



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**ESTUDIO QUÍMICO, ESPECTROSCÓPICO Y TOXICOLÓGICO DE LA  
DEGRADACIÓN TÉRMICA DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Ingeniero en Alimentos ANA LUISA CHÁVEZ HERNÁNDEZ

DR. RAÚL GUILLERMO ENRÍQUEZ HABIB  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., , AGOSTO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESTUDIO QUÍMICO, ESPECTROSCÓPICO Y TOXICOLÓGICO DE  
LA DEGRADACIÓN TÉRMICA DEL ACEITE DE SEMILLA DE UVA**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Ingeniero en alimentos ANA LUISA CHÁVEZ HERNÁNDEZ**



## JURADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada	Instituto de Química, UNAM
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa	Instituto de Química, UNAM
Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla	Instituto de Química, UNAM
Vocal: Dra. Julia Cassani Hernández	UAM-Xochimilco
Secretario: Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Facultad de Química, UNAM

Esta tesis se realizó en el laboratorio 1-5 del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib. La tesis contó con el apoyo económico de CONACYT (CVU/Becario) 847870/629456.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl G. Enríquez Habib por brindarme su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de investigación, sus enseñanzas. También, por ser un ejemplo a seguir como investigador.

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante la maestría (CVU: 847870).

Al Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM.

Al equipo de investigación del laboratorio 1-5 del Instituto de Química de la UNAM. Especialmente a la M. en C. Alejandra Pineda Amaya y el M. en C. Marco Antonio Obregón Mendoza por su importante colaboración en esta tesis y sus enseñanzas. También agradezco sus comentarios y aportaciones del M. en C. Yair Álvarez Ricardo y el M. en C. William Meza Morales y la Dra. Arias Olguín.

Por su importantes aportaciones y colaboraciones en esta tesis: la Dra. Miriam Estévez Carmona por haber realizado los ensayos de toxicidad aguda en ratones, y la Dra. Patricia V. Torres Duran y la Q. A. Mara V. Morales Santo por haberme permitido realizar los ensayos de TBARS en su laboratorio.

A los técnicos académicos del Instituto de Química de la UNAM.

A los miembros del jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. José Federico del Río Portilla y Dra. Julia Cassani Hernández.

A mi familia: mis padres Rosa Hernández Hernández, Rolando Chávez Torrijos; mis hermanos Rosa María Chávez Hernández, Juan Manuel Chávez Hernández, Ángel Ezequiel Chávez Hernández y David Abraham Flores Juárez, y mi hijo Oliver Alejandro Chávez por ser un pilar en mi formación académica y brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mis profesores de maestría.

A mis amigos: Mabel Enríquez, Miriam Pérez, Fernanda Saldívar, Ulises González, Sergio López, Denisse Chirinos, Karina Salomón, Frida Herrera, Manuel Vivanco, Juan Carlos Machado y Dylan Sánchez.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	8
ABSTRACT.....	10
RESUMEN.....	11
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	2
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.....	7
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS .....	7
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS .....	7
5.1. Objetivo general .....	7
5.2. Objetivos particulares .....	7
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
6.1. Materia prima .....	8
6.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). .....	8
6.3. Composición de ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente utilizando RMN <sup>1</sup> H .....	9
6.4. Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT).....	10
6.5. Viscosidad.....	10
6.6. Transesterificación y análisis del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM). .....	11
6.7. Grado de oxidación lipídica, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	11

6.8. Inducción de peroxidación lipídica en el aceite de semilla de uva evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro de ratón. ....	12
6.9. Modelo générico de toxicidad en <i>Artemia Salina</i> . ....	13
6.10. Modelo de toxicidad aguda en ratones. ....	14
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
7.1. Caracterización del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C a través de RMN.....	15
7.2. Caracterización del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C mediante FTIR.....	30
7.3. Caracterización del aceite de semilla de uva original mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas. ....	32
7.4. Viscosidad.....	33
7.5. Grado de oxidación lipídica, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). ....	34
7.6. Inducción de peroxidación lipídica en el aceite de semilla de uva, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro de ratón. ....	35
7.7. Modelo generico de toxicidad en <i>Artemia Salina</i> . ....	37
7.8. Modelo de toxicidad aguda en ratones. ....	38
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES .....	39
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.....	40
APÉNDICE .....	45



## ABREVIATURAS

CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuteriado.
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas.
cSt	Centistokes = 10 <sup>-6</sup> m <sup>2</sup> /s.
°C	Grados Celsius.
δ	Desplazamiento químico en partes por millón (ppm).
d	Doble (o doblete).
dd	Doble de dobles.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
dq	Doble de cuartetos.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FTIR	Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier.
g	Gramos.
h	Horas.
MHz	Megahertz.
μg	Microgramos.
μL	Microlitros.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
min	Minutos
m	multiplete.

ng	Nanogramos.
ppm	Partes por millón.
Q	quintuplete (pentaplete en el software MNova).
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
t	tiempo.
TBA	Ácido Tiobarbitúrico.
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía en Capa Fina).

## ABSTRACT

The goal of this thesis was to characterize the chemical changes in the grape seed oil that resulted after its thermal treatment by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) and TBARS assay. Among all these analytical techniques used, the most sensitive for detecting structural changes in the grape seed oil was  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy being appropriate for qualitative analysis because of the high sensitivity of the proton nuclei based on its high natural abundance. In addition, viscosity was assessed and also toxicity using a murine model and an *Artemia salina* bioassay. The consequences of the thermal treatment over the original structure of the grape seed oil including the possible negative effects on human diet are discussed.

## RESUMEN

El propósito de esta tesis fue caracterizar los cambios químicos en el aceite de semilla de uva como resultado del tratamiento térmico mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la Espectroscopía de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-FT), la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM) y el ensayo TBARS. La RMN  $^1\text{H}$  es particularmente sensible para observar cambios estructurales cualitativos resultantes del tratamiento térmico debido a que el núcleo de hidrógeno tiene una abundancia natural del 99 %. Adicionalmente, se midió el cambio en la viscosidad, así como la toxicidad resultante del tratamiento térmico evaluada mediante un modelo murino y el modelo empleando *Artemia salina*. Se discuten las consecuencias del tratamiento térmico en la estructura original del aceite de semilla de uva, así como las posibles consecuencias dañinas en la dieta humana causadas por el sobrecalentamiento.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La uva es el fruto de la vid perteneciente a la familia *Vitaceae* género *Vitis*.<sup>1</sup> El consumo de uva en México se dirige principalmente a 63% para consumo en fresco, 24.4% para elaboración de vinos y jugos, y un 12.6 % se deshidrata.<sup>2</sup>

Se estima, para el año 2030, un crecimiento de la demanda mundial de uva del 23.48% y un aumento de la producción nacional del 31.94%. Algunas estrategias para incentivar el desarrollo productivo nacional de uva son: optimizar los procesos que otorguen valor agregado a la cadena productiva e impulsar la diversificación de los subproductos derivados de la elaboración de vinos y jugos.<sup>2</sup>

En la industria vitivinícola, los principales subproductos de la uva son el tallo, hollejo y semilla. Una alternativa para su aprovechamiento consiste en la extracción del aceite de la semilla.<sup>3</sup> Éste contiene en promedio los siguientes ácidos grasos: 73.15% linoleico (18:2n-6), 13.65% oleico (18:1n-9), 6.81% palmítico (16:0), 4.04% esteárico (18:0), y 0.42% alfa-linolénico (18:3n-3).<sup>4</sup> Además, se caracteriza por tener un punto de humeo de 216 °C,<sup>3</sup> es decir, la temperatura en la cual un aceite comienza a desprender humo<sup>5</sup> y puede servir como un indicador de su estabilidad.<sup>6</sup>

En general, un aceite adecuado para freír debe tener un elevado punto de humeo, superior a los 200 °C.<sup>3</sup> Por esta razón, el aceite de semilla de uva sería recomendado para el freído de alimentos en comparación con otros aceites como aceite de oliva extra virgen (195 °C) y girasol (212 °C).<sup>7</sup>

Por otra parte, la causa más importante del deterioro de los aceites es la oxidación cuyas consecuencias son: la reducción en su tiempo de vida útil, menor valor nutricional y la producción de compuestos tóxicos. Los primeros productos de degradación son los hidroperóxidos, intermediarios en la formación de los productos de degradación secundarios, y su presencia previamente se ha determinado mediante <sup>1</sup>H RMN.<sup>8</sup>

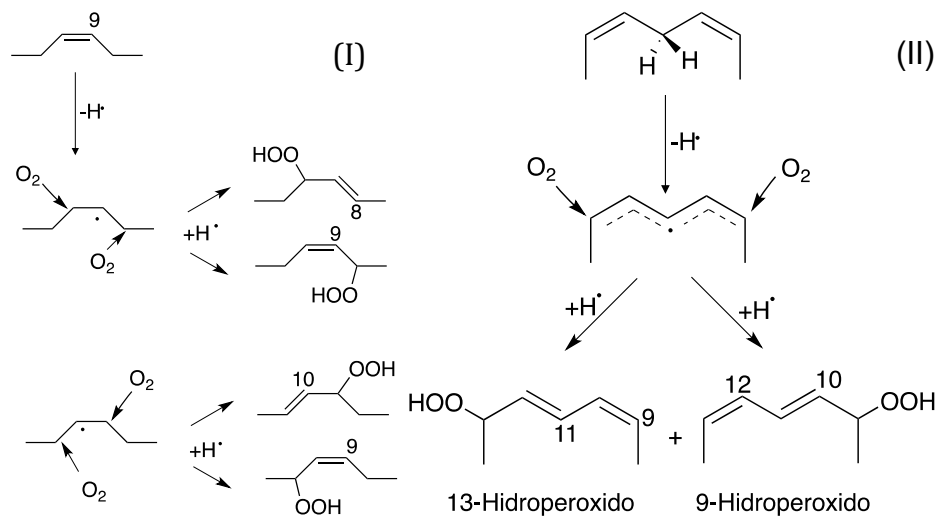
Asimismo, la estabilidad oxidativa depende de los antioxidantes presentes en el aceite.<sup>9</sup> Por ejemplo, el aceite de semilla de uva es una fuente de compuestos bioactivos como los tocoferoles, especialmente  $\alpha$ -tocoferoles cuya actividad antioxidante es mayor<sup>10</sup>. Fernandes y colaboradores (2013) reportaron en aceites de semilla de uva (variedades: *touringa nacional*, *periquita*, *cornifesto* y *tinta amarela*) una elevada actividad antioxidante, mediante el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), entre 38.68 % y 65.39% dependiendo de la variedad de uva.<sup>11</sup>

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

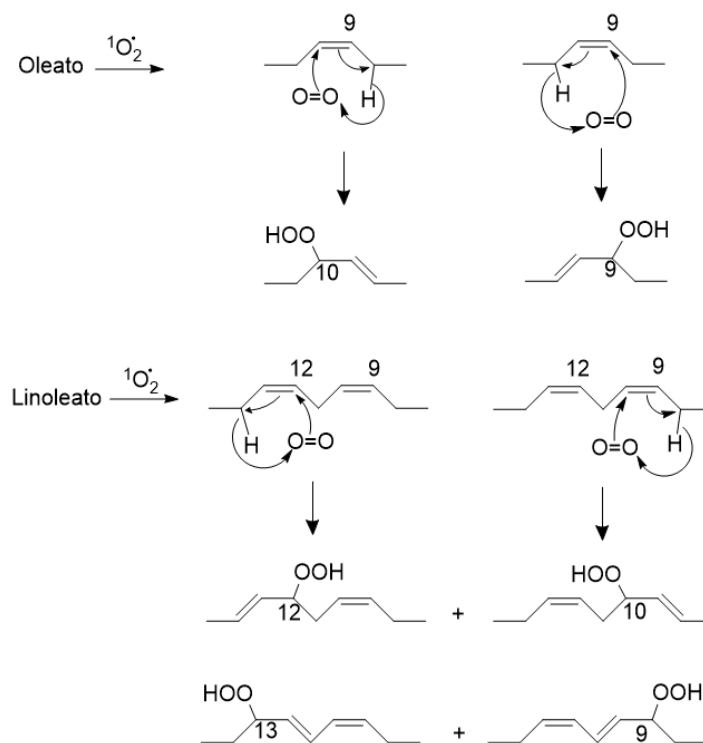
La estabilidad oxidativa en los aceites es importante porque de ello depende su periodo de vida media o vida útil. La oxidación de los aceites genera productos de degradación primarios, hidroperóxidos, propensos a descomponerse en temperatura alta e intermediarios en la formación de productos de degradación secundarios como aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta.<sup>12</sup>

Los hidroperóxidos se forman mediante dos procesos: autooxidación o radicales libres y fotooxidación a través de oxígeno en estado de singulete. El primer proceso comienza con una ruptura homolítica entre los átomos de hidrógeno y carbono formando un radical alquilo ( $R\bullet$ ), denominado iniciación. Posteriormente, éste reacciona con el oxígeno en estado de triplete ( $^3O_2$ ), que corresponde al estado de radical de la molécula de oxígeno, generando un radical peróxido ( $ROO\bullet$ ) que abstrae un radical hidrógeno ( $H\bullet$ ) de otra molécula lipídica para formar un hidroperóxido ( $ROOH$ ) y un radical alquilo ( $R\bullet$ ), esta es la etapa de propagación. Por último, la reacción termina mediante el acoplamiento entre dos radicales libres ( $ROO\bullet$  y  $R\bullet$ ), Figura 1. En contraste, la oxidación mediante oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), que es el estado excitado de la molécula de oxígeno, consiste en un mecanismo concertado en el cual el  $^1O_2$  ataca al átomo de carbono del doble enlace, desplazándolo y formando un hidroperóxido alílico

*trans*, Figura 2. En ambos procesos los átomos de hidrógeno alílicos son propensos a su remoción.<sup>12-14</sup>

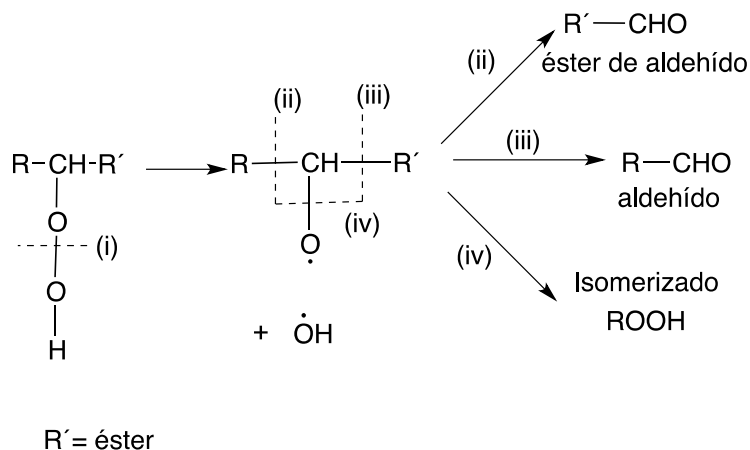


**Figura 1:** Formación de hidroperóxidos mediante el mecanismo de autooxidación en oleato (I) y linoleato (II).<sup>13</sup>



**Figura 2:** Formación de hidroperóxidos mediante oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) en oleato y linoleato.<sup>13</sup>

A partir de los hidroperóxidos, se forman los radicales alcoxi- (RO•) e hidroxilo- (OH•) por ruptura homolítica entre dos átomos de oxígeno. El radical RO• se acopla con un átomo de carbono vecino generando aldehídos y cetonas. Por otro lado, si se rompe el enlace carbono-oxígeno se forman isómeros del hidroperóxido, Figura 3.<sup>12,13</sup>

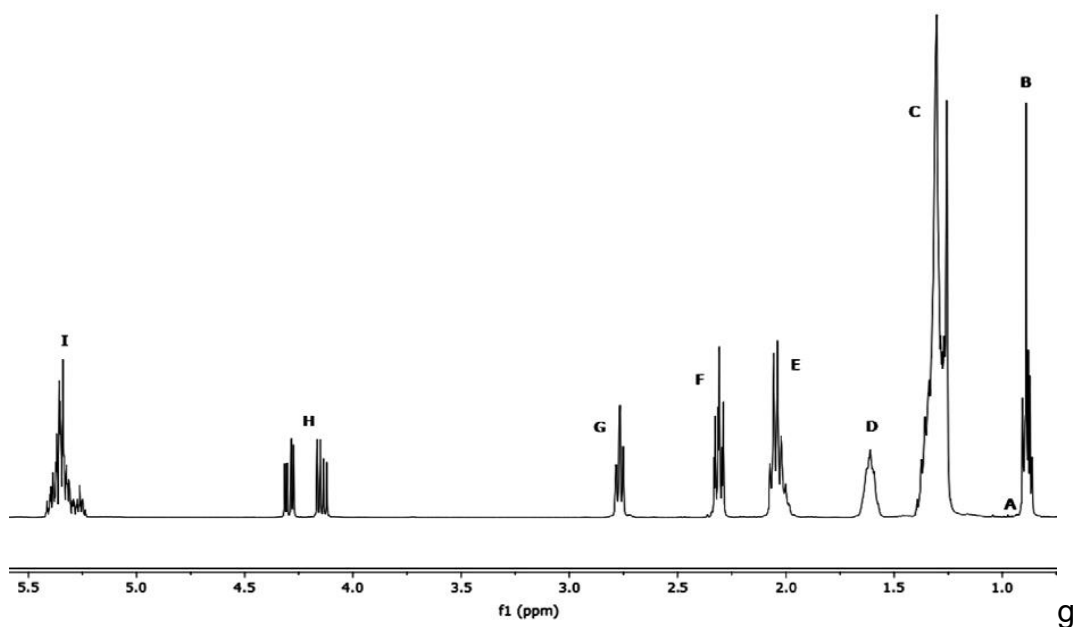


**Figura 3:** Formación de productos de oxidación secundarios a partir de hidroperóxidos.<sup>13</sup>

Los productos de oxidación primarios se pueden analizar mediante el índice de peróxido, índice de iodo, cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), y los productos de oxidación secundarios se pueden estudiar mediante CG-EM y determinando espectrofotométricamente el complejo rojo-fluorescente entre el ácido tiobarbitúrico y malondialdehído (ensayo de TBARS). Sin embargo, estas metodologías requieren un laborioso pretratamiento de la muestra, uso de disolventes caros (grado HPLC) y en algunos casos, los resultados son poco sensibles como el índice de peróxido, índice de iodo y el ensayo de TBARS. Ante estas dificultades se han propuesto metodologías alternativas como el empleo del IR y la RMN para analizar los productos de oxidación primarios y secundarios en los aceites comestibles debido a sus características de sensibilidad, mínimo requerimiento en la cantidad de muestra y reducción de tratamientos innecesarios en la preparación de la muestra.<sup>15</sup>



En investigaciones previas se ha logrado identificar nueve regiones características en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de aceites comestibles como de oliva, girasol, trigo, linaza y soya, entre otros utilizando como referencia triglicéridos simples como triestearina, trioleina, trilinoleina y trilinolenina.<sup>16</sup> Posteriormente, Hanganu y colaboradores mediante espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  lograron asignar las señales características de los triglicéridos que componen el aceite de semilla de uva (Tabla 1 y Figura 4),<sup>17</sup> similares a los previamente reportados.



**Figura 4:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de aceite de semilla de uva en 400 MHz.

Señal	$\delta$ (ppm)	Protón	
A	0.95	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Metilo del ácido linolénico.
B	0.85	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Metilo de todos los ácidos grasos excepto ácido linolénico.
C	1.25	$-(\text{CH}_2)_n-$	Metileno de todos los ácidos grasos.
D	1.6	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Metileno beta a un carbonilo.
E	2.02	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Metileno alílico.
F	2.3	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Metileno alfa a un carbonilo.
G	2.75	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	Metileno doblemente alílico.
H	4.19	$-\text{CH}_2-\text{OCOR}$	Metileno 1 y 3 del glicerol.
I	5.35	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Metino vinílico.

**Tabla 1:** Desplazamiento químico de las señales del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite de semilla de uva en 400 MHz.

También, la RMN  $^1\text{H}$  permite determinar el porcentaje de ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico y ácidos saturados mediante la integración del metilo del ácido oleico y del ácido linoleico (A), el metilo de ácido alfa-linolénico (B), metileno alílico (C), metileno alfa-carbonilo (D) y metileno doblemente alílico (E).<sup>18</sup> A su vez, permite cuantificar el porcentaje de degradación de los ácidos grasos mayoritarios en los aceites comestibles. Por ejemplo, en aceites de girasol y maíz tratados térmicamente en 70 °C por 11 días, se observó una reducción de 13 % de ácido linoleico y 5 % de ácido oleico.<sup>19</sup>

Además, mediante RMN  $^1\text{H}$  se ha identificado la aparición de señales de hidroperóxidos en ca. 8.4 ppm y aldehídos en ca. 9.4 ppm y 9.8 ppm. La intensidad de las señales de aldehídos aumenta conforme disminuyen las de los peróxidos y tienen concordancia con lo determinado por métodos clásicos como el índice de peróxido.<sup>19</sup>

Igualmente, se han realizado estudios mediante espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para determinar los cambios más significativos en los aceites comestibles tratados en condiciones oxidativas y por tratamiento térmico aeróbico. Algunas bandas representativas son: vibración de tensión de metinos vinílicos *cis*, 3006  $\text{cm}^{-1}$ ; el desplazamiento de esta banda hacia frecuencias bajas coincide con la aparición de las señales de hidroperóxidos. Vibración de tensión de metilenos, 2853  $\text{cm}^{-1}$ ; la relación entre esta banda y la anterior aumenta conforme desaparecen los dobles enlaces *cis*; carbonilo de ésteres de glicerol, 1746  $\text{cm}^{-1}$ ; la variación de la banda en 1746  $\text{cm}^{-1}$  a 1744  $\text{cm}^{-1}$  puede relacionarse con la superposición de la banda en 1727  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a carbonilos de aldehídos saturados como hexanal. Por último, se encuentra la vibración de flexión de metinos en 960  $\text{cm}^{-1}$  y 990  $\text{cm}^{-1}$  y en frecuencias menores las de metinos vinílicos *trans* aislados.<sup>20,21</sup>

Se han combinado estas dos espectroscopías ( $^1\text{H}$  RMN y FTIR) para determinar los productos de oxidación primarios y secundarios en el aceite de girasol durante su almacenamiento. Sin embargo, la RMN  $^1\text{H}$  proporciona información que permite elucidar la estructura de los productos primarios y secundarios de la oxidación de aceites comestibles en contraste con FTIR.<sup>22</sup>

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

En México, industrialmente no se produce aceite de semilla de uva; sin embargo, una cuarta parte de la producción de uva mexicana se destina para la elaboración de jugos y vinos.<sup>2</sup> Por esta razón es relevante aprovechar la semilla de uva para producir aceite y por ende generar un valor agregado a este subproducto.

Aunado a lo anterior, estudiar el aceite de semilla de uva durante su tratamiento térmico proporcionaría información relevante, con respecto a sus posibles cambios físicos y químicos; y así poder compararlo con los aceites más utilizados para la elaboración de alimentos. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio químico, toxicológico y espectroscópico de la degradación térmica del aceite de semilla de uva.

### CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

El aceite de semilla de uva debido a su composición elevada de ácido linoleico y ácido oleico tendría mayor estabilidad térmica y por ende se esperaría que fuera menos tóxico.

### CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

#### 5.1. *Objetivo general*

Realizar un estudio químico, espectroscópico y toxicológico de la degradación térmica de aceite de semilla de uva.

#### 5.2. *Objetivos particulares*

1. Caracterizar el aceite de semilla de uva mediante espectroscopía de RMN <sup>1</sup>H RMN e IR-FT.
2. Medir los cambios en la viscosidad del aceite de semilla de uva durante el tratamiento térmico en 150 °C y 280 °C.
3. Cuantificar el porcentaje de degradación del térmica del aceite de semilla de uva mediante RMN <sup>1</sup>H.

4. Realizar el análisis comparativo de la transesterificación del aceite de semilla de uva original y el tratado térmicamente, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).
5. Realizar ensayos comparativos de actividad pro-oxidante *in vitro* del aceite de semilla de uva antes y después del tratamiento térmico, y por último, realizar ensayos comparativos de toxicidad *in vivo* con el aceite de semilla de uva original y la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

## CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. *Materia prima*

Se utilizó aceite de semilla de uva marca Borges. Se colocó aproximadamente 100 mL de aceite de semilla de uva en un vaso de precipitados de 250 mL y calentó en 150 °C en una parrilla de calentamiento con agitación magnética. Después de 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h y 24 h de tratamiento térmico se recolectaron seis alícuotas de 15 mL. El procedimiento anterior se repitió para un tratamiento térmico en 280 °C y se recolectaron cuatro alícuotas de 15 mL después de 1 h, 3 h, 6 h y 10 h. Se eligieron los tratamientos térmicos de 150 °C y 280 °C porque son las temperaturas baja y alta que alcanza una estufa convencional y se midieron utilizando un termopar.

### 6.2. *Resonancia Magnética Nuclear (RMN).*

Se disolvió 25±0.5 mg de aceite de semilla de uva (original y tratado térmicamente) en 0.6 mL CDCl<sub>3</sub>. La alícuota, previamente filtrada, se trasvasó a un tubo de resonancia de 5 mm.

En todos los aceites de semilla de uva se realizaron experimentos de RMN <sup>1</sup>H en un espectrómetro Varian, Unity Inova 500 MHz. Solamente en el aceite original y tratado térmicamente en 150 °C, 24 h y en 280 °C, 10 h se llevaron a cabo experimentos de RMN <sup>13</sup>C, DEPT 90, DEPT 135, COSY, HSQC y HMBC en un espectrómetro Bruker AVANCE III HD 500 MHz.

### 6.3. Composición de ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente utilizando RMN $^1H$

La composición de los ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original y durante su tratamiento térmico fueron obtenidos mediante la metodología de Guillen y Ruíz, 2003.<sup>18</sup> Las señales utilizadas fueron: 0.89 ppm; **A** ( $CH_3$  ácido linoleico y ácido oleico); 0.98 ppm, **B** ( $CH_3$  ácido alfa-linolénico); **C** 2.04 ppm ( $CH_2-CH=CH$ ); **D** 2.3 ppm ( $CH_2-CO_2R$ ), y 2.7 ppm, **E** ( $CH=CH-CH_2-CH=CH$ ). El porcentaje de ácidos grasos saturados (S), ácido oleico (O), ácido linoleico (L) y ácido alfa-linolénico (Ln) se expresa en porcentaje molar a través de las ecuaciones 1-7. El porcentaje de ácido alfa-linolénico se obtuvo mediante las señales de los metilos terminales (A y B). El porcentaje de ácido linoleico se obtuvo mediante la relación de metilenos doblemente alílicos entre grupos acilo. Este último representa el porcentaje de ácidos grasos totales y a su vez equivale a un metileno doblemente alílico para el ácido linoleico y dos para el ácido alfa-linolénico, (ver ecuación 3). El porcentaje de ácido oleico se obtuvo mediante la relación de metilenos alílicos entre grupos acilo que es igual a la suma de ácidos grasos insaturados por el número de grupos alílicos (2 para cada ácido graso), ecuación 5. Por último, el porcentaje de ácidos saturados es 1 menos la fracción de ácidos grasos insaturados, ecuación 7.<sup>18</sup>

$$(1) Ln = \frac{B}{B + A}$$

$$(2) \frac{E}{D} = L + 2Ln$$

$$(3) L = \left( \frac{E}{D} - \frac{2B}{B + A} \right)$$

$$(4) \frac{C}{D} = 2(O + L + Ln)$$

$$(5) O = \left( \frac{C}{2D} - \frac{E}{D} + \frac{B}{B + A} \right)$$

$$(6) L + Ln + O + S = 1$$

$$(7) S = 1 - \frac{C}{2D}$$

#### 6.4. Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT)

Se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de las muestras de aceite de semilla de uva original y de los tratados térmicamente en 150 °C por 24 h y en 280 °C por 10 h entre dos cristales de NaCl en un espectrofotómetro IR-FT Bruker Tensor 27. Los espectros fueron adquiridos en un intervalo de longitud de onda entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  y 50  $\text{cm}^{-1}$ . A partir de estos, se seleccionaron cuatro regiones características de la formación de productos de degradación que previamente han sido estudiadas: 3008  $\text{cm}^{-1}$ , metinos vinílicos *cis*; 2853  $\text{cm}^{-1}$ , metilenos; 1741-1743  $\text{cm}^{-1}$ , carbonilo del éster de glicerol, y 990-960  $\text{cm}^{-1}$ , metinos vinílicos *trans*.<sup>22,23</sup> Posteriormente, se calculó la absorbancia de cada región característica de las muestras de aceites mediante la ecuación 8 y se graficó la absorbancia obtenida para cada muestra de aceite.

$$(8) A = \log \frac{1}{T}$$

#### 6.5. Viscosidad.

Se examinaron alícuotas de 5 mL del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150°C durante 1 h, 3 h, 6 h y 12 h en un viscosímetro CANNON número 200. Por otra parte, se colocaron alícuotas más viscosas del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C durante 18 h y 24 h, y en 280 °C 1 h, 3 h y 6 h en un viscosímetro CANNON número 300. En todos los casos, las mediciones de viscosidad se hicieron por cuadruplicado y registrando la temperatura del ambiente con un termómetro de mercurio. El valor de constante de viscosidad se obtuvo a partir de la temperatura del ambiente, interpolando en la ecuación de la recta de cada viscosímetro. Después, la constante de viscosidad se multiplicó por el tiempo obtenido en cada viscosímetro con cada muestra.

#### 6.6. *Transesterificación y análisis del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente mediante CG-EM.*

La preparación de la muestra se llevó al cabo siguiendo la metodología de Anastopoulos y col., 2009.<sup>24</sup> Se colocaron 2 g de aceite de semilla de uva original, 20 mg KOH (1% wt) y 12 mL MeOH grado HPLC en un sistema en reflujo con una canastilla de calentamiento y agitación. El transcurso de la transesterificación se siguió mediante TLC. Posteriormente, se confirmó la esterificación con un espectro de RMN <sup>1</sup>H en 300 MHz, donde se visualizó la desaparición de las señales de 4.29 ppm correspondientes al metileno 1 y 3 del glicerol unido al éster de ácido graso (sistema ABX) y el metino del glicerol unido a un ácido graso en 5.26 ppm. El procedimiento anterior se repitió para el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h y en 280 °C, 10 h (ver apéndice, figuras A 27- A 29).

#### 6.7. *Grado de oxidación lipídica, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

Se preparó una curva patrón con 0 µL, 20 µL, 40 µL y 60 µL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) al 0.01 % y respectivamente se adicionó 120 µL, 100 µL, 80 µL, 60 µL y 40 µL de HCl 0.6 N. Posteriormente, se adicionó a cada tubo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Todos los tubos se colocaron en un baño de agua y después de la primera ebullición de las muestras se dejaron 20 minutos más hasta virar al color rosa.

Se colocaron en un tubo de ensayo 50 mg de las muestras de aceite de semilla de uva original, tratado térmicamente en 150 °C, 24 h y 280 °C, 10 h, y sus respectivas fracciones polares de cada tratamiento térmico, previamente disueltas en hexano. Se adicionó en todos los tubos 70 µL de HCl 0.6 N y 1 mL TBA y después se colocaron en un baño de agua caliente hasta la evaporación del hexano.

Se midió la absorbancia de las muestras de la curva patrón y el aceite de semilla de uva utilizando un espectrofotómetro de UV-visible en una longitud de onda de 535 nm. La muestra de la curva patrón con 0 µL TEP se utilizó como

blanco para ajustar la absorbancia a cero en el espectrofotómetro. A partir de la curva patrón se obtuvo la ecuación de la recta, la cual se utilizó para interpolar la absorbancia de las muestras de aceite y correlacionarla con la concentración de malondialdehído (MDA) presentes en la muestra. Esta técnica de referencia indica que 22 g TEP equivalen a 7.2 g MDA.

6.8. *Inducción de peroxidación lipídica en el aceite de semilla de uva evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro de ratón.*

Se preparó un homogenizado de cerebro de ratón el cual se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Por duplicado se colocaron 5  $\mu\text{L}$  en un pozo de una placa de 96. Posteriormente se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y 150  $\mu\text{L}$  de una disolución que contenía: 98 % de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en  $\text{NaOH}$  0.1 N; 1 % de tartrato de Na y K al 2 %, y 1 %  $\text{CuSO}_4$  al 1%. Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu disuelto en agua (1:1). Se mezcló bien e incubó por 30 minutos en temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en 540 nm y se sustituyeron los valores en la siguiente fórmula para obtener el contenido de proteína del sobrenadante y ajustando a 2.66 mg/mL con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 9.5 mM, pH=7.4.

$$\text{proteina} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \left( \frac{A_{540 \text{ nm}} - 0.05012}{0.0028} \right) 40$$

Para medir la inducción de estrés oxidativo de las muestras se colocaron por duplicado 375  $\mu\text{L}$  de sobrenadante (2.666 mg proteína/ mL), 50  $\mu\text{L}$  de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20  $\mu\text{M}$ . Después, se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de las muestras de aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C durante 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h y 24 h, y las del tratamiento en 280°C durante 1 h, 3 h, 6 h y 10 h con una concentración de 20 mg/mL, disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO). Al final se dejaron incubar 30 min en 37°C con agitación.



Posteriormente, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA) e incubó 10 minutos en un baño de hielo. Se centrifugó en 12,000 rpm durante 5 min en temperatura ambiente e incubó durante 30 min en un baño de agua entre 70 y 80  $^{\circ}\text{C}$ . Se dejó enfriar y por duplicado se colocó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo en los pozos de una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia en 540 nm e interpoló los valores en la curva estándar para obtener la concentración de TBARS en disolución. La ecuación de la recta que se utilizó fue la siguiente.

$$TBARS (\mu M) = \frac{A_{540\text{ nm}} + 0.00877}{0.07558}$$

Adicionalmente se prepararon dos muestras: basal y blanco. El blanco tenía agua destilada en lugar del sobrenadante de cerebro de ratón y el basal conteniendo PBS en lugar de la muestra. La muestra blanca se utilizó como cero de referencia, y la muestra basal se utilizó para medir el nivel de estrés oxidativo del sobrenadante del cerebro de ratón sin la presencia de alguna muestra de aceite. Este valor se restó de los obtenidos para cada muestra de aceite con la finalidad de obtener el valor neto de estrés oxidativo en cada muestra.

#### 6.9. Modelo de toxicidad en *Artemia Salina*.

Se preparó una disolución madre para cada uno de los aceites de semilla de uva original y el tratado térmicamente en 150 $^{\circ}\text{C}$ , 24 h y 280 $^{\circ}\text{C}$ , 10 h en una concentración de 20 mg/mL, utilizando como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta se prepararon tres diluciones, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando como disolvente H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O destilada con 10 *Artemias* y 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución en un pozo de una placa de 96 con el objetivo de tratar a las *Artemias* en tres dosis: 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este procedimiento se repitió por triplicado para las muestras de cada aceite. Después, se dejó incubar por 24 h y se contaron las *Artemias* muertas con ayuda de un microscopio electrónico. Al final, se calculó el porcentaje de *Artemias* muertas para cada dosis.

#### 6.10. Toxicidad aguda en ratones.

Se usaron ratones albinos NIH hembra de  $30 \pm 5$ g. Se ambientaron en las condiciones de laboratorio siete días previos. Se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h, temperatura de  $23 \pm 2$  °C y humedad de  $55 \pm 10\%$ . Se siguieron normas nacionales e internacionales de cuidado y manejo animal (NOM-062-ZOO-1999).

Los ratones tuvieron libre acceso a agua y comida estándar. Previamente al estudio de toxicidad se privaron de alimento 12 h (pero no de agua). Se administraron las diferentes dosis de aceites; se observaron los signos, síntomas y cambios de comportamiento de los animales las tres horas posteriores a la administración. Después de esto se observaron y contaron los animales vivos diariamente los siguientes 14 días. Se registró el peso corporal el día de inicio del estudio, a los 7 y 14 días.

Una vez terminado el estudio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

El consumo diario de productos secundarios de oxidación de aceites, expresado en g/kg, se calculó tomando de referencia el consumo diario de aceite (30 mL/persona),<sup>25</sup> el peso corporal promedio de una persona mexicana (70 kg), la densidad del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h (0.86 g/mL) y su rendimiento de la fracción polar cromatográfica (31.7%). El consumo de productos de degradación sería 116 mg /Kg. A partir de esto, se trataron a los ratones con dos dosis de 26.7 g/Kg (230 %) y 34.4 g/Kg (300 %). También, se utilizaron dos grupos control uno sin ingesta de aceite y otro grupo con una dosis de aceite original 43 g/Kg (370 %).

## CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente a través de RMN

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite semilla de uva original mostró 11 señales características (Figura 5 y figura 6). **(A)**  $\text{CH}_3$ - ácido linoleico y ácido oleico ca. 0.89 ppm y ca. 0.88 ppm debido a dos triples sobrepuestos del ácido linoleico y ácido oleico, ácidos grasos mayoritarios en el aceite de semilla de uva en un porcentaje de 73.15% y 13.65%, respectivamente;<sup>4</sup> y cuyas señales se centran en 0.88 ppm y 0.89 ppm,<sup>8</sup> figura 7. **(B)**  $\text{CH}_3$ - ácido alfa-linolénico ca. 0.98 ppm (t); **(C)**  $-(\text{CH}_2)_n-$  ca. 1.30 ppm (m); **(D)**  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$  ca. 1.60 ppm (dq); **(E)**  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$  ca. 2.04 ppm (dq); **(F)**  $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$  ca. 2.31 ppm (td). Las señales **(E)** y **(F)** son señales sobrepuestas del ácido linoleico y ácido oleico, con diferente intensidad de cada triple y cuarteto, Figura 8. Por otra parte, el metileno alílico **(E)** del ácido linoleico se espera con mayor desplazamiento químico por efecto anisotrópico de desprotección<sup>26</sup> debido a sus dos insaturaciones, en comparación con el ácido oleico, Figura 9. Esto no se observa en la señal **(G)**  $\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH}$  (t) ca. 2.77 ppm ya que corresponde mayoritariamente al ácido linoleico, figura 7.

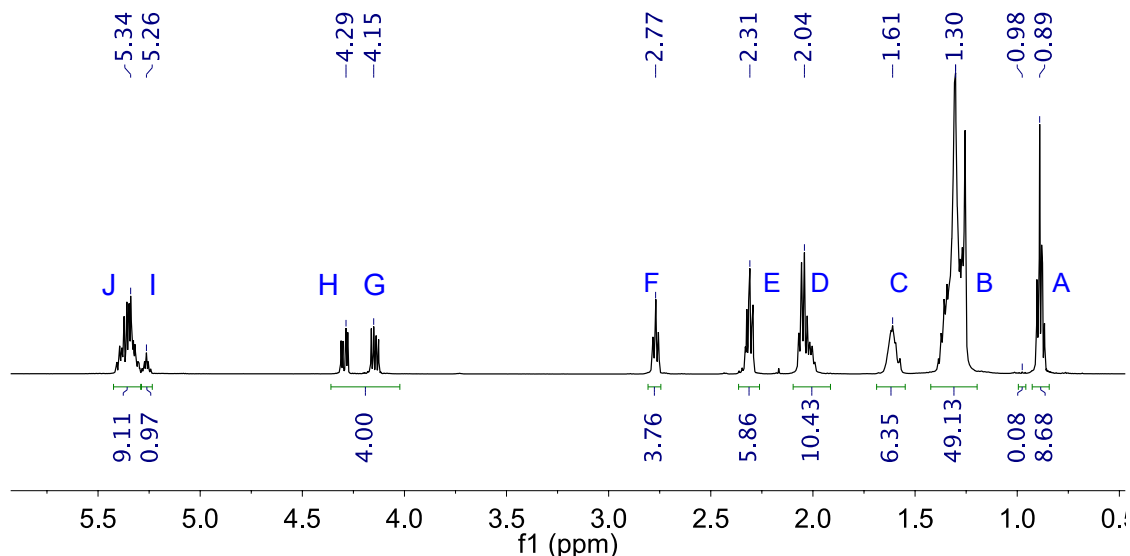
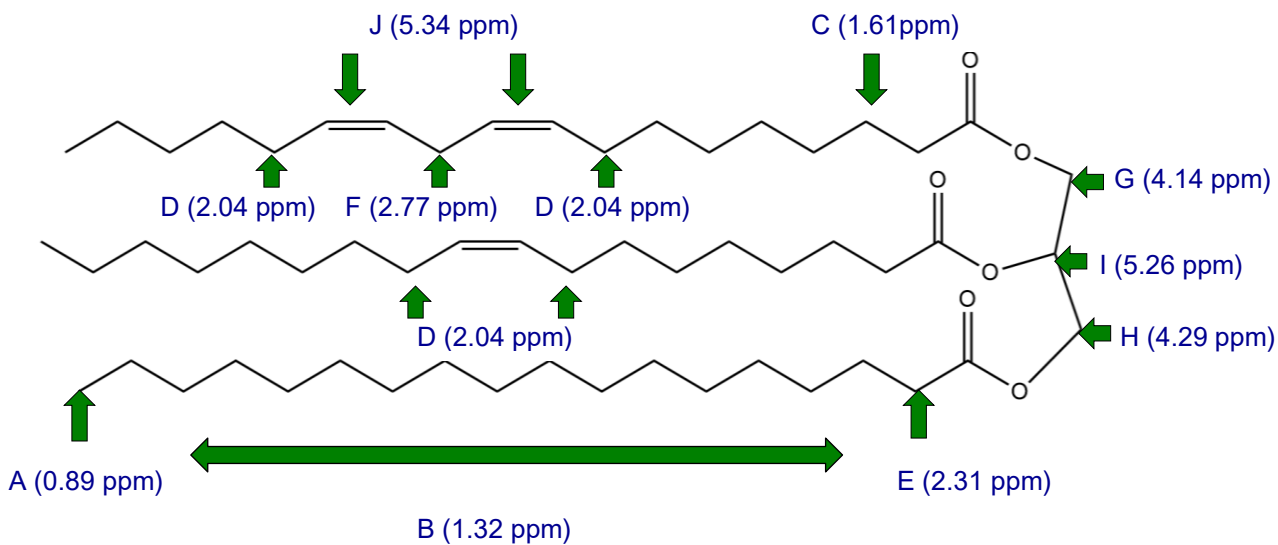
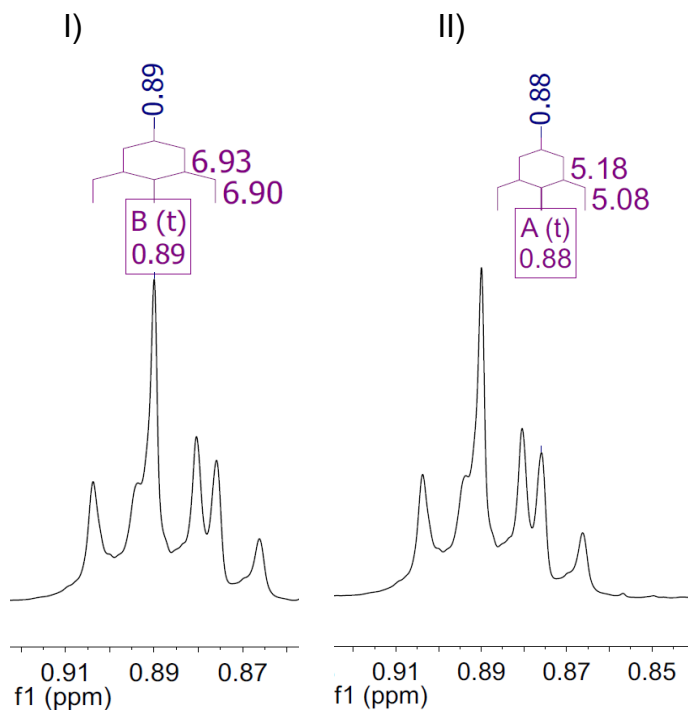


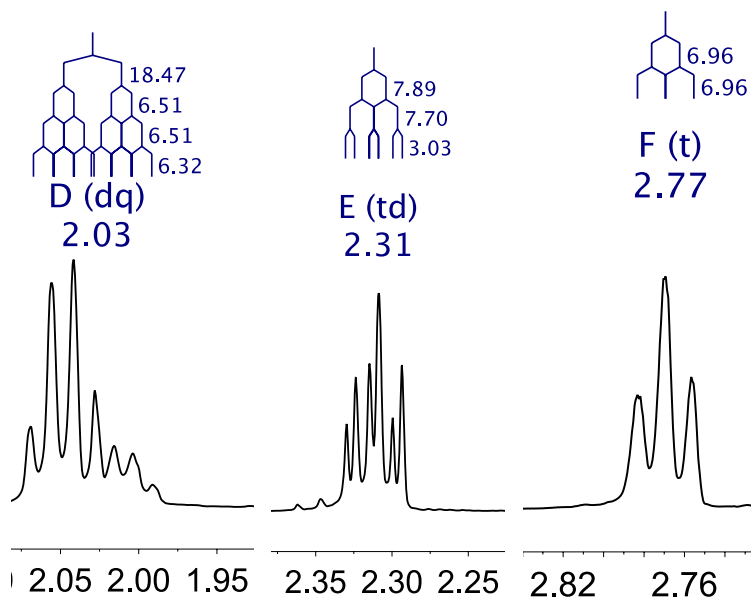
Figura 5: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz de aceite de semilla de uva original.



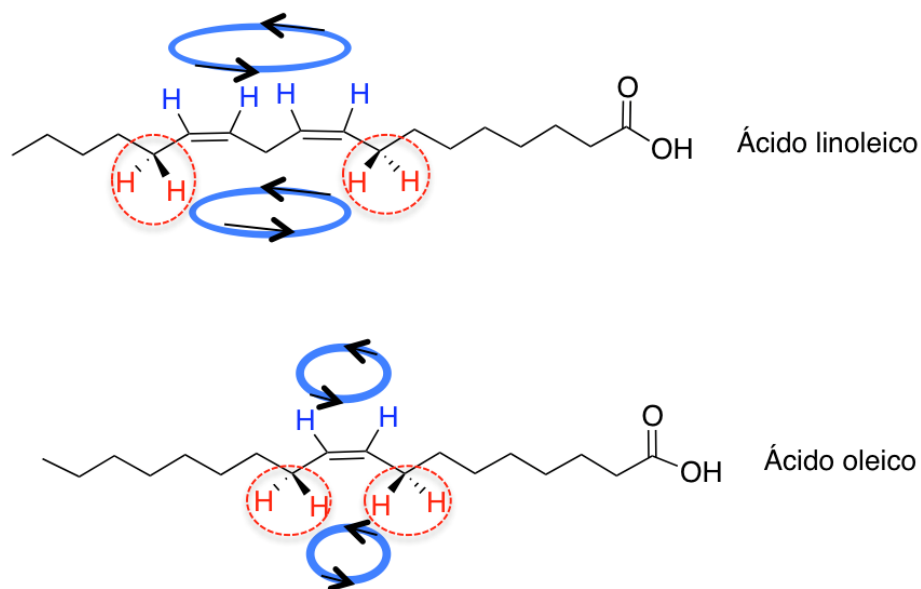
**Figura 6:** Asignación de las señales de los ácidos grasos que conforman al triglicérido del aceite de semilla de uva.



**Figura 7:** Señal de los metilos del ácido linoleico 0.89 ppm (I) y oleico 0.88 ppm (II).

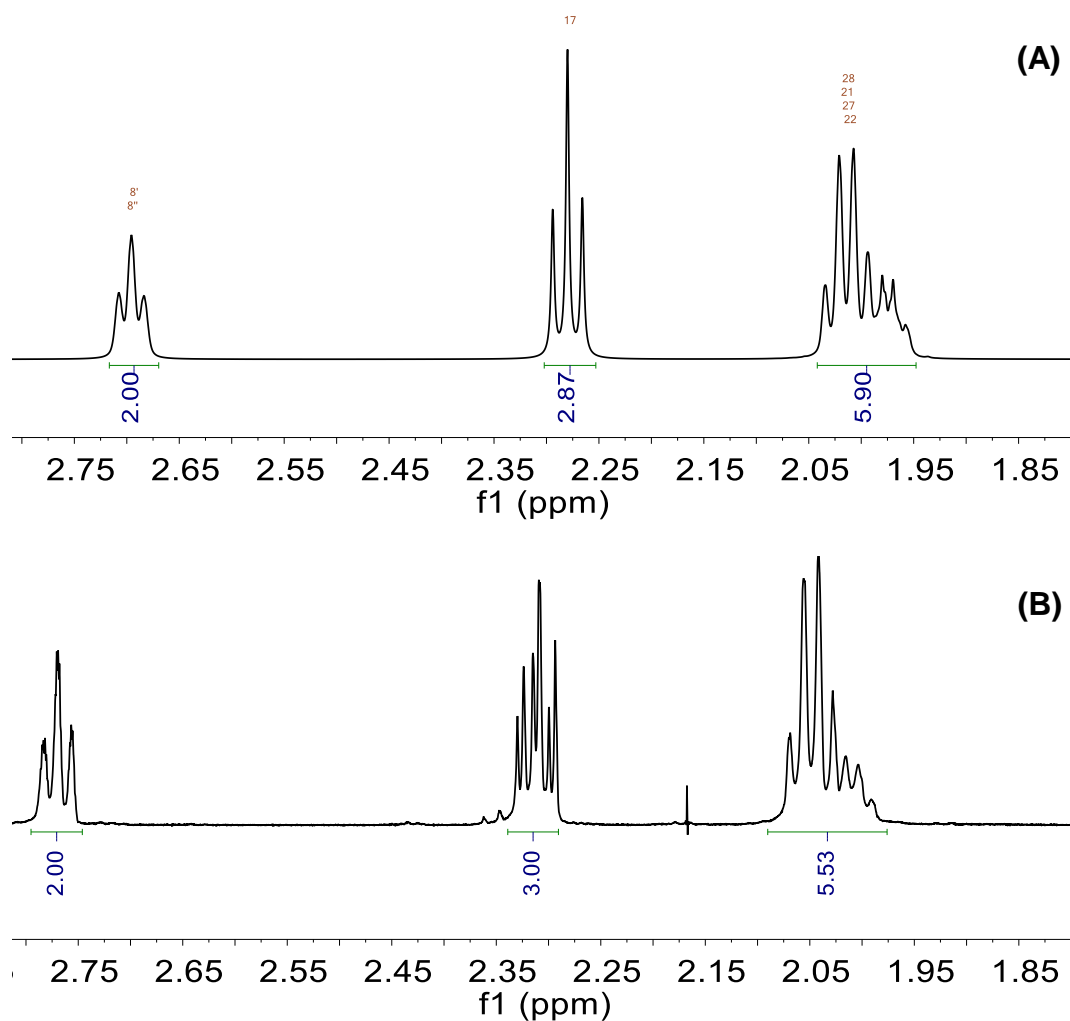


**Figura 8:** Constantes de acoplamiento y desplazamiento químico de las señales del ácido oleico (D y E) y en el ácido linoleico (D, E y F) presentes en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite de semilla de uva.



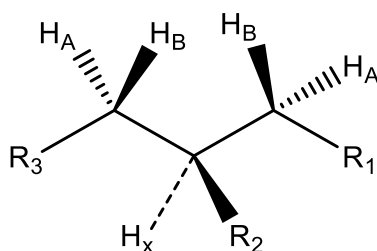
**Figura 9:** Efecto anisotrópico en el ácido linoleico y ácido oleico. Debido al efecto anisotrópico de los dobles enlaces, los hidrógenos de los metinos (azules) se encuentran desprotegidos y los hidrógenos de los metilenos alílicos (rojos) se encuentran protegidos.

Aunado a lo anterior, con el programa *MestReNova* se realizó una simulación espectral entre el ácido oleico y ácido linoleico, en una relación 70:30, Figura 10. Las integrales de las señales alílicas (ca. 2.03 ppm) se compararon, tomando como referencia la señal doblemente alílica en ca. 2.77 ppm cuya integral se ajustó a 2 hidrógenos en ambos espectros. Las integrales teóricas y experimentales son muy similares. Por lo tanto, se propone lo siguiente: la relación cuantitativa entre ácido linoleico y oleico es aproximadamente 70:30.

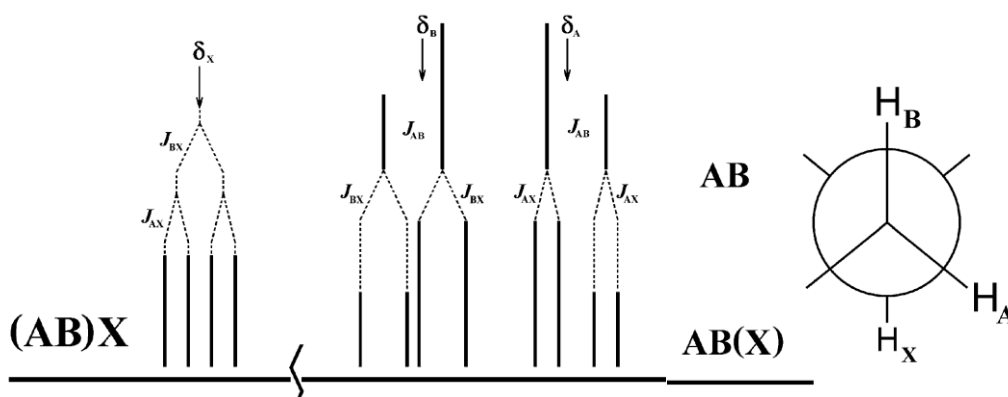


**Figura 10:** Comparación entre la simulación espectral del ácido oleico y ácido linoleico en una relación 70:30 (A) y el espectro original (B).

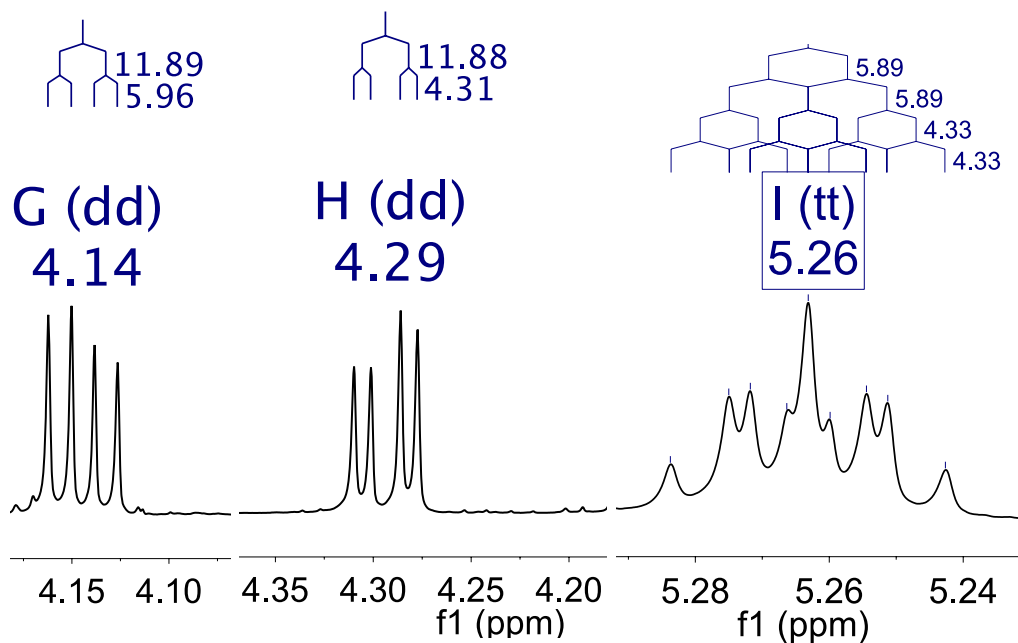
Por último, se observan las señales características de los metilenos 1 y 3 del glicerol (H y J) ca. 4.14 ppm (dd) y 4.29 ppm (dd), y (J) el metino del glicerol ca. 5.26 ppm (tt). Estas señales son características del sistema ABX, figuras 11 y 12 que visualizan los acoplamientos típicos de este sistema de espines. Además, se observa que  $H_x$  se acopla con los dos  $H_A$ ,  $J_{AX}=5.96$  y con los dos  $H_B$ ,  $J_{BX}=4.31$ , ver figura 13.



**Figura 11:** Sistema ABX en el aceite de semilla de uva.



**Figura 12:** Ejemplo representativo de un sistema ABX.<sup>26</sup>

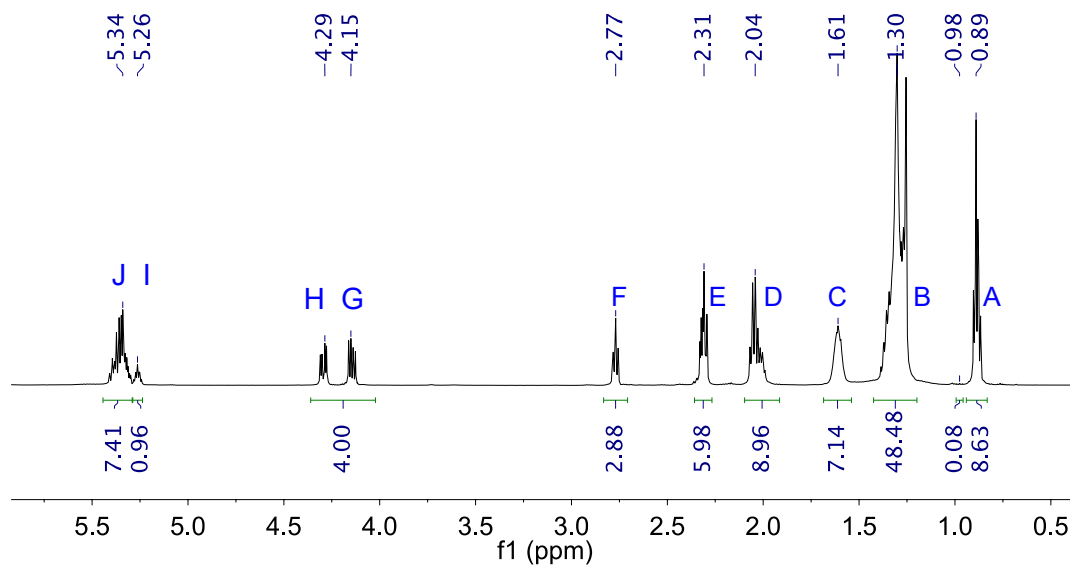


**Figura 13:** Señales características del éster de glicerol en el espectro de RMN del aceite de semilla de uva  $H_A \delta=4.14$ ,  $H_B \delta=4.29$ ,  $H_X \delta=5.26$ .

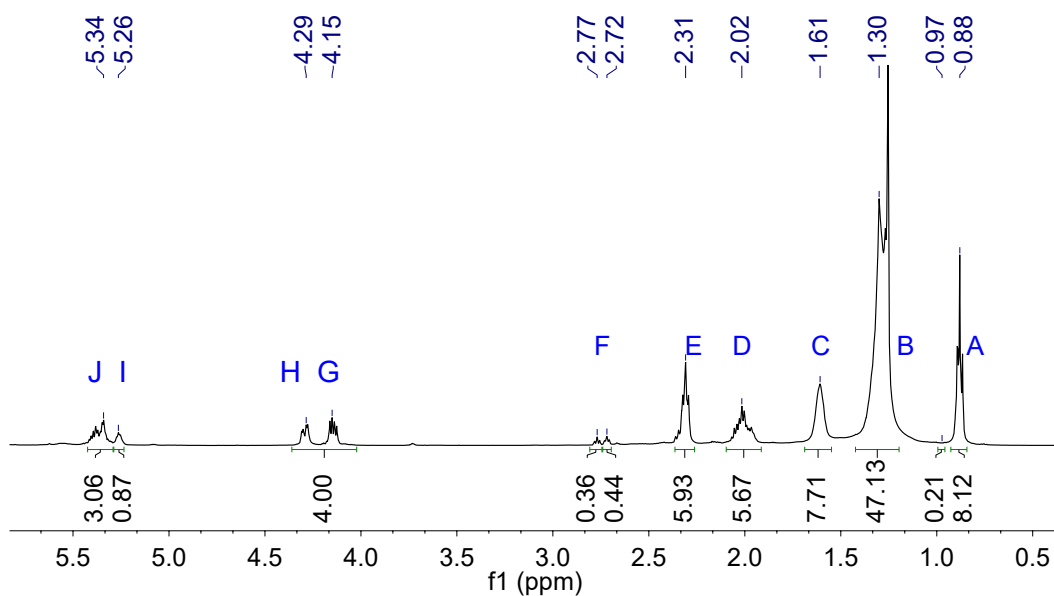
Se compararon los cambios en la relación de las integrales entre el aceite de semilla de uva original y el tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C (ver tabla 2-3 y Figura 14-15) y se observó un incremento en las integrales de metilenos alfa y beta al carbonilo por la formación de aldehídos, y una reducción en las integrales de metileno alílico, metino vinílico y metileno doblemente alílico por la degradación de los ácidos grasos insaturados.

Adicionalmente, se observó la aparición de dos nuevas señales ca. 2.71 ppm (t) y 3.73 ppm (m) en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C por 10 h, figura 15. La primera puede corresponder a un metileno doblemente alílico por su desplazamiento químico y multiplicidad mientras que la segunda puede corresponder a un hidrógeno sobre un carbono oxigenado (peróxido o epóxido).





**Figura 14:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.



**Figura 15:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C, 10 h

Muestras	Integración				
	Metilo de ácido oleico y ácido linoleico	Metileno doblemente alílico de ácido linoleico	Metileno alílico	Metileno alfa al carbonilo	Metino del glicerol
Aceite de semilla de uva original	8.68	3.76	10.43	5.86	0.97
Aceite de semilla de uva 150 °C, 1 h	8.64	3.79	10.46	5.92	0.95
Aceite de semilla de uva 150 °C, 3 h	8.67	3.78	10.46	5.93	0.98
Aceite de semilla de uva 150 °C, 6 h	8.64	3.71	10.34	5.92	0.97
Aceite de semilla de uva 150 °C, 12 h	8.45	3.36	9.89	5.91	0.97
Aceite de semilla de uva 150 °C, 18 h	8.59	3.18	9.59	6.08	0.99
Aceite de semilla de uva 150 °C, 24 h	8.63	2.88	8.96	5.98	0.96

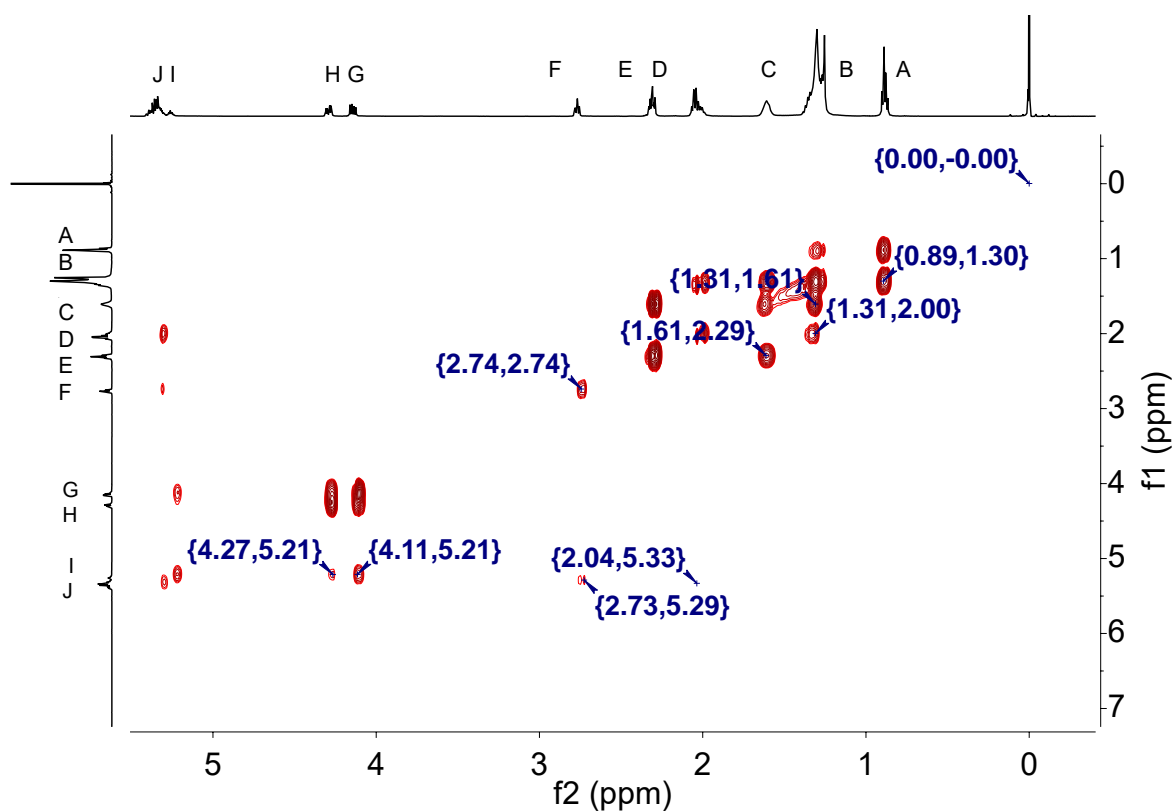
**Tabla 2:** Integrales de las señales en el espectro de RMN <sup>1</sup>H del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150°C.

Muestras	Integración				
	Metilo de ácido oleico y linoleico	Metileno doblemente alílico de ácido linoleico	Metileno alílico	Metileno alfa al carbonilo	Metino del glicerol
Aceite de semilla de uva original	8.68	3.76	10.43	5.86	0.97
Aceite de semilla de uva 280 °C, 1 h	8.73	3.12	9.92	5.82	0.97
Aceite de semilla de uva 280 °C, 3 h	8.75	2.31	9.4	5.91	0.96
Aceite de semilla de uva 280 °C, 6 h	8.58	1.32	8.16	5.91	0.96
Aceite de semilla de uva 280 °C, 8 h	8.42	0.73	7.07	5.91	0.94
Aceite de semilla de uva 280 °C, 10 h	8.12	0.36	5.67	5.93	0.87

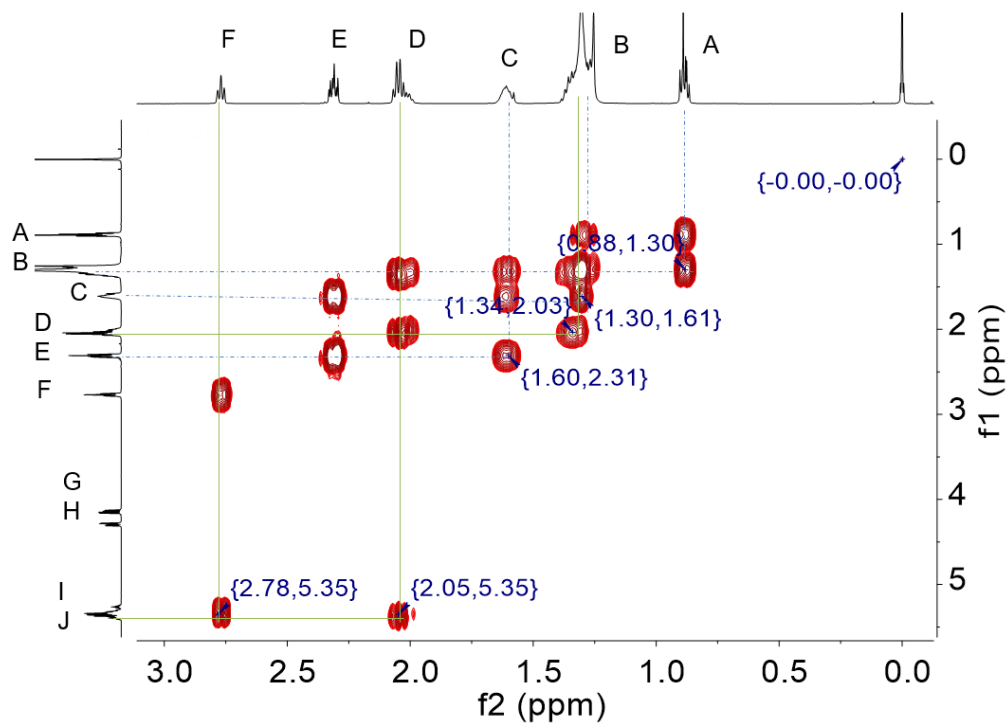
**Tabla 3:** Integrales de las señales en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 280 °C.

La conectividad entre las señales descritas anteriormente fue determinada mediante el experimento de RMN  $^1\text{H}$  2D, COSY (ver Figura 16-17) y se encontraron los siguientes acoplamientos entre hidrógenos vecinos:  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$  (0.89 ppm, 1.3 ppm);  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$  (1.29 ppm, 1.61 ppm);  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$  y  $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$  (1.59 ppm, 2.31 ppm);  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$  (1.34 ppm, 2.05 ppm);  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$  y  $\text{CH=CH}$  (2.03 ppm, 5.36 ppm). Lo anterior describe el acoplamiento entre los hidrógenos del ácido oleico. Adicionalmente, se observa el acoplamiento vecinal entre  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$  y  $\text{CH=CH}$  (2.78 ppm, 5.34 ppm), característico en el ácido linoleico. También, se observan los acoplamientos entre hidrógenos vecinos de los metilenos 1 y 3 del glicerol con el metino del glicerol; característicos de los triglicéridos, ver figura 18.

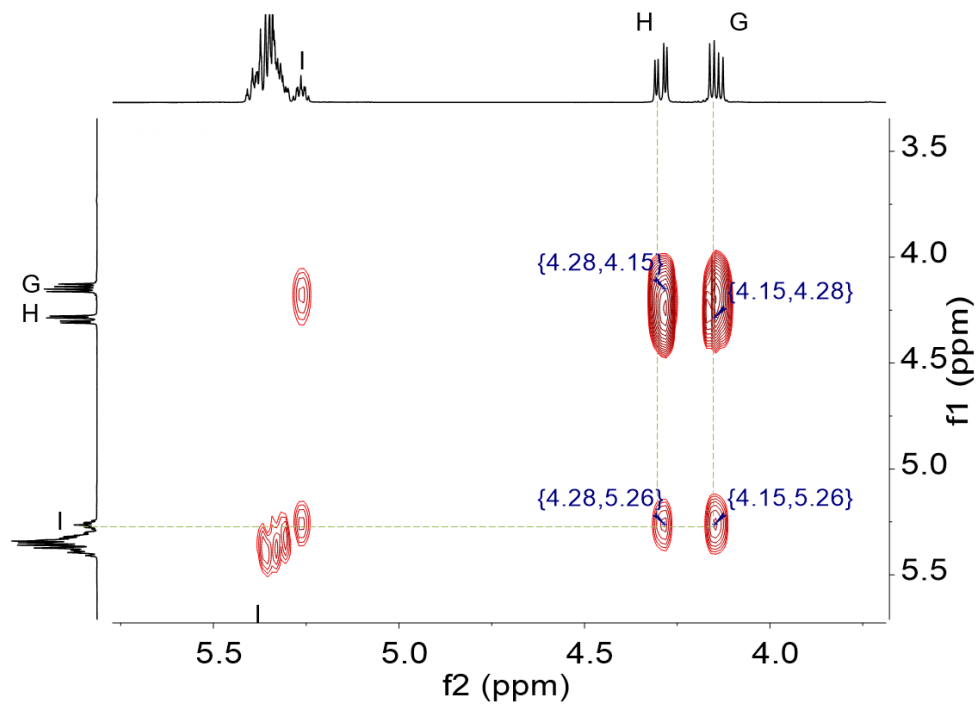
Cabe mencionar que no se observaron cambios significativos entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  2D, COSY del aceite de semilla de uva original y el tratado térmicamente en 150 °C por 24 h y 280 °C por 10 h (Figura A 1-A 2).



**Figura 16:** Espectro de RMN 2D, COSY en 500 MHz, del aceite de semilla de uva original.



**Figura 17:** Espectro de RMN 2D, COSY en 500 MHz, del aceite de semilla de uva original. (A) metilo, (B) metilenos alifáticos, (C) metileno beta al carbonilo, (D) metilenos alifáticos, (E) metileno alfa al carbonilo, (F) metileno doblemente alifático.



**Figura 18:** Espectro de RMN 2D, COSY en 500 MHz, del aceite de semilla de uva original. (G) y (H) metilenos 1 y 3 del glicerol, (I) metino del glicerol y (J) metinos vinílicos.

Por otra parte, se realizaron experimentos de  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90, DEPT 135, HSQC y HMBC (ver apéndice, figura A 3- A 14). Las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en  $150^\circ\text{C}$  por 24 h y en  $280^\circ\text{C}$  por 10 h mostraron la siguiente conectividad: metilo de ácido oleico y ácido linoleico con metileno alifático; metileno alfa y beta al carbonilo; metinos vinílicos con metileno alílico y metileno doblemente alílico, respectivamente; los metilenos 1 y 3 de glicerol con el metino de glicerol, tabla 4. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos previamente en los experimentos de RMN  $^1\text{H}$  2D COSY.

Además, se corrobora lo siguiente: la señal de ca. 2.71 ppm en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en  $280^\circ\text{C}$  por 10 h corresponde probablemente a un metileno doblemente alílico y señal de ca. 3.73 ppm es cercana a la señal de los metinos de epóxidos ca. 2.9 ppm.<sup>27,28</sup> Adicionalmente, en el espectro de  $^{13}\text{C}$  el desplazamiento químico ca. 61.53 ppm, corresponde a un átomo de carbono unido a un heteroátomo (oxígeno) ca. 60 ppm-75 ppm.<sup>29</sup>

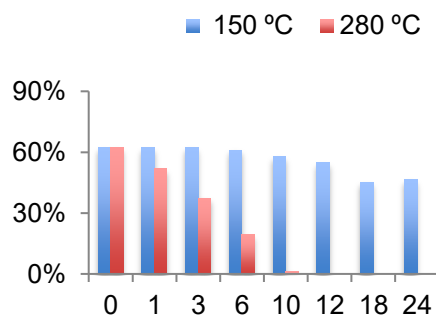
Grupo funcional	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HSQC ( $\delta$ )	HMBC ( $\delta$ )
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ (L, O)	13.9-14.10	0.89	1.30
$\text{-CH}_2\text{-CH}_3\text{-}$ (L, O)	22.4-22.6	1.30	0.89, 1.26
$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$	24.6-24.8	1.61	1.30, 2.30
$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-}$	25.6-25.7	2.77, 2.71*	1.3, 2.3
$\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$	27.0-27.25	2.04	5.30
$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCOR}$	29.0-29.2	1.30	1.30, 1.61, 2.30
$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-}$	29.60	1.25	2.04
$\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_3$ (Ln)	31.9	1.30	0.89, 1.30
$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$	33.7-33.8	2.30	1.6
$\text{R-CHOCH-R}$	61.53*	3.73*	
$\text{R-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-R}'$	62.8	4.30, 4.14	4.14, 4.30, 5.26
$\text{R-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-R}'$	68.8	5.26	4.14, 4.30
$\text{-CH=CH-}$	129.0	5.34	5.34, 2.77, 2.05
$\text{-CH=CH-}$	130.0	5.34	2.71*, 2.77, 2.05, 1.30
$\text{R-CO}_2\text{-R}'$	173.14		5.26, 4.14, 4.30, 2.31, 1.61

**Tabla 4:** Asignación de señales del espectro de  $^{13}\text{C}$  del aceite de semilla de uva original, tratado térmicamente en  $150^\circ\text{C}$  por 24 h y en  $280^\circ\text{C}$  por 10 h. \*Señales únicamente observadas en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en  $280^\circ\text{C}$  por 10 h.

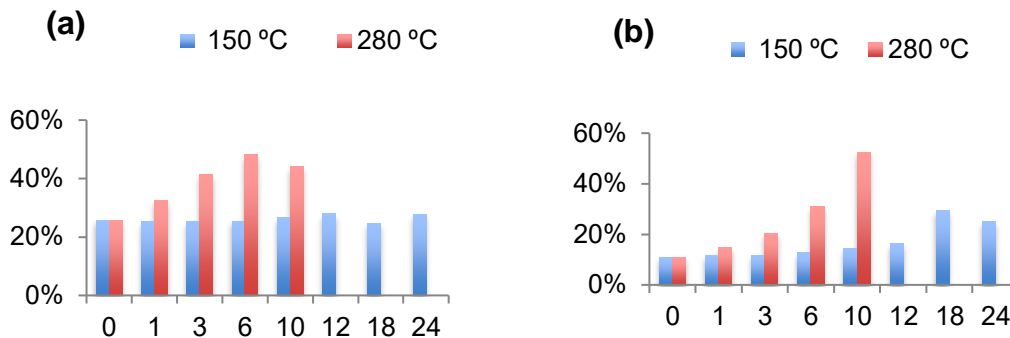
Para calcular el porcentaje de ácidos grasos mayoritarios en el aceite de semilla de uva original y el correspondiente a su tratamiento térmico en 150 °C y 280 °C se utilizaron las siguientes señales del espectro de RMN <sup>1</sup>H: metilos de ácido oleico y ácido linoleico, 0.89 ppm; metilo de ácido alfa-linolénico, 0.98 ppm; metileno alílico, 2.04 ppm; metileno alfa a carbonilo, 2.3 ppm, y metileno doblemente alílico, 2.77 ppm (ver apéndice, figura A 14-A 23) utilizando la metodología propuesta por Guillén y Ruíz, 2003.<sup>18</sup>

Empleando esta última metodología, se encontró la siguiente proporción de ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original: 62.34 % ácido linoleico, 25.74% ácido oleico, 11.01% ácidos grasos saturados cuyos valores son similares a los previamente reportados.<sup>4</sup>

Por otra parte, en el aceite tratado térmicamente en 150 °C durante 24 h, el ácido linoleico disminuyó su porcentaje de 62.34 a 46.32 % (35 % degradación) y en el tratado térmicamente en 280 °C por 10 h se redujo de 62.34 a 1.06 % (98 % degradado), ver gráfica 1. Además, la relación entre el ácido oleico con el ácido linoleico y los ácidos grasos saturados con el ácido linoleico aumenta drásticamente en el tratamiento en 280 °C, y paulatinamente en el tratamiento en 150 °C (ver grafica 2). Lo cual, pueda deberse a la drástica reducción del ácido linoleico debido a la susceptibilidad de los ácidos grasos doblemente insaturados a la peroxidación lipídica, en comparación con los ácidos grasos mono-insaturados.<sup>12,13</sup>

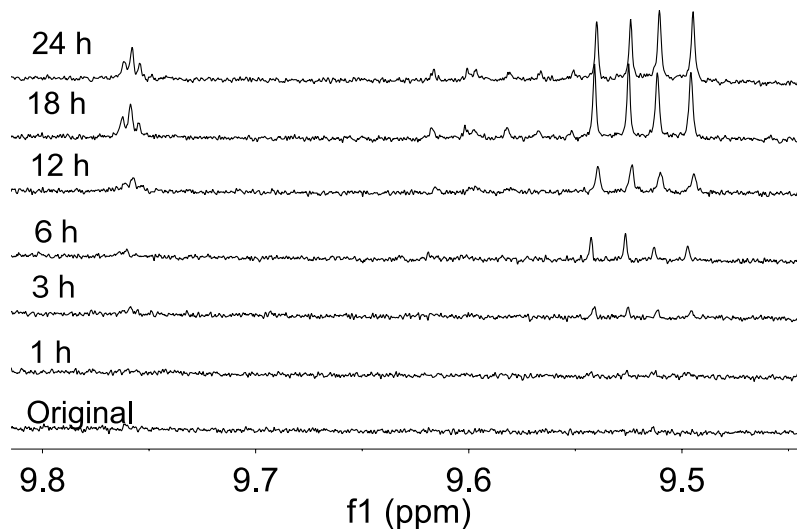


**Gráfica 1:** Porcentaje de ácido linoleico en el aceite de semilla tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C empleando la metodología de Guillén y Ruíz.



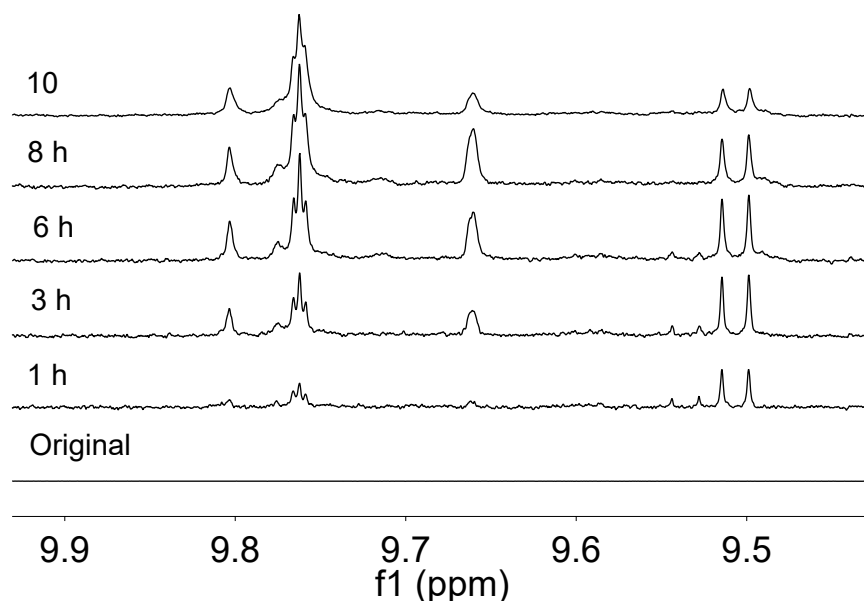
**Gráfica 2:** Relación entre el ácido oleico con el ácido linoleico (a) y los ácidos grasos saturados con el ácido linoleico (b) en el aceite de semilla tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C empleando la metodología de Guillén y Ruíz.

Otros cambios significativos se observaron en la región entre 9.4 ppm y 9.9 ppm, la aparición de tres señales: 9.49 ppm (d), 9.55 ppm (d), y 9.76 ppm (t) en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 12 h y 280 °C por 3 h. Estos desplazamientos químicos corresponden al del hidrógeno de un aldehído, (9 ppm-11 ppm),<sup>26</sup> ver figuras 19 y 20.



**Figura 19:** Espectros de RMN <sup>1</sup>H en 500 MHz de aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C en tiempos de 1 a 24 h.





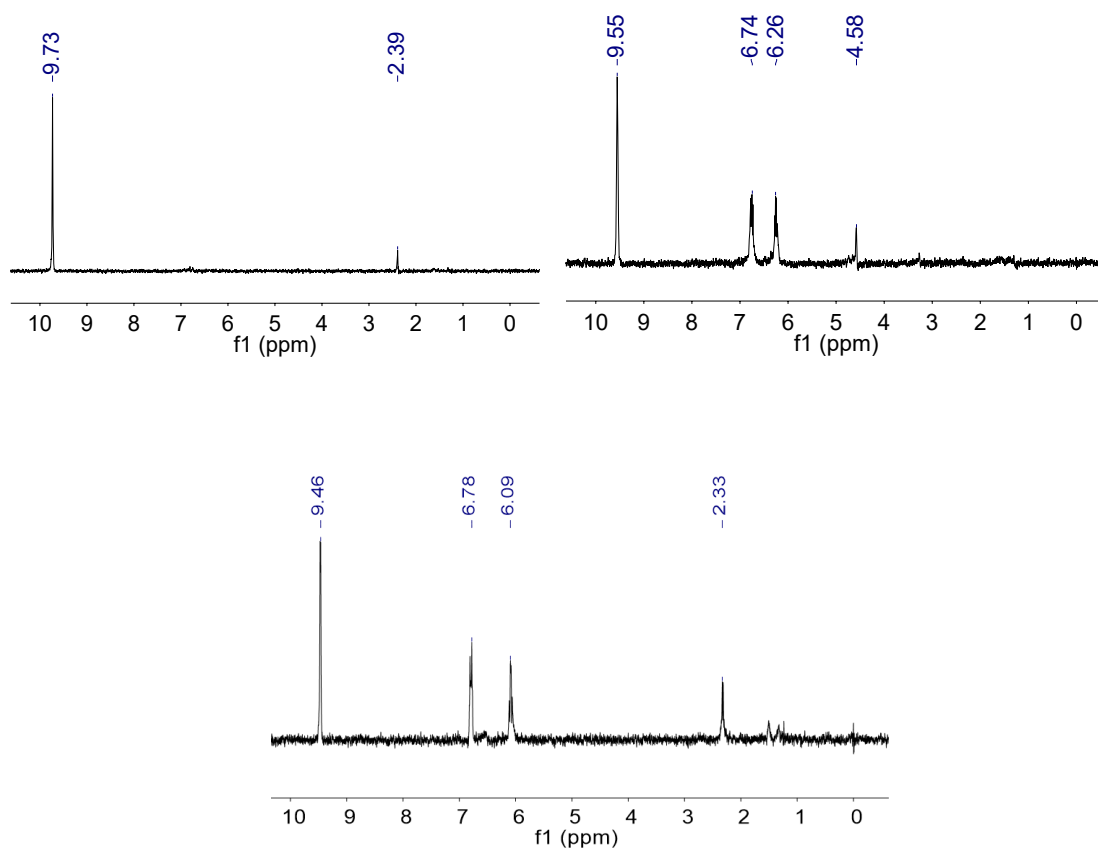
**Figura 20:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz de aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C en tiempos de 1 a 10 h.

Las señales de 9.73 ppm (t), 9.55 ppm (d) y 9.46 ppm (d) se irradiaron mediante un experimento TOCSY selectivo para conocer su conectividad con otras señales presentes en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h, ver figura 21.

La señal de 9.73 ppm (CHO, t) tiene conectividad con un metileno alfa al carbonilo (2.39 ppm) cuyo desplazamiento es ligeramente mayor al carbonilo de los ácidos grasos de los triglicéridos; por lo tanto, correspondería a un **aldehído saturado**.

La señal de 9.55 ppm (CHO, d) tiene conectividad con las señales de 6.74 ppm (R-CH=CH-CHO), 6.26 ppm (R-CH=CH-CHO) y 4.58 ppm (CHO-CH=CH-CHOH-R) y pudiera corresponder a **4-hidroxi-2-nonenal** un compuesto volátil derivado del ácido linoleico.<sup>30</sup> Su presencia se corrobora en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h siendo más pronunciada la señal entre 12 h y 18 h, y después desciende en 24 h. Además, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite de uva tratado térmicamente en 280 °C por 10 h, la señal es tenue en 1 h de tratamiento térmico y desaparece posteriormente, figura 20.

Por último, la señal en 9.46 ppm (CHO, d) tiene conectividad con hidrógenos en 6.78 ppm (R-CH=CH-CHO), 6.09 ppm (R-CH=CH-CHO), 2.33 ppm (CH=CH-CH<sub>2</sub>-) y pudiera corresponder a un **trans-2-alquenal**.

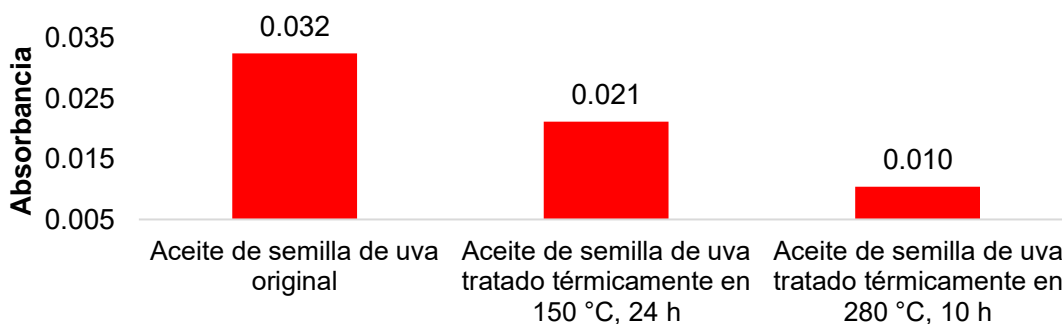


**Figura 21:** TOCSY selectivo del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h, señales de 9.73 ppm (t), 9.55 ppm (d) y 9.46 ppm (d).

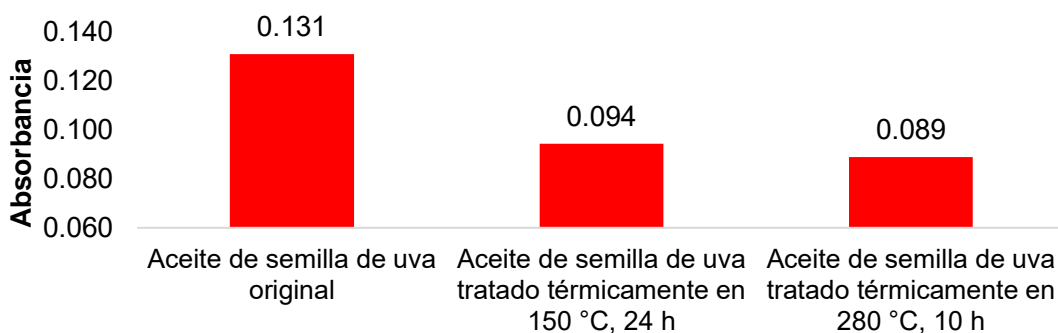
## 7.2. Caracterización del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C y 280 °C mediante IR-FT.

A partir de los espectros de IR-FT del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150°C por 24 h y tratado térmicamente en 280°C por 10 h (ver apéndice, figuras A 24-A 26), se destacan cuatro regiones: 3008 cm<sup>-1</sup>, metinos vinílicos *cis*; 2853 cm<sup>-1</sup>, metilenos; 1741-1743 cm<sup>-1</sup>, carbonilo de éster de glicerol, y 990-960 cm<sup>-1</sup>, metinos vinílicos *trans*.

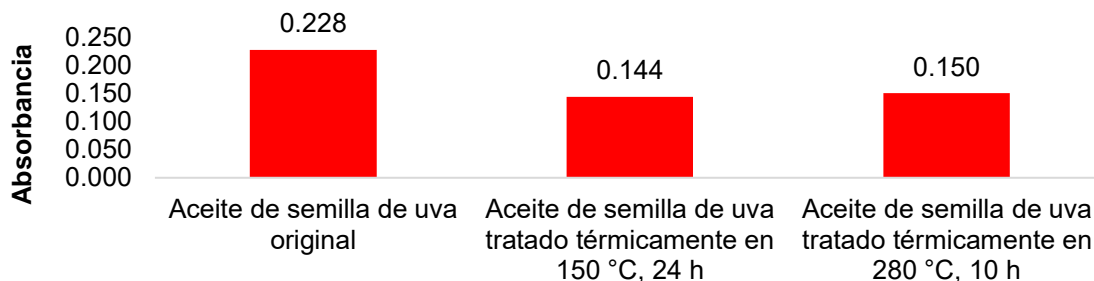
Las bandas en las regiones en  $3008\text{ cm}^{-1}$ ,  $2853\text{ cm}^{-1}$ , y  $1741\text{-}1743\text{ cm}^{-1}$  mostraron una disminución a medida que aumenta la temperatura, gráfica 3-5. El descenso de la absorbancia en la región de  $3008\text{ cm}^{-1}$  probablemente se deba al deterioro de los dobles enlaces *cis*, porque se empiezan a formar hidroperóxidos, primeros productos de degradación en los aceites tratados térmicamente;<sup>13,21</sup> igual ocurre, en la región de  $2853\text{ cm}^{-1}$ . La disminución en la región entre  $1741\text{ cm}^{-1}$  y  $1743\text{ cm}^{-1}$  probablemente se deba a la hidrólisis del éster de glicerol; además, el desplazamiento de la señal de  $1741\text{ cm}^{-1}$  hacia  $1743\text{ cm}^{-1}$  ocurre con la sobreposición de los carbonilos del éster de glicerol con los carbonilos de los productos de degradación secundarios.<sup>23</sup>



**Gráfica 3:** *Metinos vinílicos cis* ( $3008\text{ cm}^{-1}$ ).

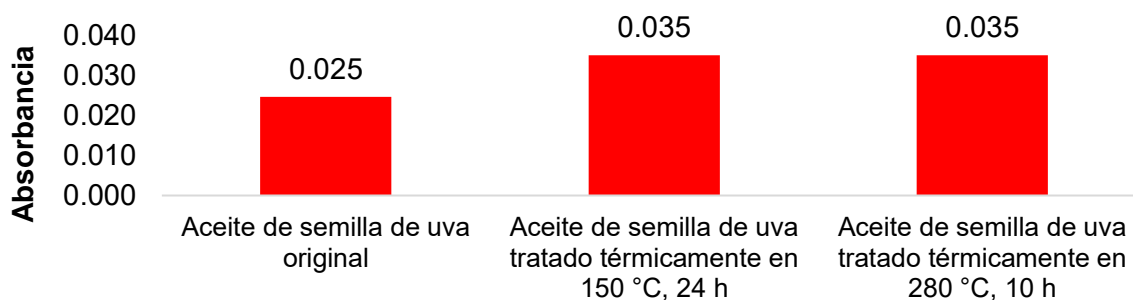


**Gráfica 4:** *Metilenos* ( $2853\text{ cm}^{-1}$ ).



**Gráfica 5:** Carbonilos ( $1741\text{ cm}^{-1}$  –  $1743\text{ cm}^{-1}$ ).

Por otra parte, en la región entre  $990\text{ cm}^{-1}$  y  $960\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a metinos vinílicos *trans* no se observó señal en el aceite de semilla de uva original, pero sí en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en  $150\text{ °C}$  por 24 h y  $280\text{ °C}$  por 10 h (gráfica 6), lo cual se debe a la formación de dienos conjugados *trans* y grupos olefínicos *trans*<sup>21,31</sup> y tiene concordancia con los resultados obtenidos en el espectro de TOCSY selectivo (RMN  $^1\text{H}$ ).



**Gráfica 6:** Metinos vinílicos *trans* ( $960\text{ cm}^{-1}$  –  $99\text{ cm}^{-1}$ ).

### 7.3. Caracterización del aceite de semilla de uva original mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM).

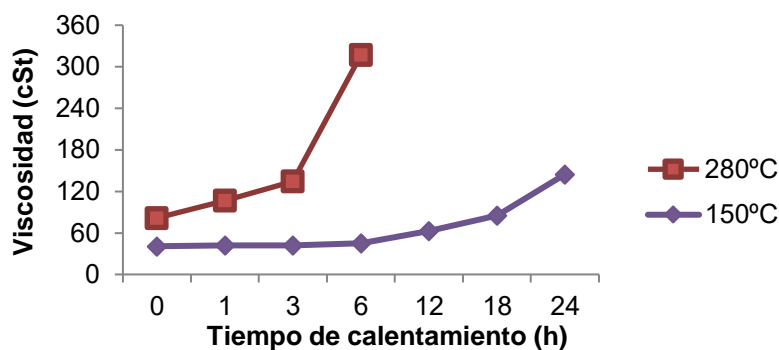
Se realizó una reacción de transesterificación con el aceite de semilla de uva original, y con el tratado térmicamente en  $150\text{ °C}$  por 24 h y  $280\text{ °C}$  por 10 h. El seguimiento de la reacción se realizó mediante TLC y se comprobó la ruptura de los ácidos grasos unidos al glicerol mediante un experimento de RMN  $^1\text{H}$ . En éste se observa la desaparición de las señales características del éster de

glicerol, (G) 4.29 ppm, (H) 4.14 ppm y (I) 5.26 ppm (ver apéndice, figuras A 27-29).

En los espectros de masas, se encontraron estructuras de los ésteres metílicos de los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite de semilla de uva: ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico. Utilizando de referencia el pico base y el ion molecular (ver apéndice, figura A 30-A 46), los cuales se compararon con los previamente reportados.<sup>32,33</sup>

#### 7.4. Viscosidad

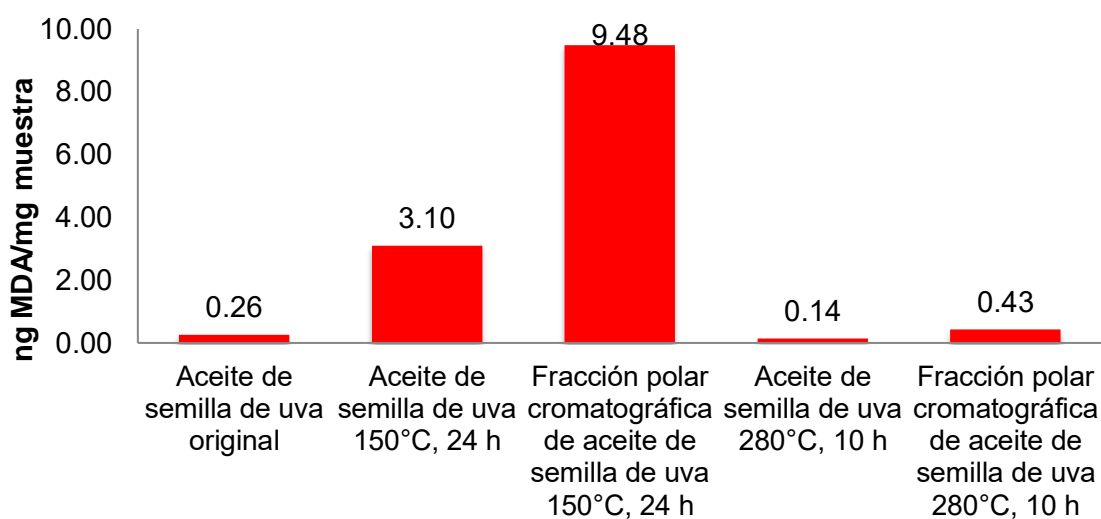
La viscosidad del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C se mantuvo constante durante las primeras 6 horas de tratamiento térmico y posteriormente aumentó progresivamente, mientras en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C la viscosidad aumentó a partir de 1 h y drásticamente a partir de las 6 h, ver gráfica 7. De lo anterior se destaca que la viscosidad aumenta conforme transcurre la oxidación de los ácidos grasos por el acoplamiento de los radicales alquilo generados en los ácidos grasos esterificados formando polímeros constituidos por unidades de triglicéridos.<sup>14</sup> Por ello, se comprueba que la viscosidad es un parámetro fisicoquímico del grado de deterioro de los aceites.



**Gráfica 7:** viscosidad del aceite de semilla de uva original y tratados térmicamente en 150 °C y 280 °C.

7.5. Grado de oxidación lipídica, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

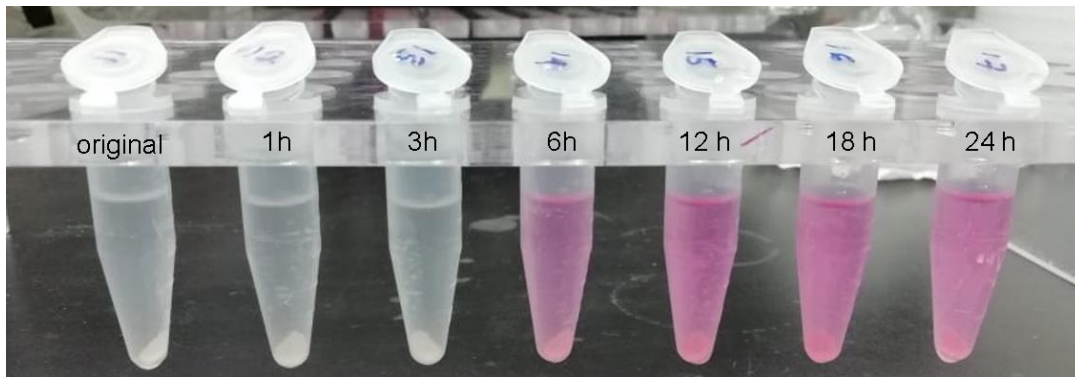
El aceite de semilla de uva original mostró mayor concentración de MDA (0.29 ng/mg) que el tratado térmicamente en 280 °C por 10 h (0.28 ng/mg). Por otra parte, el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h presentó una mayor concentración de MDA (3.10 ng/mg) en comparación con los dos anteriores, ver gráfica 8. Las concentraciones mayores de MDA en un tratamiento térmico en 150 °C se pudieran deber a una mayor concentración de hidroperóxidos que son menos estables en temperatura alta ya que rápidamente se convierten en aldehídos porque se aumenta la velocidad de la reacción por una mayor energía de activación derivada del aumento de temperatura,<sup>12</sup> y la formación de aldehídos volátiles que se pierden por el drástico tratamiento térmico.



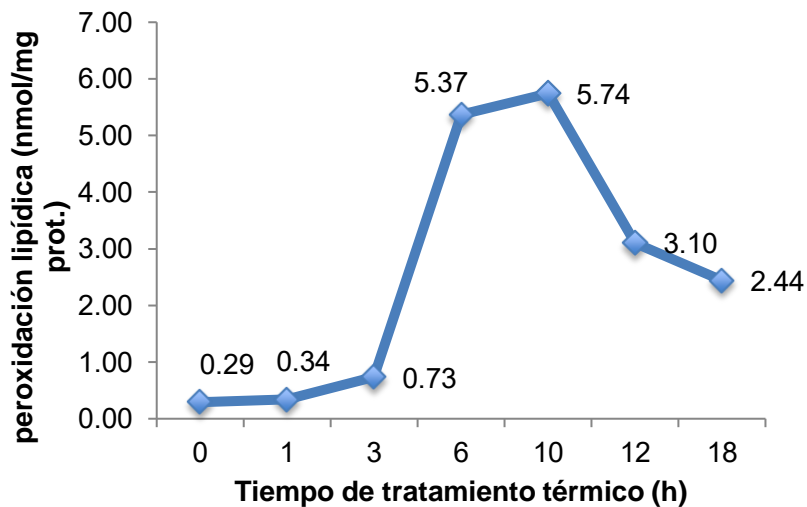
**Gráfica 8:** Concentración de MDA en el aceite de semilla de uva original, tratado térmicamente en 150 °C por 24 h y 280 °C por 10 h.

7.6. *Inducción de peroxidación lipídica en el aceite de semilla de uva, evaluado mediante la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogeneizado de cerebro de ratón.*

La actividad prooxidante fue nula en el aceite original y los aceites tratados térmicamente en 150 °C durante 1 h y 3 h. En cambio, en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C durante 6 h la inducción de la peroxidación lipídica aumentó pronunciadamente y se mantuvo constante por los siguientes tiempos de degradación, figura 22 y Gráfica 9.



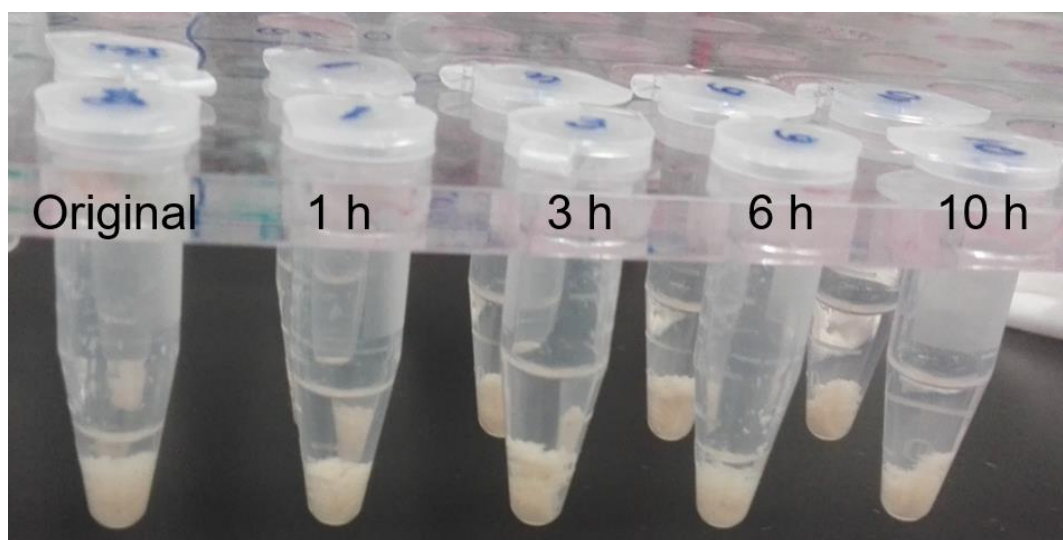
**Figura 22:** Inducción de peroxidación lipídica del aceite de semilla de uva original y tratados térmicamente en 150°C.



**Gráfica 9:** Inducción de peroxidación lipídica del aceite de semilla de uva original y tratados térmicamente en 150°C.

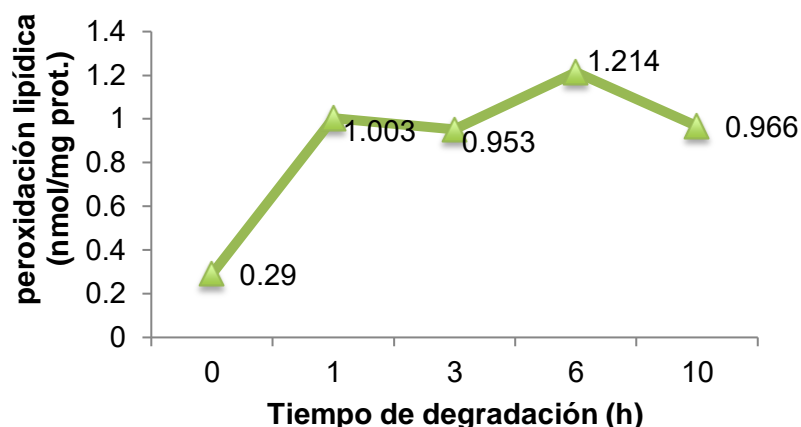
Por otra parte, el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C no presentó inducción de peroxidación lipídica, figura 23 y Gráfica 10.

Los dos ensayos de TBARS concuerdan entre sí. En ambos se destaca que el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 280 °C tienen menor cantidad de aldehídos en comparación con el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C. Sin embargo, mediante RMN <sup>1</sup>H se logró identificar al 4-hidroxi-2-nonenal, un producto de oxidación secundarios derivado del ácido linoleico<sup>34,35</sup> y que después de una deshidratación forma un aldehído doblemente insaturado<sup>36</sup> el cual pudiera reaccionar con el TBA y formar un cromóforo cuya absorbancia es cercana a los 540 nm.<sup>37</sup> Por esta razón en los ensayos de TBARS hay mayor cantidad de aldehídos en el tratamiento térmico en 150 °C en comparación con el de 280°C, puesto que este producto de degradación se consume rápidamente en 280 °C. De lo anterior, se propone que en estos ensayos de TBARS se determinó el contenido de aldehídos doblemente insaturados derivados del 4-hidroxinonenal y no malonaldehído.



**Figura 23:** Inducción de peroxidación lipídica del aceite de semilla de uva original y tratados térmicamente en 280 °C.





**Gráfica 10:** Inducción de peroxidación lipídica del aceite de semilla de uva original y tratados térmicamente en 280 °C.

### 7.7. Modelo genérico de toxicidad en *Artemia Salina*.

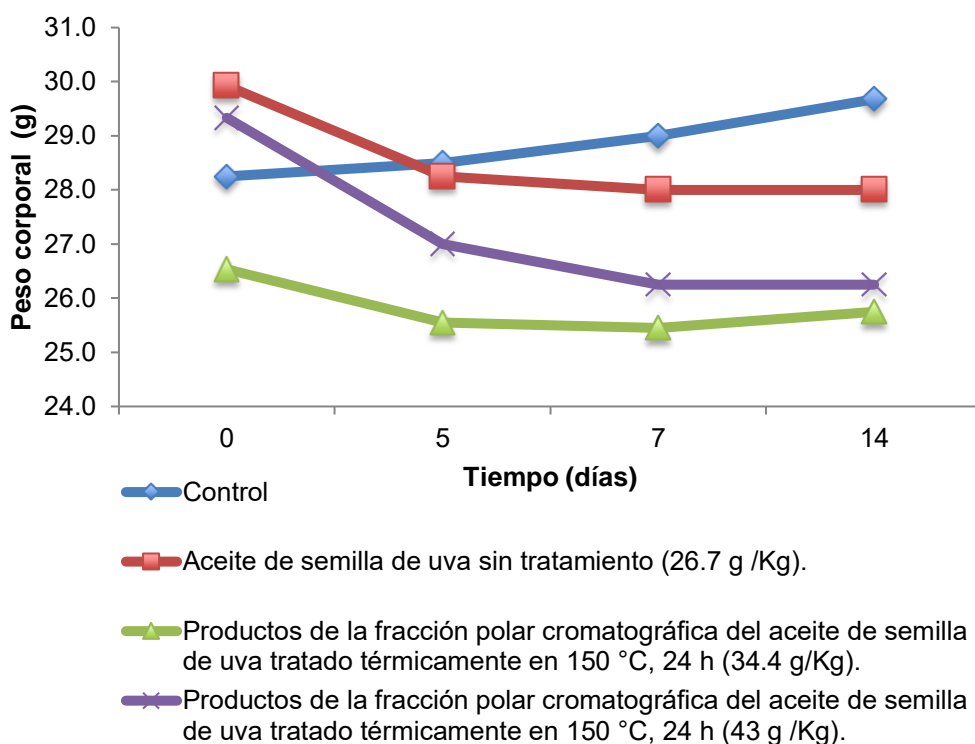
En este modelo se utilizó el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C por 24 h y 280 °C por 10 h, para los cuales se evaluó su toxicidad en tres concentraciones, 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1000 µg/mL, ver tabla 5. El aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C por 10 h mostró 100 % toxicidad para una concentración de 1000 µg/mL seguido del aceite de semilla de uva original, 11.11 %, y el tratado térmicamente en 150 °C por 24 h, 6.45 %.

Muestras de aceite de semilla de uva.	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
Aceite original	0 %	0 %	11.11 %
Aceite tratado térmicamente 150°C, 24 h.	0 %	0 %	6.45 %
Aceite tratado térmicamente 280°C, 10 h.	0 %	0 %	100 %
Fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente 150°C, 24 h.	0 %	0 %	100 %

**Tabla 5:** Porcentaje de toxicidad del aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C por 24 h y 280 °C por 10 h, en el modelo de ecotoxicidad.

### 7.8. Modelo de toxicidad aguda en ratones.

Se evaluó la toxicidad de la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h en un modelo murino que previamente mostró 100% de toxicidad en el modelo de *Artemia Salina*. En general, ningún ratón murió, solo el grupo de ratones tratados con una dosis de 43 g/kg presentaron una pérdida de peso del 10 %, gráfica 11. Por esta razón se propone que la reutilización del aceite con tratamiento térmico prolongado en la elaboración de alimentos pudiera repercutir en problemas de salud.



**Gráfica 11:** Estudio de toxicidad aguda de los productos de la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

El aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C mostró estabilidad térmica durante las primeras 6 h de tratamiento térmico. Además, el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C por 24 h no presentó toxicidad en el modelo murino, pero sí repercutió en la pérdida de peso de los ratones. Por lo tanto, reutilizar el aceite pudiera repercutir en daños en la salud que serían observados a largo plazo.

Por lo tanto, tratar térmicamente los aceites comestibles en temperaturas drásticas e intervalos de tiempo cortos favorece la formación de productos de degradación secundarios que pudieran repercutir en daños a la salud que serían observados a largo plazo. Asimismo, la viscosidad de los aceites es mayor en temperaturas altas y puede ser un indicador de su grado de deterioro y por ende su toxicidad. Por estas razones, se recomienda cocinar los alimentos empleando temperaturas bajas y no reutilizar el aceite.

También, se observó que la RMN  $^1\text{H}$  fue la técnica que proporcionó más información durante el tratamiento térmico de las muestras de aceites. El experimento de RMN  $^1\text{H}$ , TOCSY selectivo fue útil en la elucidación de la estructura de tres productos de degradación presentes en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h: 4-hidroxi-2-nonenal, aldehídos saturados e insaturados.

## CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Jackson RS. 2 - Grape Species and Varieties. In: Jackson RS, ed. *Wine Science (Fourth Edition)*. Fourth Edi. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press; 2014:21-67. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00002-6>
2. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A (SAGARPA). *PLANEACIÓN AGRÍCOLA NACIONAL 2017-2030: UVA Mexicana*. México; 2017.
3. Pardo JE, Fernández E, Rubio M, Alvarruiz A, Alonso GL. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*vitis vinifera*). *Eur J Lipid Sci Technol*. 2009;111:188-193. doi:10.1002/ejlt.200800052
4. Lachman J, Hejtmánková A, Táborský J, et al. Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;63:620-625. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.044
5. O'Brien RD. Fats and Oils Analysis. In: *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. Tercera. New York: CRC Press; 2009:197-261. doi:10.1201/9780203483664.ch3
6. Gunstone F. Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Second Edition. *Veg Oils Food Technol Compos Prop Uses, Second Ed*. 2011:1-24.
7. Katragadda HR, Fullana A, Sidhu S, Carbonell-Barrachina ÁA. Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chem*. 2010;120:59-65. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.070
8. Guillen MD, Goicoechea E. Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from 1H nuclear magnetic resonance data. *Food Chem*. 2009;116:183-192. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2009.02.029
9. Guillén MD, Ruiz A. Study by Proton Nuclear Magnetic Resonance of the

- Thermal Oxidation of Oils Rich in Oleic Acyl Groups. *J Am Oil Chem Soc.* 2005;82:349-355.
10. Codină GG, Poroch-Serițan M, Mironeasa S. Blending of sunflower oil with grape seed oil: impact on physico-chemical parameters and radical scavenging activity. *Food Environ Saf.* 2015;14:101-107.
  11. Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira JA, Ramalhosa E. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Res Int.* 2013;50:161–166. doi:10.1016/j.foodres.2012.09.039
  12. Choe E, Min DB. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2006;5(4):169-186. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x
  13. Frankel EN. Lipid oxidation. *Prog Lipid Res.* 1980;19(1-2):1-22. doi:10.1016/0163-7827(80)90006-5
  14. Dobarganes MC, Marquez-Ruiz G. Formation and Analysis of Oxidized Monomeric, Dimeric, and Higher Oligomeric Triglycerides. In: Erickson MD, ed. *Deep Frying: Chemistry, Nutrition, and Practical Applications: Second Edition.* USA; 2007:1-447.
  15. Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *Eur Food Res Technol.* 2013;236(1):1-15. doi:10.1007/s00217-012-1866-9
  16. Guillén, María D and Ruiz A. Edible oils: Discrimination by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *J Sci Food Agric.* 2003;83(4):338-346. doi:10.1002/jsfa.1317
  17. Hanganu A, Todașca MC, Chira NA, Maganu M, Roșca S. The compositional characterisation of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chem.* 2012;134(4):2453-2458. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.048
  18. Guillén MD, Ruiz A. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance as a fast tool for

- determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003;105(9):502-507. doi:10.1002/ejlt.200300799
19. Guillén MD, Ruiz A. Oxidation process of oils with high content of linoleic acyl groups and formation of toxic hydroperoxy- and hydroxyalkenals. A study by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *J Sci Food Agric*. 2005;85(14):2413-2420. doi:10.1002/jsfa.2273
  20. van de Voort FR, Ismail AA, Sedman J, Emo G. Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*. 1994;71(3):243-253. doi:10.1007/BF02638049
  21. Guillén, María D and Cabo N. Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions  
Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *J Sci Food Agric*. 2000;80:2028-2036. doi:10.1002/1097-0010(200011)80:14<2028::AID-JSFA713>3.0.CO;2-4
  22. Guillen M, Goicoechea E. Detection of Primary and Secondary Oxidation Products by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in Sunflower Oil during Storage. *J Agric Food Chem*. 2007;55:10729-10736. doi:10.1021/jf071712c
  23. Dubois J, van de Voort FR, Sedman J, Ismail AA, Ramaswamy HR. Quantitative Fourier transform infrared analysis for anisidine value and aldehydes in thermally stressed oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1996;73(6):787-794. doi:10.1007/BF02517956
  24. Anastopoulos G, Zannikou Y, Stamoulis S, Kalligeros S. Transesterification of Vegetable Oils with Ethanol and Characterization of the Key Fuel Properties of Ethyl Esters. *Energies*. 2009;2(2):362-376. doi:10.3390/en20200362
  25. PROFECO. Estudio de calidad: aceites vegetales comestibles. *Rev del Consum*. 2010:36-46.

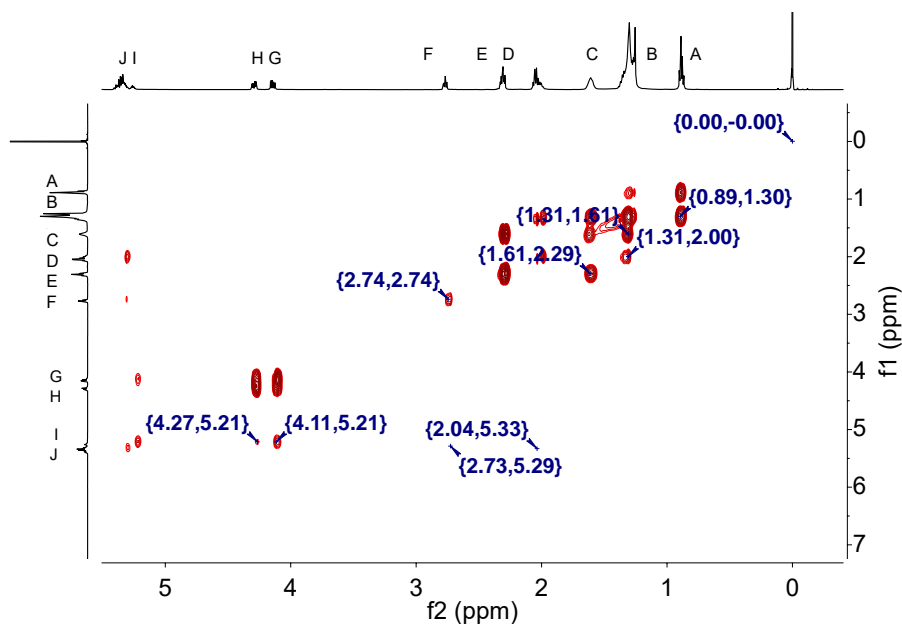
26. Jacobsen NE. NMR data interpretation explained : understanding 1D and 2D NMR spectra of organic compounds and natural products. 2017:131, 232-244.
27. Aerts HAJ, Jacobs PA. Epoxide yield determination of oils and fatty acid methyl esters using <sup>1</sup>H NMR. *JAOCs, J Am Oil Chem Soc.* 2004;81(9):841-846. doi:10.1007/s11746-004-0989-1
28. Goicoechea E, Guillen MD. Analysis of Hydroperoxides, Aldehydes and Epoxides by <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance in Sunflower Oil Oxidized at 70 and 100 °C. *J Agric Food Chem.* 2010;58(10):6234-6245. doi:10.1021/jf1005337
29. Silverstein, Robert M, Francis X. Webster and DJK. Spectrometric Identification of Organic Compounds. *J Am Chem Soc.* 2005:119. doi:10.1021/ja00903a077
30. Goicoechea E, Guillén MD. Volatile compounds generated in corn oil stored at room temperature. Presence of toxic compounds. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014;116(4):395-406. doi:10.1002/ejlt.201300244
31. Dubois J, van de Voort FR, Sedman J, Ismail AA, Ramaswamy HR. Quantitative Fourier transform infrared analysis for anisidine value and aldehydes in thermally stressed oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1996;73(6):787-794. doi:10.1007/BF02517956
32. Wu H-Q, Huang X-L, Lin X-S, Huang F, Zhu Z-X, Ma Y-F. Gas Chromatographic Retention Time Rule and Mass Spectrometric Fragmentation Rule of Fatty Acids and Its Application in Food. *Chinese J Anal Chem.* 2007;35(7):998-1003. doi:10.1016/S1872-2040(07)60065-6
33. Christie WW. The Lipid Web. <http://lipidhome.co.uk/ms/methylesters.htm>. Published 2018.
34. Pryor WA, Porter NA. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(6):541-543. doi:10.1016/0891-

5849(90)90153-A

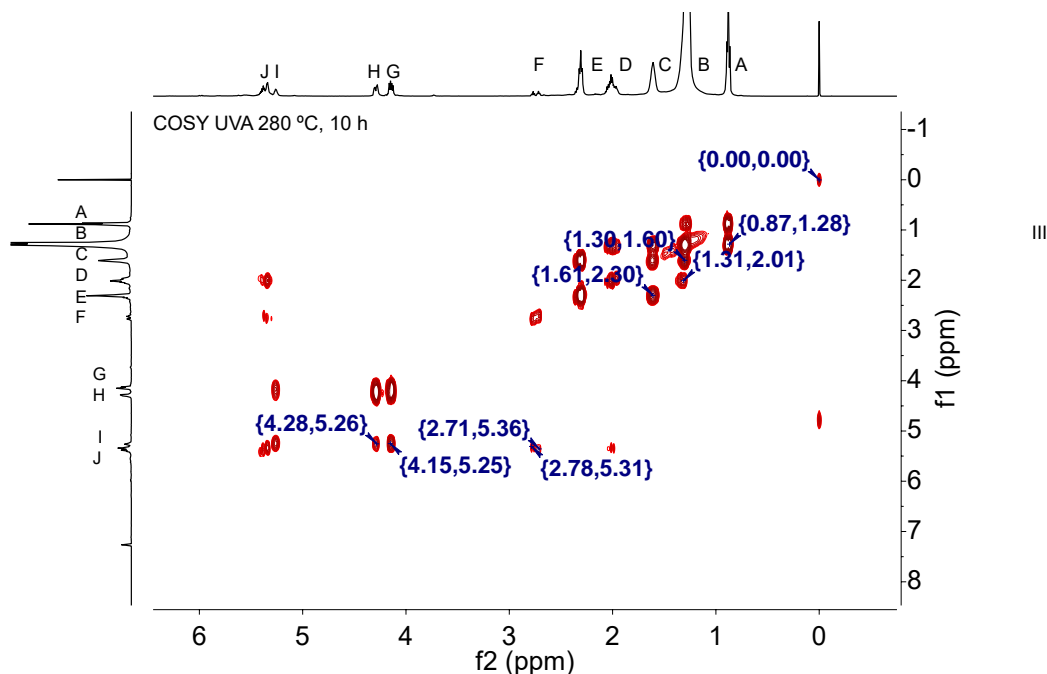
35. Gentile F, Arcaro A, Pizzimenti S, et al. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genet.* 2017;4:103-137. doi:10.3934/genet.2017.2.103
36. Witz G, Lawrie NJ, Zaccaria A, Ferran HE. The reaction of 2-thiobarbituric acid with biologically active alpha, beta-unsaturated aldehydes. *J Free Radic Biol Med.* 1986;2(1):33-39. doi:10.1016/0748-5514(86)90121-2
37. Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of red pigment by a two-step 2-thiobarbituric acid reaction of alka-2,4-dienals. Potential products of lipid oxidation. *Lipids.* 1988;23(11):1024-1031. doi:10.1007/BF02535647



## APÉNDICE



**Figura A 1:** Espectro de RMN bidimensional, COSY en 500 MHz, del aceite de semilla de uva tratado térmicamente 150°C, 24h. (A) metilo terminal, (B) metilenos alifáticos, (C) metileno beta al carbonilo, (D) metilenos alílicos, (E) metileno alfa al carbonilo, (F) metileno doblemente alílico, (G y H) metilenos 1 y 3 del glicerol, (I) metino del glicerol, (J) metinos vinílicos.



**Figura A 2:** Espectro de RMN bidimensional, COSY en 500 MHz, del aceite de semilla de uva tratado térmicamente 280°C, 24h. (A) metilo terminal, (B) metilenos alifáticos, (C) metileno beta al carbonilo, (D) metilenos alílicos, (E) metileno alfa al carbonilo, (F) metileno doblemente alílico, (G y H) metilenos 1 y 3 del glicerol, (I) metino del glicerol, (J) metinos vinílicos.

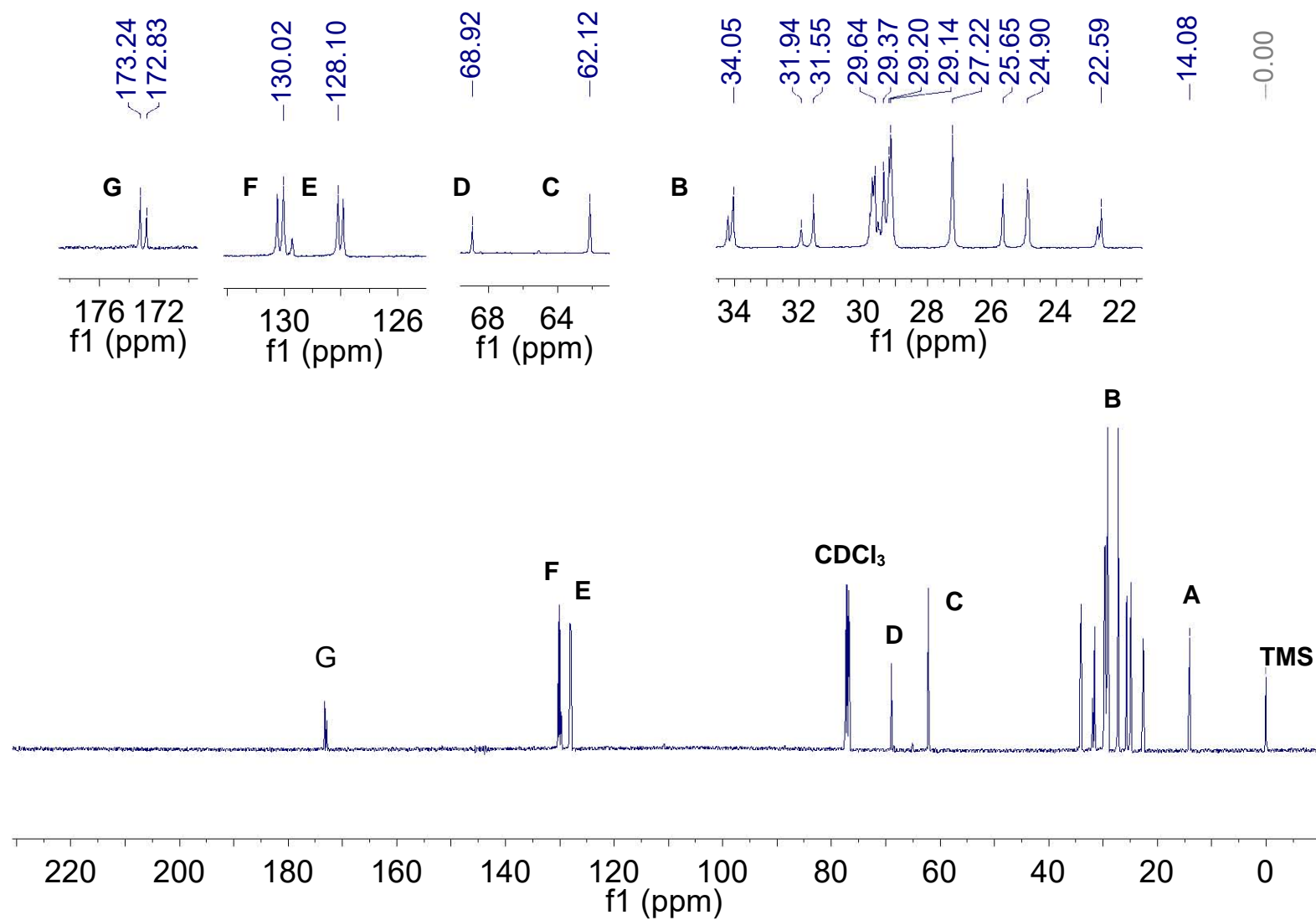


Figura A 3: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva original.

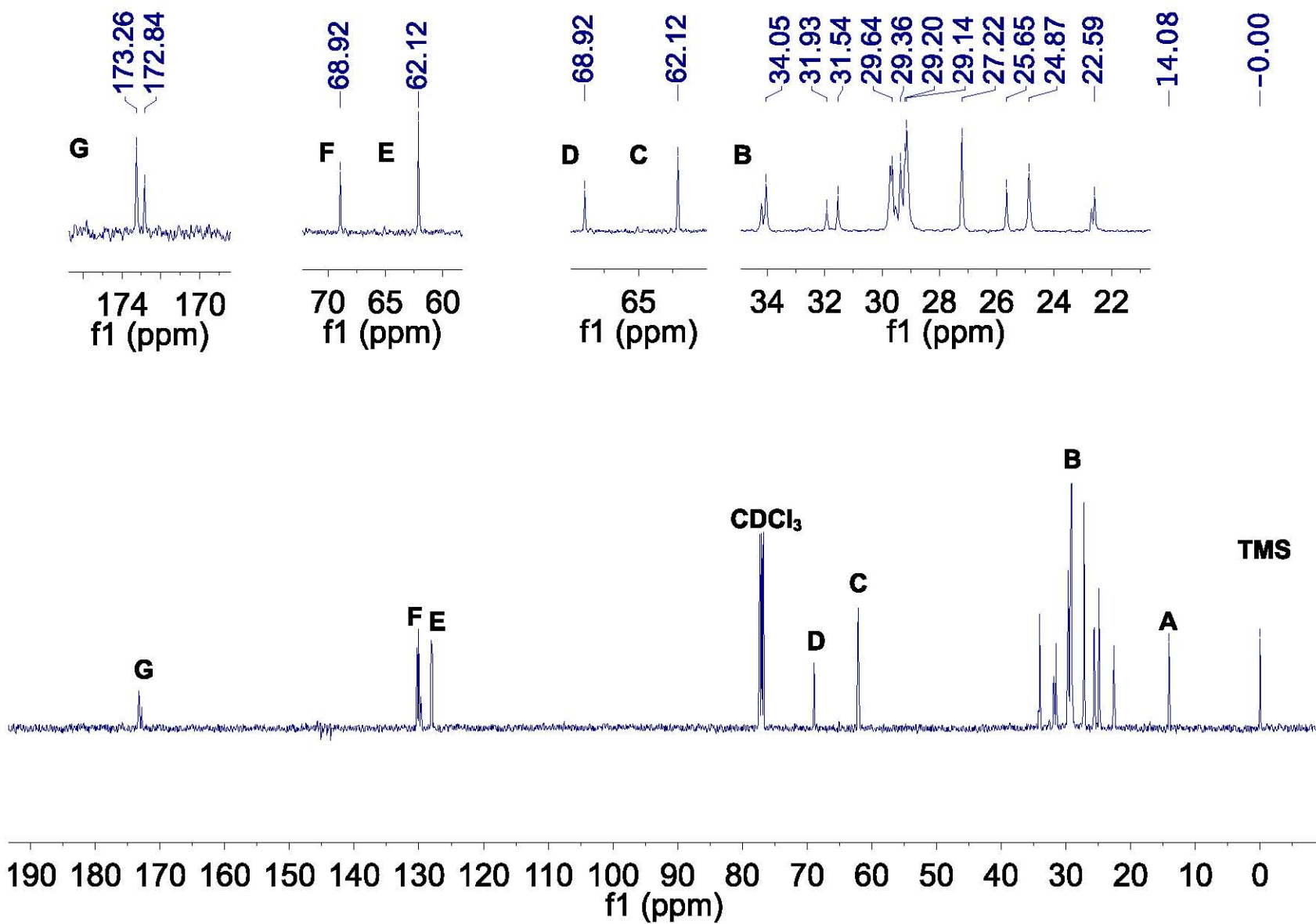


Figura A 4: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C durante 24 horas.

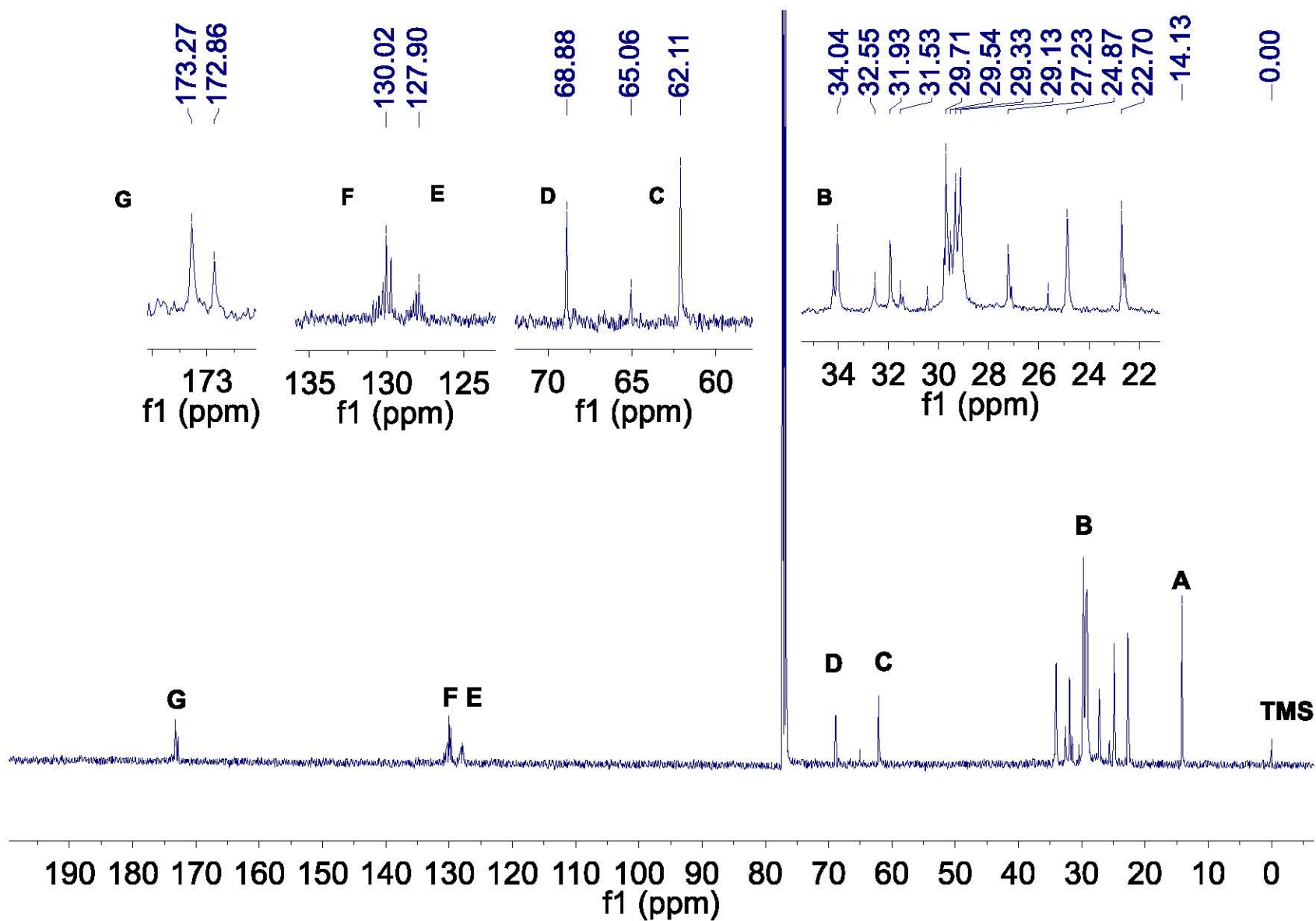
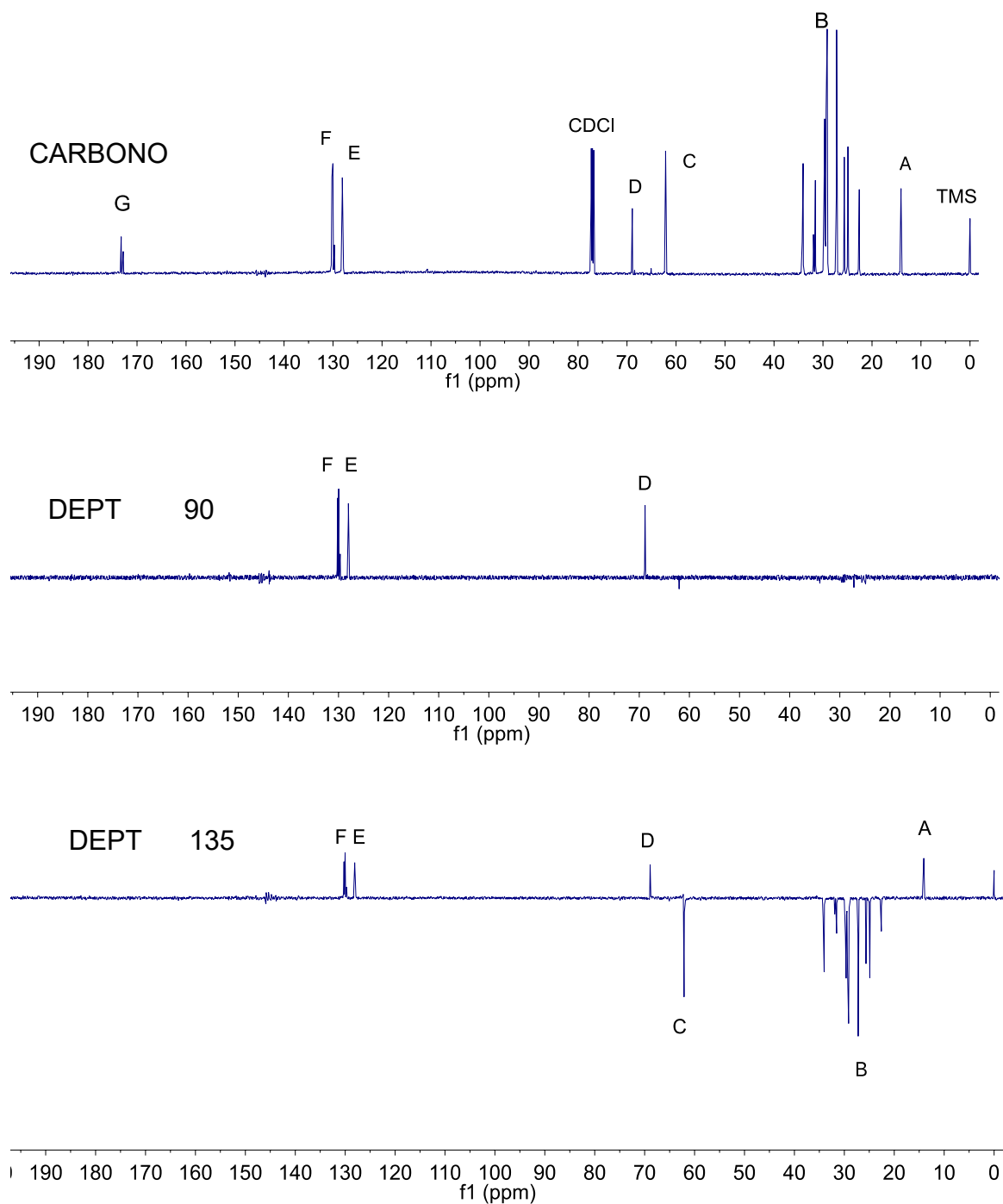
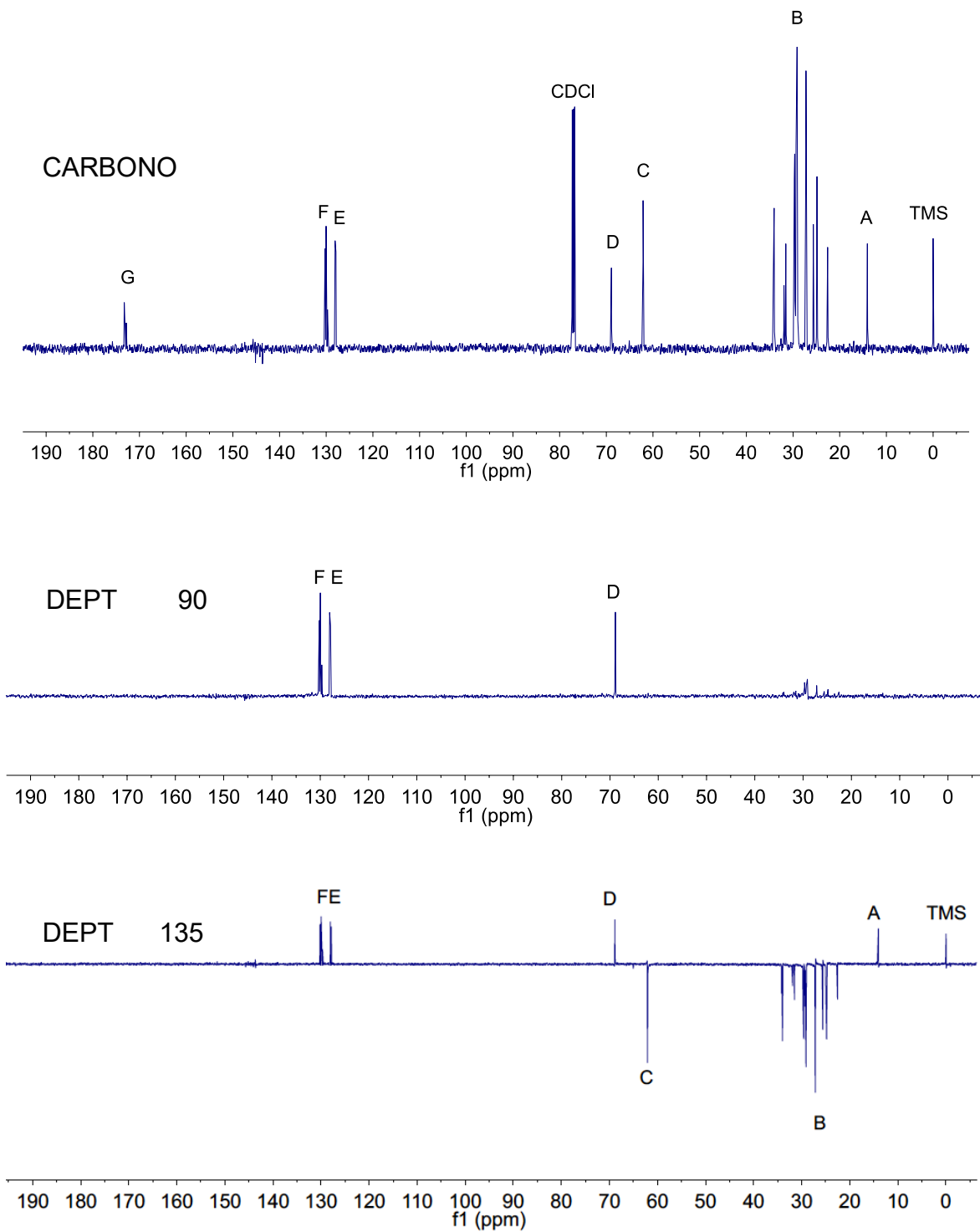


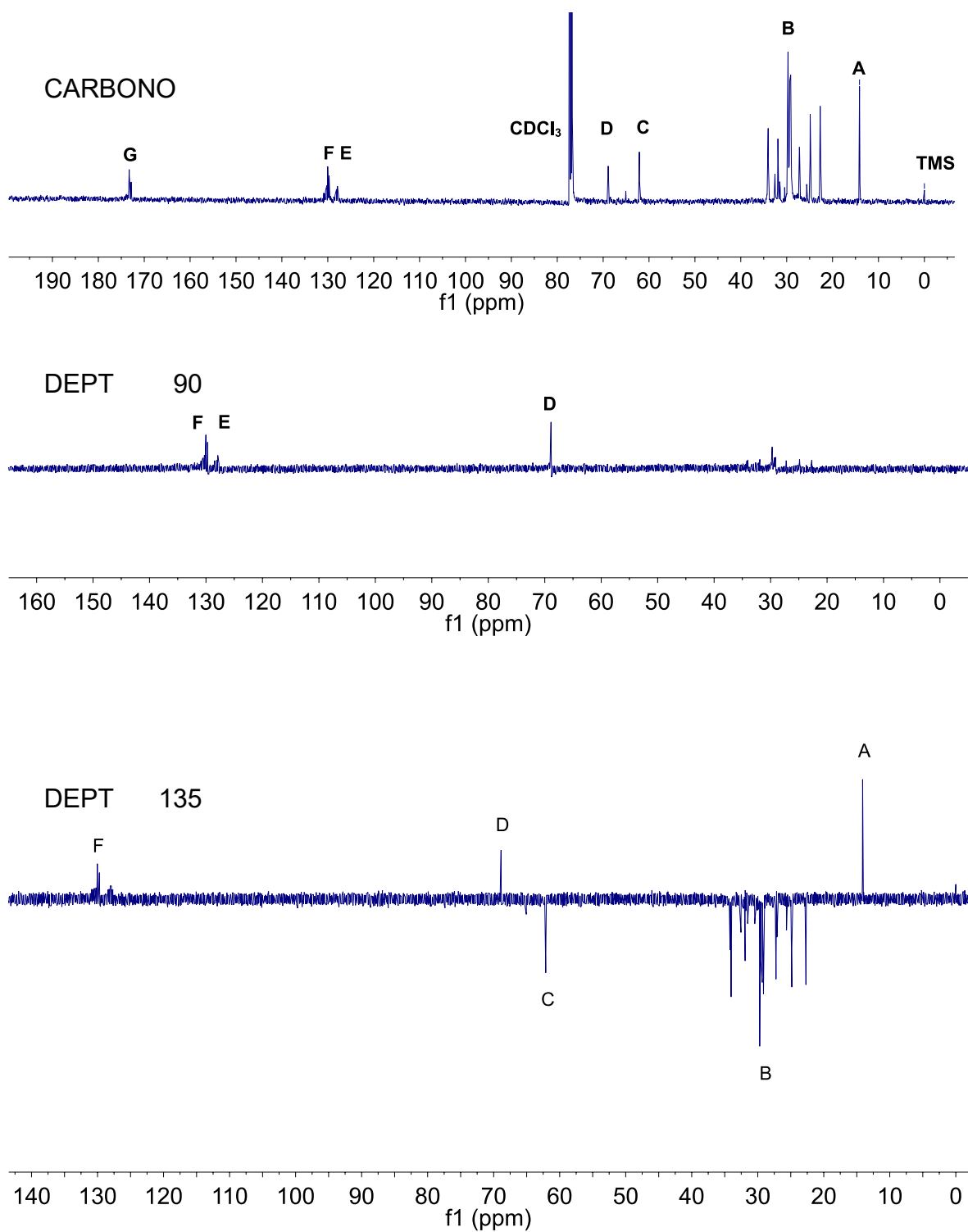
Figura A 5: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C durante 10 horas.



**Figura A 6:** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90 y DEPT 135 en 500 MHz del aceite de semilla de uva original.



**Figura A 7:** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90 y DEPT 135 en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C durante 24 horas.



**Figura A 8:** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90 y DEPT 135 en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C durante 10 horas.

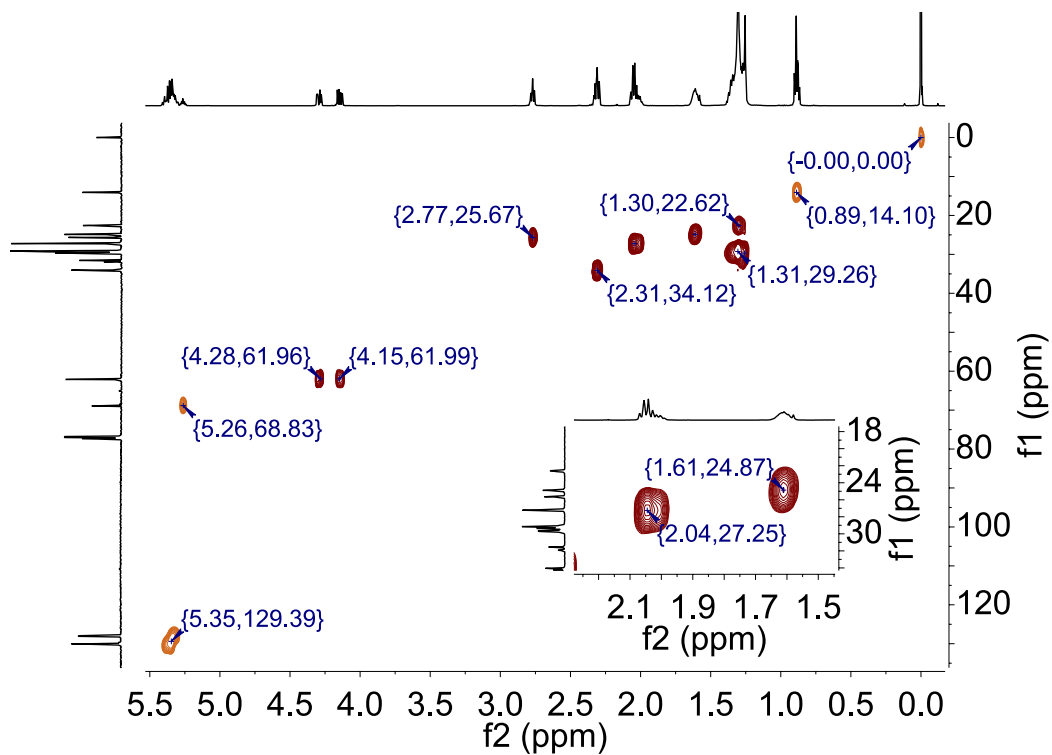


Figura A 9: Espectro de RMN 2D HSQC en 500 MHz del aceite de semilla de uva original.

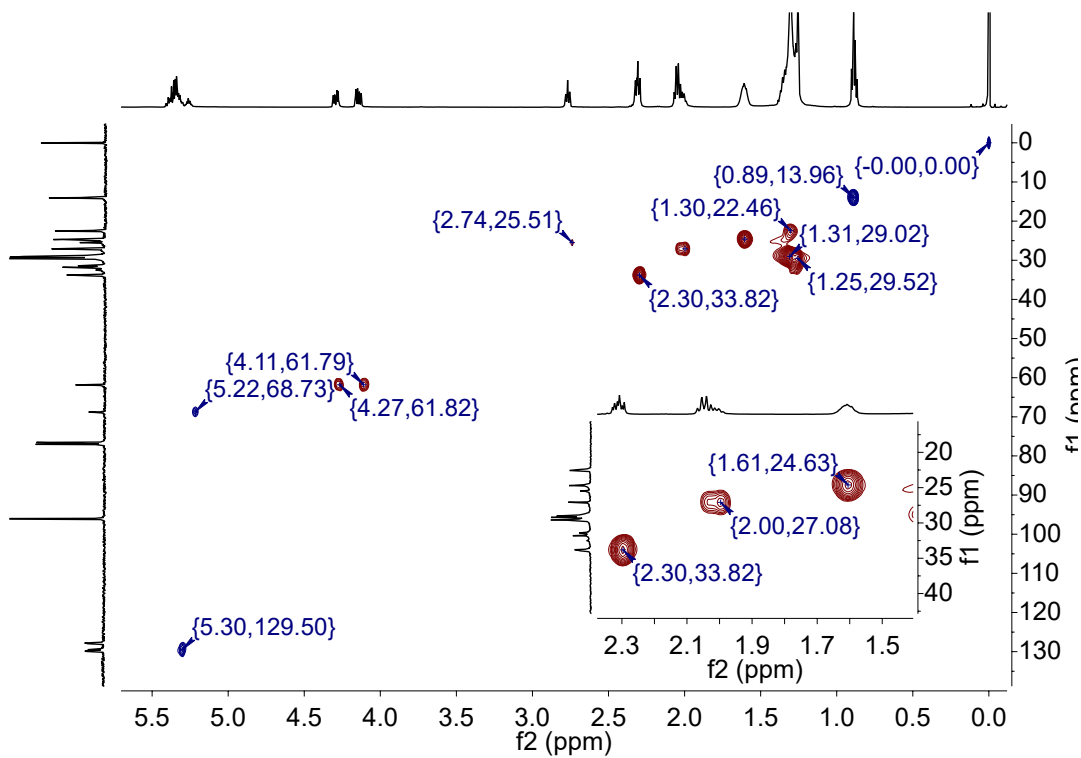
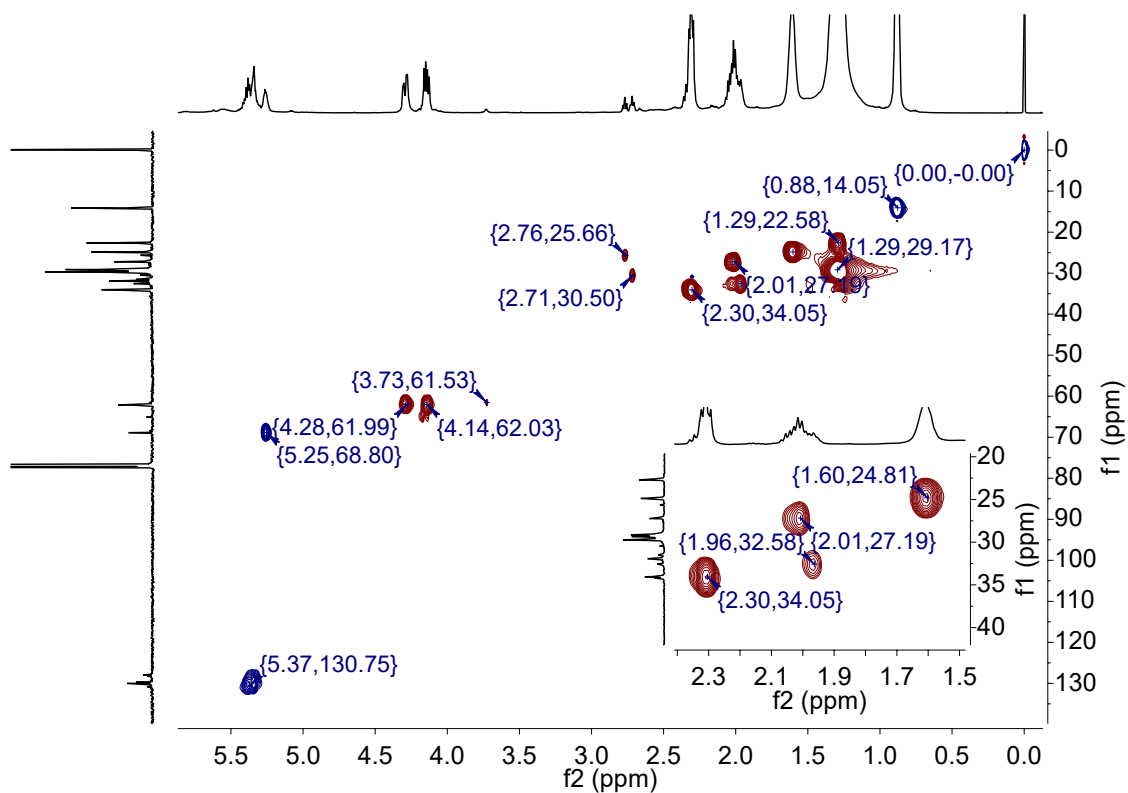


Figura A 10: Espectro de RMN 2D HSQC en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C, 24 h.





**Figura A 11:** Espectro de RMN 2D HSQC en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C, 10 h.

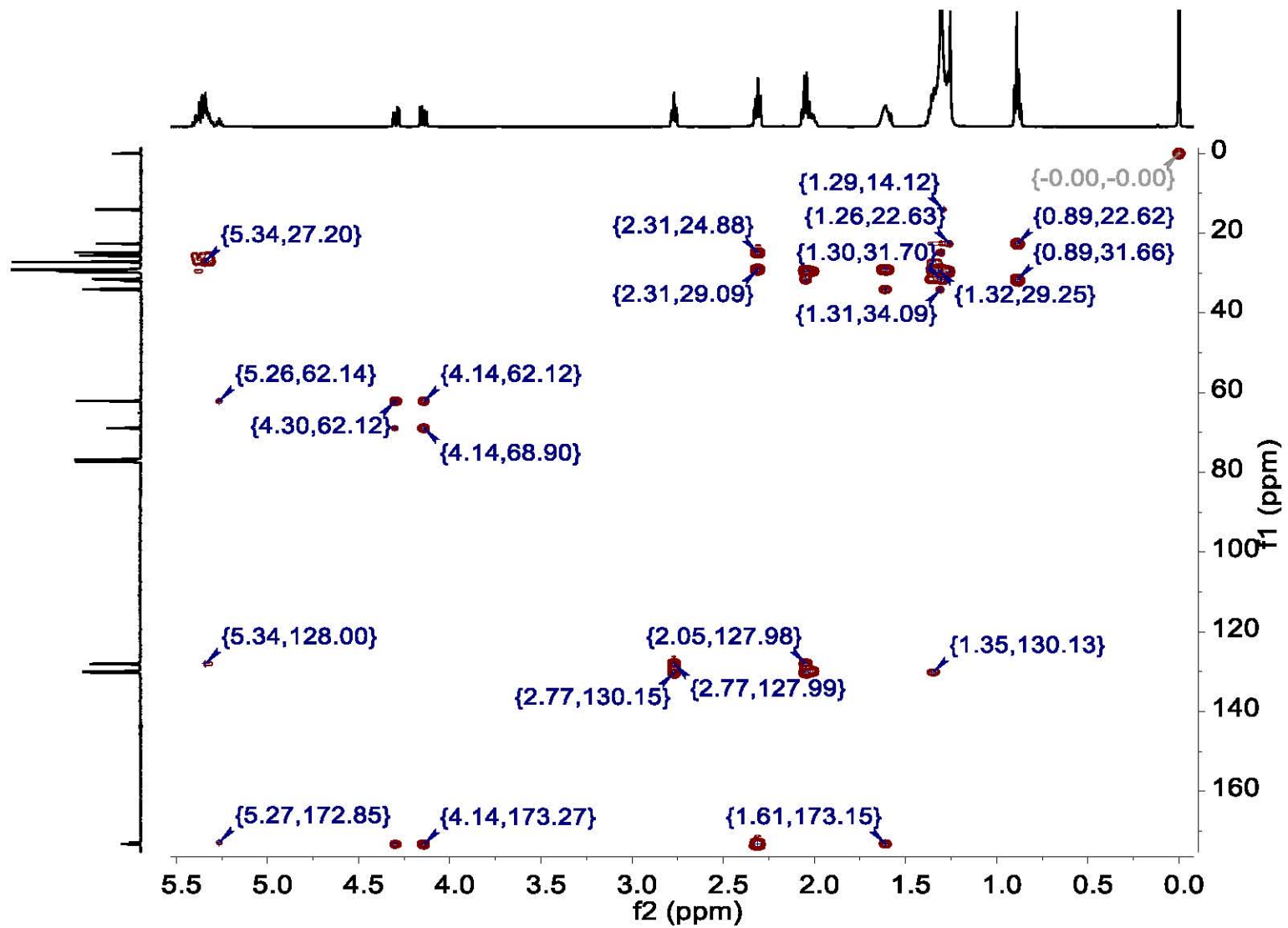


Figura A 12: Espectro de RMN 2D HMBC en 500 MHz del aceite de semilla de uva original.

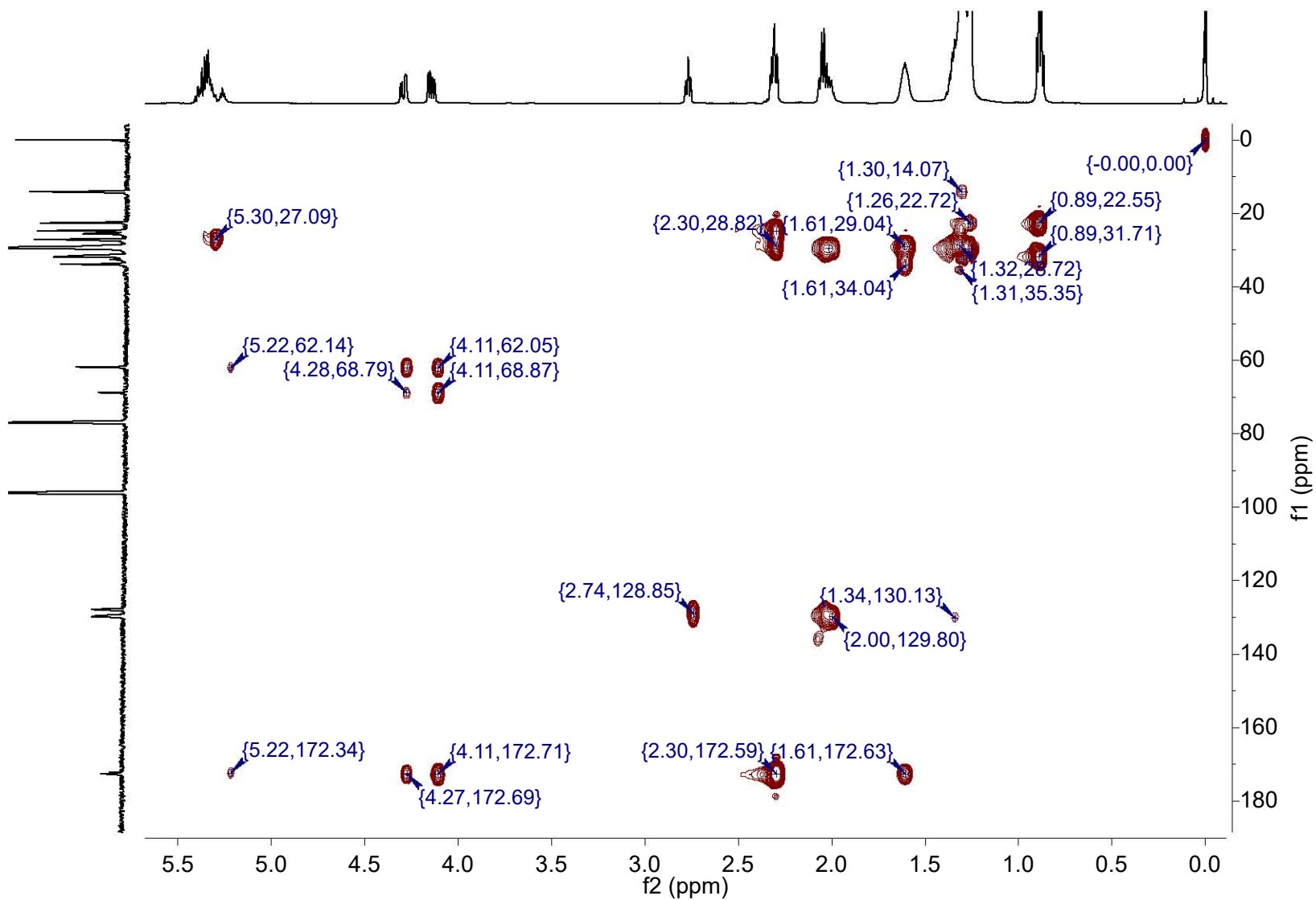


Figura A 13: Espectro de RMN 2D HMBC en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C, 24 h.

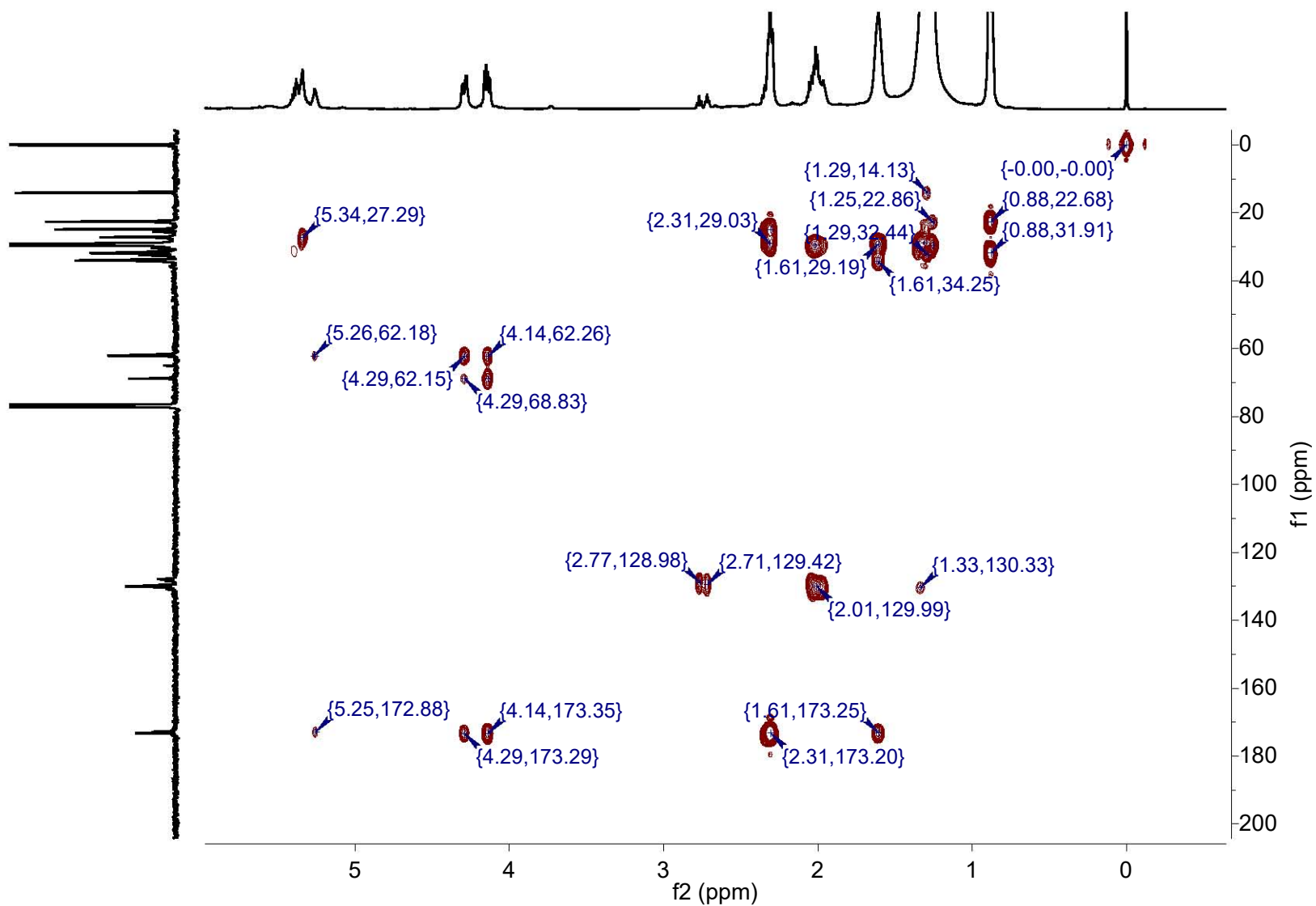
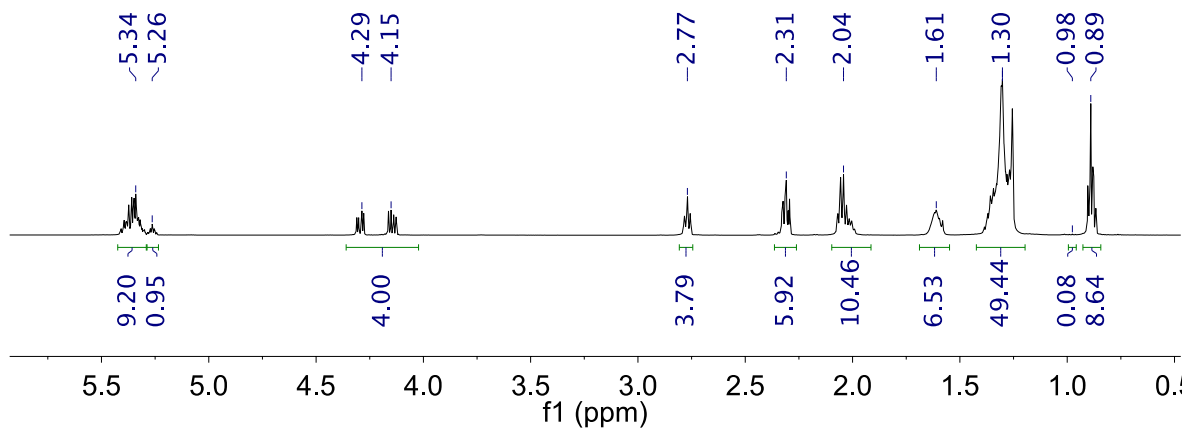
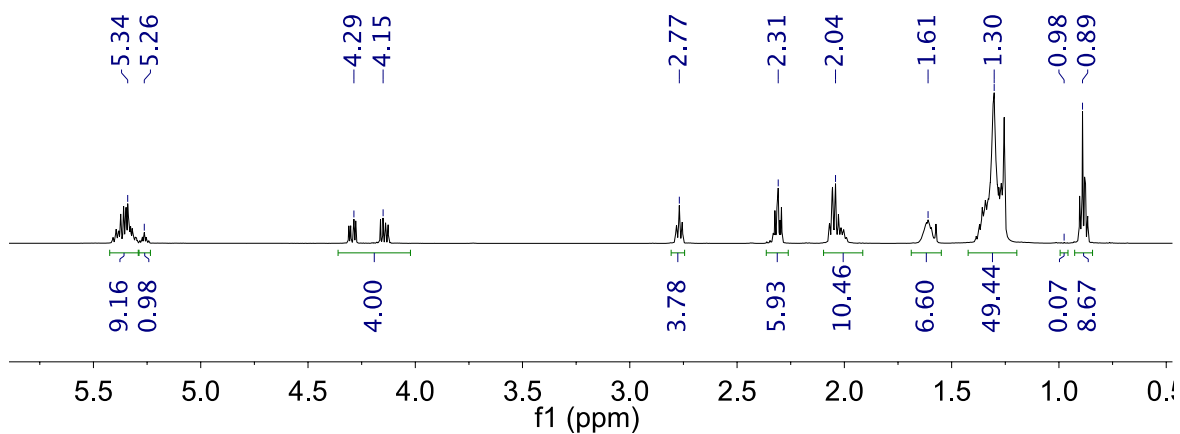


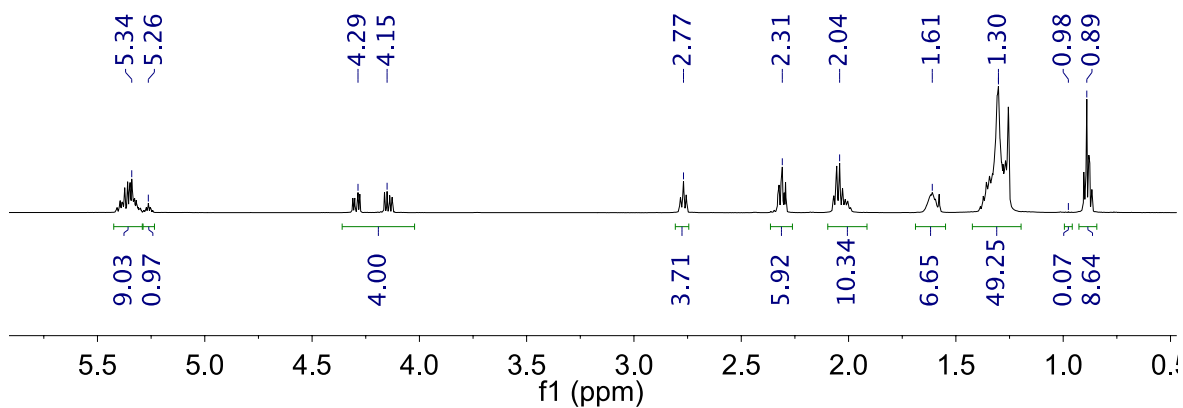
Figura A 14: Espectro de RMN 2D HMBC en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C, 10



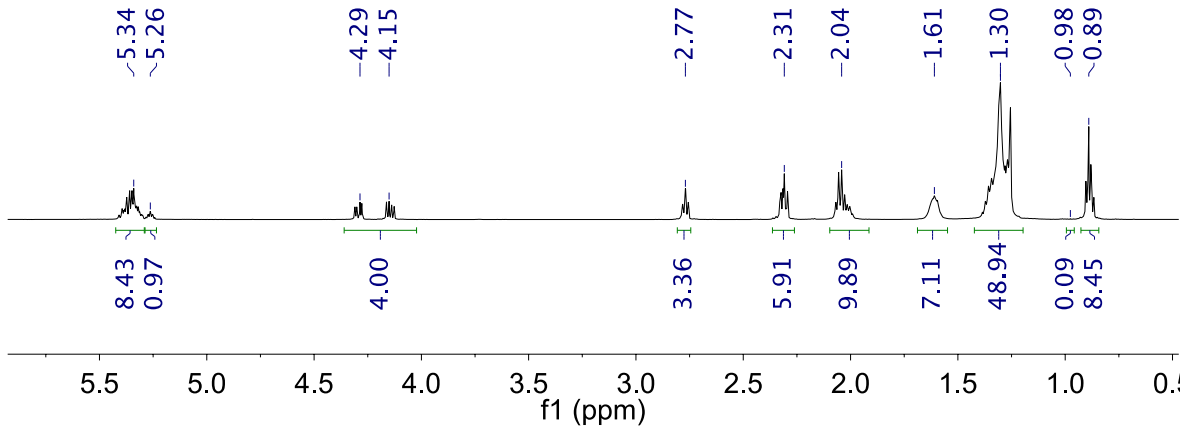
**Figura A 15:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 1 h.



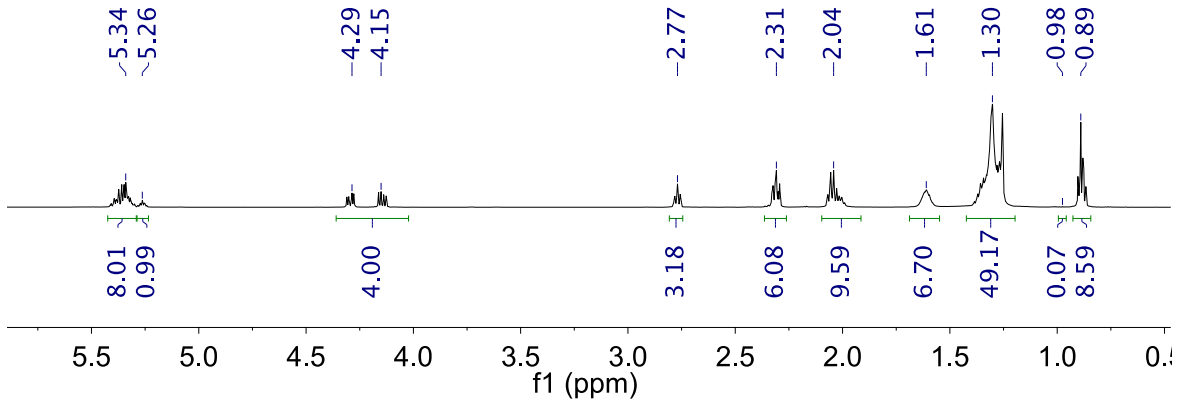
**Figura A 16:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 3 h.



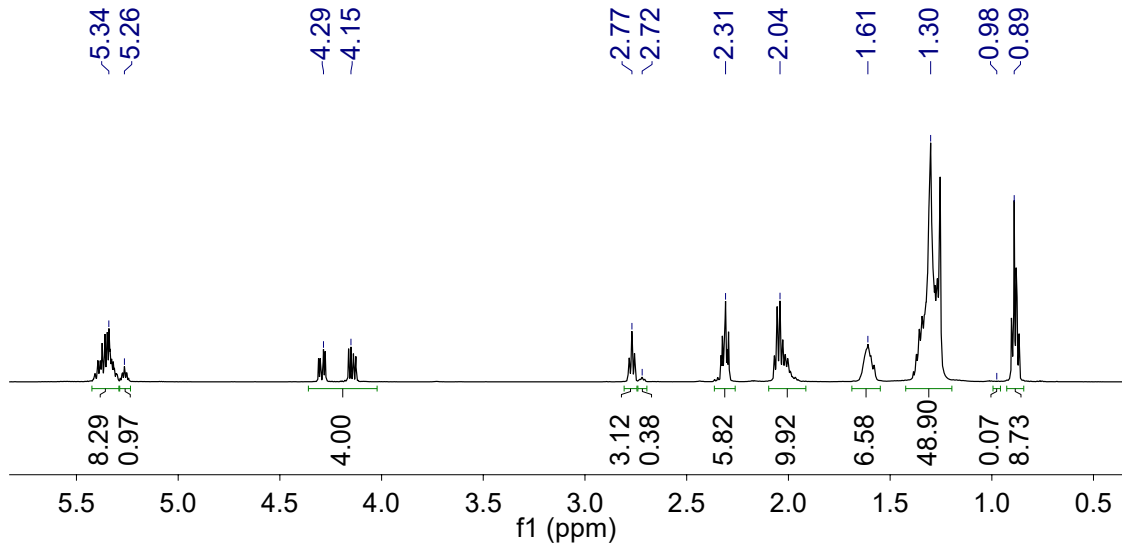
**Figura A 17:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 6 h.



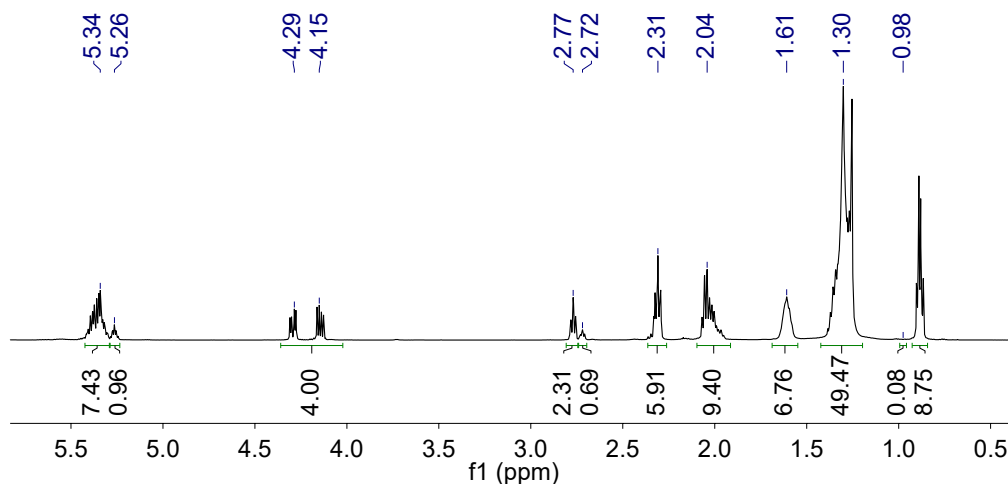
**Figura A 18:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 12 h.



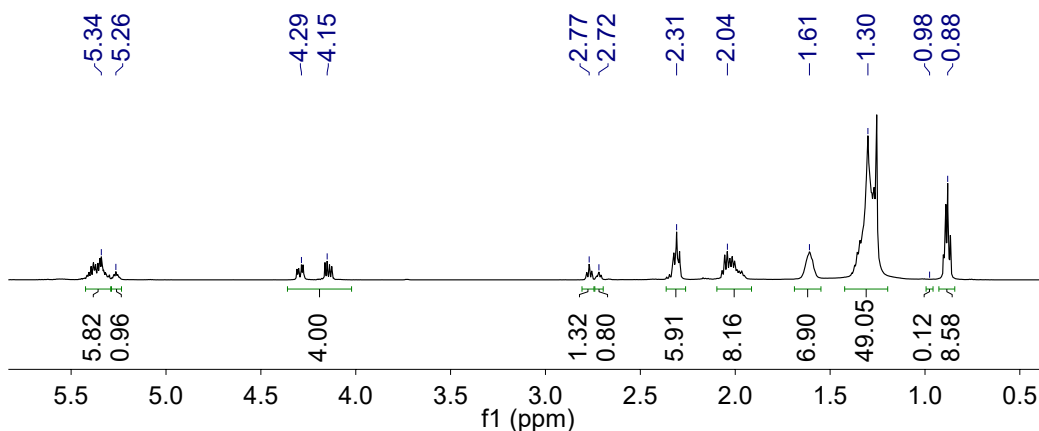
**Figura A 19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 18 h.



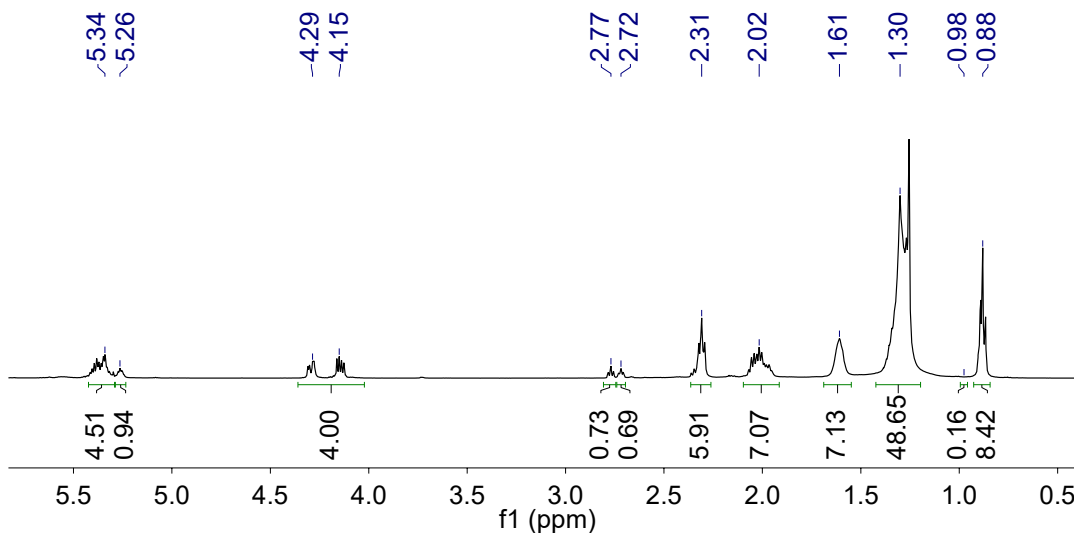
**Figura A 20:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 1 h.



**Figura A 21:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 3 h.



**Figura A 22:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 6 h.



**Figura A 23:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 8 h.

Muestras	Integral					Porcentaje de ácidos grasos			
	Metilo de ácido oleico y linoleico	Metilo de ácido alfa-linolenico	Metileno alílico	Metileno alfa al carbonilo	Metileno doblemente alílico de ácido linoleico	% ácidos grasos saturados	% ácido oleico	% ácido linoleico	% ácido alfa-linoleico
Aceite de semilla de uva original	8.68	0.08	10.43	5.86	3.76	11.01%	25.74%	62.34%	0.91%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 1 h	8.64	0.08	10.46	5.92	3.79	11.66%	25.24%	62.19%	0.92%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 3 h	8.67	0.07	10.46	5.93	3.78	11.80%	25.25%	62.14%	0.80%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 6 h	8.64	0.07	10.34	5.92	3.71	12.67%	25.47%	61.06%	0.80%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 12 h	8.45	0.09	9.89	5.91	3.36	16.33%	27.87%	54.75%	1.05%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 18 h	8.59	0.07	9.59	6.8	3.18	29.49%	24.56%	45.15%	0.81%
Aceite de semilla de uva 150 °C, 24 h	8.63	0.08	8.96	5.98	2.88	25.08%	27.67%	46.32%	0.92%

**Tabla A 1:** Porcentaje molar de ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 150 °C durante 1h, 3h, 6h, 12h, 18 h y 24 h determinado mediante RMN <sup>1</sup>H en 500 MHz.



Muestras	Integral					Porcentaje de ácidos grasos			
	Metilo de ácido oleico y linoleico	Metilo de ácido alfa-linolenico	Metileno alílico	Metileno alfa al carbonilo	Metileno doblemente alílico de ácido linoleico	% ácidos grasos saturados	% ácido oleico	% ácido linoleico	% ácido alfa-linoleico
Aceite de semilla de uva original	8.68	0.08	10.43	5.86	3.76	11.01%	25.74%	62.34%	0.91%
Aceite de semilla de uva 280 °C, 1 h	8.73	0.07	9.92	5.82	3.12	14.78%	32.41%	52.02%	0.79%
Aceite de semilla de uva 280 °C, 3 h	8.75	0.08	9.4	5.91	2.31	20.47%	41.36%	37.24%	0.92%
Aceite de semilla de uva 280 °C, 6 h	8.58	0.12	8.16	5.91	1.32	30.96%	48.11%	19.52%	1.41%
Aceite de semilla de uva 280 °C, 8 h	8.42	0.16	7.07	5.91	0.73	40.19%	49.39%	8.49%	1.93%
Aceite de semilla de uva 280 °C, 10 h	8.12	0.21	5.67	5.93	0.36	52.19%	44.26%	1.03%	2.52%

**Tabla A 2:** Porcentaje molar de ácidos grasos en el aceite de semilla de uva original y tratado térmicamente en 280 °C durante 1h, 3h, 6h, 8 h y 10 h determinado mediante RMN <sup>1</sup>H en 500 MHz.

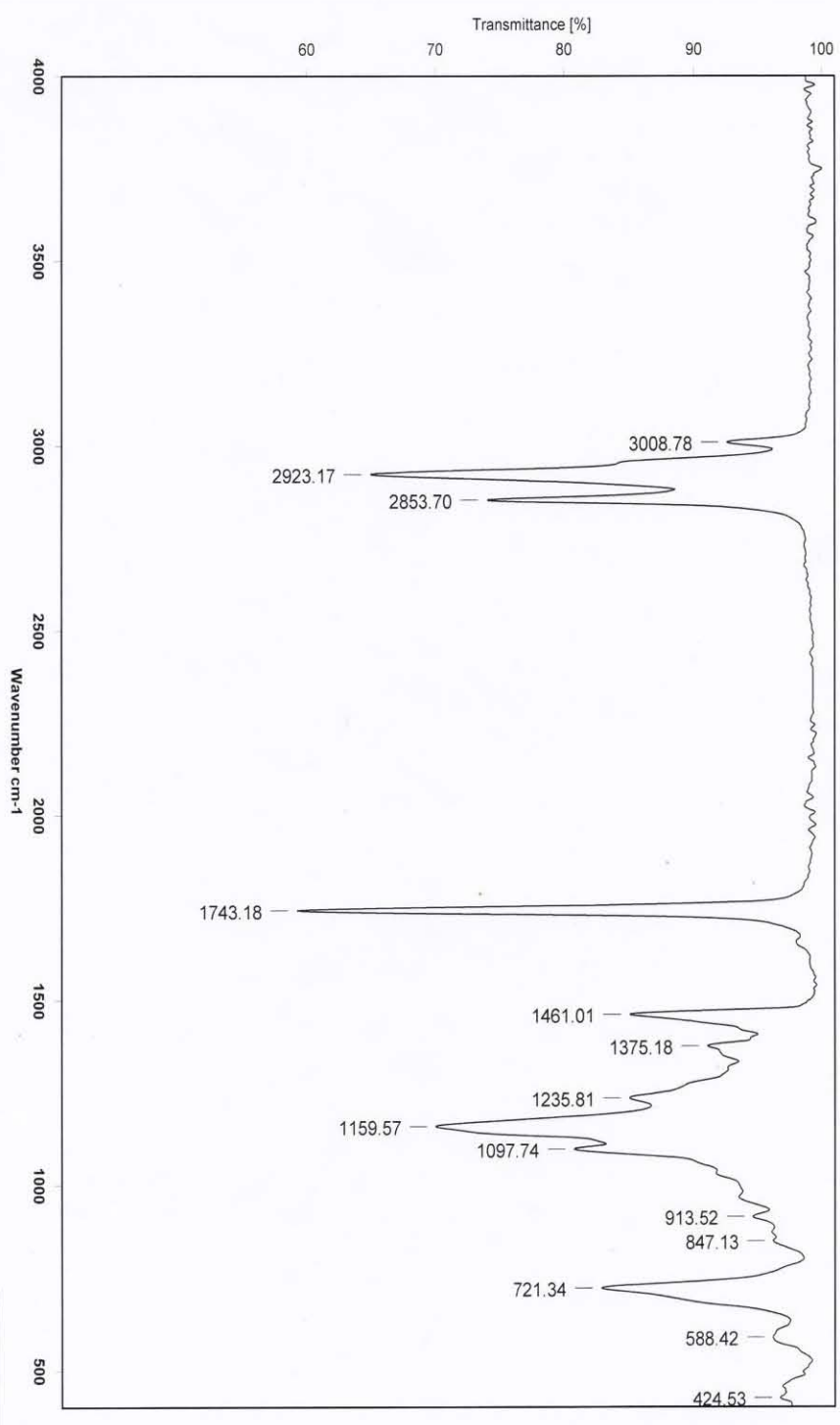


Figura A 24: Espectro de FTIR del aceite de semilla de uva original.

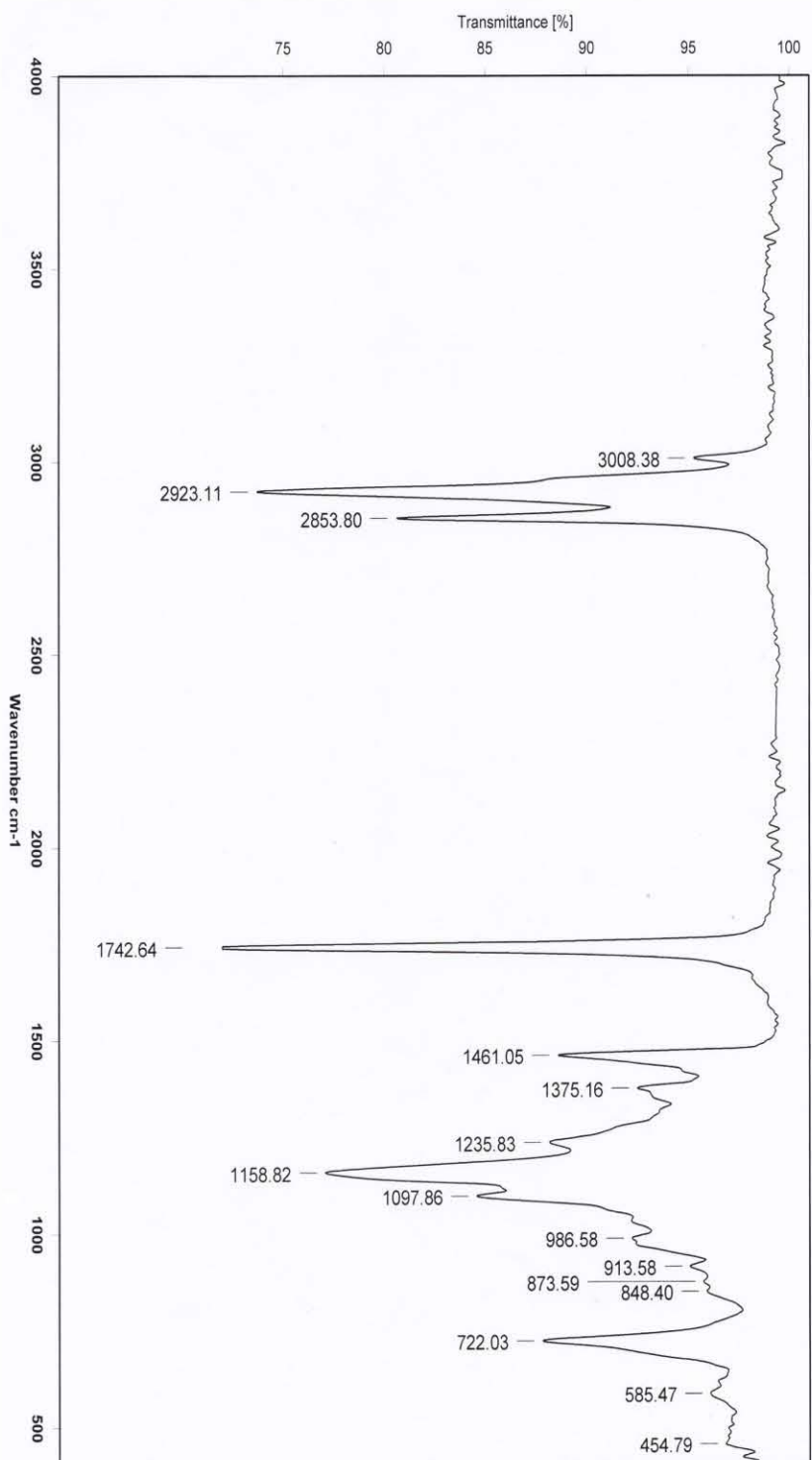


Figura A 25: Espectro de FTIR del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C, 24 h.

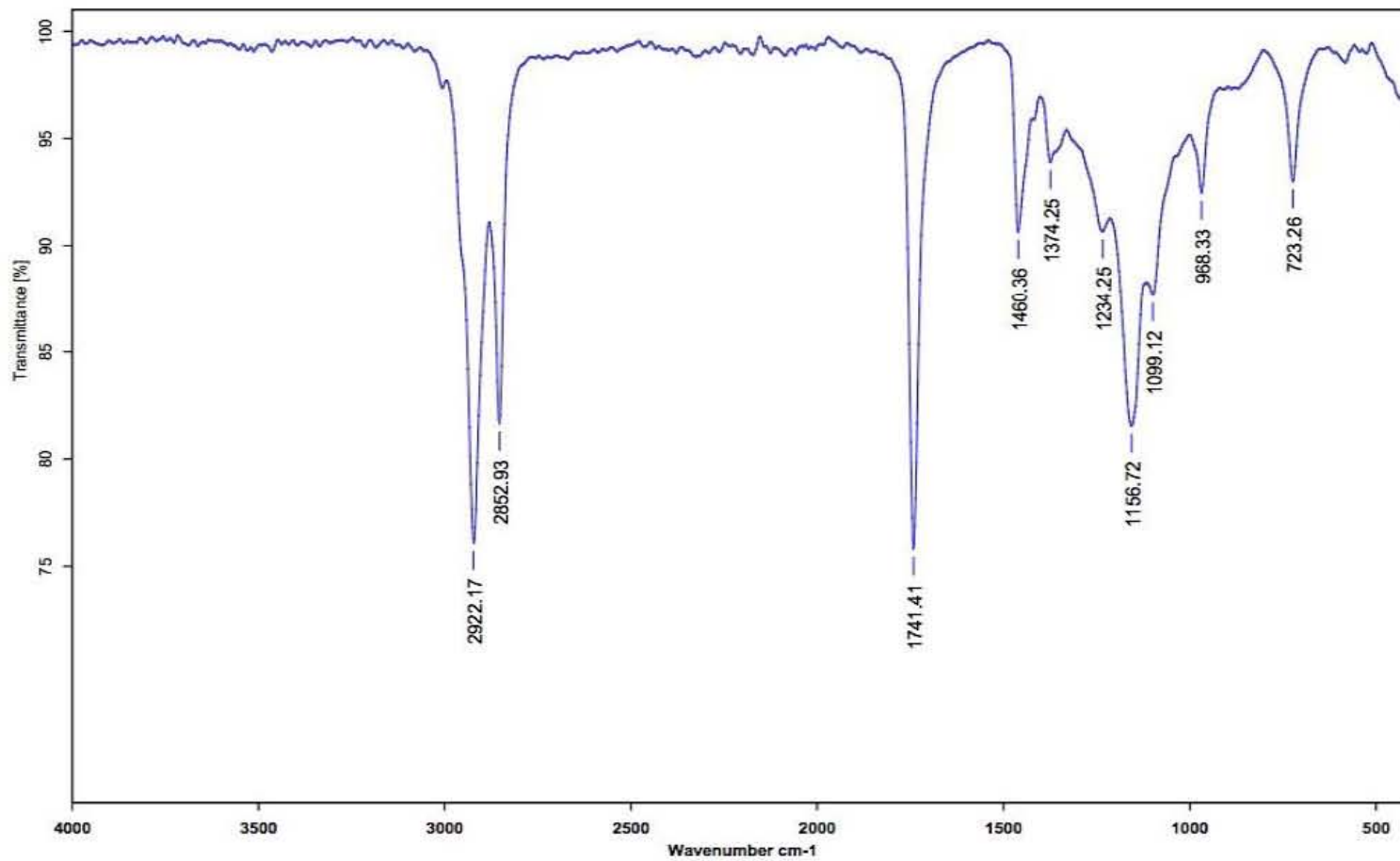
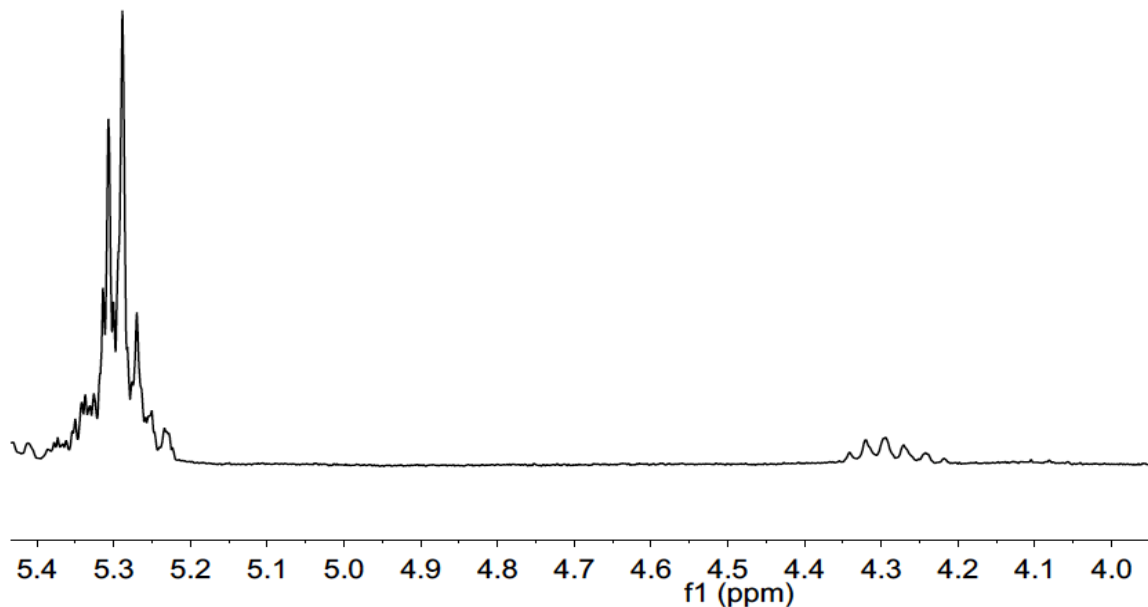
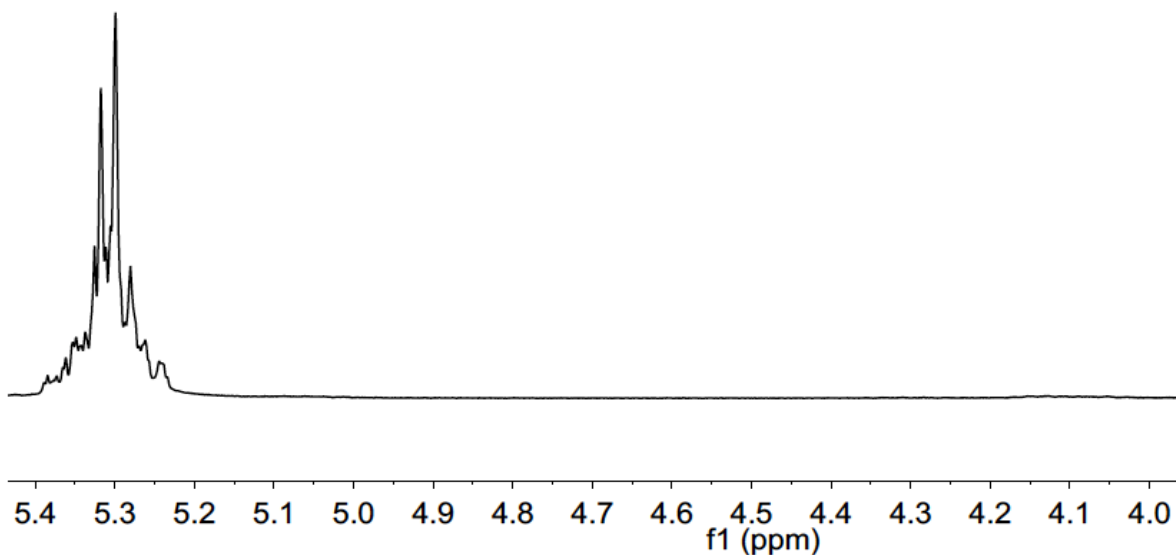


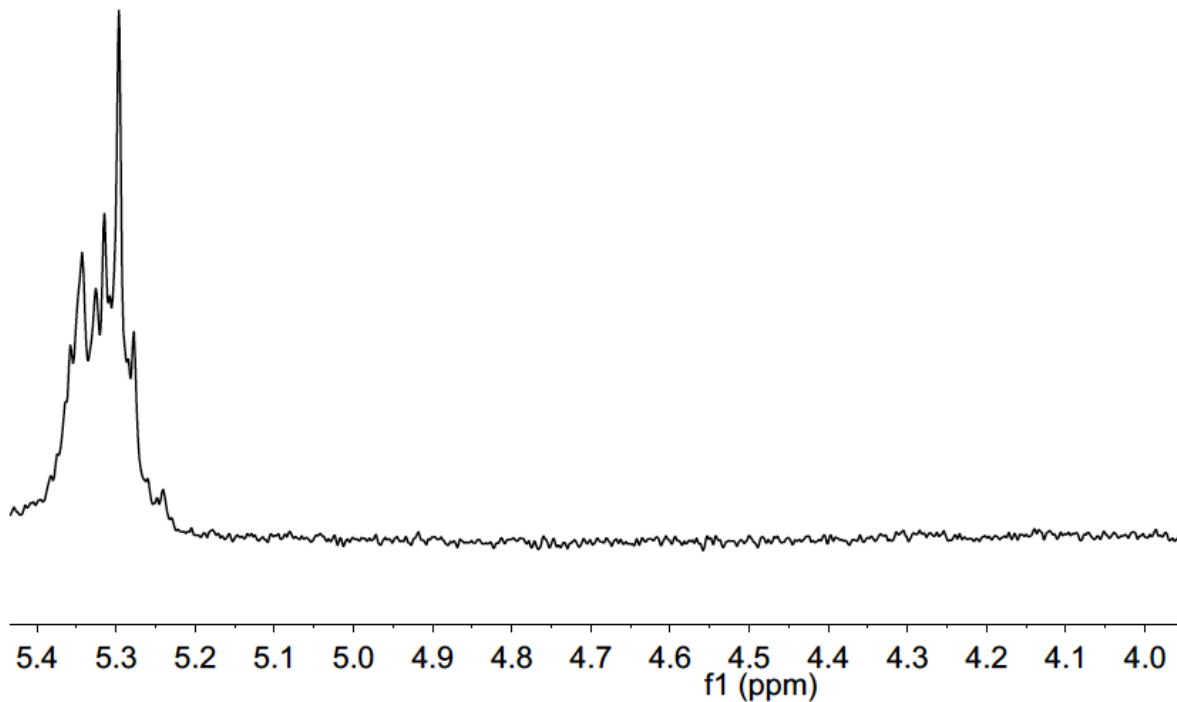
Figura A 26: Espectro de FTIR del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C, 10 h.



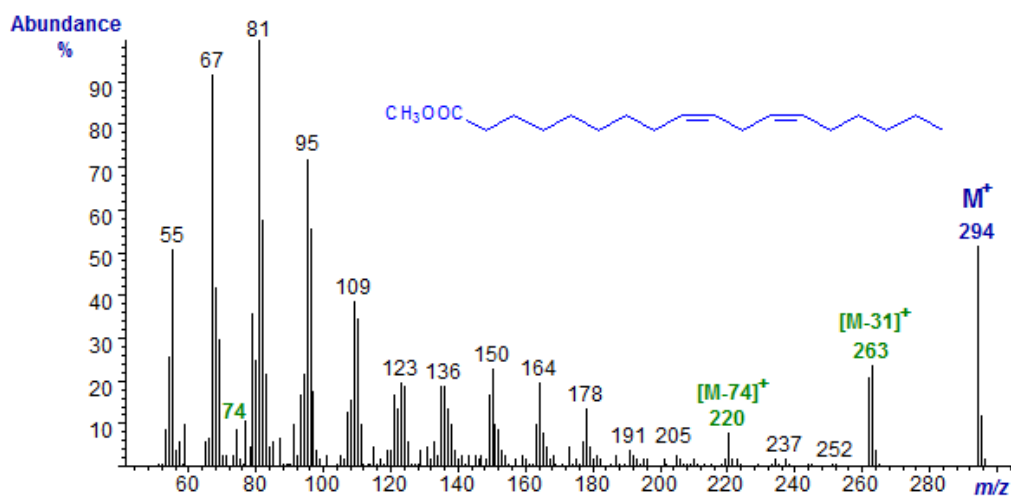
**Figura A 27:** Espectro de RMN  $^1H$  en 500 MHz de la transesterificación del aceite de semilla de uva original. Se observó la disminución de las señales en 4.29 ppm y 4.14 ppm, correspondientes a los hidrógenos de metileno del glicerol unido al éster de ácido graso (sistemas AB), y la desaparición de la señal del metileno del glicerol, 5.26 ppm, unido a un ácido graso.



**Figura A 28:** Espectro de RMN  $^1H$  en 500 MHz de la transesterificación del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150°C durante 24h. Se observó la desaparición de las señales en 4.29 ppm y 4.14 ppm, correspondientes a los hidrógenos de metileno del glicerol unido al éster de ácido graso (sistemas AB), y en 5.26 ppm del metileno del glicerol unido a un ácido graso.



**Figura A 29:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 500 MHz de la transesterificación del aceite de semilla de uva tratado térmicamente  $280^\circ\text{C}$  durante 10h. Se observa la desaparición de las señales en 4.29 ppm y 4.14 ppm, correspondientes a los hidrógenos de metileno del glicerol unido al éster de ácido graso (sistemas AB), y en 5.26 ppm del metino del glicerol unido a un ácido graso.

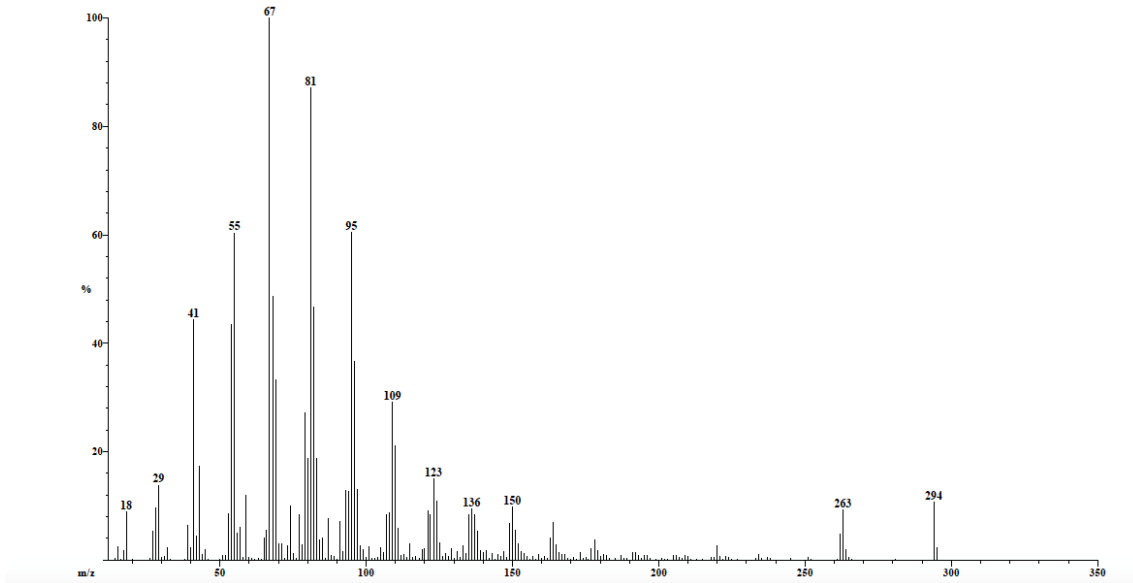


**Figura A 30:** Espectro de masas del éster metílico de ácido linoleico<sup>33</sup>.

Scan: 2347  
Base: m/z 67; 13.2%FS TIC: 6401920

R.T.: 23.55

#Ions: 240

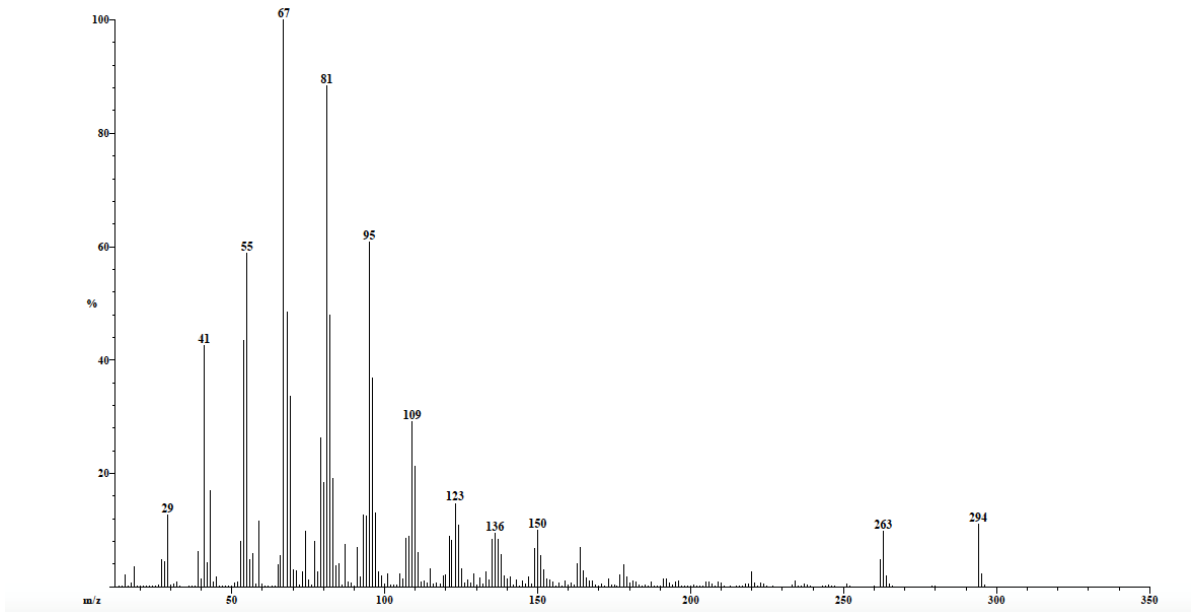


**Figura A 31:** Espectro de masas del éster metílico de ácido linoleico encontrado en el aceite de semilla de uva original.

Scan: 2472  
Base: m/z 67; 38.6%FS TIC: 18417416

R.T.: 23.59

#Ions: 382



**Figura A 32:** Espectro de masas del éster metílico de ácido linoleico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

Scan: 2339  
Base: m/z 67; 4.1%FS TIC: 3020044

R.T.: 23.48

#Ions: 285

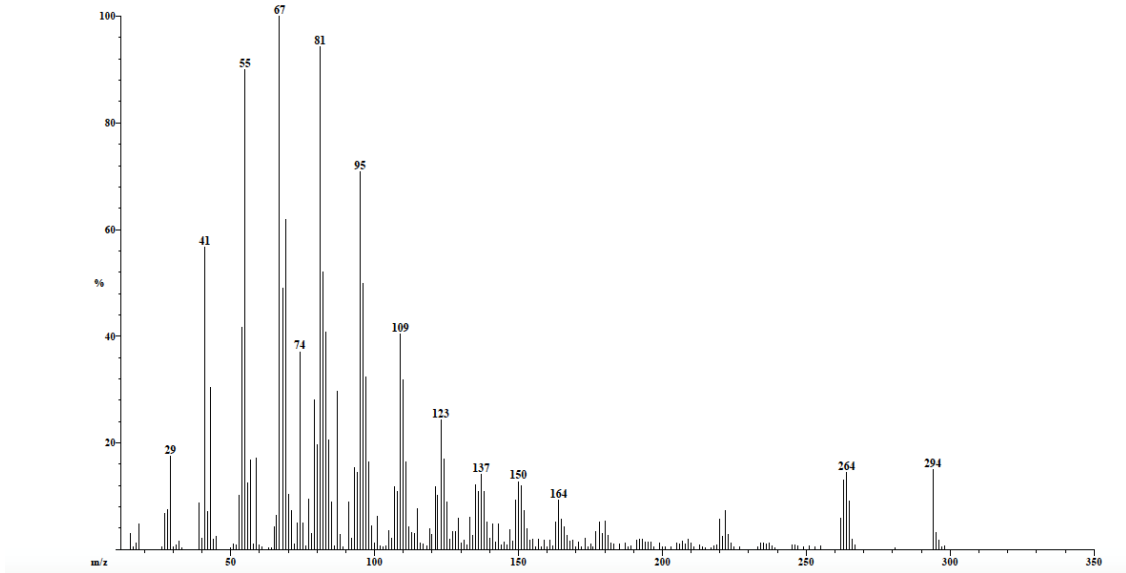


Figura A 33: Espectro de masas del éster metílico de ácido linoleico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 10 h.

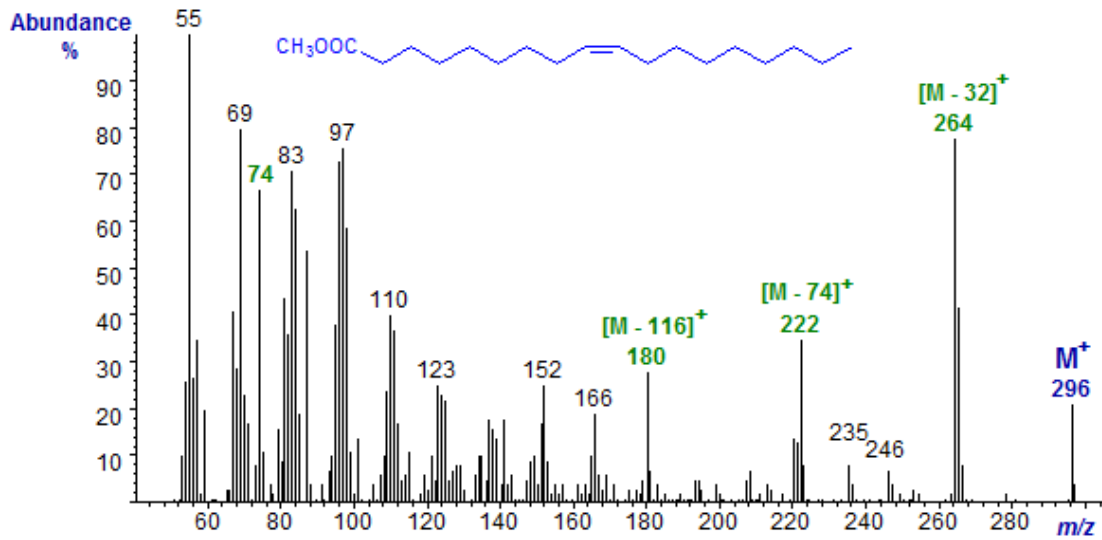


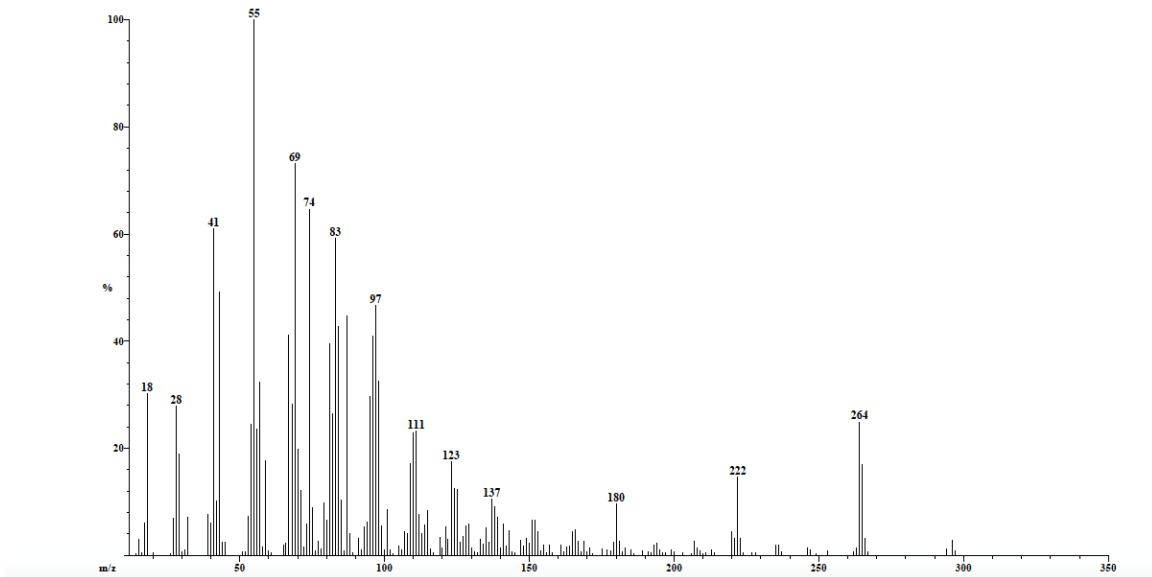
Figura A 34: Espectro de masas del éster metílico de ácido oleico<sup>33</sup>.



Scan: 2357  
Base: m/z 55; 3.9%FS TIC: 2560980

R.T.: 23.63

#Ions: 203

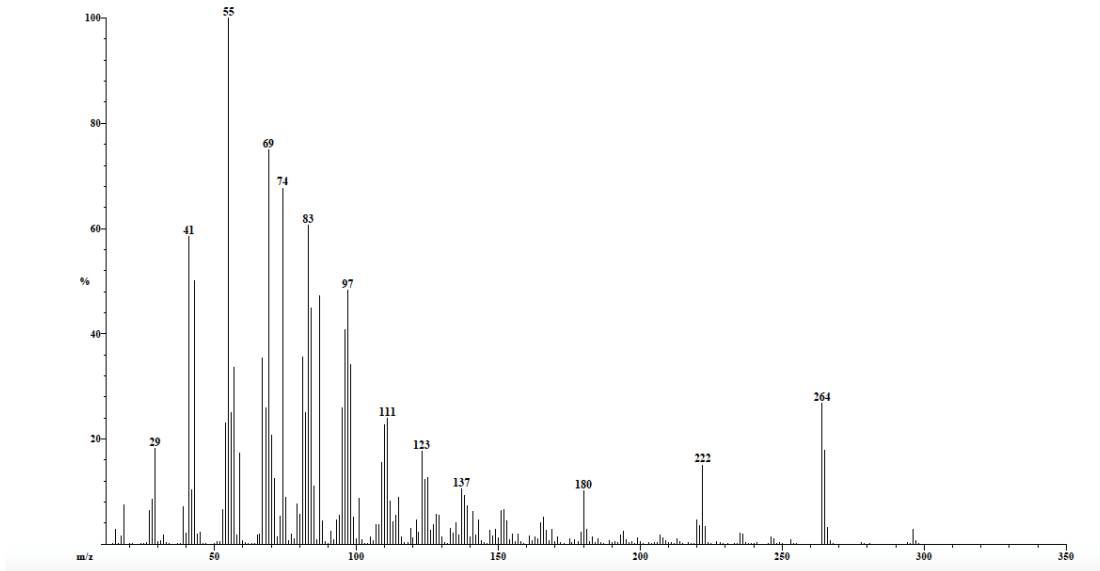


**Figura A 35:** Espectro de masas del éster metílico de ácido oleico en el aceite de semilla de uva original.

Scan: 2481  
Base: m/z 55; 17.2%FS TIC: 10687532

R.T.: 23.66

#Ions: 309

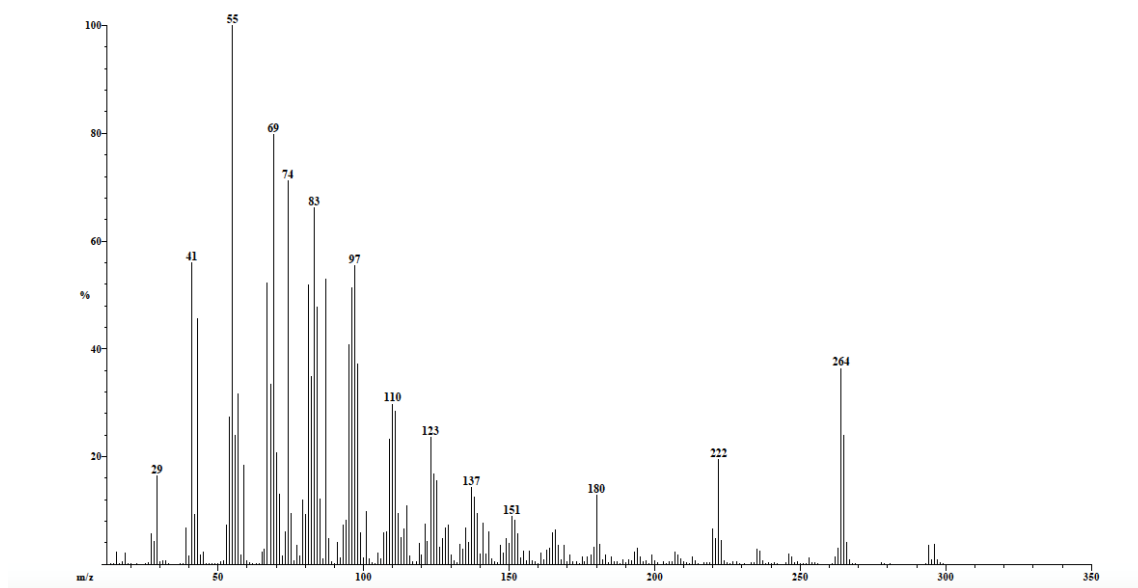


**Figura A 36:** Espectro de masas del éster metílico de ácido oleico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

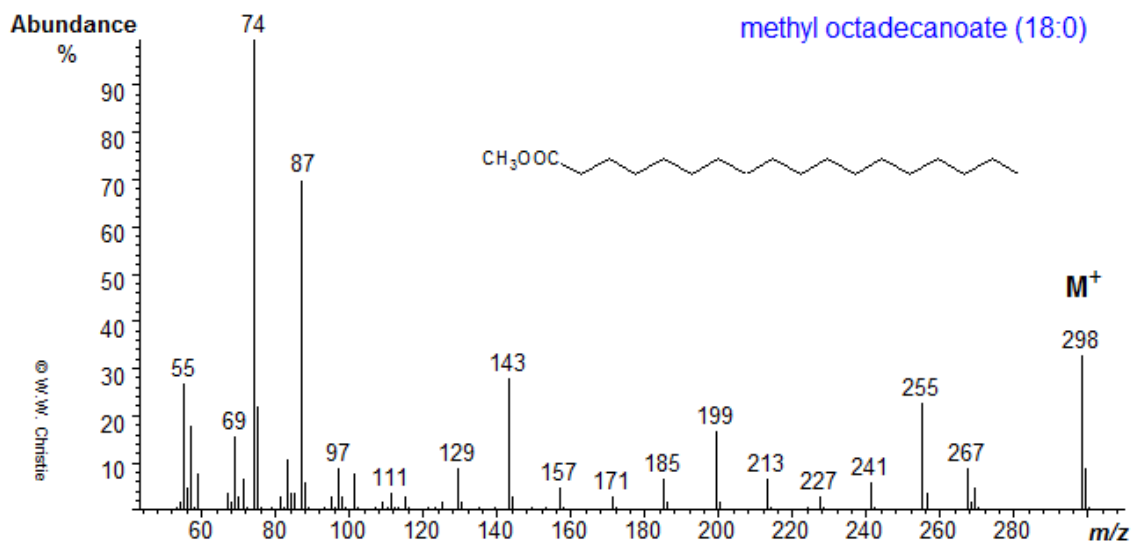
Scan: 2355  
Base: m/z 55; 17.7%FS TIC: 13094808

R.T.: 23.61

#Ions: 474



**Figura A 37:** Espectro de masas del éster metílico de ácido oleico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 10 h.

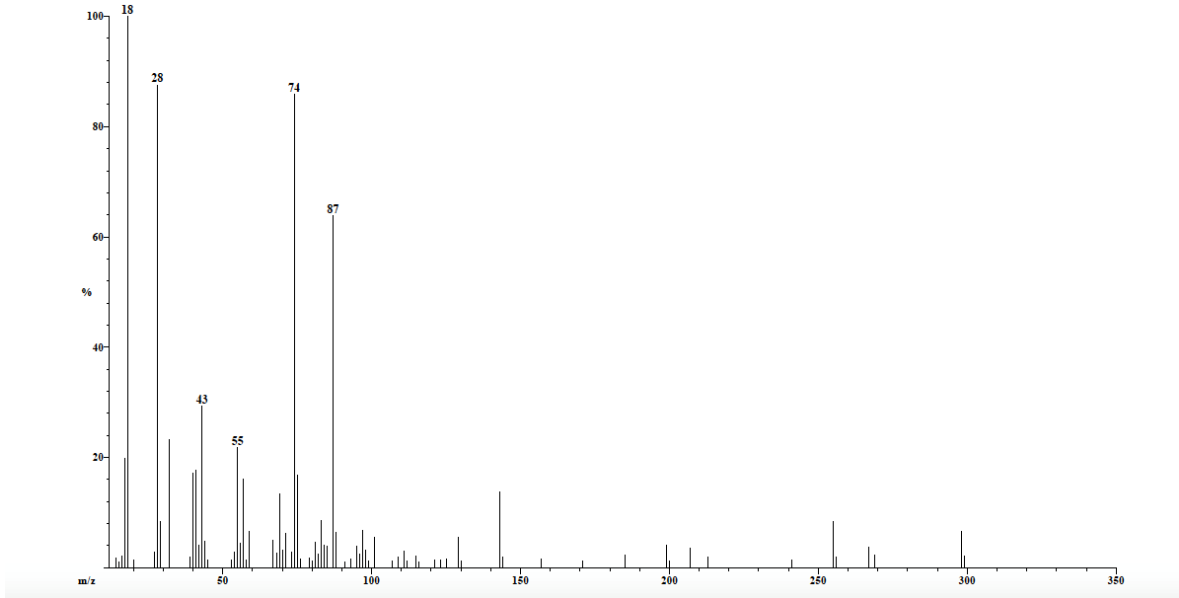


**Figura A 38:** Espectro de masas del éster metílico de ácido esteárico<sup>33</sup>.

Scan: 2393  
Base: m/z 18; 1.2%FS TIC: 348348

R.T.: 23.93

#Ions: 81

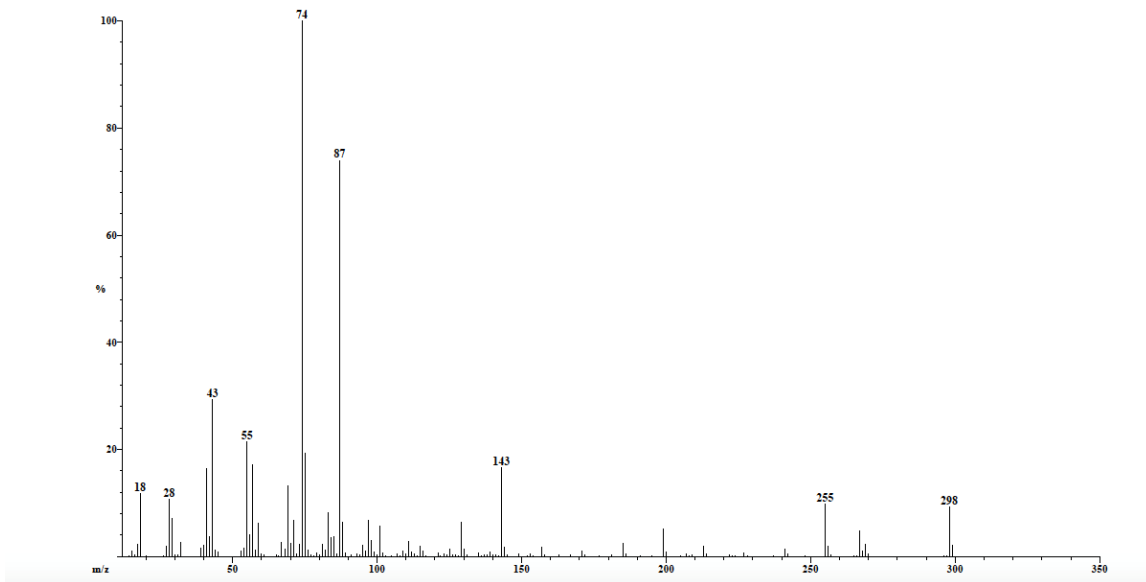


**Figura A 39:** Espectro de masas del éster metílico de ácido esteárico en el aceite de semilla de uva.

Scan: 2516  
Base: m/z 74; 10.6%FS TIC: 2299552

R.T.: 23.95

#Ions: 152

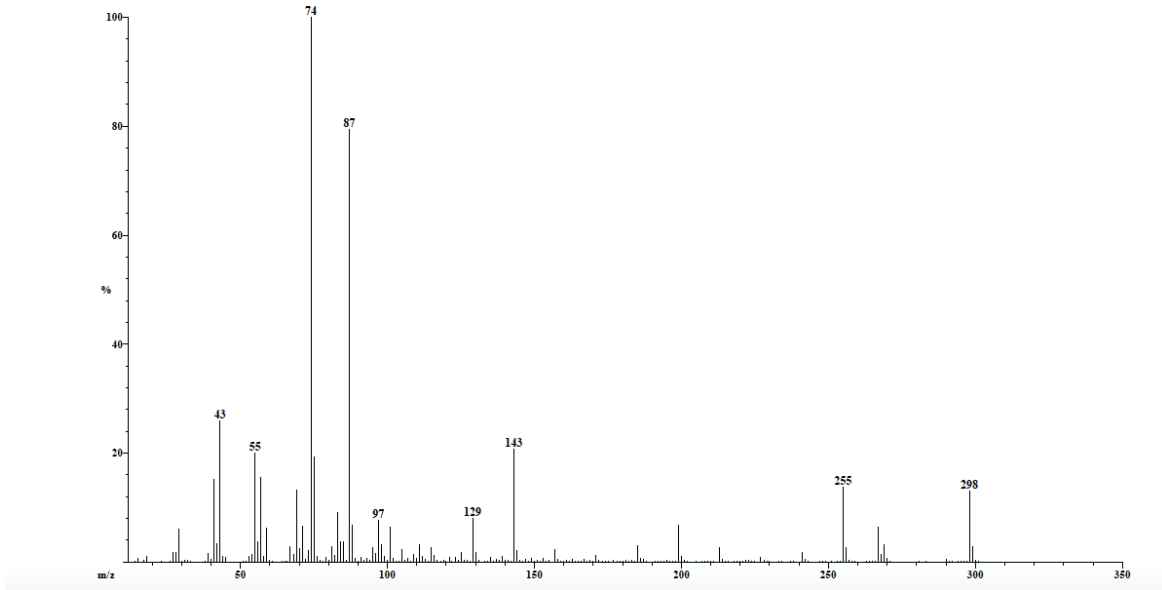


**Figura A 40:** Espectro de masas del éster metílico de ácido esteárico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

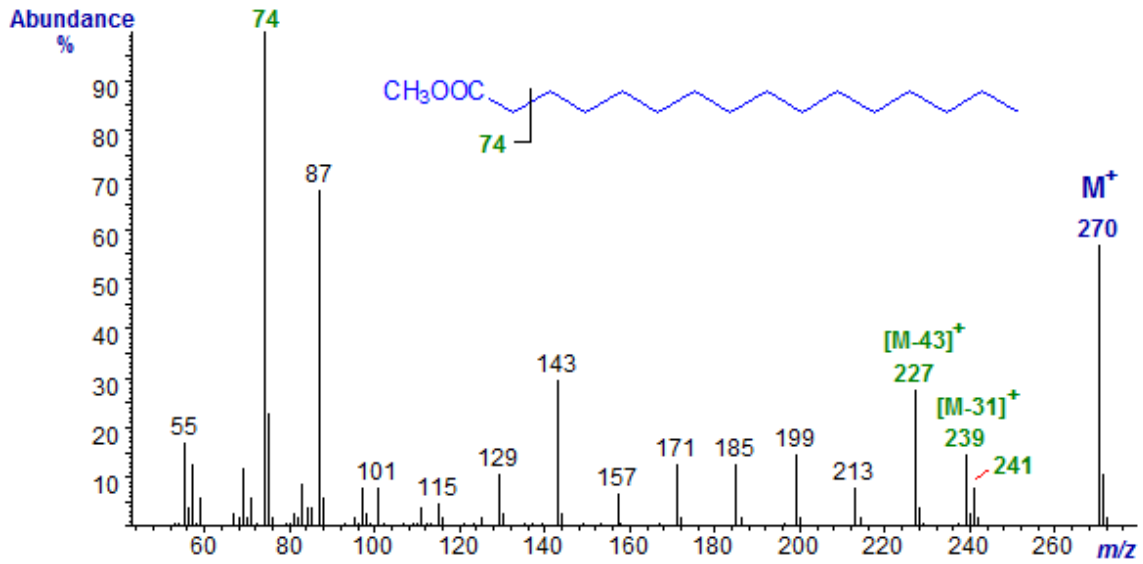
Scan: 2388  
Base: m/z 74; 25.2%FS TIC: 5647040

R.T.: 23.89

#Ions: 304



**Figura A 41:** Espectro de masas del éster metílico de ácido esteárico en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 10 h.

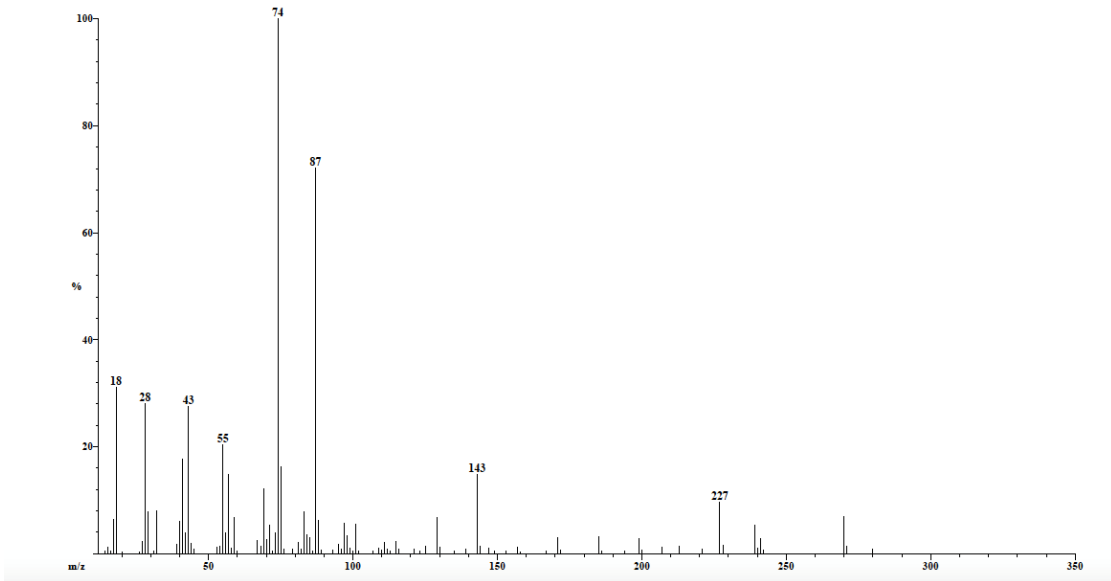


**Figura A 42:** Espectro de masas del éster metílico de ácido palmítico<sup>33</sup>.

Scan: 2104  
Base: m/z 74; 3.6%FS TIC: 813020

R.T.: 21.52

#Ions: 105

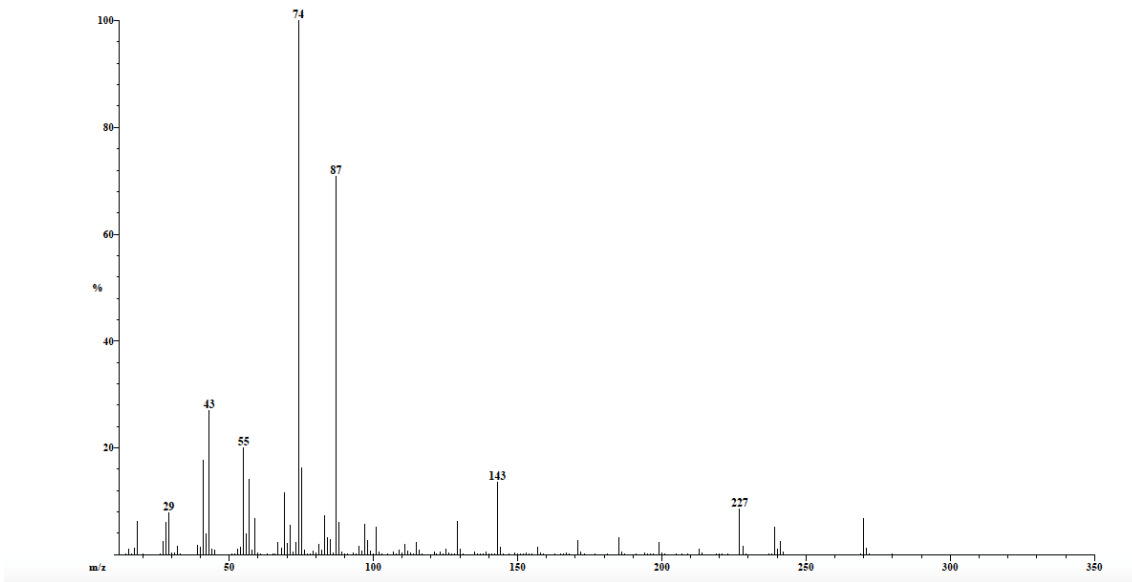


**Figura A 43:** Espectro de masas del éster metílico de ácido palmítico del aceite de semilla de uva original.

Scan: 2225  
Base: m/z 74; 20.1%FS TIC: 3920504

R.T.: 21.53

#Ions: 194

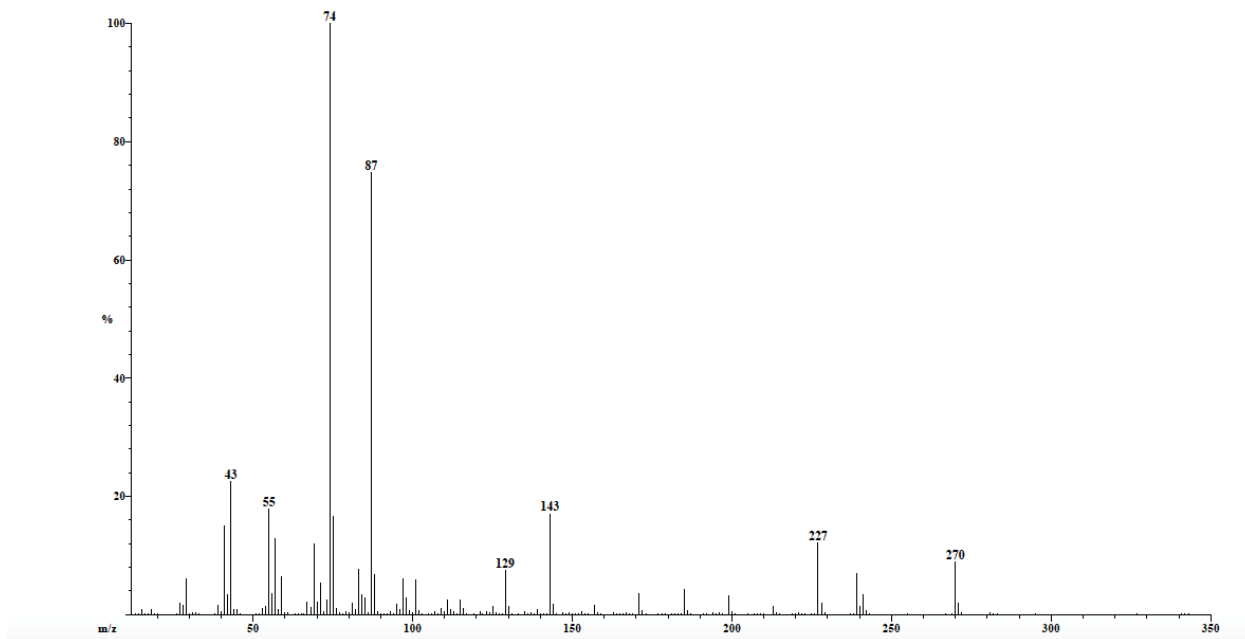


**Figura A 44:** Espectro de masas del éster metílico de ácido palmítico del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.

Scan: 2097  
Base: m/z 74; 33.8%FS TIC: 6701116

R.T.: 21.46

#Ions: 321

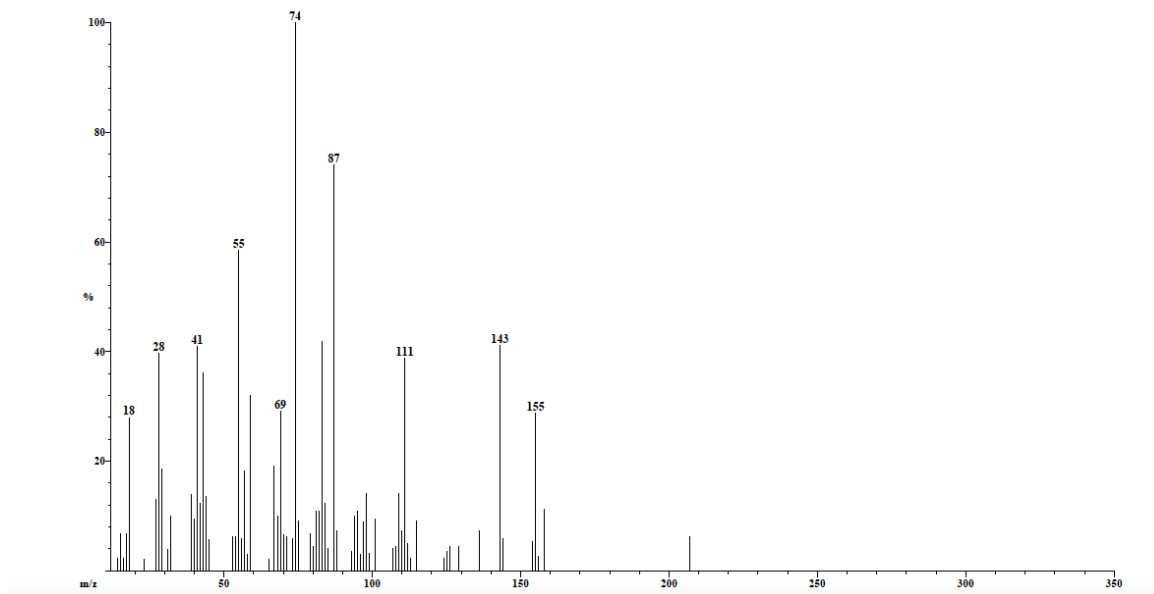


**Figura A 45:** Espectro de masas del éster metílico de ácido palmítico del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280 °C, 10 h.

Scan: 1250  
Base: m/z 74; .5%FS TIC: 227268

R.T.: 14.4

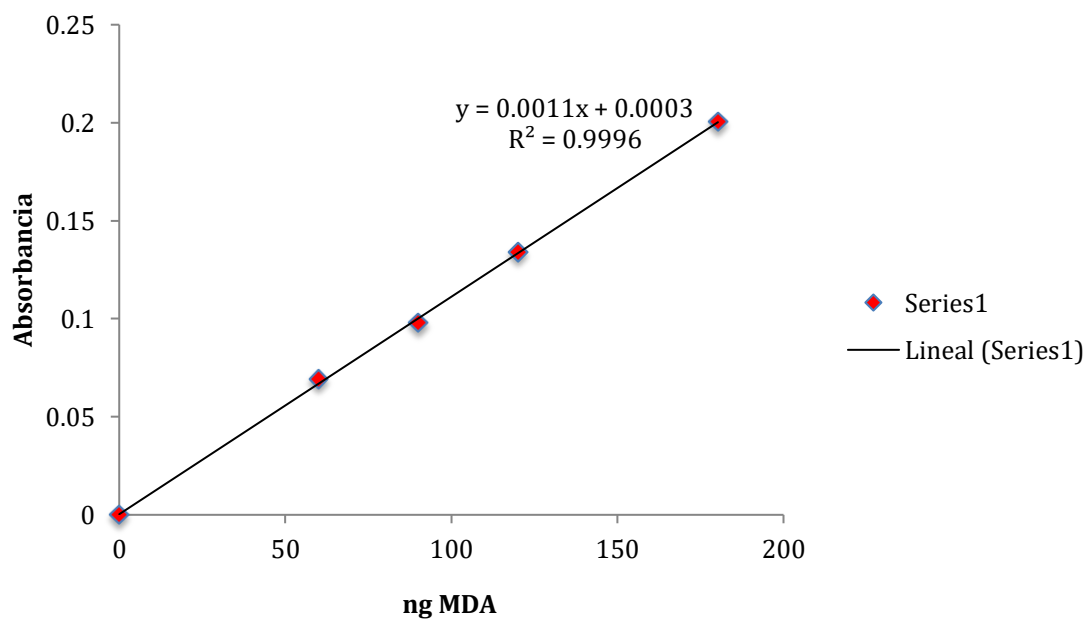
#Ions: 79



**Figura A 46:** Espectro de masas del éster metílico de (E)-2-decenal encontrado en el aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 280°C, 10 h.

Disol. TEP/H2O(uL)	Absorbancia (Abs.)		Abs. promedio	Masa TEP (ng)	FACTOR (masa TEP/Abs.)	Masa MDA (ng)	FACTOR (masa MDA/abs.)
0	0	0	0	-	-	0.00	-
20	0.07	0.068	0.069	183.6	2660.87	60.09	870.83
30	0.097	0.099	0.098	275.4	2810.20	90.13	919.70
40	0.132	0.136	0.134	367.2	2740.30	120.17	896.82
60	0.201	0.2	0.2005	550.8	2747.13	180.26	899.06
						Promedio	888.91

**Tabla A 3 :** Curva patrón de MDA.



**Gráfica A 1:** Curva patrón de MDA

MUESTRA	ABSORBANCIA		ABSORBANCIA PROMEDIO	ng MDA	mg muestra	concentración (ng MDA/mg muestra)
Aceite de semilla de uva original	0.014	0.015	0.0145	12.98	50	0.26
Aceite de semilla de uva 150°C, 24 h	0.177	0.169	0.173	154.89	50	3.1
Fracción polar cromatográfica de aceite de semilla de uva 150°C, 24 h	0.287	0.2	0.2435	218.02	23	9.48
Aceite de semilla de uva 280°C, 10 h	0.007	0.009	0.008	7.16	50	0.14
Fracción polar cromatográfica de aceite de semilla de uva 280°C, 10 h	0.026	0.023	0.0245	21.94	51	0.43

**Tabla A 1:** Contenido de TBARS en el aceite de semilla de uva original, tratado térmicamente en 150 °C, 24 h y 280 °C, 10 h.

Tiempo (días)	0	7	14
Control (sin aceites)	28.3±1.7	29.0±1.5	29.7±1.6
Aceite de semilla de uva sin tratamiento (50ml/Kg).	29.9±2.1	28.0±1.7	28.0±1.2
Productos de la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h (30ml/Kg).	26.5±0.9	25.5±0.7	25.8±0.9
Productos de la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h (40 ml/Kg).	29.3±0.6	26.3±0.9	26.3±0.5

**Tabla A 2:** Estudio de toxicidad aguda de los productos de la fracción polar cromatográfica del aceite de semilla de uva tratado térmicamente en 150 °C, 24 h.