sensorial

De acuerdo a las indicaciones llevadas a cabo por Watts, se definió el protocolo de evaluación sensorial de la manera siguiente (Watts, 1992):

- Número de panelistas: 30
- Tamaño de muestra: 20 mL
- Temperatura de la muestra: 15 °C

Los utensilios necesarios para ejecutar el análisis sensorial fueron:

- 1 hielera para transportar las 3 muestras
- 3 recipientes de 1 litro con tapa
- 90 vasos de plástico de 30 mL con tapa, para muestras
- 1 plumón permanente negro
- 30 vasos de 250 mL de plástico, para agua de enjuague
- Servilletas
- 5 litros de agua natural
- Plumas
- 30 encuestas de evaluación sensorial

A cada una de las formulaciones se les asignó un código de 3 dígitos al azar: A la formulación 1 se le asignó el código 387, a la formulación 2 el código 589 y a la formulación 3 el código 236. La boleta de evaluación sensorial para las formulaciones se diseñó como se presenta en la Figura 20:

Test de preferencia - Bebida hidratante sabor uva			
Nombre _____	Fecha _____		
Por favor enjuáguese la boca con agua antes de comenzar. Pruebe las tres muestras en el orden presentado, de izquierda a derecha. Si lo desea, puede repetir el procedimiento una vez que haya probado todas las muestras.			
Ordene las muestras de la más aceptable a la menos aceptable, de izquierda a derecha, usando los números siguientes:			
1=más gustado, 3=menos gustado			
(Si tiene alguna pregunta, por favor dirigirse al encuestador)			
Muestra	_____	_____	_____
Ordenar (1 al 3)	_____	_____	_____
Gracias por su participación			

Figura 20. Boleta para evaluación sensorial de la bebida hidratante

3.8 Medición de propiedades de la bebida hidratante

Después de elegir la formulación de acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial, se preparó la formulación elegida y se midieron propiedades fisicoquímicas (pH, %Acidez y °Brix), químicas (Fenoles totales y capacidad antioxidante) y se realizaron los análisis microbiológicos indicados en el numeral 6 de la NOM-218-SSA1-2011:

- Mesófilos aerobios
- Coliformes totales

Además, debido al origen del extracto, se llevó a cabo el análisis microbiológico de cuenta en placa para mohos y levaduras de acuerdo a las técnicas descritas en el apartado 3.9.

3.9 Técnicas analíticas

3.9.1 Determinación de propiedades fisicoquímicas

- pH

Es un registro potenciométrico de la actividad de los iones hidrógeno por el uso de un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, o un electrodo combinado. La fuerza electromotriz (fem) producida por el sistema electroquímico varía linealmente con el pH. El pH de la muestra se determina por interpolación (Rodier, 1981).

Se realizó la lectura del pH a una solución de 10 g en 100 mL de agua destilada, empleando un potenciómetro manual, introduciendo el electrodo en la solución. Se utilizaron 10 mL de solución por cada medición y se realizaron 3 réplicas.

- %Acidez

La acidez se determinó por titulación y se midió el volumen de NaOH estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en una alícuota de 10 mL de solución de muestra, determinando el punto final por medio del cambio de color que se produce por la presencia del indicador ácido-base empleado (Kader, 2011). Los resultados se reportaron en g/mL ácido tartárico.

- °Brix

Esta técnica se basa en el principio de refracción total de la luz (originada por el tipo y la concentración de las sustancias disueltas en una disolución líquida), que tiene lugar en la

capa límite entre el prisma y la muestra. El índice de refracción del prisma determina el límite superior del rango de medición, ya que este debe ser siempre mayor que el de la muestra (Furlan, 2011). La medición de °Brix se hizo por triplicado.

3.9.2 Determinación de propiedades químicas

- Determinación de %Humedad

El % de humedad de la muestra se determinó a través del método de estufa. La técnica se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua (SE, 1986). Los resultados se expresaron en %.

- Fenoles totales

El reactivo de Folin-Ciocalteu utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción. Mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente a 765 nm, donde el molibdeno es reducido en el complejo y se da la reacción de transferencia de electrones (Tovar del Río, 2013). Se usa un buffer de carbonato para ajustar el pH (Singleton, 1999). Los resultados se expresan en mg/mL.

- Capacidad antioxidante por el método ABTS

La técnica para la generación del radical catión ABTS*⁺, implica la producción directa del cromóforo ABTS*⁺ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera se mide el grado de decoloración a 734 nm, como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS*⁺ (Fernández, 2006). Se usa Trolox como estándar y los resultados se expresan en mM Trolox.

3.9.3 Análisis microbiológicos

- Mesófilos aerobios

El método consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio agar nutritivo después de cierto tiempo y temperatura de incubación de 35±2°C; 48±2h (SS, NOM-092-SSA1, 1994).

- Coliformes totales

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo de agar Mac Conkey en el que se desarrollan bacterias a 35±2°C; en aproximadamente 24 h (SS, NOM-113-SSA1, 1994).

- Mohos y levaduras

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico de agar papa dextrosa, acidificado a un pH de 3.5 e incubado a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 3 a 5 días dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (SS, NOM-111-SSA1, 1994).

3.10 Tratamiento estadístico

Para todas las pruebas se utilizó un diseño de un solo factor, y se llevó a cabo un análisis ANOVA para determinar si existía o no diferencia significativa entre variedades de orujo, así como tipos de extracción, con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en IBM SPSS Statistics 22. Para el caso de la evaluación sensorial, se utilizó un análisis de ordenamiento por rangos (Suma de rangos de Friedman) (Pedrero, 1989).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de propiedades en el orujo fresco y deshidratado

4.1.1 Propiedades físicas y fisicoquímicas de orujos

El orujo fresco contiene aproximadamente 75% de humedad, y después del acondicionamiento, este porcentaje se redujo hasta el 15%. Además del agua, también se pueden encontrar monosacáridos como glucosa y fructosa en concentraciones pequeñas. Esto se puede deducir a partir de los resultados obtenidos para °Brix, que indican el contenido de sólidos en solución. Esta variable se utiliza en la práctica para controlar el proceso de fermentación.

En este estudio, el contenido de sólidos solubles fue de 1.2 a 1.5 gramos por cada 100 gramos de muestra fresca (Figura 21) y de 1.3 a 2.1 gramos por cada 100 gramos de muestra deshidratada, siendo el orujo C. Sauvignon/Malbec el que presentó un contenido de sólidos 40% más alto que el promedio en orujo deshidratado.

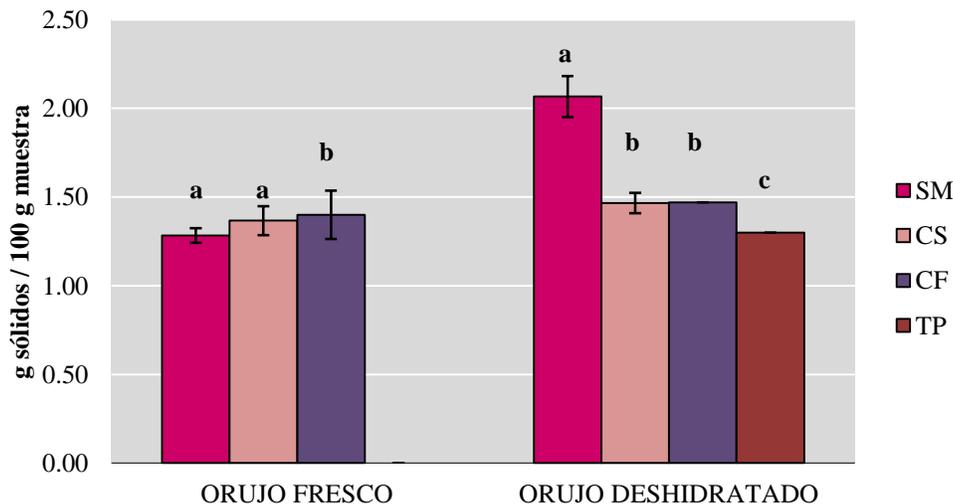


Figura 21. Sólidos solubles de orujos frescos y deshidratados, procedentes de diferentes variedades de uva : Cabernet Sauvignon/Malbec (SM), Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) y Tempranillo. Las barras verticales indican la desviación estándar. Las letras diferentes indican que existe diferencia significativa.

El porcentaje de acidez encontrado para los orujos fue de 2.2 a 2.6% para orujo fresco y de 2 a 3.6% para el orujo deshidratado, debido a la concentración de ácidos orgánicos (principalmente ácido tartárico, además de los ácidos, málico y en menor cantidad, el cítrico) en la muestra (Figura 22A). La producción de estos ácidos es consecuencia del

metabolismo de las especies microbianas que protagonizan el curso de la fermentación. La producción de estos ácidos influye en la acidez de los mostos, y, por consiguiente, de los orujos fermentados, aunque no se han reportado variaciones importantes del pH antes y después de la fermentación. El contenido de acidez es superior o ligeramente superior en el mosto que en el fermentado (Suárez, 1992).

La uva en estado fresco contiene entre 4.5 y 6% de acidez titulable (Castro, 2012). Por medio de la medición de esta propiedad, se puede predecir el estado de madurez del producto, y, por lo tanto, el contenido de azúcares disponibles para la fermentación. No se encontró diferencia significativa entre variedades para el orujo fresco; sin embargo, en el caso del orujo deshidratado, el porcentaje de acidez sí presenta diferencia significativa de acuerdo a la variedad.

El pH del orujo (Figura 22B) oscila entre 3.3 y 3.6, un valor más bajo comparándolo con el de la uva fresca, que, para diferentes variedades, es cercano a 3.2 en la pulpa y mosto y 3.9 en el hollejo (Ruíz, 2007). Se encontró diferencia significativa con respecto de la variedad de orujo.

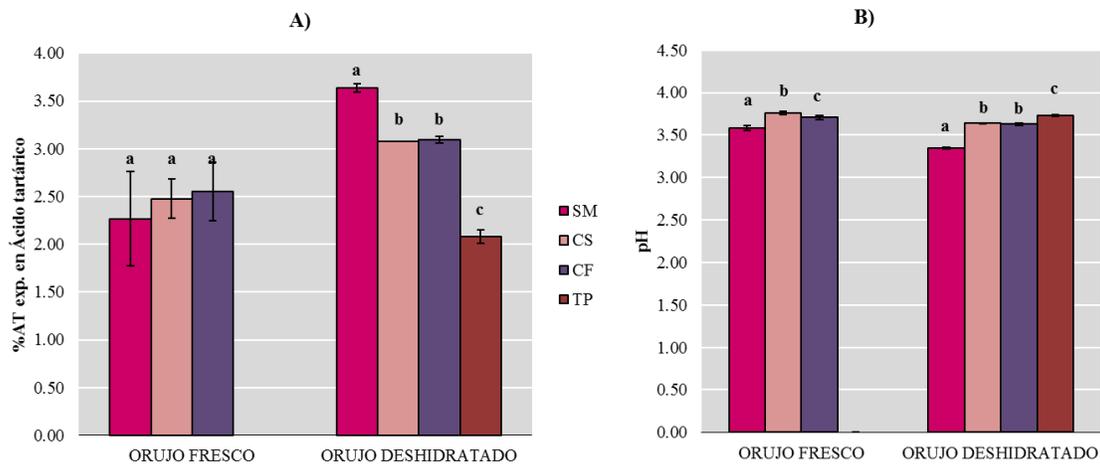


Figura 22. (A) Acidez y (B) pH de orujos frescos y deshidratados, procedentes de diferentes variedades de uva : Cabernet Sauvignon/Malbec (SM), Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) y Tempranillo. Las barras verticales indican la desviación estándar. Las letras diferentes indican que existe diferencia significativa.

Los fermentados en pureza de mosto a cargo de especies de levaduras suelen presentar un pH comprendido entre 2.5 y 4.5, dependiendo de la variedad y grado de madurez de la uva, de las especies de levadura y de las condiciones fisicoquímicas que intervienen en la fermentación. Por otra parte, los vinos presentan valores de pH que oscilan entre 3 y 4

(Ruíz, 2007). La concentración de hidrogeniones se debe en gran parte a los ácidos que provienen de la uva, y que representan del 20 al 50% de la acidez orgánica total (Suárez, 1992).

4.1.2 Fenoles totales y actividad antioxidante de orujos

En uvas, el contenido y tipo de compuestos fenólicos es diferente entre variedades, siendo Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc y Pinot Noir las que tienen un mayor contenido de polifenoles, principalmente flavonoles y antocianinas. Estos compuestos son liberados del hollejo y las semillas durante la maceración, etapa fundamental en la producción de vino tinto, el cual puede alcanzar concentraciones de hasta 3000 mg/L de compuestos fenólicos (Landrault & Poucheret, 2001). Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales, lo que les confiere actividad antioxidante, relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer (Barberán, 2003).

Los compuestos fenólicos pueden encontrarse en altas concentraciones en la uva y sus derivados, y el orujo no es la excepción. Todas las partes de la uva contienen polifenoles, y a pesar del proceso de extracción al cual es sometida la uva roja durante la maceración, existe un residuo de compuestos fenólicos en el hollejo y la pulpa del fruto; además, debido a que la semilla no sufre ningún tipo de ruptura, se conservan polifenoles propios de ésta.

La proporción en la cual se encuentran distribuidos los diferentes compuestos dependerá tanto de la parte de la uva como de la variedad de ésta. Por lo tanto, el origen de la uva (y, por consiguiente, del orujo) es una variable que influye en el tipo y la cantidad de compuestos fenólicos encontrados. Además, debe tomarse en cuenta el efecto de degradación que puede provocar el proceso de secado o cualquier otro tipo de tratamiento previo a la extracción (Cruz, 2012).

A través de la deshidratación del orujo de uva se puede obtener un ingrediente con altas concentraciones de compuestos fenólicos. Para Cabernet Sauvignon (Figura 23) se obtuvo un contenido de fenoles totales de 232.21 mg AG/g de orujo deshidratado (casi 3 veces más que el orujo fresco), mientras que para Cabernet Franc el contenido fue de 178.91 21 mg AG/g de orujo deshidratado (2 veces más que el orujo fresco), un valor similar al de la mezcla Cabernet Sauvignon-Malbec (183.97 mg AG/g). Cabe destacar que estos compuestos se obtienen a partir de un residuo, lo que quiere decir que, sin necesidad de

invertir en materia prima, se obtiene un material con propiedades antioxidantes. Después de la deshidratación, el orujo Cabernet Sauvignon tiene una concentración de compuestos fenólicos que duplica el valor promedio, presentando diferencia significativa con respecto de los demás orujos ($p \leq 0.05$).

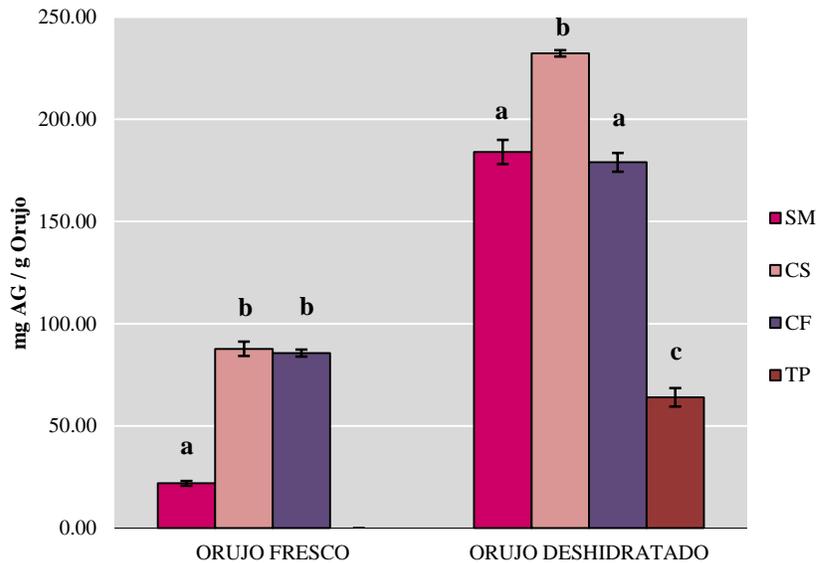


Figura 23. Contenido de fenoles totales para diferentes variedades de orujo fresco y deshidratado procedentes de diferentes variedades de uva : Cabernet Sauvignon/Malbec (SM), Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) y Tempranillo (TP). Las barras verticales indican la desviación estándar. Las letras diferentes indican que existe diferencia significativa.

La actividad antioxidante de las distintas variedades de orujo también presenta el patrón encontrado en el contenido de fenoles totales, debido a que esta propiedad está directamente relacionada con el tipo de compuestos fenólicos contenidos. Cada gramo de orujo deshidratado de la variedad Cabernet Sauvignon aporta aproximadamente el 10% de los polifenoles que contiene 1L de vino tinto (2,370 a 3,610 mg AG/L), y presenta aproximadamente el 1% de su actividad antioxidante (25.23 a 42.67 mmol de ET/L; Van Leeuw, 2014).

Una actividad antioxidante elevada indica que en el producto se encuentran presentes compuestos como el ácido gálico y las procianidinas. En vinos, el contenido de este polifenol puede representar hasta el 50% del contenido de fenoles totales (Van Leeuw, 2014). Debido a la relativamente lenta extracción de este compuesto de las semillas de uva, se obtienen concentraciones más altas en tiempos mayores, lo cual es característica de los

vinos tintos (Geana, 2016), y, según los resultados obtenidos en este estudio, también es válido en el caso del orujo.

Las procianidinas también presentan alta actividad antioxidante, pero debido a su alto grado de polimerización, se dificulta su extracción durante la maceración del vino tinto. Estos compuestos también se han encontrado en el orujo de la uva. Según Guéndez (2005), la fracción de flavonoides exhibió actividad antioxidante mayor comparada con la fracción de ácidos fenólicos. Se asume que la procianidina B1 es uno de los aceptores de radicales libres más importantes de la uva y sus extractos (Guendez, 2005). En uvas de la variedad Cabernet Sauvignon, estos compuestos se encuentran en concentraciones de 58.25 mg/L y 52.11 mg/L para procianidina B1 y B2, respectivamente (Van Leeuw, 2014).

La uva Cabernet Sauvignon (Figura 24) presentó diferencia significativa en la actividad antioxidante entre variedades, tanto en el orujo fresco como en el deshidratado. En el caso del orujo fresco, la variedad Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc presentaron actividad antioxidante 3 veces mayor que Cabernet Sauvignon-Malbec, encontrándose diferencia significativa.

Para el orujo deshidratado, Cabernet Sauvignon obtuvo un valor promedio de 0.25 mmol TE/g orujo deshidratado, mientras que la mezcla Cabernet Sauvignon-Malbec, Cabernet Franc y Tempranillo obtuvieron valores de 0.21, 0.16 y 0.06 mmol TE/g orujo deshidratado, respectivamente. Todos los orujos deshidratados presentaron diferencia significativa.

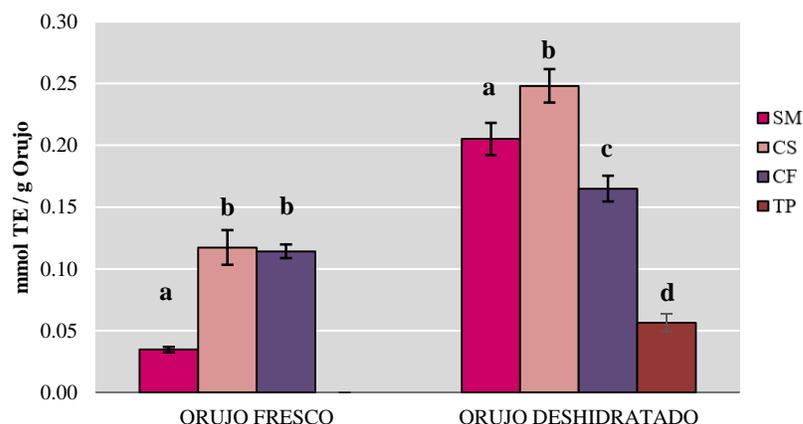


Figura 24. Actividad antioxidante para diferentes variedades de orujo fresco y deshidratado procedentes de diferentes variedades de uva : Cabernet Sauvignon/Malbec (SM), Cabernet Sauvignon (CS), Cabernet Franc (CF) y Tempranillo (TP). Las barras verticales indican la desviación estándar. Las letras diferentes indican que existe diferencia significativa.

En diferentes estudios se han reportado la capacidad de ciertos compuestos para retrasar la oxidación de aceites vegetales, así como de grasas de origen animal. Eskin y Przybylski (2000) estudiaron antioxidantes sintéticos y naturales y los aplicaron en aceite para observar qué compuestos retrasaban la oxidación con mayor efectividad. Sin tomar en cuenta los compuestos sintéticos, el kaempferol, la quercetina y myricetina presentaron 56, 70 y 80% de inhibición de la formación de peróxidos (Eskin & Przybylski, 2000). Estos compuestos pueden estar presentes también en el orujo, y contribuir a la actividad antioxidante de éste.

Milic (1998) encontró que el efecto antioxidante aumenta en orden gálico>cafeico>clorogénico>vanílico>salicílico, en un sistema de aceite de girasol enriquecido (Milic, 1998).

La actividad antioxidante de productos a partir de extractos de uva, depende de muchas variables, no solo de ciertos compuestos. La complejidad del perfil de fenoles de cierto producto, además de los efectos sinérgicos que puedan ocurrir entre compuestos, pueden explicar la alta actividad antioxidante de los extractos correspondientes (Thorsten, 2009). Esto quiere decir que la actividad antioxidante depende de la combinación de varios compuestos fenólicos, y no de uno solo.

El orujo deshidratado Cabernet Sauvignon presentó las mayores concentraciones de fenoles totales y actividad antioxidante, y debido a esto, fue el orujo elegido para las actividades posteriores.

Al realizar la comparación de los resultados en base seca (Figura 25), se observa que existe cierto porcentaje de degradación de los compuestos fenólicos presentes. Se ha encontrado que las estructuras son sensibles a ciertos factores ambientales, como las altas temperaturas (Piccardo, 2013), presencia de oxígeno, así como la luz. El porcentaje de degradación de los compuestos fenólicos debido al secado fue de 7% para Cabernet Sauvignon, presentando una disminución de la actividad antioxidante del producto del 23%.

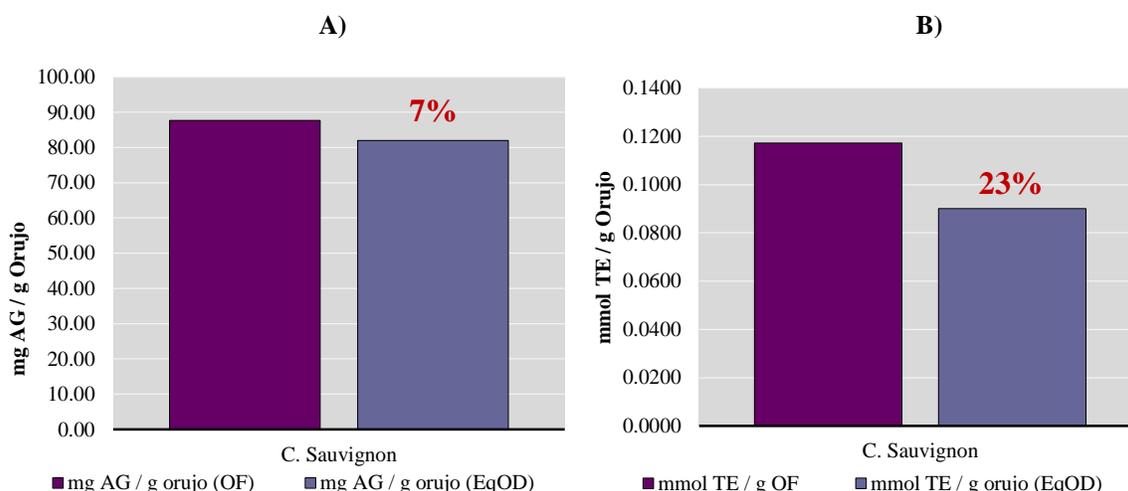


Figura 25. (A) Contenido de fenoles totales y (B) Actividad antioxidante para orujo fresco (OF) Cabernet Sauvignon

4.1.3 Calidad microbiológica de orujos

La presencia de microorganismos en los alimentos, especialmente su número y clase, pueden indicar el nivel de calidad del alimento, ya que éstos pueden ser responsables de la descomposición de los alimentos o de la transmisión de patógenos o toxinas (Alarcón, 2001).

La calidad higiénica de los alimentos viene a ser una función de la naturaleza y número de los agentes bióticos que le contaminan, por lo cual, se lleva a cabo la evaluación sanitaria de los alimentos mediante análisis microbiológicos (Bello, 2000).

En el caso del orujo de uva roja, es indispensable una buena calidad sanitaria en el producto deshidratado, ya que el extracto o el producto final no puede ser sometido a temperaturas tan altas como las de pasteurización una vez que se adicionan los polifenoles, puesto que son compuestos termolábiles a partir de los 60 °C (Piccardo, 2013). Además, debe cumplirse con los límites máximos permitidos de mesófilos aerobios en la Norma Oficial Mexicana 218, con valor de 50 UFC/mL (SS, NOM-218-SSA1, 2011).

Ninguno de los orujos, fresco o deshidratado, tuvo presencia de coliformes totales, que son bacilos gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos, que pueden o no fermentar la lactosa, tales como *Escherichia coli*. La presencia de estos microorganismos es un indicador de malas prácticas de higiene (Farias, 2015). Las UFC/g para cada prueba de conteo en placa se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados para análisis microbiológicos de orujo fresco y deshidratado

ORUJO	CONTEO	VARIEDAD	UFC/g
ORUJO FRESCO	MOHOS Y LEVADURAS	C. Franc	5.20×10^7
		C. Sauvignon	2.75×10^7
		Tempranillo	-
		Sauvignon-Malbec	2.05×10^7
	MESOFILOS AEROBIOS	C. Franc	6.35×10^7
		C. Sauvignon	2.85×10^7
Tempranillo		-	
COLIFORMES TOTALES	Todos	$<10^*$	
ORUJO DESHIDRATADO	MOHOS Y LEVADURAS	C. Franc	4.85×10^6
		C. Sauvignon	3.00×10^3
		Tempranillo	$<10^*$
		Sauvignon-Malbec	1.90×10^4
	MESOFILOS AEROBIOS	C. Franc	7.50×10^3
		C. Sauvignon	<10
		Tempranillo	3.70×10^6
COLIFORMES TOTALES	Todos	$<10^*$	

Para orujo fresco diluciones de 1×10^{-5} a 1×10^{-7} ; para orujo deshidratado 1×10^{-2} a 1×10^{-4}

*UFC en diluciones 10^{-1}

Cabernet Franc presentó las concentraciones más altas tanto de mohos y levaduras, así como en mesófilos aerobios en estado fresco, con una cuenta de 5.2×10^7 UFC/g y 6.35×10^7 UFC/g, respectivamente.

El orujo deshidratado variedad Tempranillo fue el único que mostró diferencia significativa para mesófilos aerobios, con la cuenta más elevada (3.70×10^6 UFC/g). El orujo variedad Cabernet Sauvignon-Malbec y Cabernet Franc obtuvieron la misma cuenta (7.50×10^3 UFC/g), y Cabernet Sauvignon no tuvo presencia de colonias. Para mohos y levaduras, Cabernet Franc tuvo diferencia significativa, con 4.85×10^6 UFC/g. Los otros tres orujos no tuvieron diferencia significativa en los resultados obtenidos.

Debido a que las uvas son tomadas directamente del viñedo y llevadas a la trituradora, para la posterior fermentación de éstas, la presencia de ciertos hongos y bacterias es normal. Las uvas maduras pueden albergar 10^4 - 10^6 UFC/g de microorganismos, de los cuales, los

grupos que comúnmente habitan en la superficie del fruto son: Levaduras, bacterias productoras de ácido acético y bacterias ácido lácticas. Kántor & Kačániová identificaron 12 especies de levaduras y 30 de bacterias en uvas de mesa, siendo los géneros predominantes *Bacillus*, *Candida*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Aureobasidium* y *Saccharomyces cerevisiae* (Kántor & Kačániová, 2015). Estos microorganismos presentaron crecimiento en los medios de cultivo.

A pesar de que la cantidad de microorganismos presentes en el orujo fresco es superior al dato reportado para uvas maduras, existen otros factores que afectan la cuenta de bacterias y hongos en el producto. Garijo (2011) encontró *S. cerevisiae*, además de *O. oeni* en uvas variedad Tempranillo durante la maduración, responsables del proceso de vinificación de la uva. Además de estas levaduras (encontradas naturalmente en la uva), durante el proceso de vinificación, se adicionan levaduras para llevar a cabo la fermentación, lo cual puede explicar la presencia de levaduras en el orujo del presente trabajo, en concentraciones más altas de lo reportado para uva fresca.

Estas levaduras llevan a cabo la glucólisis y posterior fermentación alcohólica del ácido pirúvico, obteniéndose principalmente etanol, además de ácidos orgánicos como el ácido succínico, láctico, cítrico, ácidos volátiles como el ácido acético, entre otros compuestos, que contribuyen a las propiedades fisicoquímicas del vino, tales como: pH y % de acidez.

Después de la trituración de la uva, se lleva a cabo la primera fermentación 70°C, temperatura a la cual son eliminados los microorganismos presentes en el producto fresco. Aunado a esto, la presencia de altas concentraciones de etanol alcanzadas al final del proceso fermentativo, son tóxicas para la mayoría de hongos y bacterias.

En general, la carga microbiana disminuyó considerablemente debido a la disminución de la humedad, y, por consiguiente, de la actividad de agua, además del tratamiento térmico a 40°C, debido a que los microorganismos encontrados en el producto son mesófilos gram negativos, no termo resistentes. El orujo deshidratado con menor cantidad de microorganismos viables fue Cabernet Sauvignon.

A pesar de que la mayoría de los microorganismos identificados en la uva son propios del medio y no representan ningún peligro para el ser humano, existen otros microorganismos patógenos que pueden causar daños en la salud. En este sentido, el aprovechamiento del orujo es seguro, con cargas de mesófilos aerobios de 3×10^3 UFC/g en el orujo fresco

variedad Cabernet Sauvignon y <10 UFC/g para el orujo deshidratado. Los demás orujos deshidratados quedan fuera de lo establecido por la Norma Oficial Mexicana 218, que menciona como valor límite 50 UFC/g para mesófilos aerobios (SS, NOM-218-SSA1, 2011).

4.2 Efecto del tipo de extracción en las propiedades del extracto de orujo

Compuestos presentes en los vegetales con propiedades funcionales o tecnológicas han cobrado gran importancia en los mercados de alimentos. Se buscan métodos eficientes, económicos y favorables al ambiente para la extracción de estas sustancias (Azuola, 2007). En la actualidad existen varios métodos de extracción. La extracción a altas temperaturas es la más común, pero se han estudiado otros métodos no convencionales como el ultrasonido o microondas, que han mostrado mayores rendimientos y menos daño a los compuestos extraídos, además de ser amigables con el medio ambiente. Junto con el método de extracción, deben tomarse en cuenta otros aspectos como la temperatura y el tiempo de extracción, tipo de solvente y características del compuesto a extraer.

Tratamientos a diferentes temperaturas y con distintos métodos han sido evaluados para encontrar las variables óptimas, que ayuden a la extracción de una mayor cantidad de soluto por unidad de volumen de disolvente, y que, además, no provoquen daños en las estructuras de estos compuestos.

La extracción de los compuestos fenólicos del orujo de uva deshidratado se llevó a cabo a través de tres métodos (Figura 26), encontrándose un rendimiento 20% mayor para la maceración a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la maceración, y 56% mayor que con sonicación (42kHz; 100W) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, se mostró diferencia significativa entre los 3 métodos ($p\leq 0.05$) tanto para el contenido de fenoles totales como para la actividad antioxidante, con valores de 76.84 mg AG/ml extracto y 0.0897 mmol TE/ml extracto, respectivamente. Estos resultados difieren con estudios realizados por otros investigadores. Medina (2015) estudió el efecto del método de extracción en el contenido de fenoles del hollejo de uva roja, utilizando ultrasonido a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (25 kHz) y extracción por maceración a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, encontrándose diferencia significativa entre todos los métodos, y con una mayor obtención de estos compuestos con ultrasonido a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (540 mg AG/ml extracto) que con la extracción a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora (230 mg AG/ml extracto).

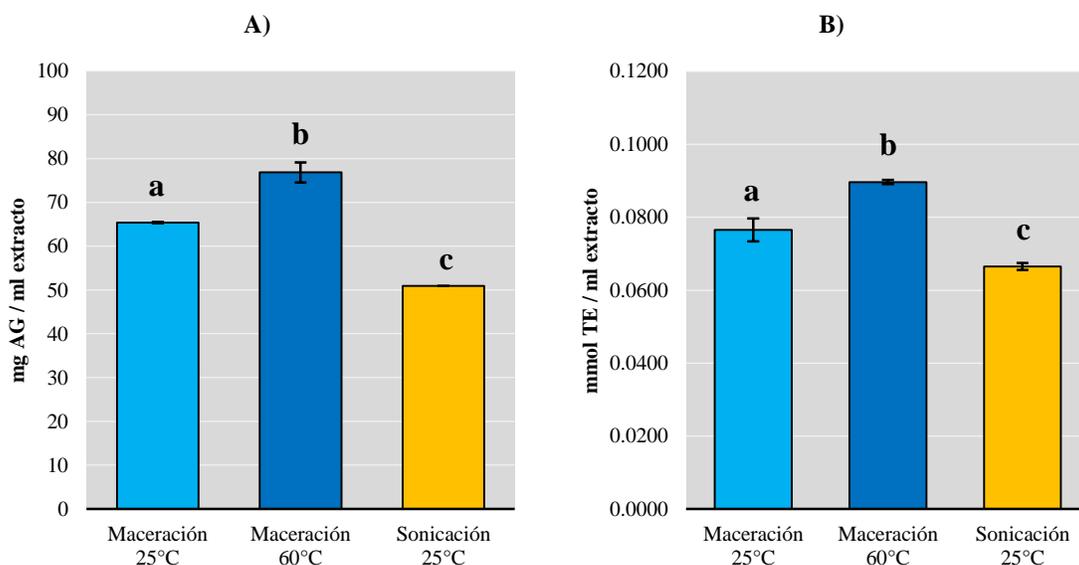


Figura 26. Contenido de fenoles totales (A) y actividad antioxidante (B) de extractos etanólicos de orujo Cabernet Sauvignon utilizando diferentes condiciones de extracción (tiempo de extracción: 1 hora). Las barras verticales indican la desviación estándar. Las letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa.

Comparando las condiciones de extracción se puede argumentar que la maceración realizada por Medina (2015) fue llevada a cabo a 70°C, temperatura a la cual se ha reportado degradación de los compuestos fenólicos, y debido a esto, se obtuvieron mejores resultados con sonicación. Después de 60 °C, los compuestos fenólicos se degradaron, traduciéndose este hecho en la disminución del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.

La frecuencia empleada en este proyecto fue de 42 kHz, y aunado a factores como la presencia de agua, exposición prolongada a las ondas de ultrasonido, así como un deficiente control de la temperatura, pueden afectar el rendimiento de la extracción.

Parámetros como la frecuencia y la intensidad de la radiación ultrasónica también deben ser evaluados para lograr una mayor extracción de los metabolitos secundarios de una planta con la menor cantidad de energía posible. Las frecuencias más empleadas deben estar entre 20 y 100 kHz en un intervalo de potencia de 100 a 800 W (Rodríguez, 2014).

El incremento de la intensidad de la radiación ultrasónica es eficiente hasta cierto valor a partir del cual no se logra modificar el equilibrio de extracción. Con el incremento de la frecuencia y la potencia puede ocurrir la degradación sonoquímica del producto de interés, ya que por reacción del sustrato con los radicales libres prevalece el mecanismo

sonoquímico sobre el mecanismo sonomecánico. Esta consideración es muy importante para lograr hacer de la extracción por ultrasonido un proceso económicamente más factible (Rodríguez, 2014).

Prieto (2011) estudió el efecto de la frecuencia (35 y 130 kHz) y tiempos de tratamiento (0, 15, 30, 45, 60 y 75 minutos) en la extracción de compuestos fenólicos del hollejo de uva roja. El contenido de fenoles totales se incrementó frente a las muestras sin tratamiento, alcanzando su máxima concentración a los 75 minutos y 35 kHz de extracción. La actividad antioxidante presenta una disminución en los tratamientos a 130 kHz en todos los tiempos de estudio, debido al desarrollo de reacciones redox catalizadas por las ondas de ultrasonido. A excepción del ácido gálico, todos los polifenoles analizados disminuyen su concentración comparando con los tratamientos de ultrasonido a 35 kHz y el control. Esto puede ser explicado por el efecto químico de la exposición de solventes orgánicos y medios acuosos a ondas de ultrasonido que favorecen la formación de radicales libres (Figura 26), como el radical hidroxilo, participando en reacciones secundarias con los compuestos presentes en el extracto, disminuyendo su concentración y a su vez, su actividad antioxidante (Prieto, 2011).

Cuando el agua se encuentra en una proporción mayor al 60 %, disminuye la eficiencia de la extracción ultrasónica debido al incremento de la formación de radicales libres a partir de la disociación del agua inducida por el US. En presencia de estas especies de gran energía pueden tener lugar reacciones de oxidación junto con las reacciones de extracción con lo que disminuye la cantidad de principio activo extraído (Rodríguez, 2014).

4.3 Compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico

El orujo de uva constituye cerca del 20% en peso de la producción de uva utilizada en la producción de vino, por lo cual, 10 millones de toneladas de residuos son generadas anualmente. Antocianinas, catequinas, flavonoles, ácidos fenólicos, así como alcohol y estilbenos, son los principales componentes del orujo de uva. Tan solo las antocianinas representan un subproducto muy importante, debido a que se utilizan como colorantes naturales en alimentos (Kammerer, 2004). Todos estos compuestos pueden tener aplicación en esta industria, razón por la cual se identificaron los polifenoles que predominan en el orujo por medio de electroforesis capilar.

La muestra del extracto etanólico de orujo de uva Cabernet Sauvignon fue inyectada en el equipo, y se identificaron los compuestos presentes añadiendo estándares para hacer crecer los picos. El tiempo de prueba fue de 30 minutos, a una temperatura de 25 °C, y se corrieron tres pruebas por cada compuesto identificado.

En la Figura 27 se muestra un electroferograma del extracto obtenido a partir del orujo fresco y deshidratado.

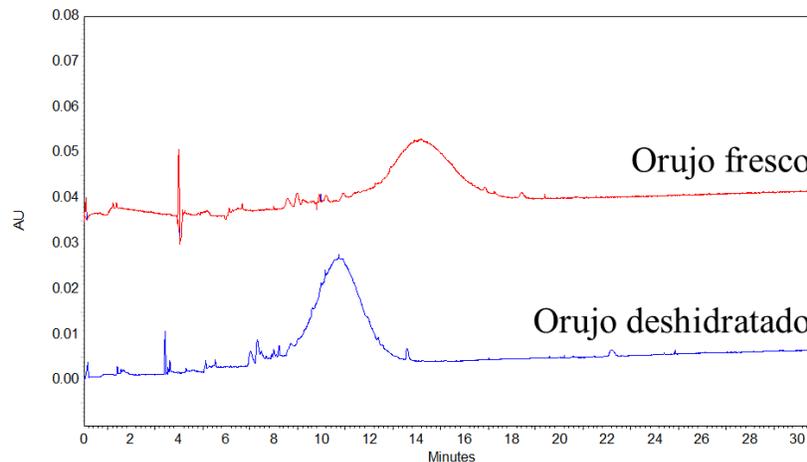


Figura 27. Electroferograma del extracto de orujo Cabernet Sauvignon fresco y deshidratado

La concentración de los compuestos debido al proceso de secado resulta en un ligero crecimiento de los picos, con una señal de 0.028 AU para el pico máximo en el caso del producto deshidratado. Para el orujo fresco, el pico máximo fue de 0.02 AU.

En la Figura 28 se indican los compuestos identificados en el extracto etanólico. Para más detalles de su identificación ver el ANEXO 2. Se identificó satisfactoriamente epicatequina, catequina, rutina, vainillina, ácido trans-cinámico, ácido coumárico, quercetina y ácido gálico. El ácido clorogénico, ácido gentísico, ácido ferúlico y kaempferol no se identificaron, pero se obtuvo una aproximación del tiempo de retención de cada uno de ellos gracias a la adición de los estándares y el posterior crecimiento de los picos correspondientes.

En diversos estudios se han encontrado flavonoides como catequina, epicatequina, así como los galatos (Thorsten, 2009), además de proantocianidinas como la procianidina B1 y B2 principalmente en la semilla (Kammerer, 2004), aunque también se pueden encontrar en el hollejo (Pinasseau, 2016). También se ha reportado la presencia de ácidos fenólicos como gálico, hidroxicinámico y coumárico en el orujo de uva (Mildner, 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

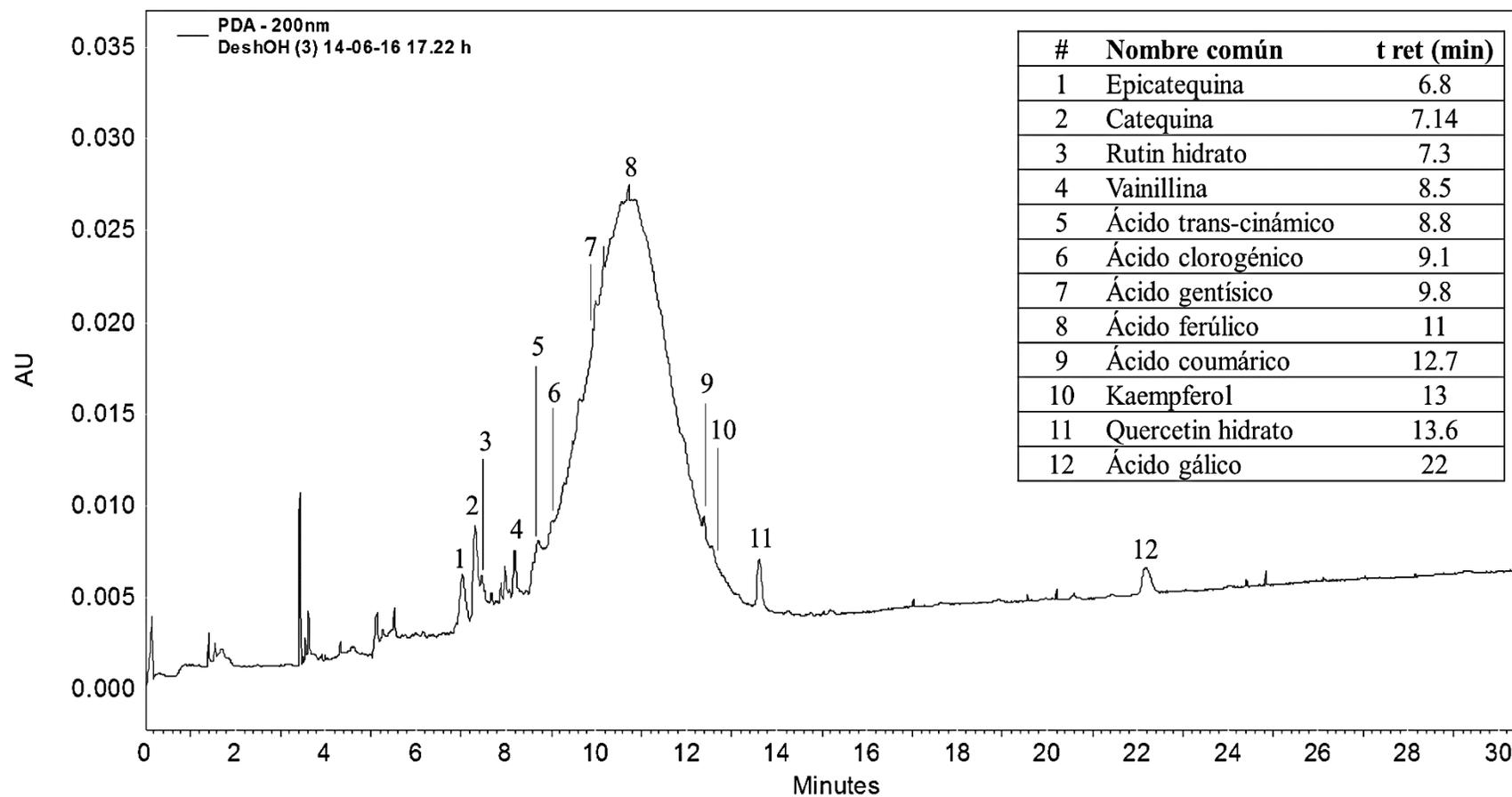


Figura 28. Electroferograma de orujo de uva roja variedad Cabernet Sauvignon deshidratado. Cada pico representa un compuesto identificado.

Se sospecha que las proantocianidinas, compuestos de pesos moleculares medios, son la causa del pico más grande registrado en el electroferograma del extracto, con tiempos de retención de 9 a 13 minutos. Las estructuras para los compuestos identificados se indican en la Figura 29.

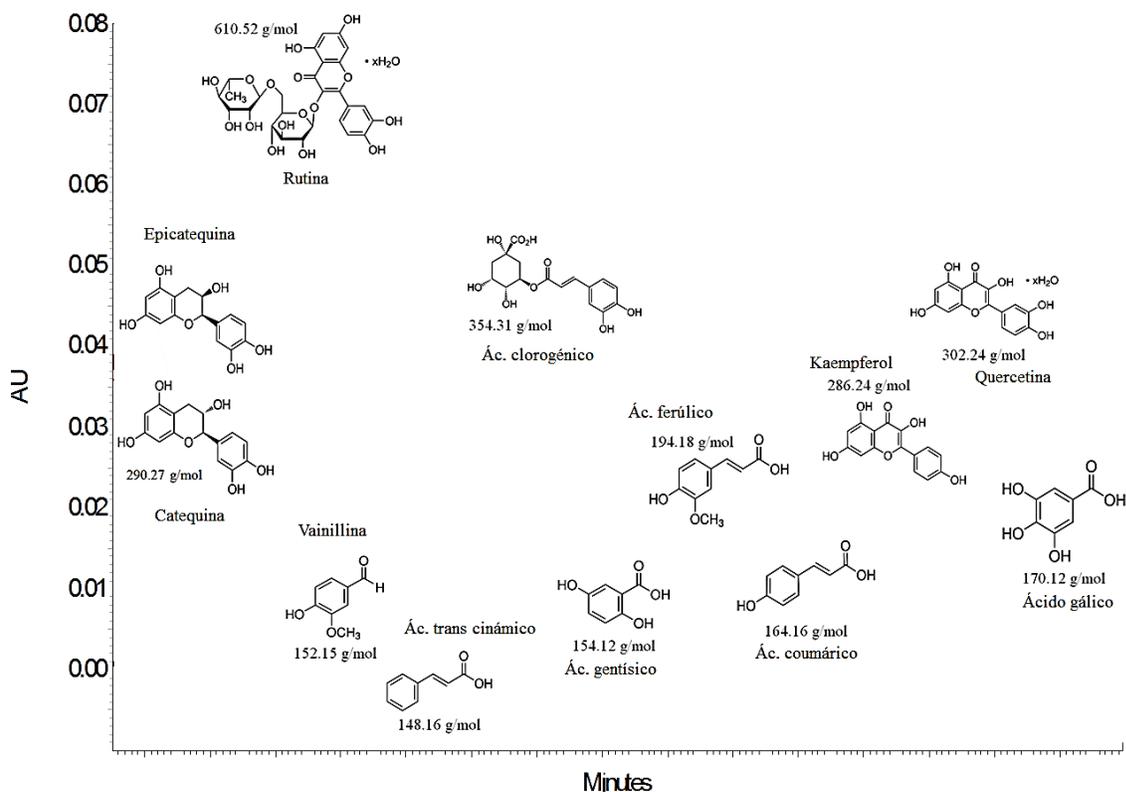


Figura 29. Estructuras de los compuestos identificados

A medida que aumenta el peso molecular de los compuestos fenólicos, es necesario disminuir la polaridad del disolvente. En la Figura 30 se observa que, al extraer con agua, no se registra la señal ancha producida por los polímeros encontrados en el extracto de orujo.

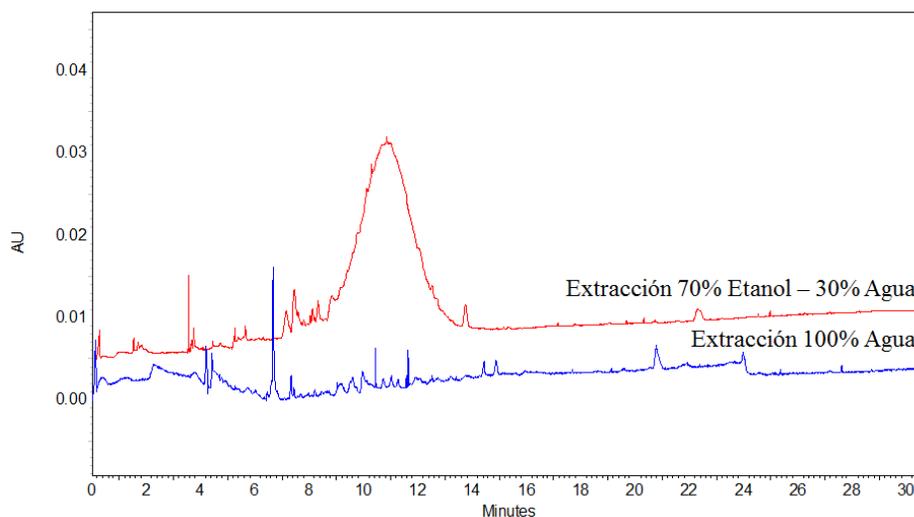


Figura 30. Electroferograma de extracto de orujo de uva roja, obtenido con (A) 70%etanol-30% H_2O y (B) H_2O

Para la hidrólisis de los compuestos de alto peso molecular (taninos condensados); así como la ruptura de los enlaces glicosídicos que suelen unir algunos compuestos fenólicos con azúcares, se llevó a cabo una maceración a $90^{\circ}C$ con HCl. Esto pudo haber dañado los compuestos fenólicos, por lo cual debe diseñarse un tratamiento menos agresivo, que sea capaz de descomponer los polímeros en sus unidades sin afectar las estructuras de los polifenoles. En la Figura 31 se observa la diferencia en las señales obtenidas en el electroferograma antes y después de la hidrólisis.

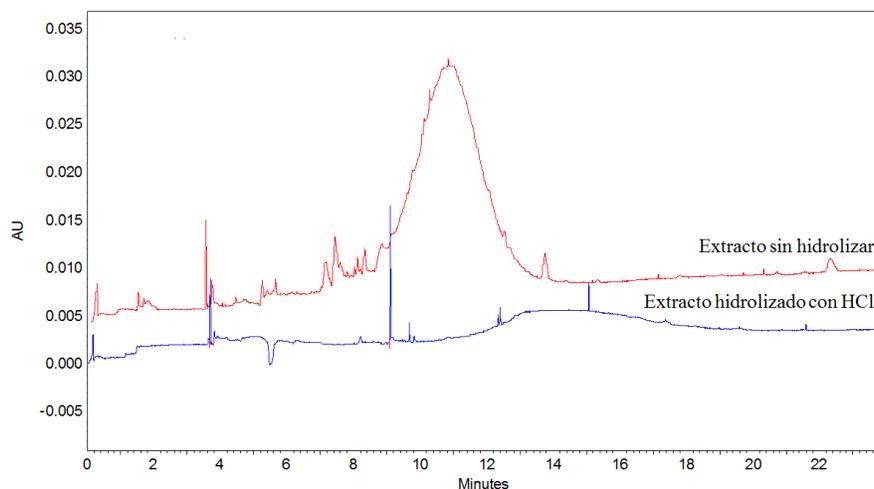


Figura 31. Electroferograma de extracto etanólico de orujo de uva (A) Sin hidrolizar (B) Hidrolizado con HCl

Los compuestos que se inyectaron como estándares para esta etapa de la identificación fueron epicatequina, rutina, catequina, ácido coumárico y ácido gálico, los cuales en su mayoría son monómeros que, a través de polimerización, forman proantocianidinas, por lo cual, se esperaba un aumento de las señales. Estos picos se muestran en la Figura 32.

El ácido gálico se forma principalmente debido a la hidrólisis de esteres galato durante la maceración, por lo que este compuesto puede ser fácilmente encontrado en vino tinto sus residuos. El ácido cinámico juega un papel muy importante en la ruta de biosíntesis de polifenoles, hasta convertirse en ácido coumárico, que es el sustrato en la formación de flavonoides y otros compuestos de tipo no flavonoide, entre los cuales se encuentran quercetina y ácido cafeico (Mildner, 2010).

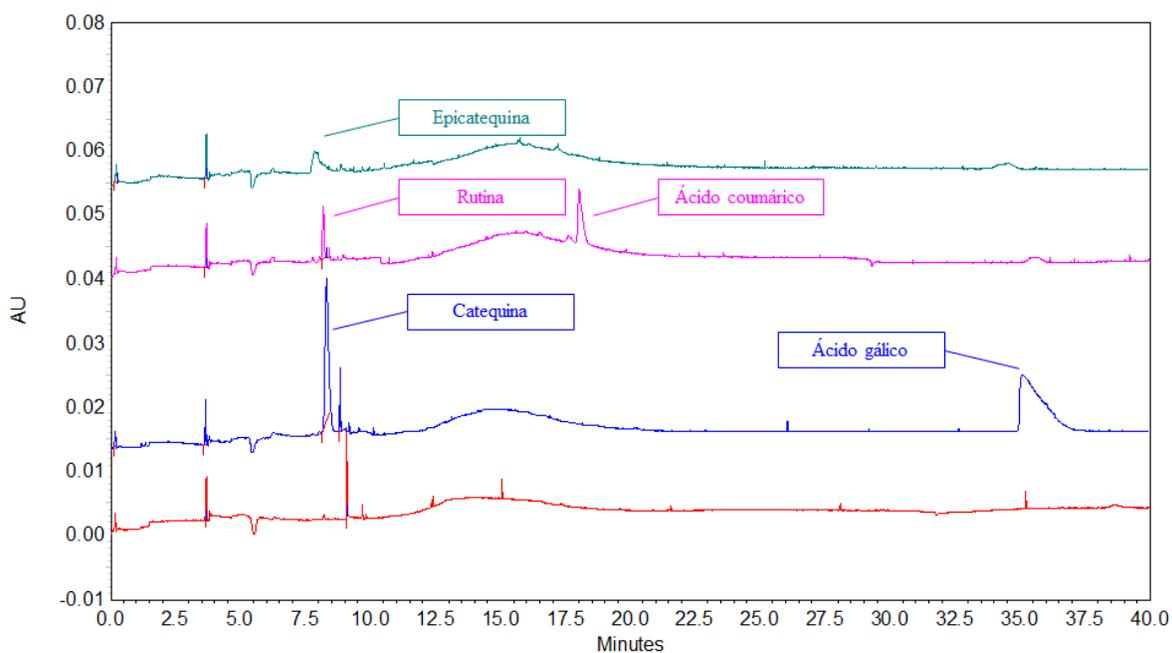


Figura 32. Compuestos identificados (monómeros) en extracto hidrolizado

En el extracto hidrolizado se encontró epicatequina y catequina en tiempos similares, por lo cual fue difícil identificar de qué compuesto se trataba. También se encontró ácido gálico a los 35 minutos. En conclusión, no se identificó ninguna señal adicional, solo se confirmó la presencia de algunos polifenoles ya identificados en el extracto inicial.

4.4 Evaluación sensorial de la bebida hidratante

El análisis sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído. Esta disciplina comprende un conjunto de técnicas para la medida precisa de las respuestas humanas a los alimentos e intenta aislar las propiedades sensoriales y aportar información útil para el desarrollo de productos, control durante la elaboración, vigilancia durante el almacenamiento, entre otras (Ramírez, 2012).

Las muestras evaluadas fueron preparadas utilizando las tres formulaciones propuestas. A través de la prueba de ordenamiento por rangos o prueba de Friedman (Watts, 1992) se obtuvo una indicación de la muestra con mayor aceptabilidad.

Según la tabla de diferencias críticas absolutas de la suma de rangos de Friedman (Nivel de significancia de 5%) (Watts, 1992), con 30 panelistas y tres muestras, el valor crítico tabulado para $p = 0.05$ es de 19. Por lo tanto, la aceptabilidad de la formulación B y C (589 y 236) fue significativamente diferente; asimismo, las formulaciones A y B no tuvieron diferencia significativa en aceptabilidad, lo mismo que para el caso de la comparación de la formulación A y C.

El panel interno consideró que la muestra más aceptable fue la B (589). No hubo diferencia significativa en lo que respecta a la aceptabilidad de las formulaciones A y C.

Con base en los resultados obtenidos, la formulación seleccionada en el presente estudio fue la B, con 30 g de fructosa, 30 g de glucosa y 10 g de sacarosa por litro de bebida.

4.5 Evaluación de propiedades en la bebida hidratante

Después de elegir la formulación de acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial, se preparó la formulación elegida y se midieron propiedades fisicoquímicas (pH y °Brix), químicas (fenoles totales y capacidad antioxidante), así como los análisis microbiológicos indicados en el numeral 6 de la NOM-218-SSA1-2011 (mesófilos aerobios y coliformes totales). Además, debido al origen del extracto, se llevó a cabo el análisis microbiológico de cuenta en placa para mohos y levaduras. Los resultados para todas las propiedades se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados obtenidos para las pruebas llevadas a cabo para el modelo de bebida hidratante

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	pH	3.28
	°Brix	6.9
PROPIEDADES QUÍMICAS	Fenoles totales	443.28±0.0339 mg AG/600 mL de bebida
	Actividad antioxidante	0.3053±0.0229 mmol TE/600 mL de bebida
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	Mesófilos aerobios	<10*
	Coliformes totales	<10*
	Mohos y levaduras	<10*
*Diluciones de 1×10^{-1} para todos los análisis microbiológicos		

Los resultados para las propiedades fisicoquímicas pueden compararse con los del producto comercial Gatorade®, el cual tiene un pH de 3.22 y 5.7 °Brix, valores relacionados con sus componentes, principalmente el ácido cítrico y los compuestos en solución.

La adición del extracto seco a la formulación le dio otras ventajas al consumo de este producto, ya que, a diferencia de otras bebidas isotónicas, tiene un aporte de polifenoles con actividad antioxidante.

Si se compara el contenido de fenoles totales del vino, que va de 2000 a 3600 mg/L (Landrault & Poucheret, 2001; Salazar, 2011; Van Leeuw, 2014) con los de la bebida formulada en este proyecto, se encontrará que el aporte de polifenoles es del 20% con respecto de un litro de vino tinto, a pesar de haberse obtenido a través de los residuos de la industria, con aproximadamente 740 mg/L de bebida hidratante. Considerando que para extraer esta cantidad de polifenoles solamente se requiere 1.875 g de orujo deshidratado, se puede comprender más fácilmente la ganancia que representaría el poder aprovechar estos compuestos.

Al observar la actividad antioxidante del producto, se encontró que 0.5088 mmol TE/L de bebida representa apenas el 2% de la actividad antioxidante del vino. Van Leeuw, por ejemplo, determinó una capacidad antioxidante de 25.23 a 42.67 mmol de ET/L (Van Leeuw, 2014).

Debido a que la obtención del vino tinto y la extracción de compuestos fenólicos para este estudio se llevaron a cabo con distintas metodologías, las concentraciones y los compuestos encontrados en el vino y en el extracto adicionado a la bebida fueron diferentes, y, por lo tanto, sus propiedades químicas también. Por eso no es extraño que la actividad antioxidante de la bebida se encuentre por debajo de la reportada para el vino. Además,

debe recordarse que estos compuestos se obtuvieron a partir de un residuo, con la intención de encontrar una alternativa para su aprovechamiento.

Por último, se concluyó que la bebida para deportistas adicionada con el orujo de uva variedad Cabernet Sauvignon deshidratado que se utilizó en este trabajo es segura para su consumo, ya que los valores obtenidos para conteo en placa son <10 UFC/g para todos los indicadores. También deben llevarse a cabo pruebas de vida de anaquel para asegurar que los valores encontrados se mantienen con respecto del tiempo, y ofrecer un producto que cumpla con las características mencionadas al momento de su lanzamiento.

Se puede reformular la bebida para aumentar el aporte de polifenoles y la actividad antioxidante. Para llevar a cabo esto, debe tomarse en cuenta que las propiedades sensoriales del producto no se vean afectadas debido a que algunos polifenoles producen sabores astringentes y/o amargos.

5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

- Las variedades del orujo de uva no tuvieron efecto en sus propiedades fisicoquímicas (pH, acidez y °Brix), pero sí la presentación del orujo; esto es fresco o deshidratado. Para el caso del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante, así como en la calidad microbiológica del producto, sí se encontró diferencia significativa entre variedades. El orujo deshidratado Cabernet Sauvignon presentó los valores más altos en contenido de fenoles y actividad antioxidante. Además, tuvo una cuenta en placa de mesófilos aerobios de <10 UFC/g, demostrando que es un producto inocuo. Por estas razones fue elegido como materia prima para la obtención de los compuestos fenólicos aplicados en la bebida.
- El extracto etanólico obtenido a partir de maceración a 60 °C tuvo la mayor concentración de polifenoles y actividad antioxidante, mostrando diferencia significativa con respecto de la sonicación y la extracción a 25 °C.
- Se identificó epicatequina, catequina, rutina, vainillina, ácido trans-cinámico, ácido coumárico, quercetina y ácido gálico, que contribuyen a las propiedades químicas del orujo deshidratado variedad Cabernet Sauvignon utilizada en este proyecto.
- El extracto seco obtenido a partir de la evaporación del extracto etanólico de orujo Cabernet Sauvignon es apto para su aplicación en una bebida hidratante, con las ventajas de enriquecer este alimento funcional, que puede tener efectos benéficos en la salud de los consumidores.

6 RECOMENDACIONES

- Optimizar el procedimiento de extracción para encontrar la relación soluto-disolvente.
- Posibilidad de utilizar la liofilización y compararla con el secado a 40 °C para observar si se puede aumentar el rendimiento.
- Estudiar el efecto de la frecuencia de sonicación en la degradación de los compuestos fenólicos mediante electroforesis capilar para diferentes variedades de uva.
- Identificar los compuestos fenólicos de cada variedad de orujo y estudiar la relación que tiene cada compuesto en las propiedades químicas del extracto.
- Realizar un análisis detallado del perfil de polifenoles contenidos en el orujo de uva, cuantificando cada uno de los compuestos encontrados.
- Incluir los galatos y las procianidinas B1y B2 en los estándares a identificar por medio de electroforesis capilar.
- Aplicar otra metodología para hidrolizar los taninos, utilizando ácidos orgánicos en concentraciones bajas o a través de enzimas.
- Estudiar la cinética de degradación de cada uno de los compuestos identificados en solución acuosa y posteriormente en diversos sistemas alimenticios.
- Estudiar el efecto de los extractos aplicados en aceites para retrasar la oxidación de estos productos.
- Comparar el extracto obtenido contra otros antioxidantes naturales y sintéticos
- Determinar la vida de anaquel de la bebida hidratante adicionada con compuestos polifenólicos de la uva.

ANEXO 1

GENERALIDADES DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Lavado del equipo antes de iniciar la identificación

Para colocar las soluciones se utilizan viales. Por default se utilizan 3 viales, que se llenan a 3/4 de su capacidad, con agua desionizada (BI: A1), NaOH 0.1N (BI: B1) y el buffer de tetra boratos (BI:C1), respectivamente. Además, se coloca un vial vacío en la charola de salida (BO: A1) y dos viales más con buffer en las charolas de entrada y salida (BI: D1 y BO: D1) para llevar a cabo la separación, como se ilustra en la Figura 33:

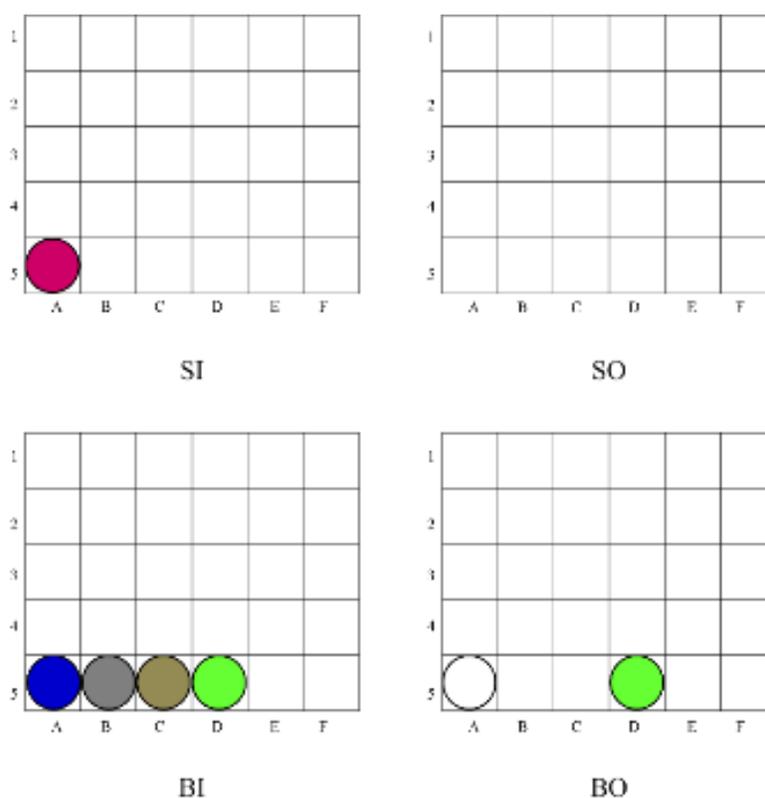


Figura 33. Arreglo de viales dentro del sistema de electroforesis capilar

Se enciende el equipo presionando el botón de “Power”, y posteriormente se ejecuta el software 32 Karat, donde se selecciona el equipo PACE MDQ1 – DAD (Diode Array Detector). Debe realizarse un lavado con las condiciones indicadas en la Tabla 22.

Tabla 22. Condiciones de lavado del equipo

ETAPA	PRESIÓN (PSI)	DURACIÓN (MIN)	BI	BO
1	30 psi	2 min	A1	A1
2	30 psi	10 min	B1	A1
3	30 psi	2 min	A1	A1
4	30 psi	10 min	C1	A1

Para ajustar las condiciones debe considerarse la longitud total L_T , el campo E y el voltaje V:

$$E = \frac{V}{L_T}$$

$$V = L_T * E$$

Durante esta prueba, los valores para la longitud total L y el campo E fueron:

- $L_T=53.4$ cm
- $E=0.518$ kV/cm

Dando como resultado para el voltaje un total de 30 kV:

$$V = 53.4 \text{ cm} * 0.518 \frac{\text{kV}}{\text{cm}} = 27.66 \text{ kV} \approx 30 \text{ kV}$$

ANEXO 2

ELECTROFEROGRAMAS

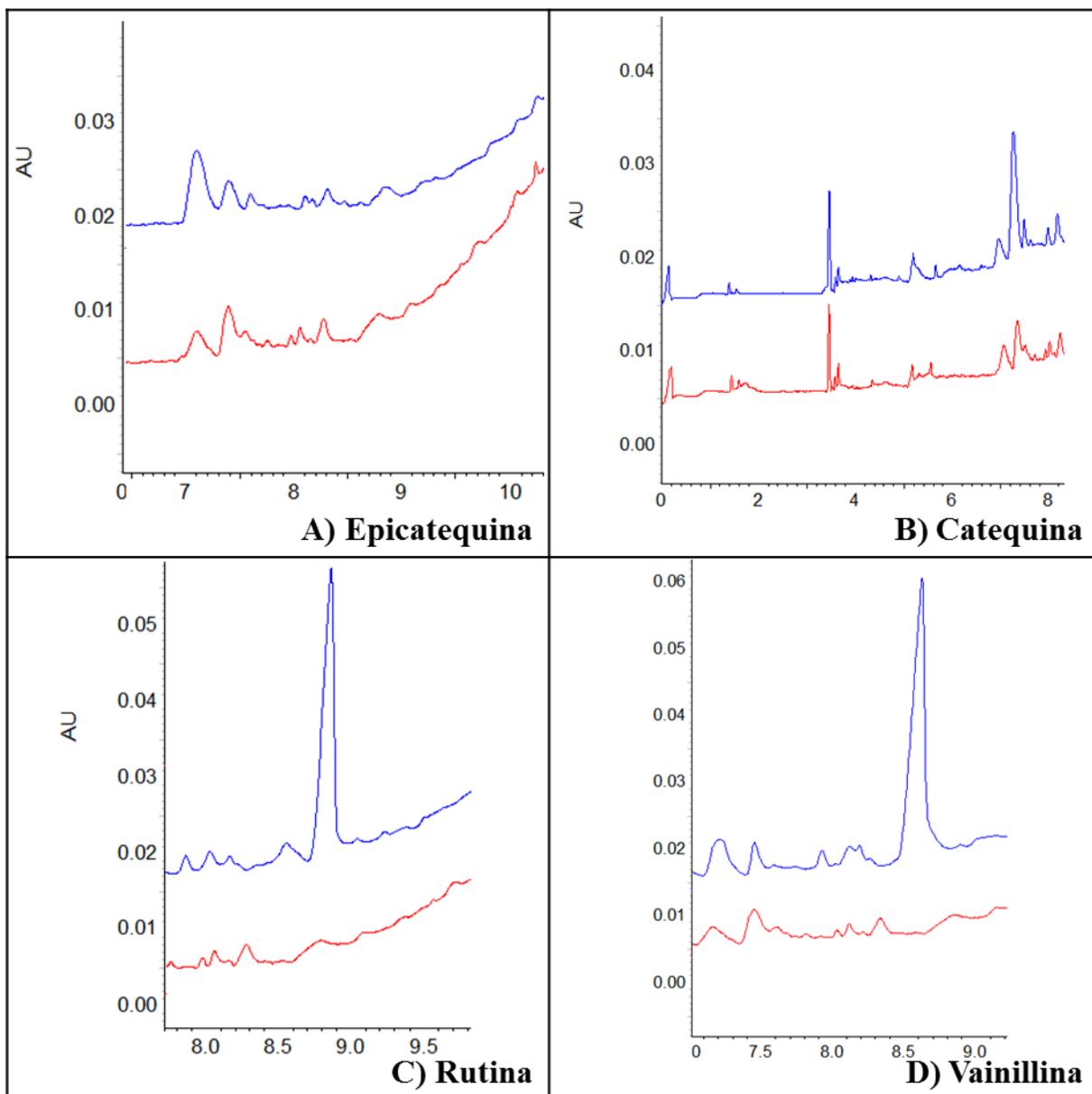


Figura 34. Electroferogramas de la identificación de cada polifenol por el método de adición de estándar (A-D). La línea roja es la señal del extracto y la línea azul corresponde al extracto adicionado con estándar. Los compuestos mostrados son A) Epicatequina, B) Catequina, C) Rutina y D) Vainillina.

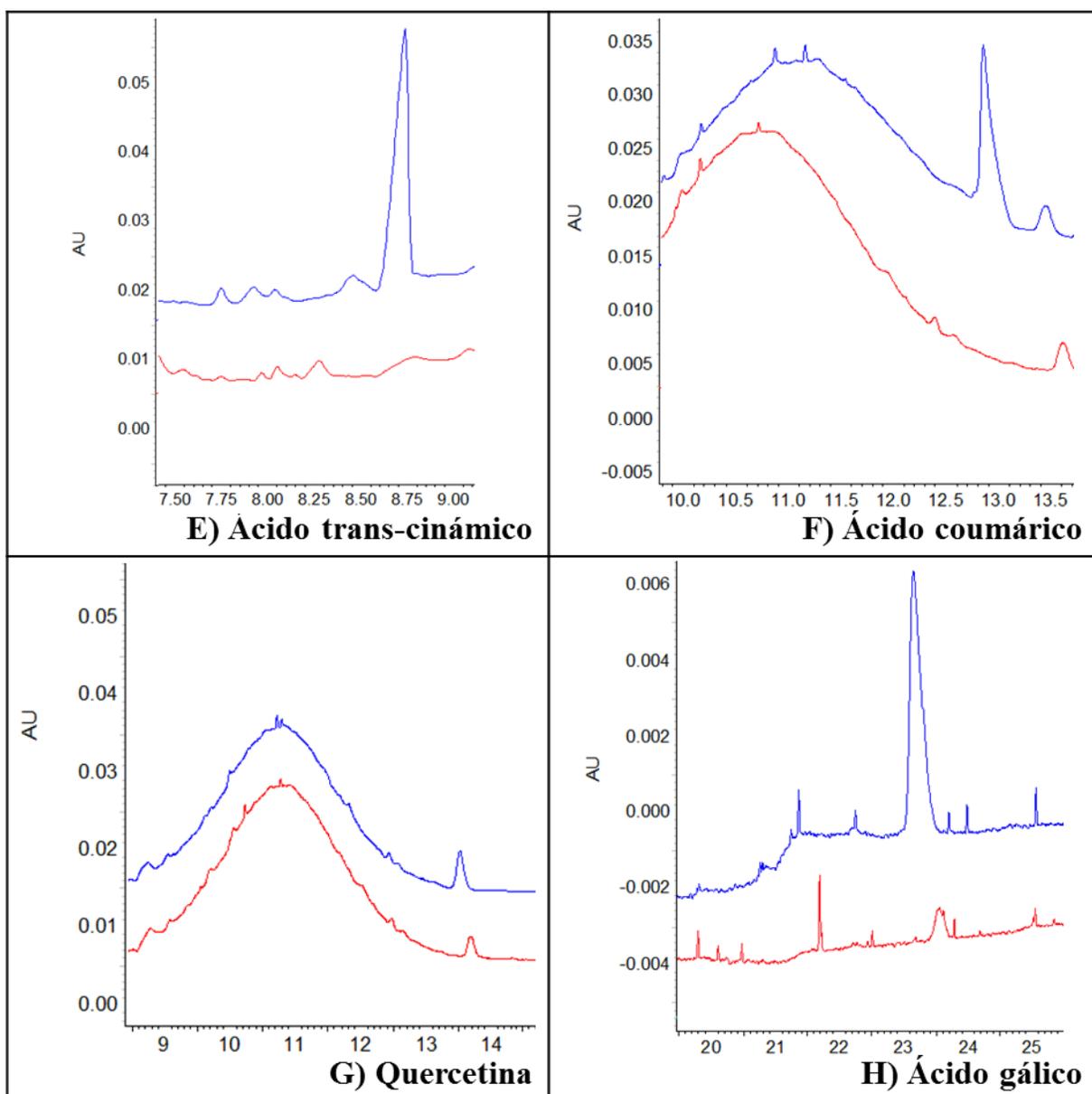


Figura 35. Electroferogramas de la identificación de cada polifenol por el método de adición de estándar (E-H). La línea roja es la señal del extracto y la línea azul corresponde al extracto adicionado con estándar. Los compuestos mostrados son E) Ácido trans-cinámico, F) Ácido coumárico, G) Quercetina y H) Ácido gálico.

ANEXO 3

CÁLCULOS PARA LA FORMULACIÓN DE LA BEBIDA HIDRATANTE

Formulación de la bebida hidratante

A continuación, se describen con mayor detalle los criterios consultados para la definición de las cantidades para cada ingrediente.

- **Sales**

En la Tabla 23 se resumen los pesos moleculares y contenido de Sodio y Potasio por cada gramo de sustancia. Con esta información, se definió la cantidad de sales que deben adicionarse por cada litro de bebida hidratante.

Tabla 23. Cálculos para definir la cantidad de sales adicionadas a la bebida

NOMBRE DE LA SAL	FÓRMULA QUÍMICA	PESO MOLECULAR POR COMPUESTO (G/MOL)	PESO MOLECULAR DE LA SAL (G/MOL)	RELACIÓN COMPUESTO/SAL (EN 1 MOL)	RELACIÓN COMPUESTO/SAL (MG/G)
FOSFATO MONO POTÁSICO	KH_2PO_4	$K = 39.09 \text{ g/mol}$ $H_2 = 2 \text{ g/mol}$ $P = 30.97 \text{ g/mol}$ $O_4 = 64 \text{ g/mol}$	136.06 g/mol	$\frac{39.09 \text{ g K}}{136.06 \text{ g fosfato}}$	$287.2 \frac{\text{mg K}}{\text{g fosfato}}$
CLORURO DE SODIO	$NaCl$	$Na = 22.98 \text{ g/mol}$ $Cl = 35.45 \text{ g/mol}$	58.43 g/mol	$\frac{22.98 \text{ g Na}}{58.43 \text{ g cloruro}}$	$393.29 \frac{\text{mg Na}}{\text{g cloruro}}$
CITRATO DE SODIO DI HIDRATADO	$Na_3C_6H_5O_7H_4O_2$	$Na_3 = 68.94 \text{ g/mol}$ $C_6 = 72 \text{ g/mol}$ $H_5 = 5 \text{ g/mol}$ $O_7 = 112 \text{ g/mol}$ $H_4 = 4 \text{ g/mol}$ $O_2 = 32 \text{ g/mol}$	293.94 g/mol	$\frac{68.94 \text{ g Na}}{293.94 \text{ g citrato}}$	$234.54 \frac{\text{mg Na}}{\text{g citrato}}$

En función a los resultados obtenidos, se decidió agregar las siguientes cantidades de sales por cada litro de bebida:

0.5 g	Cloruro de sodio	196.65 mg Sodio
0.5 g	Citrato de sodio	117.27 mg Sodio
1.0 g	Fosfato mono potásico	287.54 mg Potasio

Estos valores son constantes para las 3 formulaciones que se definirán en el apartado de Azúcares.

- **Azúcares**

Se establecieron 3 formulaciones, basándose en las referencias. Una formulación se estableció con 50% Fructosa y 50% Glucosa (Maughan, 2009), otra de acuerdo a la información encontrada en un estudio de etiquetas (PROFECO, 2011) para una formulación comercial, con 42% Fructosa, 42% Glucosa y 16% Sacarosa, y, por último, una tercera formulación con 50% Glucosa y 50% Sacarosa, para evaluar la aceptabilidad de las mezclas de azúcares en un análisis sensorial.

El contenido total de azúcares se fijó en 70 g de azúcares por litro de bebida para las tres formulaciones.

- **Polifenoles del orujo de uva**

Considerando un contenido de fenoles totales de 76.84 mg AG/mL de extracto concentrado, se calculó la cantidad de extracto necesaria para obtener un mínimo de 120 mg de ácido gálico por cada 600 mL de bebida, debido a que se encontraron productos en el mercado que declaran polifenoles en concentraciones de hasta 125 mg por 600 mL de bebida. A continuación, se indica la secuencia de cálculo:

$$1 \text{ extracción} = \frac{0.375 \text{ g orujo}}{1.5 \text{ mL etanol } 70\%} = 0.7 \text{ mL extracto concentrado}$$

$$0.7 \text{ ml extracto concentrado} \left(\frac{76.84 \text{ mg Ácido Gálico}}{1 \text{ mL extracto concentrado}} \right) = 53.78 \text{ mg Ácido Gálico}$$

$$120 \text{ mg Ácido Gálico} \left(\frac{1 \text{ extracción}}{53.78 \text{ mg Ácido Gálico}} \right) = 2.23 \text{ extracciones} \cong 3 \text{ extracciones}$$

Se ajusta el cálculo para 3 extracciones, con lo que se obtiene una concentración teórica de 161.36 mg de Ácido Gálico por cada 600 mL. Es así que, para un litro de bebida, debe agregarse el extracto seco equivalente a 5 extracciones:

$$1000 \text{ mL bebida} \left(\frac{161.36 \text{ mg Ácido Gálico}}{600 \text{ mL bebida}} \right) \left(\frac{1 \text{ extracción}}{53.78 \text{ mg Ácido Gálico}} \right) = 5 \text{ extracciones}$$

El extracto etanólico obtenido de las 5 extracciones se evaporó hasta obtener un extracto seco, que se adicionó a la bebida al final del proceso de mezclado.

7 REFERENCIAS

1. Alarcón, L. (2001). *Manual de Prácticas de Microbiología Básica y Microbiología de Alimentos*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, México.
2. Alzate, L. M. (2011). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para mejorar la calidad sensorial y nutricional de productos avícolas. *Producción + limpia*, VI (1), 108-127. Antioquia, Colombia.
3. Azuola, R. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 10(4), 30-40. Cartago, Costa Rica.
4. Barberán, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*, 5(2), 41-53. Murcia, España.
5. Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios Generales de los Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España.
6. Berdahl, D. (2010). Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. En E. A. Decker, R. J. Elias, & D. J. McClements (Edits.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*, 1 (1), 408-409. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
7. BID. (2000). *Trayectoria y Demandas Tecnológicas de las Cadenas Agroindustriales en el Mercosur Ampliado. Vinto y Frutas: Uva de Mesa y Pasas*. Montevideo: PROCISUR.
8. Cabello, P. (18 de Enero de 2012). *Fratelli Pasini. Tanques de fermentación*. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de <http://vinospasini.blogspot.mx/2012/01/tanques-de-fermentacion-ii-volumen-y.html>
9. Castro, R. (2012). Calidad de uva de mesa CV. Princess (*Vitis vinifera* L.) y conservación del raquis por defecto del 1-MCP. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(1), 37-47. Hermosillo, México.
10. Christian, G. D. (2009). *Química Analítica* (6 ed.). Madrid, España: MC GRAW HILL.
11. Club_Planeta. (2014). *Regiones vinícolas del mundo*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2015, de http://www.clubplaneta.com.mx/bar/regiones_vinicolas_del_mundo.htm
12. CODEX. (1981). *Codex Stand 67-1981. Norma del CODEX para las uvas pasas*.
13. Comerge. (20 de Abril de 2016). *BODEGAS COMENGE*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://www.comenge.com/blog/cultura-viticola/que-diferencia-hay-entre-una-uva-de-mesa-y-una-de-vinificacion.html>
14. Cruz, L. (2012). Extracción de polifenoles a partir de hollejo de uva. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22(3), 10-15. La Habana, Cuba.

15. Eskin, N. A., & Przybylski, R. (2000). Antioxidants and Shelf Life of Foods. En N. A. Eskin, & D. S. Robinson (Edits.), *Food Shelf Life Stability* (pág. 370). Florida, USA: CRC PRESS.
16. FAO. (2015). *FAOSTAT*. Recuperado el 4 de Junio de 2016, de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
17. Farias, M. (2015). *Fundamentos de bacteriología*. México: Trillas.
18. Fernández, M. S. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Publicación Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 56(2), 201-225.
19. Fernaroli, G. (1975). *Handbook of flavor ingredients* (Vol. I). New York: CRC PRESS.
20. Furlan, W. D. (2011). *Instrumentos ópticos y optométricos: Teoría y prácticas*. Valencia: Els Autors.
21. García. (2009). Compuestos bioactivos de frutos templados y sus beneficios en la salud. En G. A. González Aguilar, E. Álvarez Parrilla, L. A. De la Rosa, I. G. Olivas, & J. F. Ayala Zavala (Edits.), *Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos y cortados* (págs. 195-210). México: Trillas.
22. Garijo, P. (2011). Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period. *European Food Research and Technology*, 1 (233), 359-365.
23. Geana, E. (2016). Changes in polyphenolic content of berry skins from defferent red grapes cultivars during ripening. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 95-104.
24. González, V. (2001). *Revisión de la Composición de las Barras y Bebidas Comerciales para Deportistas. Tesis de Química Farmacéutica Bióloga*. México: UNAM.
25. Guendez, R. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry*, 1-9.
26. Guo, M. (2009). *Functional foods: Principles and technology*. Cambridge, England: CRC PRESS.
27. Guy, J. P., & Wood, R. (1974). *Beverages carbonated and noncarbonated*. Westport: The AVI Publishing Company. USA.
28. Harvey, D. (2002). *Química analítica moderna*. Madrid, España: MC GRAW HILL.
29. Hollman, P. C. (2000). Flavonoids, flavones, and flavanols-nature, ocurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and agriculture*(31), 1081-1093.
30. Jorstad, C. (6 de Febrero de 2015). Juez federal desestima Twinings falso anuncio. Demanda colectiva. Arkansas, Estados Unidos. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <https://topclassactions.com/lawsuit-settlements/lawsuit-news/49119-federal-judge-dismisses-twinings-false-ad-class-action/?lang=es>

31. Kader, A. A. (2011). *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas*. California: UCANR Publications. USA.
32. Kammerer, D. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and White grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(52), 4360-4367.
33. Kántor, A., & Kačániová, M. (2015). Diversity of Bacteria and Yeasts on the surface of Table Grapes. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*(48), 149-155.
34. Landrault, N., & Poucheret, P. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(49), 3341-3348.
35. Liu, R. H., & Felice, D. L. (2007). Antioxidants and whole food phytochemicals for cancer prevention. En F. Shahidi, & C.-J. Ho (Edits.), *Antioxidant measurement and applications* (págs. 15-34). American Chemical Society, Washington D. C.
36. LUCOZADE. (2015). *Lucozade Sport Science*. Recuperado el 3 de Abril de 2016, de www.lucozade.com/science
37. Manach, C., & Scalbert, A. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, (79)727-747.
38. Martel, P., & Pascal, G. (2000). Aditivos antioxidantes. En J. L. Multo (Ed.), *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias* (pág. 806). Zaragoza: ACRIBIA.
39. Maughan, R. J. (2009). Sports beverages for optimizing physical performance. En P. Paquin (Ed.), *Functional and speciality beverage technology* (pág. 500). Cambridge: CRC PRESS.
40. Mazza, G., & Girard, B. (1998). *Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado*. Zaragoza, España: ACRIBIA.
41. Medina, I. (2015). Assisted extraction of bioactive compounds from plum and grape peels by ultrasonics and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*(166), 268-275.
42. Mejía, J. (2015). *CUIB, UNAM*. Recuperado el 25 de Agosto de 2015, de El perfil normativo de los vitivinicultores en el estado de Querétaro: El cultivo de la vid. Avances.: http://cuib.unam.mx/publicaciones/15/16.NECESIDADES_DE_INFORMACION_EL%20perfil%20informativo_JOSE_MEJIA_RUIZ.html
43. Menéndez. (2013). *Los alimentos funcionales. Nuevos alimentos para un nuevo estilo de vida*. Asturias, España: EDICIONES TREA.
44. Mildner, S. (2010). Phenolic compounds from winemaking waste and its antioxidant activity towards oxidation of rapeseed oil. *International Journal of Food Science / Technology*(45), 2272-2280.
45. Milic, B. (1998). Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*(61), 441-447.

46. Murkovic, M. (2003). Phenolic compounds. En M. Murkovic, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (págs. 4507-4514). Norwich, U. K.
47. OIV. (2015). *Organización Internacional de la Viña y el Vino*. Obtenido de http://www.oiv.int/oiv/info/es_press_conference_OIV_oct_2015?lang=es
48. Panda, H. (2011). *The Complete Book on Wine Production*. Delhi, India: NPCS.
49. Pazos. (2005). *Inhibición de la oxidación lipídica en el músculo de pescado mediante la utilización de polifenoles obtenidos a partir del bagazo de uva*. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España.
50. Pedrero, D. (1989). *Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos Analíticos*. México: ALHAMBRA MEXICANA.
51. Piccardo, D. (2013). Extracción de Polifenoles y Composición de Vinos Tintos Tannat Elaborados por Técnicas de Maceración Prefermentativa. *Revista Agrociencia Uruguay*.
52. Pinasseau, L. (2016). A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS Method to Characterize and Quantify Grape Skin Tannins after Chemical Depolymerization. *Molecules*, 1-13.
53. PlantVid. (2015). *Plantvid.com*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de Venta de variedades de uva de vinificación tintas: <https://plantvid.com/uva-de-vinificacion-tinta>
54. Popkin, B. (2009). The role of beverages in a healthy diet: Key issues and guidelines. En P. Paquin (Ed.), *Functional and speciality beverage technology* (págs. 451-483). CRC PRESS.
55. Prieto, R. (2011). Extracción con ultrasonido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de uva variedad Isabella (*Vitis labrusca*). *Revisión de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 11(1), 119-126.
56. PROFECO. (2011). *El laboratorio de PROFECO reporta: Estudio de calidad. Bebidas hidratantes para deportistas*. México: Revista del Consumidor.
57. Quiñones. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*.
58. Ramírez, J. S. (2012). Análisis sensorial: Pruebas orientadas al consumidor. *ReCiTeIA*, 12(1), 84-102.
59. Rodier, J. (1981). *Análisis de aguas: Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar*. Barcelona: OMEGA.
60. Rodríguez, Z. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 139-147.
61. Rodríguez-Riera, Z. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *CENIC Ciencias Químicas*, 1(45), 139-147.

62. Rouessac, F. (2003). *Métodos y técnicas instrumentales modernas. Teoría y ejercicios resueltos*. Madrid, España: MC GRAW HILL.
63. Ruíz, M. (2 de Mayo de 2007). *La Rioja*. Recuperado el 14 de Enero de 2017, de Sobre los valores de pH y rh del vino: http://www.larioja.com/prensa/20070502/rioja_region/sobre-valores-vino_20070502.html
64. SAGARPA. (2014). *SIAP SAGARPA*. Recuperado el 25 de Junio de 2016, de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
65. Salazar, R. (2011). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2 (77), 135-143.
66. SE. (1986). NMX-f-083. *Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios*.
67. Seeram, N. P., & Heber, D. (2007). Impact of berry phytochemicals on human health: Effects of beyond antioxidation. En F. Shahidi, & C.-T. Ho (Edits.), *Antioxidant Measurement and Applications* (págs. 326-336). Washington, D. C., U. S. A.
68. Shi, X. (1995). Effect of carbohydrate type and concentration and solution osmolality on water absorption. *Journal of applied physiology*(27), 1607-1615.
69. Singleton, V. L.-R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 152-178.
70. SS. (1994). NOM-086-SSA1. *Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales*.
71. SS. (1994). NOM-092-SSA1. *Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*.
72. SS. (1994). NOM-111-SSA1. *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. México.
73. SS. (1994). NOM-113-SSA1. *Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*. México.
74. SS. (1996). NOM-120-SCFI. *Información comercial-Etiquetado de productos agrícolas-Uva de mesa*.
75. SS. (2011). NOM-218-SSA1. *Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba*.
76. Suárez, J. (1992). *Microbiología enológica: Fundamentos de vinificación* (Segunda ed.). Madrid: EDICIONES MUNDI-PRENSA.
77. Thorsten, M. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera L.*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*(112), 551-559.
78. Togores, J. H. (2003). *Tratado de enología*. Barcelona, España: Ediciones Mundi-Prensa.

79. Tovar del Río, J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología.
80. Van Leeuw, R. (2014). Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grapes: Specificity of Pinot Noir. *Journal of food Composition and Analysis*(36), 40-50.
81. Vinetur. (27 de Julio de 2015). *Vinetur. La revista digital del vino*. Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de El 55% de la producción de uva en el mundo se destina a elaboración de vino: <https://www.vinetur.com/2015072720379/el-55-de-la-produccion-de-uva-en-el-mundo-se-destina-a-elaboracion-de-vino.html>
82. Wach, A., & Pyrzynska, K. (2005). Quercetin content in some food and herbal samples. En *Food Chemistry* (págs. 699-704). ELSEVIER: Warsaw, Poland.
83. Watson, E. (2014). *FOODnavigator-usa.com*. Recuperado el 12 de Agosto de 2015, de Breaking news on food & beverage development - North America: Bai Brands under fire over “antioxidant-packed” claims as judge allows false advertising lawsuit proceed: http://www.foodnavigator-usa.com/Regulation/Bai-Brands-under-fire-over-antioxidant-packed-claims?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright
84. Watts, B. M. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. Ottawa, Ontario, Canadá: CIID.
85. Wilson, G. (2004). Efecto de substratos orgánicos sobre el crecimiento inicial de la vid *Vitis vinifera L.* Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias, Ecuador.
86. Young, V. R. (2002). 2001 W. O. Atwater memorial lecture and the 2001 ASNS president's lecture: Human nutrient requirements: the challenge of the post-genome era. *Journal of Nutrition*, 4(132), 621-629.