



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Nutrición Humana**

**CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, NUTRACÉUTICA Y  
SENSORIAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE BAGAZO DE UVA  
ROJA (*Vitis vinifera*)**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Nutrición Humana

**Presenta**  
Fabiola Carolina Muñoz De La Cruz

**Dirigido por**  
Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

**SINODALES**

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Presidente

Dr. Horacio Guzmán Maldonado  
Secretario

Dr. Pablo García Solís  
Vocal

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Suplente

Dra. Karina de la Torre Carbó  
Suplente

---

Biólogo Jaime Angeles Angeles  
Director de la Facultad de  
Ciencias Naturales

---

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, México  
Junio, 2009

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Nutrición Humana**

**CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA, NUTRACÉUTICA Y  
SENSORIAL DEL EXTRACTO ACUOSO DE BAGAZO DE UVA  
ROJA (*Vitis vinifera*)**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en  
Nutrición Humana

**Presenta**

Fabiola Carolina Muñoz de la Cruz

**Dirigida por**

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, México  
Junio, 2009

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA  
DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA Y EN  
EL LABORATORIO DEL DR. HORACIO GUZMÁN  
MALDONADO DEL INIFAP CAMPUS CELAYA**

# ÍNDICE

Índice de Tablas	iii
Índice de figuras	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Resumen	vii
Summary	viii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Radicales libres en los sistemas biológicos	3
2.2 Efectos biológicos de los radicales libres	5
2.2.1 Radicales libres y homeostasis	5
2.2.2 Radicales libres y daño a biomoléculas	6
2.2.3 Estrés oxidativo y procesos patológicos	9
2.3 Sistemas de defensa antioxidant	10
2.3.1 Los alimentos en la defensa antioxidant	11
2.4 Compuestos fenólicos	14
2.4.1 Flavonoides	16
2.4.2 Metabolismo y biodisponibilidad de los flavonoides	17
2.5 <i>Vitis vinifera</i>	19
2.5.1 Flavonoides en uva	20
2.5.2 Polifenoles en bagazo de uva	22
2.5.3 Usos potenciales del bagazo de uva	23
III. Justificación	25
IV. Hipótesis	26
V. Objetivos	26
VI. Materiales y Métodos	27
6.1 Obtención del material biológico	27
6.2 Extracción acuosa caliente del bagazo seco de uva roja	27
6.2.1 Determinación de los Taninos Condensados del extracto acuoso caliente del bagazo seco de uva roja.	27
6.2.2 Determinación de los Fenoles Totales del extracto acuoso caliente del bagazo seco de uva roja	28
6.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso de bagazo seco de uva roja	29
6.4 Determinación parcial de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso mediante HPLC	29
6.5 Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso caliente del bagazo de uva roja	30
6.6 Evaluación sensorial	30
6.7 Determinación de la capacidad antioxidant	31
6.8 Efecto Citotóxico sobre células de cáncer de mama	32
6.9 Análisis estadístico	33
VII. Resultados y Discusiones	34
7.1 Extracción acuosa en caliente de los fenoles totales (FT) y taninos condensados (TC) del bagazo seco de uva roja	34
7.2 Estabilidad y tiempo de vida media de los fenoles totales y taninos condensados en el extracto acuoso de bagazo seco de uva roja	36
7.3 Caracterización parcial de los fenoles totales y taninos condensados del	

extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja mediante HPLC	38
7.4 Caracterización fisicoquímica y sensorial del extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja	38
7.5 Capacidad antioxidante del extracto acuoso del bagazo seco de uva roja	41
7.6 Efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama ZR-75-1	45
VIII. Conclusiones	47
IX. Referencias bibliográficas	49
X. Anexo 1	62

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.	3
2 Fuentes de generación de radicales libres	5
3 Patologías asociadas a los radicales libres	10
4 Antioxidantes y efectos benéficos	12
5 Antioxidantes dietarios y sus efectos benéficos en la salud	15
6 Contenido de flavonoides en uvas enteras negras, rojas y blancas (mg/100g) en base húmeda.	21
7 Principales compuestos fenólicos en el extracto acuoso de bagazo de uva roja determinados mediante HPLC	39
8 Parámetros fisicoquímicos del extracto acuoso de bagazo de uva roja	40
9 Análisis sensorial del extracto acuoso de bagazo de uva roja	40
10 Capacidad antioxidante del extracto acuoso de bagazo de uva roja	44
11 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del liofilizado del extracto acuoso de bagazo de uva roja utilizado en el estudio <i>in vitro</i>	46

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>Página</b>
1 Alteraciones esenciales producidas a macromoléculas por radicales libres	7
2 Estructura química de polifenoles	16
3 Estructura química de flavonoides	18
4 Efecto de la concentración de bagazo (A) y tiempo de extracción (B) en la recuperación de compuestos fenólicos totales y taninos condensados	35
5 Estabilidad de los fenoles totales(A) y taninos condensados (B) del extracto acuoso caliente de bagazo de uva roja	37
6 Perfil cromatográfico del extracto acuoso de bagazo de uva roja	39
7 Análisis colorimétrico del extracto acuoso de bagazo de uva roja	42
8 Efecto citotóxico del liofilizado del extracto acuoso de bagazo de uva roja sobre células de cáncer de mama	46

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la aventura de la vida.

A mis Padres por su apoyo y cariño.

A la Doctora Tere García Gasca por creer y confiar en mí, por su invaluable amistad, por darme a conocer un mundo nuevo al contagiarde de su pasión por la ciencia.

A mis asesores y amigos de laboratorio por su ayuda.

A mi esposo, por enseñarme que quien persevera, alcanza.

## DEDICATORIA

A todos aquellos que me enseñaron que el único límite soy yo misma.

## RESUMEN

El consumo de uva y sus derivados se asocia con la protección contra enfermedades crónico-degenerativas debido a su contenido de compuestos fenólicos. El bagazo de uva es un subproducto de la obtención de vinos tintos que, en México, no se aprovecha. El objetivo del presente trabajo fue determinar las características fisicoquímicas y sensoriales del extracto acuoso de bagazo de uva roja así como su capacidad antioxidante y su efecto sobre células de cáncer de mama. Se utilizó una mezcla de tres variedades de uva roja (Cabernet Sauvignon, Syrah y Tempranillo, 80:10:10) donada por Cavas Freixenet, cosechada y procesada en septiembre del 2007. El bagazo se secó a 40° C durante 72 h en un horno de convección forzada, se limpió, se trituró y se almacenó en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente. El extracto acuoso se preparó utilizando 15 g de bagazo seco en 250 mL de agua tridestilada a temperatura de ebullición por 7 minutos. El contenido de fenoles totales (FT) y taninos condensados (TC) fue 1.86 mg eq de ácido gálico y 1.036 mg eq (+) catequina por gramo de bagazo seco, respectivamente. La concentración de FT no se afectó bajo incubación a diferentes temperaturas sin embargo, la concentración de TC presentó una vida media de 19, 7.7 y 4.3 horas a 4, 25 y 37° C, respectivamente con una energía de activación de 33 kJ/mol. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó por HPLC, en la que se detectaron mayoritariamente ácido siríngico, ácido benzóico, catequina, epicatequina y ácido gálico. Las características fisicoquímicas determinadas fueron acidez de 30.87%, pH de 3.56, 0.55 ° Bx y color pardo rojizo (L, 52.98; a, 4.59; b, 5.8). El análisis sensorial mostró aceptabilidad al adicionarse 50 g/L de azúcar. Los resultados por gramo de bagazo seco mostraron una capacidad antioxidante de 198.6 µmoles eq de Trolox y 88 µmoles eq de ácido ascórbico. Se encontró efecto citotóxico dependiente de la concentración sobre células de cáncer de mama ZR-75-1 con una CL<sub>50</sub> de 0.131 mg de FT/mL. Los resultados obtenidos sugieren que el bagazo de uva puede ser una fuente importante de compuestos fenólicos biológicamente activos para consumo humano.

**Palabras clave:** bagazo de uva, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, efecto citotóxico, *Vitis vinífera*.

## SUMMARY

Consumption of grapes and their derivatives is associated with protection against chronic degenerative diseases because of their phenolic compounds content. Grape bagasse is a byproduct of red wines production that is not exploited in Mexico. The purpose of this study was to determine the physicochemical and sensory characteristics of the aqueous extract of red grape bagasse, as well as its antioxidant capacity and its effect on breast cancer cells. A mixture of three red grape varieties (Cabernet Sauvignon, Syrah and Tempranillo, 80:10:10) donated by Cavas Freixenet, harvested and processed in September 2007 was used. The bagasse was dried at 40 ° C for 72 h in a forced-convection oven, it was cleaned, grinded and stored in a dark, dry place at room temperature. The aqueous extract was prepared using 15 g of dry bagasse in 250 mL of tridistilled water for 7 minutes at boiling temperature. Total phenolics (TP) and condensed tannins (CT) were of 1.86 mg eq gallic acid and 1036 mg eq (+) catechin per gram of dry bagasse, respectively. Concentration of TP was not affected by incubation at different temperatures however, concentration of CT presented a half-life of 19, 7.7 and 4.3 hours at 4, 25 and 37° C, respectively with an activation energy of 33 kJ/mol. Quantification of phenolic compounds was performed by HPLC, which were detected mostly syringic acid, benzoic acid, catechin, epicatechin and gallic acid. Physicochemical characteristics were acidity of 30.87%, pH 3.56, 0.55 ° Bx and reddish brown color (L, 52.98; a, 4.59; b, 5.8). Sensory analysis showed acceptability by adding 50 g/L sugar. Results per gram of dry bagasse showed an antioxidant capacity equivalent to 198.6  $\mu$ mol eq of Trolox and 88  $\mu$ mol eq of ascorbic acid. Cytotoxic effect on ZR-75-1 breast cancer cells was found as a function of TP concentration, with LC<sub>50</sub> of 0.131 mg FT/mL. Results suggest that red grape bagasse can be an important source of biologically active phenolic compounds for human consumption.

**Key words:** antioxidant capacity, cytotoxic effect, grape bagasse, phenolic compounds, *Vitis vinifera*.

## I. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es la molécula que sustenta la vida aerobia así, también, el metabolismo aerobio favorece la producción de radicales libres (RL). Éstos son resultado de procesos normales e inevitables, producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida como las reacciones de oxido reducción (incluyendo la provisión de energía), biosíntesis oxidativa, biodegradación y destoxicificación (Slater, 1984). Estos compuestos, en exceso, resultan nocivos para la célula y están relacionados con diversas enfermedades y condiciones degenerativas (Marx, 1985).

Los RL están relacionados con el mecanismo de defensa del organismo (respuesta inflamatoria) y, en condiciones normales, no causan daño oxidativo debido al equilibrio que existe entre la formación de estas moléculas y los sistemas de defensa antioxidante. Sin embargo, el cigarro, el alcohol, las radiaciones, algunas sustancias químicas industriales, la luz ultravioleta y el uso incontrolado de aditivos alimenticios, entre otros; favorecen el desarrollo de RL, propiciando así el estrés oxidativo (Collins, 2005).

El consumo de alimentos ricos en flavonoides está asociado a la reducción de riesgo de enfermedades crónico degenerativas (Byrne *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004). Los flavonoides son una familia de compuestos que pertenecen a los polifenoles, sintetizados por las plantas y ampliamente estudiados por su gran capacidad antioxidante. Se han descrito numerosas acciones terapéuticas para un gran número de ellos tales como efectos antivirales, antimicrobianos, antiinflamatorios, antiescleróticos, anticancerígenos y antialérgicos (Ferguson, 2001; Wollgast y Anklam, 2002).

El bagazo de uva representa una importante fuente de antioxidantes debido a su alto contenido de compuestos fenólicos. Éstos se concentran fundamentalmente en la piel u hollejo, aunque también se han encontrado compuestos con propiedades interesantes en las semillas de la uva (Flanz, 2000; Sehirli *et al.*, 2008). Aproximadamente de cada 100 kg de uva procesada se obtienen de 15-20 kg de

bagazo (ollejos, semillas y racimos) (Usaquén-Castro *et al.*, 2006). México cuenta con una importante industria vitivinícola, produce 45 millones de litros de vino anuales (Meré, 2005) y la mayor parte del bagazo se desperdicia. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente el contenido de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del extracto acuoso en caliente de bagazo seco de uva roja obtenido después del proceso de fermentación de vino tinto, así como sus características fisicoquímicas, sensoriales y el efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Radicales libres en los sistemas biológicos

Los RL son átomos o moléculas extremadamente reactivas debido a que en el último orbital de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear es decir, su magnetismo no se encuentra neutralizado con el de otro electrón. Esta inestabilidad les confiere avidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, ocasionando que la estructura afectada quede inestable y, a su vez, se convierta en un RL con diversos grados de agresividad oxidativa. De esta forma se establecen reacciones en cadena por medio de varios transportadores que se oxidan y se reducen secuencialmente, modificando biomoléculas después de transferir o capturar un electrón (Young *et al.*, 1999).

Con base en esta definición, son RL la molécula de oxígeno, el átomo de hidrógeno y los metales de transición (en estado iónico). En particular, los radicales de oxígeno, llamadas especies reactivas de oxígeno (EROs) son los que poseen una mayor reactividad y se encuentran directamente involucrados en el fenómeno de estrés oxidativo (Tabla 1). De todos éstos, el radical más activo y con mayor capacidad para alterar moléculas es el hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ) (Halliwell, 1997).

**Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.**

RADICALES	NO RADICALES
<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\text{ROO}^*</math> Radical Peroxilo</li><li>• <math>\text{RO}^*</math> Radical Alcohoxilo</li><li>• <math>\text{OH}^*</math> Radical Hidroxilo</li><li>• <math>\text{O}_2^*</math> Radical Superóxido</li><li>• <math>\text{ONOO}^-</math> Radical Peroxinitrito</li><li>• <math>\text{HO}_2^*</math> Radical Hidroperoxilo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> Peróxido de Hidrógeno</li><li>• <math>^1\text{O}_2</math> Oxígeno Singulete</li><li>• <math>\text{HOBr}</math> Ácido Hipobromoso</li><li>• <math>\text{HOCl}</math> Ácido Hipocloroso</li><li>• <math>\text{O}_3</math> Ozono</li><li>• <math>\text{NO}</math> Óxido Nítrico</li></ul>

(García-Gasca *et al.*, 2009)

Los RL pueden ser formados a partir de las reacciones metabólicas normales y reaccionan espontáneamente con los componentes celulares con la resultante degradación o inactivación de moléculas biológicas importantes. La completa reducción del oxígeno a agua requiere cuatro pasos y la generación de varios radicales libres y EROs (Clarkson *et al.*, 2000).

La producción de RL también se incrementa durante el ejercicio y como una respuesta del cuerpo a varios elementos de estrés como la edad, trauma, algunos medicamentos y enfermedades. Debido a los potenciales efectos nocivos de los RL y de los hidroperóxidos, cualquier tipo de perturbación que estimule la peroxidación lípidica y/o debilite la capacidad de las defensas antioxidantes, causan o incrementan la susceptibilidad de la célula a daño oxidativo (Collins, 2005).

Además, en los sistemas biológicos, los RL se generan a través del metabolismo oxidativo de biomoléculas, xenobióticos, drogas y químicos, irradiación (incluyendo radiación ionizante), oxidaciones de metales de transición catalizadas por minerales como Fe y Cu y secreción de oxidantes y otros procesos de inmunodefensa (Tabla 2). La catálisis de enlaces homolíticos a través de enzimas ó sin ellas y la ruptura de estos enlaces también generan RL en los sistemas biológicos (Chow, 1979).

El estrés oxidativo implica que la producción de RL supera la capacidad del organismo para neutralizarlos, apareciendo un estado de desequilibrio entre la producción de EROs y los mecanismos de defensa antioxidante. Esto provoca un efecto adverso en función de la dosis, lo que ocasiona una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que generan el deterioro y la muerte celular. El estrés oxidativo es uno de los factores etiológicos más importantes asociados a diversas patologías como son procesos cancerosos, cardiovasculares, ateroesclerosis, artritis reumatoide, inflamaciones gastrointestinales, enfermedades neurológicas degenerativas, cataratas y enfermedades degenerativas varias (Collins, 2005).

**Tabla 2. Fuentes de generación de radicales libres.**

FUENTES ENDÓGENAS	FUENTES EXÓGENAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosforilación oxidativa. En la producción de ATP, entre 1 y 3% del O<sub>2</sub> consumido se transforma en EROs</li> <li>• Oxidación enzimática de la L-arginina.</li> <li>• Cadena respiratoria mitocondrial.</li> <li>• Metabolismo normal de grasas, hidratos de carbono y proteínas</li> <li>• Estrés</li> <li>• Defectos genéticos (defectos enzimáticos, absorción anormal/transporte de nutrimentos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contaminantes ambientales (inhalación de oxidantes)</li> <li>• Radiación ionizante y ultravioleta</li> <li>• Sobre ejercitamiento</li> <li>• Químicos tóxicos como pesticidas</li> <li>• Alimentos con potencial destructor al ser consumidos en exceso: café, alcohol</li> <li>• Baja ingesta de frutas y vegetales</li> <li>• Alta ingesta calórica</li> </ul>

(Chow, 1979)

## 2.2 Efectos biológicos de los radicales libres

### 2.2.1 Radicales libres y homeostasis

Los RL incluyen EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) generados enzimáticamente o mediante interacciones químicas. Se presentan en bajas concentraciones durante el metabolismo celular normal, regulan la transducción de señales y reacciones de protección tales como fagocitosis, detoxificación y apoptosis (Irani *et al.*, 1997; García-Gasca *et al.*, 2009). Los EROs y ERNs existen en todas las células aeróbicas en balance bioquímico con los antioxidantes endógenos y exógenos. Se estima que el 5% del oxígeno molecular es convertido en EROs en la mitocondria (García-Gasca *et al.*, 2009). Bajos niveles de RL pueden alterar importantes reacciones protectoras como apoptosis, respuesta del sistema inmune ante virus, fagocitosis y destoxicación mediada por complejos del citocromo P-450 (Salganik, 2001). Entre sus funciones se encuentran:

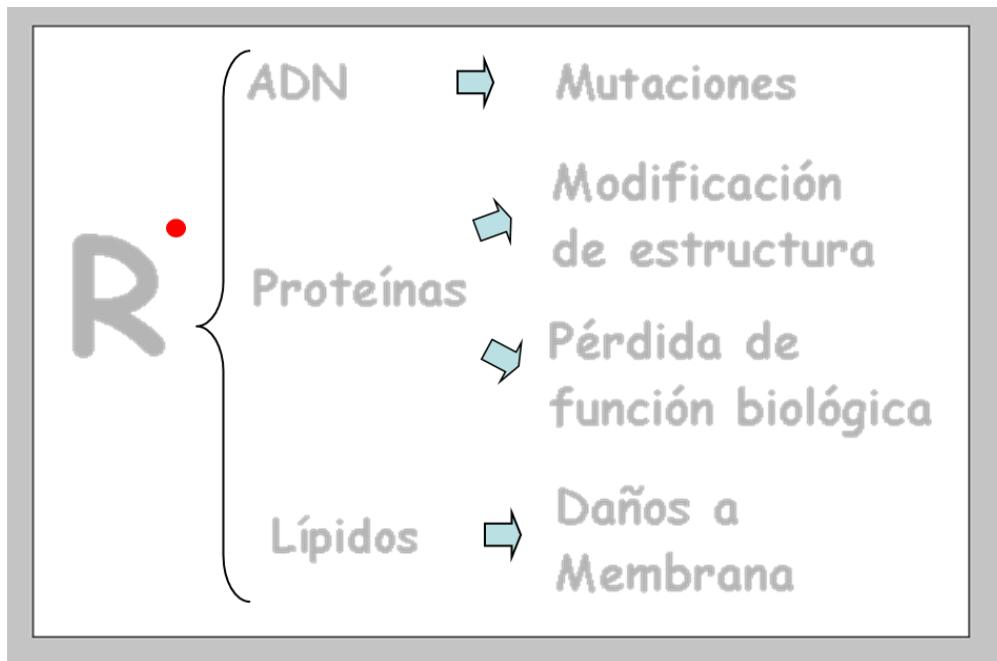
- Algunos factores de transcripción, factores de crecimiento, citoquinas, receptores y proteínas están influenciados por los RL. Por ejemplo, Kosmidou *et al.*

(2001) reportó que el peróxido de hidrógeno incrementa la producción del factor de crecimiento endotelial vascular.

- El citocromo P450 produce  $O_2^\bullet$  y  $H_2O_2$ , los cuales se relacionan con el proceso de detoxificación, que involucra la oxidación de sustancias hidrofóbicas tóxicas, transformándose en compuestos hidrofílicos (Klaunig y Kamendulis, 2004).
- La generación de EROs es importante para la activación de la apoptosis. La apoptosis ocurre cuando los monitores internos reconocen el daño o alteración en la función e inician la señalización en cascada que eventualmente activa caspasas y endonucleasas, de manera que células preneoplásicas y neoplásicas son eliminadas (Zeisel, 2004). Estudios muestran que el acúmulo de EROs induce apoptosis o necrosis mediante activación de cascadas de señalización y que esta contribución de los EROs a la apoptosis es altamente específica (Nakano *et al.*, 2006).
- Los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos son los principales contribuyentes de RL endógenos. Ante la presencia de bacterias, la célula incrementa su consumo de oxígeno generando RL que matan a las bacterias invasoras y células cancerígenas (Betteridge, 2000).

### **2.2.2 Radicales libres y daño a biomoléculas**

Una vez que el RL se genera tiene una vida media de microsegundos debido a su alta reactividad química, corto lapso de tiempo en el que es capaz de interactuar con las biomoléculas cercanas. En general, son los radicales derivados de EROs los que intervienen en la respuesta al estrés oxidativo manteniendo la homeostasis de las reacciones de oxidorreducción que ocurren en la bioquímica celular. Una vez formados los RL por el metabolismo celular, son capaces de reaccionar rápidamente con la molécula vecina al sustraer un electrón provocando su oxidación, por lo que las moléculas pierden su función específica. La mayoría de los componentes celulares pueden ser dañados por los RL produciendo disturbios metabólicos y dañando las estructuras de la membrana de diferentes maneras. El ataque al azar produce modificaciones químicas indeseables dañando macromoléculas como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y nucleótidos (Figura 1) (Martínez y Sánchez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001).



**Figura 1. Alteraciones esenciales producidas a macromoléculas por radicales libres**  
(Modificada de Martínez y Sánchez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001).

### a) Oxidación de lípidos

Los lípidos representan el grupo más susceptible al ataque de RL debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos. Este proceso, conocido como peroxidación de lípidos ha sido implicado como una reacción general biológico-degenerativa y puede ser un proceso muy importante *in vivo* (Chow, 1979). Los RL hidroxilo, perhidroxilo y el oxígeno singulete reaccionan con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de la membrana celular para formar finalmente hidroperóxidos lipídicos. La oxidación lipídica tiene la característica de ser una reacción en cadena, en la cual el ácido graso oxidado se transforma en un radical capaz de oxidar otra molécula vecina (Harman, 1972).

Los productos finales de la hidroperoxidación lipídica, como hidrocarburos volátiles, alcoholes y aldehídos, pueden difundirse a sitios diferentes de donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiostasis (Martínez y Sánchez, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001). Los materiales biológicos, particularmente membranas, contienen altas concentraciones de lípidos

insaturados, por lo que constituyen el organelo celular más expuesto. La membrana celular separa las actividades funcionales altamente ordenadas del metabolismo de la relativa aleatorización el medio ambiente externo. El medio en ambos lados de la membrana contiene oxígeno y elementos traza. Bajo estas circunstancias, la membrana es potencialmente susceptible a daño por RL de la peroxidación lipídica más que los componentes del citoplasma (Martínez y Sánchez, 2001).

A nivel endotelial, las células, en condiciones normales, permiten el intercambio de macromoléculas entre la luz y la estructura de la pared vascular, captando las LDL circulantes. El receptor para LDL no modificado es saturable, por lo que no permite un acumulo de LDL en la pared vascular. Sin embargo, cuando las LDL se oxidan por contacto con los RL, los monocitos se activan y se convierten en macrófagos que reconocen a las LDL oxidadas fagocitándolas y transformándose en células espumosas favoreciendo el daño del endotelio vascular (Kaplan *et al.*, 1999).

### **b) Oxidación de hidratos de carbono**

Los monosacáridos tienen la capacidad de reaccionar de forma no enzimática con el grupo hidroxilo de las proteínas formando productos de glicación precoz o Amadori. Cuando estos compuestos de oxidan por acción de los RL se forman compuestos sumamente reactivos llamados AGE, capaces de producir agregación de proteínas y de inhibir actividades biológicas de las mismas. Las proteínas modificadas por los AGEs pueden encontrarse en el plasma, en el compartimiento intracelular así como en la matriz extracelular, acumulándose de preferencia en la pared arterial, el mesangio glomerular, las membranas basales glomerulares y de otros capilares. La acumulación de AGEs ocurre de preferencia en proteínas de larga vida; tales como algunos tipos de colágeno ocasionando desgaste tisular y diferentes matices de la patología microvascular (Fujii *et al.*, 1995; Giardino *et al.*, 1996).

### **c) Oxidación de proteínas**

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, aunque algunas

son más vulnerables a la oxidación que otras como es el caso de las cadenas laterales de tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína. En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de RL conduce a modificaciones en la estructura terciaria de las proteínas que puede acompañarse de una fragmentación química, producción de grupos carboxilos, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica (Rodríguez *et al.*, 2001).

#### **d) Oxidación de ácidos nucleicos y nucleótidos**

La importancia biológica de los ácidos nucleicos obliga a considerar como un efecto de gran repercusión el que se presenten modificaciones en las bases de la molécula de ADN debido a la presencia de RL. A semejanza de las proteínas, parece existir una muy baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena. Sin embargo, el daño puede ser más significativo, aunque sea muy limitado en extensión y localización. La interacción de RL con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente al ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) que se encuentra unido al ADN y que en presencia del peróxido de hidrógeno genera el hidroxilo que modifica las bases del mismo. El hidroxilo puede atacar tanto purinas como pirimidinas además de generar rupturas en las cadenas del ADN (Christen, 2000).

#### **2.2.3 Estrés oxidativo y procesos patológicos**

La hipótesis del estrés oxidativo se refiere al desbalance de RL y los procesos de defensa antioxidante. La célula reacciona rápidamente con numerosas respuestas biológicas, incluyendo arresto específico del desarrollo del ciclo celular, alteraciones en la transcripción de genes, reparación de daño de ADN y de transducción de vías de señalización. Por lo anterior, los EROs pueden ser definidos como verdaderos segundos mensajeros que regulan cascadas de transducción de señales, incluyendo

la modulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  y vías de cinasas y fosfatasas de proteínas (Hartman, 1995). Estos eventos determinan si la célula se necrosa, va apoptosis o sobrevive y prolifera; razón por la que el daño con RL se ha relacionado con la etiología ó exacerbación de muchos procesos patológicos (Tabla 3) (Turturro *et al.*, 1999).

**Tabla 3 Patologías asociadas a radicales libres.**

<b>Alergia</b>	Asma bronquial Intolerancia a ácido acetil salicílico Intolerancia a alimentos
<b>Cáncer</b>	Vejiga Colo-rectal Esofágico Renal Leucemia Hepático Pulmonar Prostático Piel
<b>Corazón y vascular</b>	Ateroesclerosis Isquemia
<b>Enfermedades genéticas y metabólicas</b>	Enfermedad Granulomatosa Crónica Diabetes Mellitus Síndrome de Down
<b>Enfermedades infecciosas</b>	Hepatitis HIV Influenza virus Artritis reumatoide
<b>Enfermedades neurodegenerativas</b>	Enfermedad de Alzheimer Esclerosis lateral amiotrófica Enfermedad de Parkinson
<b>Problemas oftalmológicos</b>	Catarata Glaucoma

(Turturro *et al.*, 1999)

### 2.3 Sistemas de defensa antioxidante

En vista del daño potencial que pueden causar los RL y los hidroperóxidos sobre los componentes celulares, constituyéndose en agentes etiológicos de

enfermedades como cáncer, es importante que la célula cuente con sistemas de defensa complejos constituidos por agentes antioxidantes. Así, cuando se incrementa la producción de RL, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intra o extracelular. Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación. Al interactuar con el RL, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un RL no tóxico (Halliwell, 1999).

Los sistemas antioxidantes de producción endógena pueden ser enzimáticos, los de mayor importancia son la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa y representan la primera barrera frente a la producción de radicales libres (Tabla 4). La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimático y está dada por compuestos que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Estos compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos como el plasma y dan protección a partículas y macromoléculas circulantes. Esta segunda defensa está formada a su vez por compuestos endógenos y exógenos y, a diferencia de las enzimas antioxidantes, se modifican al reaccionar con radicales libres y necesitan ser reemplazados (Manach *et al.* 2004). Existen dos tipos de antioxidantes (Urquiaga *et al.*, 1999):

- Endógenos, dotados por el propio sistema biológico. Entre éstos se encuentran el glutatión, el urato, el ubiquinol y algunas proteínas plasmáticas, los cuales ejercen un papel protector y son reemplazados por síntesis
- Exógenos, que provienen de la dieta a través de los aportes de vitaminas E, C, carotenoides, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Son llamados antioxidantes dietarios y para ser reemplazados se necesitan ingerir en la dieta nuevamente.

### **2.3.1 Los alimentos en la defensa antioxidante**

Numerosos estudios epidemiológicos permiten llegar a la conclusión de que la dieta constituye el factor clave ambiental y una herramienta potencial para el control

**Tabla 4 Antioxidantes y sus efectos benéficos.**

Primera Barrera	Antioxidantes endógenos enzimáticos (Reparadoras)	Superoxido dismutasa	Atrapa anión superóxido
		Catalasas	Neutralizan peróxido de hidrógeno
		Glutatión peroxidasa	Cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos
Segunda Barrera	Antioxidantes endógenos no enzimáticos	Glutatión	Mantiene el poder antioxidante de las enzimas dependientes de glutatión
		Ácido úrico	Quela RL y iones metálicos (hierro y cobre)
		Melatonina	Recolector de RL
		Coenzima Q	Amortigua el efecto de los RL, al actuar como segunda barrera protectora
	Antioxidantes exógenos o dietarios (Secuestradoras de RL)	Alfa-tocoferol	Atrapa radical hidroxilo y anión superóxido
			Neutraliza oxígeno singulete
			Neutraliza los peróxidos
	Ácido ascórbico	Ácido ascórbico	Atrapa radical hidroxilo y anión superóxido
			Regenera la vitamina E.
			Neutraliza oxígeno singulete
	Carotenoides		Neutralizan oxígeno singulete
	Polifenoles	Polifenoles	De forma directa atrapan RL
			De forma indirecta quelan iones de metales de transición, reduciendo así su capacidad oxidante
			Protegen de la oxidación de las LDL
			Regeneran a las vitaminas E y C

(Adaptación de Manach *et al.*, 2004)

de enfermedades crónicas. Muchos componentes de la dieta están cercanamente interrelacionados e involucrados en varios estados de defensa antioxidante (Lampe, 1999). Existen varias razones biológicamente plausibles por lo que el consumo de frutas y vegetales disminuye o previene enfermedades crónicas. Tanto frutas como vegetales son ricas fuentes de gran variedad de nutrimentos que incluyen vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes. Esta protección ha sido atribuida principalmente a las vitaminas antioxidantes como C, E y beta caroteno. Sin embargo, cuando el papel de estos antioxidantes individuales ha sido examinado por estudios epidemiológicos los resultados no son tan claros como en aquellos obtenidos para frutas y vegetales y a menudo se muestran en desacuerdo (Prior, 2003).

Una de las razones de esta variación en los resultados podría ser que los nutrimentos en los alimentos son complejos altamente interactivos. Esto equivale a que el efecto total es mayor que el de la suma de sus partes es decir, la relación entre las partes es más efectiva y funcional produciendo más y mejores resultados que cualquier acción de una de las partes por separado (Rui, 2003). Existen importantes razones de porque deben combinarse diversos antioxidantes: Cuando todos los antioxidantes necesarios se diseminan por el cuerpo se comprometen en un amplio espectro de actividades metabólicas simultáneas. De esta manera, el estrés oxidativo es reducido significativamente. Un ejemplo de lo anterior son las vitaminas C y E, las cuales juntas tienen un efecto antioxidante mayor que cualquier antioxidante solo (Mennen *et al.*, 2005). Los suplementos pueden tener antioxidantes similares a los contenidos en los alimentos pero carecen de la función y la sinergia de los antioxidantes presentes en los alimentos (Halsted, 2003; Scott *et al.*, 2004).

El estado nutricional de sujetos afectados puede, directa o indirectamente, modificar su capacidad de defensa antioxidante y de ahí su susceptibilidad al estrés oxidativo. Una alimentación con alto contenido de vegetales y frutas se asocia con reducción en el riesgo de patologías en las que las EROs, procedentes de fuentes exógenas y endógenas, podrían estar involucradas como daño cardiovascular, varios cánceres comunes, daño cerebro-vascular y otras enfermedades crónicas como artritis reumatoide (Steinmetz y Potter, 1996; Ness y Powles, 1997). A medida que el

individuo envejece, el balance está a favor de los oxidantes, de ahí que es de vital importancia el consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos (Cao *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999).

## 2.4 Compuestos fenólicos

Tanto frutas como vegetales tienen un alto contenido de antioxidantes y fitoquímicos como la fibra, vitaminas, fitoesteroles, compuestos azufrados, carotenoides, ácidos orgánicos que contribuyen a la salud (Tabla 5). De igual forma, tienen una variedad de compuestos polifenólicos que juegan un importante papel en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas por su actividad como antioxidantes (International Food Information Council Foundation, 2006). Este grupo constituye uno de los más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal ya que son producto del metabolismo secundario de las plantas (Sardesai, 1995).

Los compuestos polifenólicos abarcan a un considerable número de sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Figura 2). La estructura de los polifenoles naturales varía desde simples moléculas como los ácidos fenólicos a compuestos altamente polimerizados como son los taninos (Manach *et al.*, 2004). Diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante en combinación que de forma aislada (Ueda *et al.*, 1996).

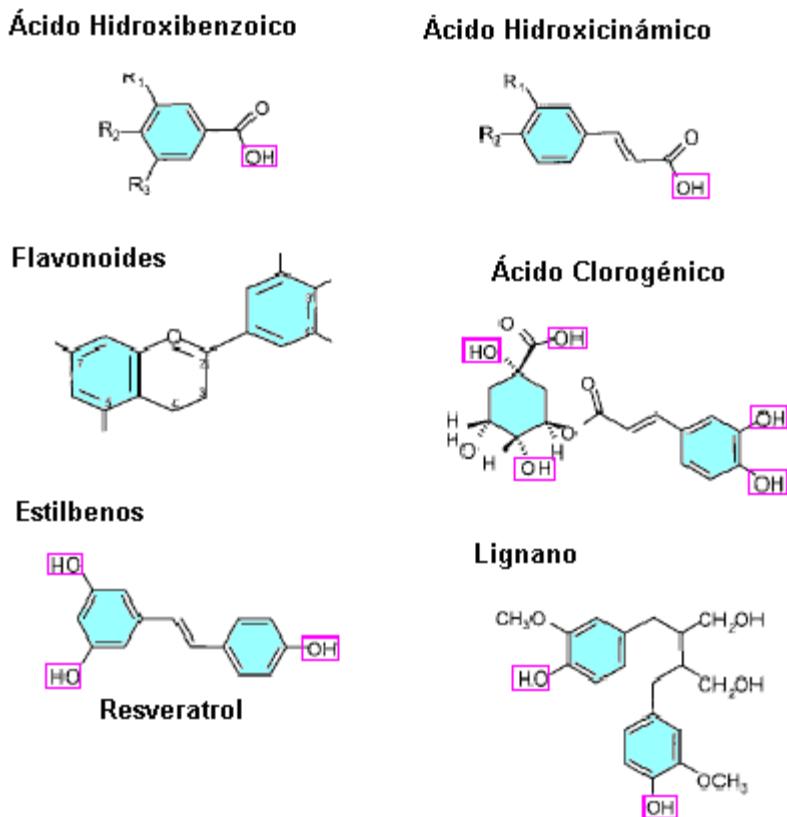
Ciertos polifenoles pueden poseer características carcinogénicas, genotóxicas o bien pueden intervenir en la síntesis de hormona tiroidea o afectar la actividad hormonal. Por ejemplo, las isoflavonas afectan la actividad estrogénica, ciertos polifenoles inhiben la absorción de hierro no heme, mientras que otros interactúan con agentes farmacológicos, alterando los efectos biológicos de los mismos o bien poseen propiedades antinutricias debido a que alteran la digestibilidad de las proteínas. Determinar si un fitoquímico es seguro o no, no es tan fácil debido a que se pueden desconocer otros componentes que acompañen al mismo. Los efectos benéficos o adversos dependen de la dosis y la población en la que se administren (Mennen *et al.*, 2005). Sin embargo, diferentes estudios epidemiológicos muestran

asociación entre una dieta rica en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer ciertas patologías especialmente las cardiovasculares y cáncer (Scalbert y Williamson, 2000).

**Tabla 5. Antioxidantes dietarios y sus efectos benéficos en la salud.**

<b>Tipo de antioxidante</b>	<b>Posibles Beneficios</b>
<b>Betacaroteno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutraliza RL</li> <li>• Reduce el riesgo de eventos cardiovasculares</li> <li>• Refuerza el sistema inmune.</li> <li>• Mantiene una visión saludable.</li> </ul>
<b>Flavonoides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refuerza los sistemas antioxidantes endógenos</li> <li>• Neutraliza RL</li> <li>• Previenen ACV y ECV</li> <li>• Previenen la inflamación</li> <li>• Poseen efecto de vasodilatación</li> <li>• Compuestos estrogénicos</li> <li>• Estabilizan a los mastocitos en reacciones alérgicas</li> <li>• Tienen efecto positivo sobre los mecanismos involucrados en la salud cardiovascular.</li> <li>• Previenen la formación de coágulos.</li> <li>• Contribuye al mantenimiento de la salud del tracto urinario</li> </ul>
<b>Luteína</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Previene contra la degeneración macular.</li> </ul>
<b>Licopeno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el riesgo de cáncer de próstata y de colon.</li> </ul>
<b>Ácido Fítico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el riesgo de cáncer de colon</li> </ul>
<b>Fitoestrógenos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el riesgo de cáncer de mama y colon.</li> </ul>
<b>Vitamina C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda a mantener la flexibilidad de los vasos sanguíneos beneficiando la presión sanguínea.</li> <li>• Mejora la respuesta inmune.</li> </ul>
<b>Vitamina E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Previene la formación de coágulos sanguíneos y la formación de plaquetas y la proliferación de éstas sobre las paredes arteriales</li> <li>• Reduce el riesgo de cáncer previniendo la proliferación celular.</li> <li>• Previene la oxidación de LDL</li> </ul>
<b>Selenio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutraliza RL</li> <li>• Fortalece el sistema inmune</li> </ul>

(International Food Information Council Foundation, 2006)



**Figura 2. Estructura química de polifenoles (Manach *et al.*, 2004)**

Algunos estudios han demostrado que las proantocianidinas tienen un efecto cardioprotector debido a su habilidad para reducir o inhibir, directa o indirectamente, la producción de RL. Por lo anterior, disminuyen la vulnerabilidad del miocardio a una reperfusión que induzca una arritmia, limitan el tamaño del infarto y facilitan la recuperación en modelos de cirugía global isquémica (Pataki *et al.*, 2002).

#### 2.4.1 Flavonoides

Dentro del grupo de los compuestos fenólicos, los flavonoides presentan potente acción antioxidante. En algunos experimentos, la capacidad antioxidante de los flavonoides excede a la de Trolox o alfa tocoferol es decir, son más efectivos como antioxidantes *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1997). Los flavonoides y otros compuestos fenólicos pueden quelar metales, afectar de señalización de la célula y proteger contra el ataque de radicales libres tanto en ambientes lipídicos como

acuosos (Rifici *et al.*, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Bravo, 1998; Pérez, 2003).

Algunos autores se refieren además a la inhibición de oxidases, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxygenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) evitando la generación de EROs *in vivo*, así como hidroperóxidos orgánicos. Los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación y formación de RL, por lo que protegen al ADN del daño oxidativo y evitan la oxidación de la vitamina E y la vitamina C en experimentos *in vitro*. Protegen al alfa tocoferol de ser utilizado por los RL o evitan que se convierta en un radical alfa-tocoferoxil, función que también ha sido sugerida para el ácido ascórbico (Waterhouse *et al.*, 1996; Bravo, 1998; Keen, 2001; Schramm *et al.*, 2001).

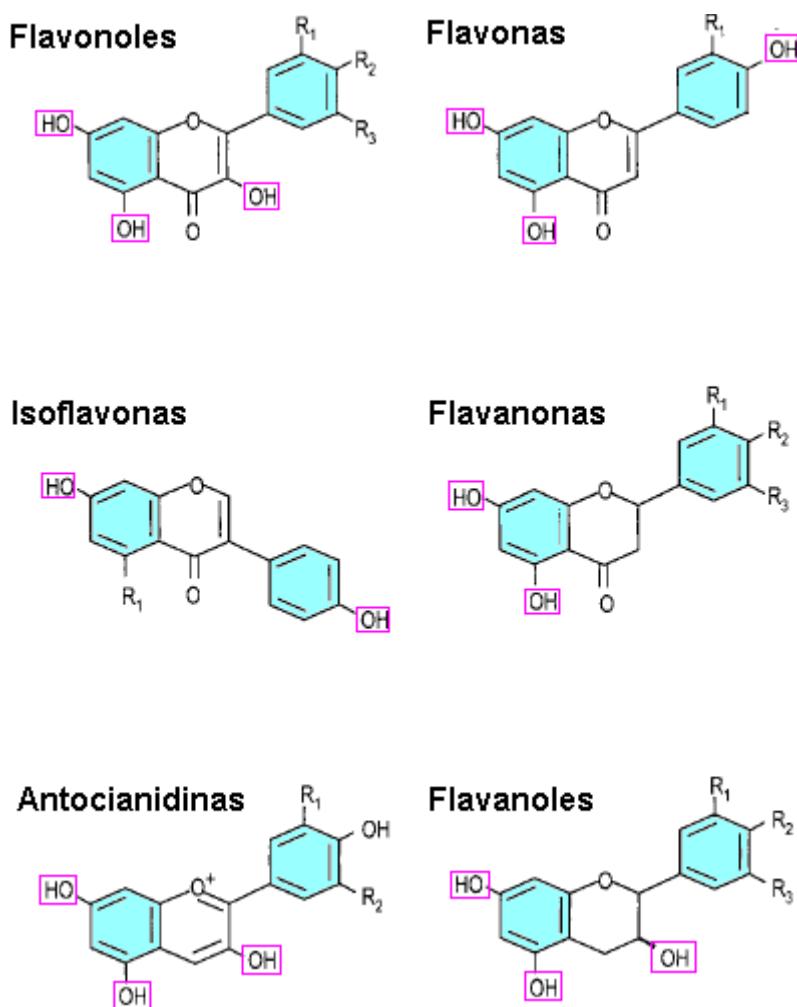
La estructura común de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos enlazados a través de 3 carbonos que usualmente forman un compuesto heterocíclico oxigenado. Las variaciones estructurales dentro de los anillos subdividen a los flavonoides en flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas y otros (Figura 3) (Manach *et al.*, 2004).

#### **2.4.2 Metabolismo y biodisponibilidad de los flavonoides**

La biodisponibilidad de los flavonoides no está aún bien establecida. Los escasos datos indican que solo una pequeña parte del compuesto es absorbido y como tal encontrada en plasma y orina. Los porcentajes de flavonoides recuperados en orina están entre el 7% y el 25% del compuesto ingerido. En el plasma humano las concentraciones encontradas después de la ingesta son del orden de 1  $\mu$ M y decrecen rápidamente (Scalbert y Williamson, 2000).

La mayoría de los polifenoles son probablemente demasiado hidrofílicos para penetrar la pared intestinal por difusión pasiva. El transporte activo que se conoce es dependiente de  $\text{Na}^+$ . Las características de absorción están determinadas por la estructura del flavonoide. Sólo las agliconas de flavonoides y los glucósidos de

flavonoides (unidos a glucosa) son absorbidos en el intestino delgado, donde son rápidamente metabolizados en el epitelio intestinal a formas metiladas, glucoronisadas o metabolitos sulfatados. De esta manera atraviesan la barrera intestinal y pasan al hígado donde se metabolizan. Las reacciones de conjugación facilitan la excreción de estos compuestos. Las bacterias que normalmente colonizan el colon también juegan un papel importante en el metabolismo de flavonoides y su absorción ya que los flavonoides no absorbidos pasan al colon donde se metabolizan por la flora bacteriana. Los compuestos absorbidos y metabolizados por hígado pueden regresar a intestino vía la circulación enterohepática y alcanzar el colon en forma química diferente (Ader *et al.*, 1996).



**Figura 3. Estructura química de flavonoides** (Manach *et al.*, 2004)

El colon tiene potencial catalítico e hidrolítico, realizando rápidamente reacciones de desconjugación y liberando a las agliconas. Algunas bacterias hidrolizan estas agliconas hacia compuestos más sencillos como ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos que pueden ser absorbidos. Estos metabolitos pueden retener parte de la capacidad reductora de sus predecesores pues conservan grupos fenólicos libres (Ader *et al.*, 1996). En general, la biodisponibilidad de los bioflavonoides es relativamente baja debido a la absorción limitada y rápida eliminación. Más aún, los flavonoides son rápida y extensamente metabolizados y las actividades biológicas de sus metabolitos no son siempre las mismas que las de sus predecesores (Scalbert y Williamson, 2000, Manach *et al.*, 2004).

Siendo los polifenoles los antioxidantes más abundantes de la dieta, la ingesta total diaria puede ser de hasta 1 g/día (Scalbert *et al.*, 2005), mientras que la ingesta promedio de flavonoides se estima en 23 mg/día y la de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día, excediendo la de otros antioxidantes como el beta caroteno (2-3 mg/día), vitamina E (7-10 mg/día) y vitamina C (70–100 mg/día) (Martínez-Flores *et al.*, 2002)

## 2.5 *Vitis vinifera*

Pertenece a la familia de las *Ampelidáceas* del género *Vitis*. Es el fruto de forma esférica, sincárpica y pulpa muy jugosa, que crece agrupándose en racimos de la vid común o vid europea por medio de zarcillos opuestos a las hojas en arbustos por lo general trepadores (Noguera, 1972). Los principales países vitivinicultores son: Francia, Italia, Portugal, Alemania y España, en Europa; Estados Unidos, México, Chile, Uruguay y Argentina, en América; Sudáfrica y el Sur de Australia (USDA, 2006).

La composición de la uva varía según se trate de uvas blancas, rojas o negras. En ambas destacan dos tipos de azúcares, principalmente glucosa y fructosa y vitaminas como A, C, ácido fólico y vitamina B6. Uvas cultivadas en regiones frías suelen tener menos azúcares. Entre los minerales, el potasio es el más abundante y se encuentra en mayor cantidad en uvas negras, el calcio y magnesio están en

cantidades moderadas y son más abundantes en uva blanca. El fósforo también está presente en la composición de las uvas, además del selenio, hierro, manganeso, cobre y zinc. Por su contenido de fibra, la uva es un laxante suave (Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa). Los beneficios de la uva derivan tanto de sus componentes nutrimentales como de los compuestos fenólicos (Dell'Agli *et al.*, 2004).

### **2.5.1 Flavonoides en uva**

Dentro de los compuestos polifenólicos en uva abundan diversas sustancias con reconocidas propiedades benéficas a la salud, tales como flavonoides y taninos responsables del color, aroma y textura característicos de estas frutas (Lesschaeve y Noble, 2005). Las uvas contienen una gran variedad de polifenoles, flavonas, flavonoles, antocianinas y principalmente flavonoides (1000-1800 mg/mL) (Tabla 6), éstos se encuentran también en la semilla y en la cáscara de la uva (Singleton, 1983, Kanner *et al.*, 1994, Dell'Agli *et al.*, 2004). Por lo que se refiere a su composición, varía grandemente aún entre variedades de la misma especie. La presencia de polifenoles en plantas está ampliamente influenciada por factores genéticos y condiciones ambientales como son clima, suelo, fertilización, raleo, germinación, grado de madurez, procesamiento y almacenamiento (Bravo, 1998; Lachman *et al.*, 2004).

Los flavonoides presentan actividades biológicas importantes para la salud como su potente acción antioxidante, debido a la inhibición de oxidación de lipoproteínas de baja densidad evitando su depósito en arterias (Kanner *et al.*, 1994; Harborne y Williams, 2000). Los flavonoides presentan además componentes adicionales que ayudan en el combate a las enfermedades como es el caso del resveratrol. Dicho fitonutriamento, encontrado principalmente en la piel de las uvas, presenta notorias propiedades antiinflamatorias y se ha ligado con la prevención de ciertos tipos de cáncer así como con la reducción de riesgo cardiovascular. Los estudios con animales muestran que (Frankel y Meyer, 1998):

- Pueden contribuir a incrementar la longevidad.

- Previenen muerte celular prematura.
- Presentan actividad antitumoral.
- Exhiben actividad antiinflamatoria no esteroidea.
- Inhiben la proliferación de células de cáncer de mama.
- Protegen contra daños neurológicos crónicos.
- Evitan el daño causado por poderosas neurotoxinas.
- Protegen, junto con otros antioxidantes, efectivamente contra el Parkinson, protegiendo células nerviosas del daño oxidativo.
- Inhiben la formación de fibrillas alrededor de los nervios evitando el Alzheimer.

**Tabla 6. Contenido de flavonoides en uvas enteras negras, rojas y blancas (mg/100g) en base húmeda.**

<b>UVAS NEGRAS</b>	Flavan 3 oles	Epicatequina	8.64
		Epicatequina 3 galato	2.81
		Epigalocatequina	0
		Epigalocatequina 3 galato	0
		Catequina	8.94
	Flavonas	Galocatequina	0
		Apigenina	0
	Flavonoles	Luteolin	0
		Kampherol	0
		Myricetina	0.45
		Quercetina	2.54
<b>UVAS ROJAS</b>	Flavan 3 oles	Epicatequina	1.95
	Flavonoles	Quercetina	3.54
<b>UVAS BLANCAS O VERDES</b>	Flavan 3 oles	Epicatequina	1.02
	Flavan 3 oles	Epicatequina 3 galato	0.43

(USDA, 2003)

Las catequinas así como otros polifenoles, son potentes secuestradores de radicales libres (hidroxil, peroxil, superóxido y 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)), y son quelantes de hierro. Tienen actividad antioxidante en plasma humano retardando la degradación del alfa tocoferol y β-caroteno e inhiben la oxidación de lípidos del plasma. Algunos estudios han encontrado que tanto la (+) catequina como la (-)

epicatequina tienen una capacidad secuestradora de RL 10 veces superior a la de L-ascorbato y  $\beta$ -caroteno cuando se prueba en bacterias (Yilmaz, 2005). También presentan actividad inhibitoria de enzimas clave involucradas en el ciclo celular, inducen apoptosis en diferentes líneas celulares e inhiben la expresión de ciertos genes relacionados con tumores, por lo que son candidatos idóneos en la prevención de cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro (Moskaug *et al.*, 2005).

El ácido gálico es un ácido fenólico también presente en las semillas y piel de la uva, éste secuestra radicales peroxil y tiene actividad antioxidante al pH del estómago además de actividad antifúngica e inducción de apoptosis (Young, 2001). Respecto a las proantocianidinas, su tamaño y composición se relaciona con su actividad antioxidante por lo que presentan diferencias como secuestrantes de RL y en sus propiedades fisicoquímicas. Una posible aplicación de algunas de las fracciones de proantocianidinas está en el campo de la preservación de alimentos como antioxidantes alimentarios y en el de protección contra cáncer de piel (Torres *et al.*, 2002).

Los polifenoles en la uva decrecen la agregación plaquetaria y la formación de lesiones arteriales estimulando la liberación de óxido nítrico. Los flavonoides como la quercetina y catequina juegan un papel importante en la prevención del daño cardiovascular y cáncer. Adicionalmente, estos flavonoides exhiben efectos anticoagulantes, protegen al corazón y arterias contra el daño oxidativo y reducen la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación (Van de Wiel *et al.*, 2001). El extracto de semilla de uva es rico en proantocianidinas. La suplementación de este fitoquímico es segura dependiendo del método de extracción. No se ha observado toxicidad en administración oral en dosis de 0.5–2 g/kg de peso corporal en ratas (Mennen *et al.*, 2005).

### **2.5.2 Polifenoles en bagazo de uva**

En las zonas agrícolas se estima que cerca del 13% del peso de las uvas procesadas para la industria vitivinícola termina como subproducto después del

prensado. El bagazo de la uva consistente de piel, semillas y raspón es una rica fuente de polifenoles con actividades antioxidantes significativas y son materiales crudos convenientes para la fabricación de productos como complementos alimenticios. La composición del bagazo es de un 45% de cascarilla, 30% de semilla y 25% de palillo en peso. Se ha estimado que el bagazo constituye el 12% del peso de la uva fresca y presenta un contenido de humedad de 65% (Fantozzi y Betschart, 1981).

Durante el proceso de la elaboración del vino la uva, una vez cosechada, se presiona para extraer la parte líquida de la fruta o mosto en donde buena parte de los compuestos polifenólicos se transfieren por migración desde el bagazo. El mosto sufre una fermentación natural a través de las levaduras que se encuentran en la superficie de la uva. Para el caso de vinos tintos se lleva a cabo una maceración del bagazo con el mosto de manera simultánea a la fermentación para permitir la migración de compuestos como taninos, antocianinas y compuestos volátiles, entre muchos otros, al vino. Durante la fermentación del mosto, la temperatura puede regularse entre 28 y 30º C. En estas condiciones, se obtiene un mayor contenido de taninos en el vino con la consecuente disminución de taninos y otros compuestos polifenólicos residuales en el bagazo de uva. Sin embargo, una cantidad importante de compuestos polifenólicos particularmente flavonoles (catequinas y proantocianidinas) permanecen en el bagazo manteniendo una actividad antioxidante significativa, aún siendo expuestos a altas temperaturas durante la destilación, por lo que se tiene particular interés en el aprovechamiento de estos subproductos para obtener un producto con compuestos fenólicos con potencial bioactivo (González-Paramás *et al.*, 2004). El bagazo contiene catequinas monoméricas y oligoméricas (flavan-3-oles, proantocianidinas) y flavonoles glicosilados (USDA, 2003).

### **2.5.3 Usos potenciales del bagazo de uva.**

El bagazo de uva ha sido utilizado como sustrato en procesos de compostaje en diferentes países como Francia, Alemania, España, Yugoslavia, Argentina e Israel

(Faure y Deschamps, 1990). En España, Italia y Grecia se obtiene un aguardiente llamado orujo mediante otra fermentación y destilación del bagazo (Flanzy, 2000).

De la aplicación del bagazo en la tecnología de los alimentos se ha obtenido un aceite comestible de potente capacidad antioxidante, extrayéndose únicamente de las semillas (Goñi *et al.*, 2007; Yemis *et al.*, 2008). También se ha encontrado que los compuestos fenólicos actúan como inhibidores de la oxidación de los lípidos de algunas carnes congeladas. En Brasil la uva permite aumentar la vida útil de la carne de pollo congelada o refrigerada ya que los fenoles extraídos del bagazo de la uva (cáscara y semilla) ayudan a retrasar la oxidación lipídica de la carne de pollo procesada y mantenida en refrigeración. Además, por poseer propiedades antibacteriales se ha empezado a utilizar como conservador natural (Ozkan *et al.*, 2004; Goñi *et al.*, 2007).

En México, la industria vitivinícola genera una gran cantidad de residuos y generalmente su eliminación sugiere un problema. Aproximadamente de cada 100 kg de uva procesada se obtienen de 15-20 kg de bagazo (hollejos, semillas y racimos) (Usaquén-Castro *et al.*, 2006), que prácticamente la industria vitivinícola de nuestro país, solo desecha.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El bagazo de uva es un subproducto de la industria vitivinícola y puede significar una fuente rica de antioxidantes a un bajo costo. En México no se aprovecha este producto secundario pues la mayor parte se desperdicia y sólo una pequeña proporción se utiliza para complementar alimento para animales o como fertilizante.

Por lo anterior, el presente proyecto pretende determinar las características fisicoquímicas y sensoriales del extracto acuoso de bagazo de uva roja así como el contenido de compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante y efecto sobre células de cáncer humano. Los resultados obtenidos permitirán determinar el potencial del bagazo de uva para ser utilizado para consumo humano.

## **IV. HIPÓTESIS**

El extracto acuoso de bagazo seco de uva roja es una rica fuente de compuestos polifenólicos con propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutracéuticas adecuadas.

## **V. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las características fisicoquímicas, sensoriales y nutracéuticas del extracto acuoso de bagazo de uva roja obtenido después del proceso de fermentación de vino tinto así como su contenido de los compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y efecto sobre células de cáncer de mama.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Optimizar el proceso de extracción acuosa en caliente de los compuestos fenólicos y taninos condensados en bagazo seco de uva roja.
2. Determinar la estabilidad y el tiempo vida media de los compuestos fenólicos totales y taninos condensados del extracto acuoso en caliente del bagazo de uva roja seco.
3. Determinar el tipo de compuestos fenólicos totales y taninos condensados en el extracto acuoso en caliente de bagazo seco de uva roja mediante HPLC.
4. Determinar las características fisicoquímicas del extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja.
5. Realizar la evaluación sensorial del extracto caliente de bagazo seco de uva roja.
6. Determinar la capacidad antioxidante del extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja.
7. Determinar el efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama ZR-75-1.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Obtención del material biológico.**

Se utilizó el bagazo (piel, semilla y raspón) de una mezcla de tres variedades de uva roja utilizadas para la elaboración de vino tinto (Cabernet Sauvignon, Tempranillo y Syrah, 80:10:10) de la cosecha de Septiembre del 2007 donadas por la empresa Cavas Freixenet. Las muestras se colectaron después del estrujado de la uva una vez transcurrida la maceración-fermentación. Fueron secadas en horno de convección forzada a 40° C por 72 horas y posteriormente irradiadas con luz ultravioleta por 5 segundos. El bagazo seco se limpió para eliminar partículas extrañas, se trituró dejando la piel, semillas y raspón y se almacenó a temperatura ambiente, protegido de la luz, en un lugar fresco y seco.

### **6.2 Extracción acuosa caliente del bagazo seco de uva roja.**

Con la finalidad de optimizar el proceso de extracción acuosa caliente se calentaron 250 mL de agua tridestilada a punto de ebullición, se agregaron a 1.5, 7.5 y 15 g de bagazo de uva seco que se dejaron reposar por 7 minutos, posteriormente se decantaron para obtener el sobrenadante, al cual se le determinó el contenido de compuestos fenólicos totales (FT) y taninos condensados (TC). Una vez determinada la concentración adecuada para la extracción de los compuestos fenólicos se determinó el tiempo de extracción probando a 5, 7, 10 y 15 min en 250 mL de agua a temperatura de ebullición.

#### **6.2.1 Determinación de los Taninos Condensados del extracto acuoso caliente del bagazo seco de uva roja.**

Los TC se cuantificaron de acuerdo al ensayo de la vainillina (Price *et al.*, 1978; Desphande y Cheryan, 1985) modificado para microplaca. El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en soluciones ácidas. La vainillina protonada es un radical electrofílico débil que reacciona en medio ácido con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermedio de esta

reacción se deshidrata rápidamente para dar un producto coloreado. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como catequina. Brevemente, se midieron 40  $\mu$ L de extracto acuoso y se colocaron en una placa de 96 pozos, adicionándole 200  $\mu$ L del reactivo de vainillina (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en proporción 1:1) recién preparado en cinco vueltas de 40  $\mu$ L cada una. Por otro lado, se preparó un blanco de muestra con 40  $\mu$ L del extracto más 200  $\mu$ L de HCl al 4% en metanol. La reacción de ambas muestras se llevó a cabo a una temperatura de 30º C durante 20 min. Finalmente la muestra se leyó a una absorbancia de 492 nm en un lector de placas marca Thermo Electron modelo Multizkan Ascent. La concentración de TC se calculó comparando con una curva estándar de (+) catequina ( $y = 0.5073x - 0.0001$ ;  $R^2 = 0.9986$ ) cuyas concentraciones fueron: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 y 0.20 mg/mL. Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina por mililitro de muestra (mg eq (+)Cat/mL).

#### **6.2.2 Determinación de los Fenoles Totales del extracto acuoso caliente del bagazo seco de uva roja.**

Los FT del extracto acuoso caliente del bagazo de uva roja se determinaron con el método de Folin Ciocalteu de Singleton y Rossi (1965) modificado para microplaca. Este método se basa en la reducción del ácido gálico por compuestos fenólicos en presencia de un álcali (carbonato de sodio); el producto da una coloración cuyo pico máximo de absorbancia es a los 760 nm. Brevemente, la extracción de los fenoles totales se realizó a partir de 12.5  $\mu$ L del extracto que se colocaron en una placa para ELISA de 96 pozos de fondo plano, a lo que se les añadieron 50  $\mu$ L de agua tridestilada y 12.5  $\mu$ L del reactivo de Folin Ciocalteu. La muestra se agitó y dejó reposar por 6 min para posteriormente añadirle 125  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio al 7% y se agitó nuevamente. Despues se añadieron 100  $\mu$ L de agua tridestilada para ajustar el volumen a 300  $\mu$ L y se agitó nuevamente. Finalmente se dejó reposar por 90 min y se leyó en un lector de placas marca Thermo Electron modelo Multiskan Ascent a 760 nm. La concentración de FT se obtuvo comparando con una curva estándar de ácido gálico ( $y = 4.8528x - 0.0336$ ;  $R^2 = 0.9987$ ) cuyas concentraciones fueron: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10,

0,12, 0,14, 0,16, 0,18 y 0,20 mg/mL. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra (mg eq AG/mL).

### **6.3 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso de bagazo seco de uva roja.**

Para evaluar la estabilidad de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso se determinó el contenido de FT (cada 24 h durante 96 h) y TC (0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 h) a 4, 25 y 37º C. Posteriormente se calculó la constante de velocidad, el tiempo de vida media y la energía de activación mediante las siguientes ecuaciones para cinéticas de primer orden (Brown *et al.*, 2004):

$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_f} = kt$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

$$\ln \frac{k_1}{k_2} = \frac{E_a}{R} \frac{(T_1 - T_2)}{T_1 T_2}$$

### **6.4 Determinación parcial de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso mediante HPLC.**

Con la finalidad de determinar parcialmente los compuestos fenólicos del extracto acuoso caliente de bagazo de uva roja se pesaron 15 g de bagazo seco de uva roja y se colocaron en 250 mL de agua tridestilada a temperatura de ebullición. Se dejó reposar por 7 minutos y posteriormente se filtró con una membrana de 0.2 µm. El filtrado fue colocado en un vial en el equipo HPLC (Agilent 11000) para su análisis por fase reversa (Ramamurthy *et al.*, 1992). La fase móvil corrió a 1.5 mL/min utilizando una columna Zorbox C18 de 15 cm y consistió en el solvente A (ácido acético al 2%) y solvente B (agua tridestilada al 68% con acetonaítrilo al 30% y 2% de ácido acético). El gradiente del solvente fue programado de 10 a 100 % de B en A

durante 30 minutos. El detector UV se programó a una longitud de onda de 280 nm con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. Los estándares utilizados fueron: ácido siríngico, ácido benzoico, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico, epicatequina, ácido salicílico, ácido vinílico, vainillina, ácido caféico y ácido ferúlico.

## **6.5 Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso caliente del bagazo de uva roja.**

Con la finalidad de determinar los parámetros fisicoquímicos del extracto acuoso caliente de bagazo de uva roja, se pesaron 15 g de bagazo seco de uva roja y se colocaron en 250 mL de agua tridestilada a temperatura de ebullición. Se dejó reposar por 7 minutos y posteriormente se filtró. A partir de este extracto se determinaron sus características fisicoquímicas. El pH se obtuvo utilizando un potenciómetro Termo Orión modelo 410 a temperatura ambiente. La acidez se determinó titulando 50 mL del extracto con solución de NaOH 0.1N valorada. Los grados Brix se obtuvieron colocando una gota del extracto en un refractómetro Atago y se midió el contenido de azúcares disueltos de la muestra a temperatura ambiente. Los parámetros de color se obtuvieron mediante un colorímetro Minolta modelo CM 2002.

## **6.6 Evaluación sensorial.**

Con la finalidad de determinar las características sensoriales del extracto acuoso en caliente del bagazo de uva roja, se pesaron 60 g de bagazo seco y se dejaron reposar por 7 minutos en 1 L de agua potable en ebullición. Se prepararon 4 muestras diferentes: extracto natural, extracto adicionado con 40 mL de jugo de limón por L, extracto adicionado con 50 g de azúcar por L y extracto adicionado con limón y azúcar. El análisis se realizó mediante un cuestionario (Anexo 1) en el que se evaluó la vista, el aroma, el sabor y el resabio mediante escala hedónica con valores del 1 al 5 (desagradable-indiferente-agradable), con 50 jueces no entrenados, de sexo indistinto, entre 20 y 45 años de edad, no fumadores.

## 6.7 Determinación de la capacidad antioxidante.

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar que un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o muestra. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado y la técnica utilizada, así como en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (Frankel y Meyer, 2000). Con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante del extracto acuoso caliente del bagazo de uva roja se determinó ésta por tres diferentes métodos:

a) *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)* (Re *et al.*, 1999). El método monitorea la actividad antioxidante de flavonoides, carotenoides y antioxidantes plasmáticos. El radical monocatión estable de ABTS (2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolina 6-ácido sulfónico) se genera con la oxidación del ABTS por el persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. Brevemente, se preparó el radical ABTS 12 horas antes de ser utilizado, posteriormente se diluyó en PBS para obtener una absorbancia final de  $0.7 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 734 nm. Se adicionaron 990  $\mu$ L del radical ABTS y se leyó la absorbancia, posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L de muestra y se midió su absorbancia a los 6 minutos. La capacidad antioxidante se determinó interpolando el diferencial en la curva de calibración previamente elaborada con Trolox. Las concentraciones utilizadas fueron de 100, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500  $\mu$ M de Trolox y la ecuación de la recta obtenida fue de  $y = 0.0002x - 0.0079$  con una  $R^2 = 0.9987$ . Los valores se reportaron en  $\mu$ M eq de Trolox ó  $\mu$ mol eq de Trolox por gramo de bagazo ( $\mu$ mol eq Trolox/g).

b) *Habilidad Reductora Férrica de Plasma (FRAP)* (Benzie y Strain, 1996). El método mide cualquier solución que contenga uno o varios antioxidantes (incluido el plasma) y se basa en la reducción del complejo ión férrico-(2, 4, 6-tripiridil-s-triazina) ( $FE^{+3}$ -TPTZ) a  $FE^{+2}$ -TPTZ. Brevemente, se tomaron 60  $\mu$ L de muestra y se le

adicionaron 240  $\mu$ L de la solución 10:1:1 compuesta por buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6), TPTZ (10 mM en HCl 40 mM) y cloruro férrico (20mM) y se leyó la absorbancia a 595 nm. Los valores se compararon con una curva patrón realizada con ácido ascórbico (AA) a concentraciones de 0, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ M. La ecuación de la recta utilizada fue  $y = 0.0062x + 0.0448$ , con una  $R^2 = 0.9998$ . Los valores se reportaron en  $\mu$ M eq de AA ó  $\mu$ mol eq de AA por gramo de bagazo ( $\mu$ mol eq AA/g).

c) 2,2 - Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995) El método mide compuestos de ácido ascórbico o isoascórbico en soluciones metanólicas. La actividad antioxidante se determinó usando el radical libre DPPH. En ésta forma la absorción máxima del radical es a 515 nm. El DPPH es reducido por acción del antioxidante (ácido ascórbico), se determina el decremento de la absorbancia. Brevemente, se tomaron 10  $\mu$ L de muestra y se le adicionaron 290  $\mu$ L de DPPH 2.28% (p/v), se dejó reposar a temperatura ambiente y oscuridad por 30 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia. El valor de la capacidad antioxidante se obtuvo al interpolar el diferencial de la absorbancia en una curva patrón construida con las concentraciones de 0, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu$ M. de ácido ascórbico. La ecuación de la recta utilizada fue  $y = 0.0765x - 0.667$ , con una  $R^2 = 0.9993$ . Los valores se reportaron en  $\mu$ M eq de AA ó  $\mu$ mol eq de AA por gramo de bagazo ( $\mu$ mol eq AA/g).

## 6.8 Efecto Citotóxico sobre células de cáncer de mama.

Con la finalidad de contar con un concentrado de compuesto fenólicos del bagazo de uva roja se pesaron 150 g del bagazo seco y se colocaron en 250 mL de agua tridestilada a temperatura de ebullición, se dejó reposar por 7 minutos, se filtró, se liofilizó y se almacenó a -20° C protegido de la luz. Se pesaron 150 mg de liofilizado, se colocaron en 25 mL de agua tridestilada a temperatura ambiente y se determinó el contenido de FT y TC como se describió anteriormente.

Para determinar el efecto citotóxico de los compuestos fenólicos del bagazo de uva roja se prepararon concentraciones de FT entre 0.3 y 0.001 mg de FT/mL de

medio de cultivo libre de suero, suplementado con albúmina sérica de bovino (ASB) (Serological No. A440) al 0.5%. Brevemente, se sembraron células ZR-75-1 de cáncer de mama ductal (American Type Culture Collection) a  $3 \times 10^4$  células por pozo en placas de 24 pozos (Nunc) en DMEM alto en glucosa (Gibco, No. 11995) con 10% de suero fetal bovino (Gibco No. 10091), L-Glutamina (Gibco, No. 25030), piruvato de sodio (Gibco, No. 11360), antibióticos: estreptomicina (Sigma No. S9137) 100mg/L y penicilina G (Sigma No. P3032) 62.1 mg/L y antimicótico: anfotericina (Gibco No. 04195780 D) 1mg/mL. Después de 48 horas, se les agregaron las diferentes concentraciones de bagazo de uva liofilizado y se determinó el número celular a las 24 h por recuento directo al microscopio (García-Gasca *et al.*, 2002).

### **6.9 Análisis estadístico.**

Se realizó la comparación de medias por medio de ANOVA para la caracterización nutracéutica mediante el método de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para la comparación entre tratamientos y Dunnett ( $p \leq 0.05$ ) para comparación entre cada tratamiento contra el control. Para el estudio sensorial se realizó la prueba de t de student ( $p \leq 0.05$ ).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

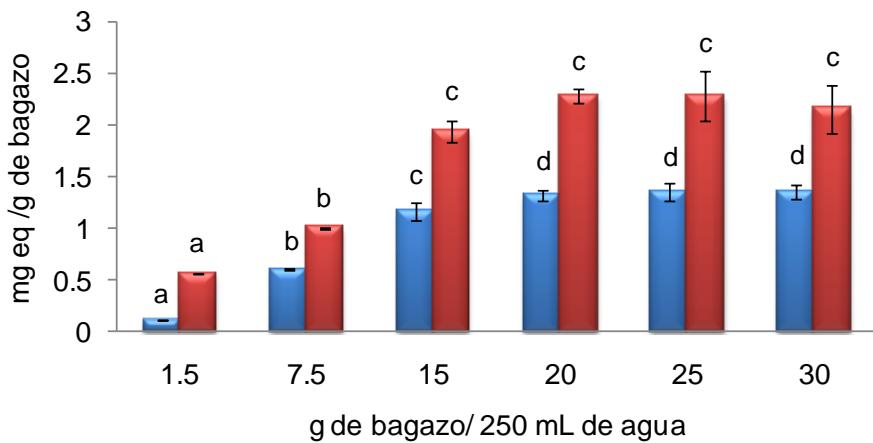
### 7.1 Extracción acuosa en caliente de los fenoles totales (FT) y taninos condensados (TC) del bagazo seco de uva roja.

Con la finalidad de lograr la mejor extracción acuosa de compuestos fenólicos de bagazo seco de uva roja se optimizó el proceso en caliente a partir de diferentes concentraciones de bagazo. La cantidad de FT y TC del bagazo seco de uva roja fueron expresados en mg eq de ácido gálico (AG) y mg eq de (+) catequina ((+)-Cat), respectivamente (Figura 4). Se determinó que la extracción máxima ( $p \leq 0.05$ ) se logró a partir de 15 g/250 mL de agua durante 7 minutos a temperatura de ebullición. Las concentraciones obtenidas fueron de 1.86 mg eq AG y 1.036 mg eq (+)-Cat por gramo de bagazo seco, respectivamente. Posteriormente se determinó que el tiempo óptimo de extracción fue de 7 minutos a temperatura de ebullición; no se observaron diferencias estadísticas a 10 y 15 minutos.

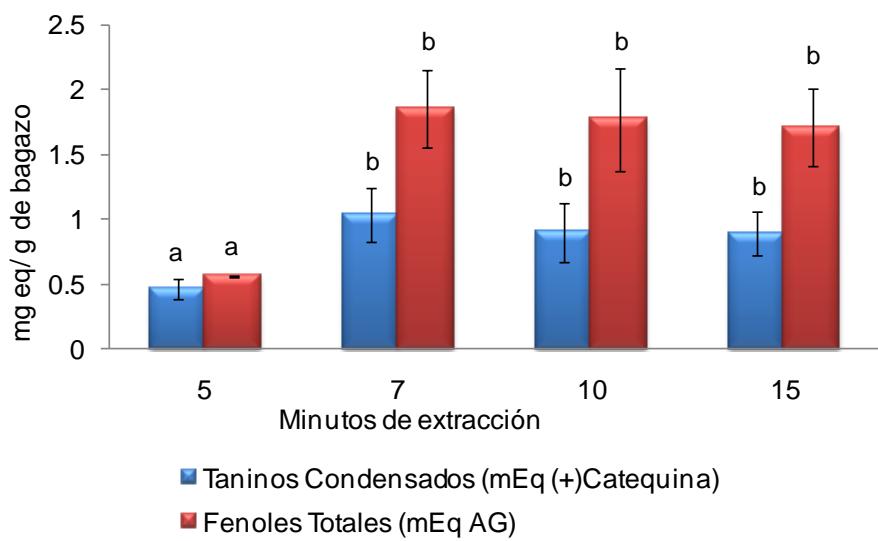
En términos de concentración de FT, los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso de bagazo de uva roja presentó 111.6 mg eq AG/L. Al comparar dicha concentración con las obtenidas para tés comerciales o preparados en fresco, se observa que se encuentra dentro del intervalo (25-350 mg eq AG/L) (Rueda, 2004). Sin embargo, es importante hacer notar que, para este estudio, la extracción se vio limitada por el tamaño de partícula ya que se utilizó bagazo seco, triturado, pero no molido, debido a que el objetivo del presente trabajo era determinar la extracción en la forma como comúnmente se preparan los tés. Lo anterior sugiere que los compuestos fenólicos de la semilla no fueron extraídos ya que éstas se encontraban enteras y representan aproximadamente el 30% del bagazo de uva (Usaquet-Castro *et al.*, 2006). Por lo anterior, es muy probable que la disminución del tamaño de partícula mediante la molienda, incluyendo a la semilla, pueda aumentar la cantidad y composición de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja.

El vino tinto representa una rica fuente de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas, taninos y flavonoides. El contenido de FT de vino tinto oscila entre 1,000 y 4,000 mg/L. En este caso es posible observar que el bagazo de

A



B



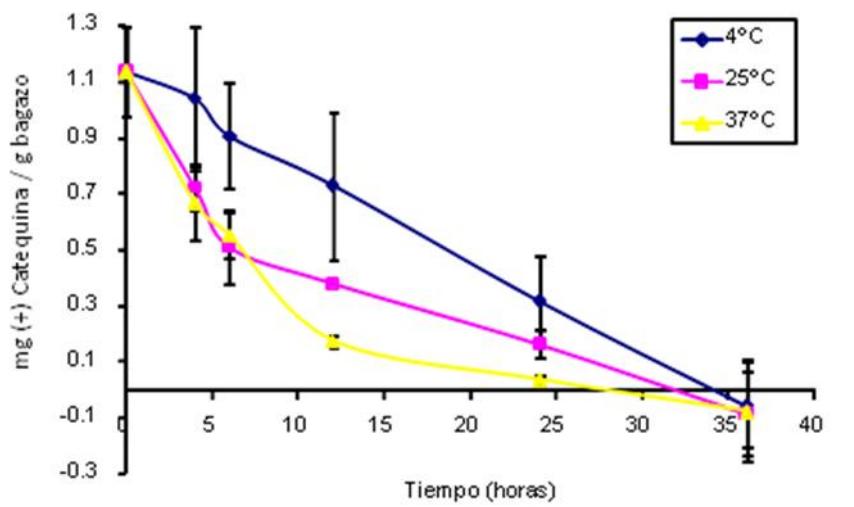
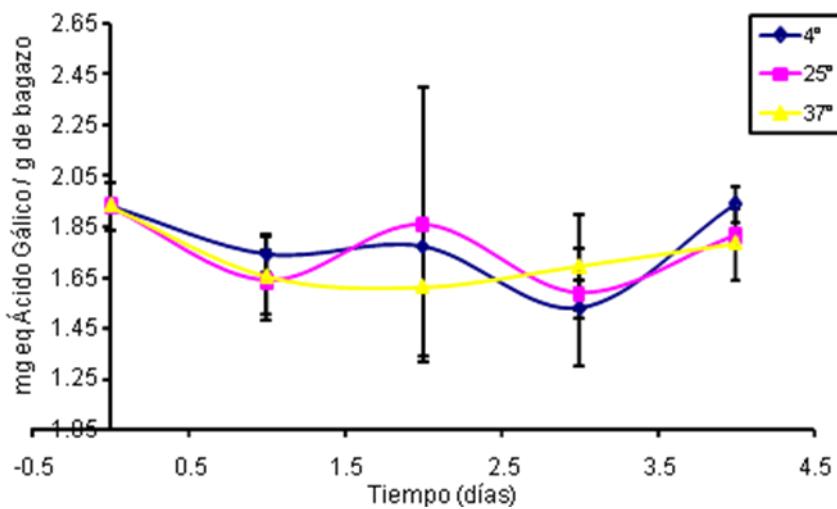
**Figura 4. Efecto de la concentración de bagazo (A) y tiempo de extracción (B) en la recuperación de compuestos fenólicos totales y taninos condensados.** (A) Se extrajo el bagazo de uva roja en agua hirviendo por 7 minutos a 1.5, 7.5, 15, 20, 25 y 30 g de bagazo en 250 mL de agua tridestilada y se determinaron los FT y TC. (B) Se obtuvo el extracto con 15 g de bagazo en 250 mL de agua tridestilada a temperatura de ebullición por 5, 7, 10 y 15 minutos y se determinaron los FT y TC. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos para cada determinación de forma independiente (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

uva conserva entre el 3 y el 10% de los FT que contiene el vino tinto (Bengoechca *et al.*, 1997; Scalbert y Williamson, 2000). Por otro lado, se ha estimado que la ingesta media de flavonoides se encuentra entre 23 y 125 mg/día (Hertog *et al.*, 1996; Martínez-Valverde y Periago, 2000; Martínez-Flores *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos sugieren que 250mL de extracto acuoso de bagazo de uva roja contienen 28 mg de FT dentro de los cuales 16 mg corresponden a TC, lo que sugiere un aporte importante de éstos compuestos.

## **7.2 Estabilidad y tiempo de vida media de los fenoles totales y taninos condensados en el extracto acuoso de bagazo seco de uva roja.**

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos. No se observó efecto sobre FT hasta las 96 horas, mientras que los taninos condensados mostraron una vida media de 19, 7.7 y 4.3 h para los tratamientos a 4, 25 y 37° C, respectivamente considerando 12 horas de incubación (Figura 5). Se calculó la energía de activación para la degradación de TC entre las diferentes temperaturas utilizando la ecuación de Arrhenius, la cual se encontró en promedio de 33 kJ/mol (7.89 kCal/mol).

Por una parte se ha establecido que las epicatequinas del té verde son relativamente estables pues, en exposición prolongada en agua a ebullición, se pierde aproximadamente el 15% de estos compuestos (Manach *et al.*, 2004). Sin embargo, Delgado-Vargas *et al.* (2000) informaron que altas temperaturas inducen a destrucción logarítmica de las antocianinas con el tiempo de calentamiento a temperatura constante. Los resultados obtenidos muestran que los TC presentes en el bagazo de uva roja son sensibles a la temperatura y se requiere poca energía para degradarlos.



**Figura 5. Estabilidad de los fenoles totales(A) y taninos condensados (B) del extracto acuoso caliente de bagazo de uva roja.** Valores obtenidos por gramo de bagazo seco. Se obtuvo el extracto con 15 g de bagazo y 250 mL de agua HPLC a punto de ebullición por 7 min. Se incubó por diferentes tiempos a 4, 25 y 37° C y se cuantificaron los FT y TC.

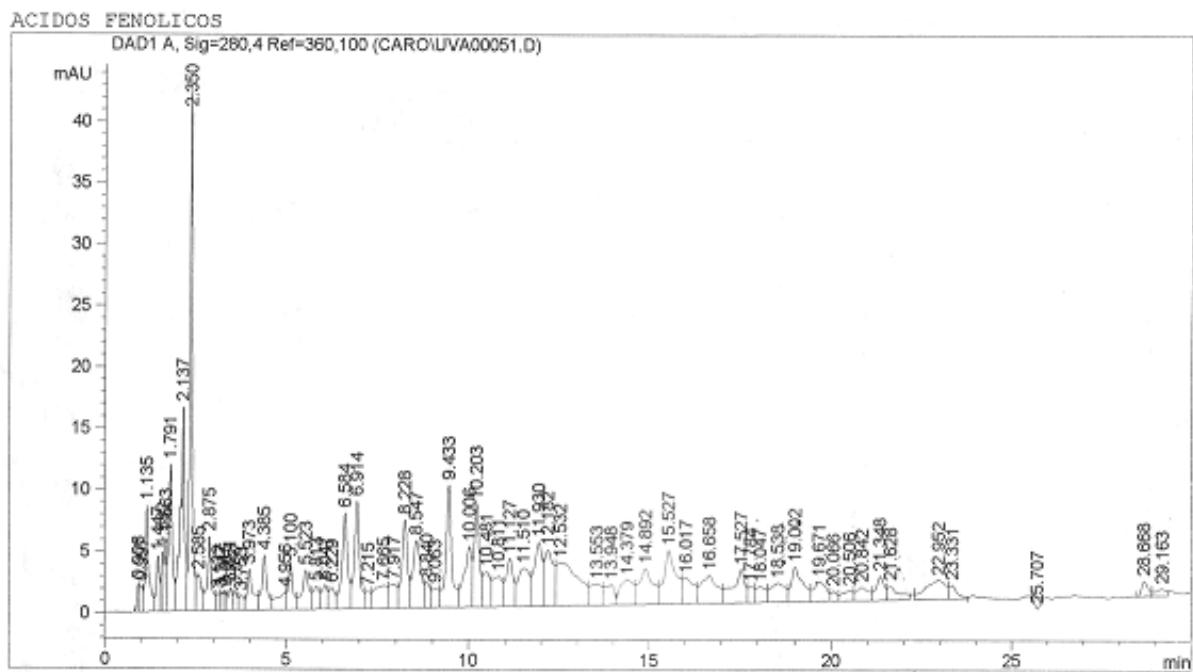
### **7.3 Caracterización parcial de los fenoles totales y taninos condensados del extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja mediante HPLC.**

Se realizó un perfil cromatográfico por HPLC para el extracto acuoso caliente del bagazo seco de uva roja (Figura 6). Los componentes más abundantes se muestran en la Tabla 7.

Las frutas rojas como la uva constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos, especialmente ácido benzoico y cinámico, antocianidinas, flavonoles, catequinas y taninos (García-Alonso *et al.*, 2002). Estudios realizados por Shanmuganayagam *et al.* (2002) mostraron que la semilla y la piel de la uva contiene principalmente cuatro tipos de compuestos fenólicos: ácido hidroxicinámico, flavonoles, antocianinas y oligomeros de catequina, epicatequina y ácido gálico. Clifford (2002) reportó que los antocianos son los constituyentes mayoritarios del zumo de uva, seguidos del ácido cinámico, flavonoles y estiblenos, al igual que en el vino, aunque estos se encuentran en mayor proporción en el zumo. Por su parte, el bagazo de uva contiene principalmente catequinas monoméricas y oligoméricas así como flavonoles glicosilados (USDA, 2003). Los resultados obtenidos muestran predominancia de ácidos fenólicos y taninos condensados en la muestra estudiada.

### **7.4 Caracterización fisicoquímica y sensorial del extracto acuoso en caliente del bagazo seco de uva roja.**

Los parámetros fisicoquímicos determinados se muestran en la Tabla 8 y los atributos sensoriales se observan en la Tabla 9. La acidez titulable y el pH mostraron que el extracto acuoso de bagazo de uva roja presenta características ácidas, similares a otras frutas como zarzamora, fresa, limón, toronja, mandarina, naranja, manzana, cereza, ciruela, durazno que se encuentra en pH 2.5-4.5. Al comparar con algunos tipos de té, como el té negro y el té verde con pH 4.5-5.5 (Hallberg y Rossander, 1984) se observa que el extracto acuoso de bagazo de uva roja fue más ácido, probablemente por la cantidad de ácidos fenólicos que contiene, como siríngico y benzóico.



**Figura 6. Perfil cromatográfico del extracto acuoso de bagazo de uva roja.** Se obtuvo el extracto acuoso con 15g de bagazo y 250mL de agua tridestilada a punto de ebullición por 7 minutos. Se llevó a cabo una cromatografía fase reversa utilizando una columna Zorbax C18.

**Tabla 7. Principales compuestos fenólicos en el extracto acuoso de bagazo de uva roja determinados mediante HPLC.**

TIEMPO DE RETENCIÓN	TIEMPO DE RETENCIÓN REFERENCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN CALIBRACIÓN	NOMBRE	CANTIDAD (ng/μL)	FACTOR DE PUREZA
6.914	7.5	6.84	CATEQUINA (flavan 3 oles)	19.28358	993
9.433	9.39	9.39	ACIDO SIRINGICO (ácido fenólico)	16.65003	999
2.35	2.45	2.34	ACIDO GALICO (ácido fenólico)	12.19863	968
10.203	10.85	10.15	EPICATEQUINA (flavan 3 oles)	7.55003	995
8.228	8.7	8.17	ACIDO VANILICO (ácido fenólico)	4.15373	989

**Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos del extracto acuoso de bagazo de uva roja.**

Acidez titulable (%)	pH	° Bx	Colorimetría		
			L	a	B
30.87 ± 2.33	3.56 ± 0.09	0.55 ± 0.05	52.98 ± 2.63	4.59 ± 2.3	5.8 ± 2.19

**Tabla 9. Análisis sensorial del extracto acuoso de bagazo de uva roja.**

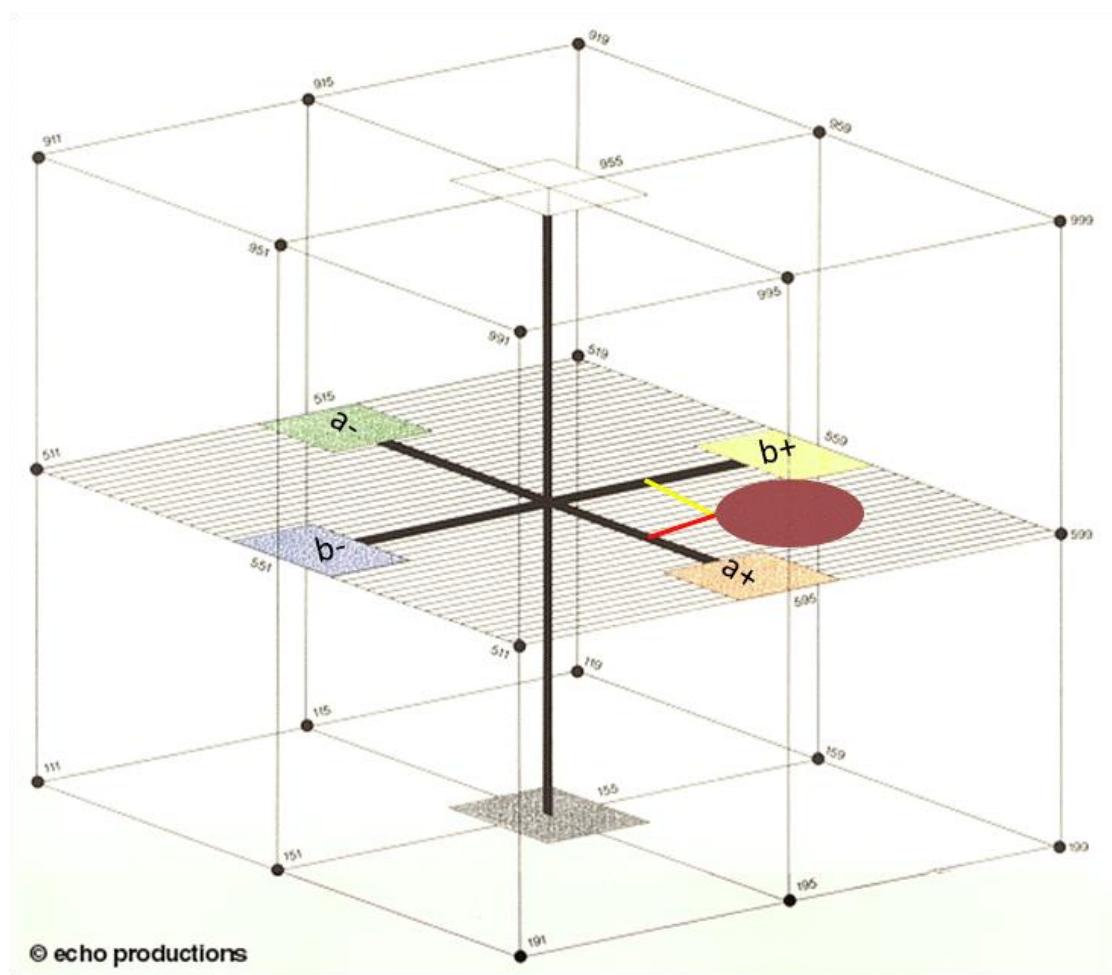
MUESTRA	VISTA	AROMA	SABOR	RESABIO
Natural	3.7±0.9	2.8 ±1.0 a	2.6 ± 1.0a	2±1.6
Extracto con limón	3.9±0.8	3.8 ±0.8 b	2.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.1±1.6
Extracto con azúcar	3.9±0.9	3.3 ±0.9 b	4.2 ± 0.8 b	1.7±1.9
Extracto con limón y azúcar	4±1.0	3.9 ±0.9 b	3.6 ±1.4b	2.1±1.9

Los flavonoides son compuestos responsables del color natural de los alimentos. Las antocianidinas presentan coloraciones rosadas, rojas, azules y violetas; mientras que las coloraciones amarillas son debido a la presencia de flavonoles, flavonas, flavononas e isoflavononas (Belitz y Grosh, 1988; Shahidi y Naczk, 1995). La colorimetría del extracto mostró una luminosidad (L) intermedia y la mezcla de dos colores primarios: rojo (a) y amarillo (b), dando como resultado una solución color pardo rojizo (Figura 7). La longitud de onda dominante se encontró entre 500 y 520 nm, lo que corresponde a la absorbancia de tonos verde-amarillo (CIE L\*A\*B\* System). En el análisis sensorial, el color del extracto resultó agradable a la vista de acuerdo a la escala utilizada.

Debido a que la mayoría de los azúcares de la uva se encuentran disueltos en el jugo, el contenido de éstos en el bagazo es muy bajo, tal como muestra el resultado obtenido para grados Brix, por lo que se considera que no presente un sabor dulce. El sabor del extracto natural resultó medianamente desagradable, principalmente ácido. Los compuestos fenólicos, son en parte, responsables del sabor, las flavonas son responsables del sabor amargo además de ciertos glicósidos flavonónicos, el ácido clorogénico y ácidos hidroxicinámicos (Shahidi y Naczk, 1995). El sabor astringente, por otra parte, se debe principalmente a la presencia de taninos condensados o proantocianidinas (Haslam y Lilley, 1988). Las muestras de extracto con limón resultaron medianamente desagradables pero mejoró la aceptabilidad al agregar azúcar. El resabio no fue detectado por todos los jueces sin embargo, los que lo detectaron lo calificaron como desagradable. El aroma fue medianamente agradable para la muestra de té natural mientras que las muestras con azúcar y/o limón resultaron agradables. La muestra que mostró mayor aceptabilidad fue la que contenía 50 g/L de azúcar, considerada como agradable.

## **7.5 Capacidad antioxidante del extracto acuoso del bagazo seco de uva roja.**

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes de la dieta y se encuentran en diferentes fuentes (Scalbert *et al.*, 2005). Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa y, además de parcialmente



**Figura 7. Análisis colorimétrico del extracto acuoso de bagazo de uva roja.** Se obtuvo el extracto acuoso con 15 g de bagazo y 250 mL de agua tridestilada a punto de ebullición por 7 min y se determinaron los parámetros a, b y L. El círculo muestra el color resultante de la combinación de rojo (a) y amarillo (b) con una luminosidad de 53. (CIE L\* A\* B\* System).

responsables de las propiedades de color, astringencia y sabor de los vegetales, su estructura química les permite secuestrar radicales libres debido a la facilidad de donar el átomo de hidrógeno de su grupo hidroxilo aromático y la estabilidad resultante que soporta un electrón desapareado (Pannala *et al.*, 2001).

Los compuestos fenólicos presentan diferente capacidad antioxidante, los antocianos y flavonoles muestran valores menores que los ácidos fenólicos (Fogliano *et al.*, 1999, Arnous *et al.*, 2001; Fernández-Pachón *et al.*, 2004). La capacidad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene su estructura (Rice-Evans y Miller, 1996). Las catequinas así como otros polifenoles, son potentes secuestradores de radicales libres (hidroxil, peroxil, superóxido y DPPH), y son quelantes de hierro (Yilmaz, 2005). El ácido gálico es un ácido fenólico también presente en las semillas y piel de la uva y secuestra radicales (Young, 2001). Respecto a las proantocianidinas, su tamaño y composición se relaciona con su actividad antioxidante por lo que presentan diferencias como secuestrantes de RL y en sus propiedades fisicoquímicas (Torres *et al.*, 2002).

La Tabla 10 muestra la capacidad antioxidante del extracto acuoso de bagazo de uva roja. Al comparar los resultados obtenidos con datos reportados para concentrados de frutas y bayas como uva (344 µmol eq Trolox/g), grosella (313 µmol eq Trolox/g), cereza (321 µmol eq Trolox/g) (Böhm *et al.*, 2000) y zarzamora 35.7-48.55 µmol eq AA/g (Moyer *et al.*, 2002) se observa que el extracto acuoso de bagazo de uva roja presenta buena capacidad antioxidante. Se ha determinado que la capacidad antioxidante de vino tinto es en promedio de 10.8 mM eq Trolox (Fernández-Pachón *et al.*, 2006), 10 veces más que la encontrada para el extracto acuoso del bagazo estudiado. Los resultados sugieren que la capacidad antioxidante determinada para el bagazo proviene principalmente de compuestos fenólicos de la piel ya que, en este caso, no se recuperaron los compuestos fenólicos presentes en la semilla.

**Tabla 10. Capacidad antioxidante del extracto acuoso de bagazo de uva roja.**

<b>TEAC</b>	198.6 $\pm$ 9.46 $\mu$ moles eq Trolox/g de bagazo
<b>FRAP</b>	87.8 $\pm$ 0.96 $\mu$ moles eq AA/g de bagazo
<b>DPPH</b>	88.21 $\pm$ 0.41 $\mu$ moles eq AA/g de bagazo

## 7.6 Efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama ZR-75-1

Con la finalidad de conocer la actividad citotóxica del bagazo seco de uva roja, se preparó un concentrado de FT que fue liofilizado, al que se le determinó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante mediante TEAC (Tabla 11). El extracto acuoso de FT del bagazo de uva roja mostró efecto citotóxico en función de la concentración (Figura 8), con una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de 0.131 mg FT/mL.

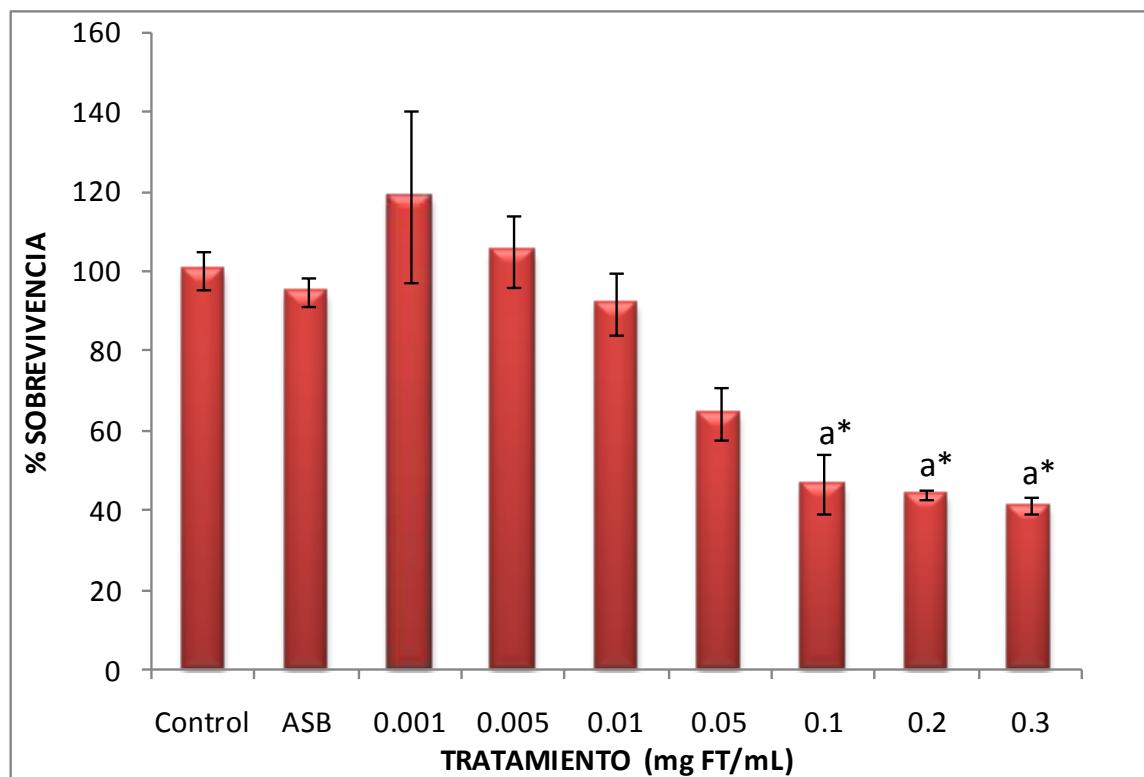
Se ha observado que compuestos fenólicos presentes en té verde y té negro como epigalocatequín-3-galato y epigalocatequina son responsables del efecto inhibitorio sobre líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano (Yang *et al.*, 2000). La concentración mínima para inhibir la transformación preneoplásica de células de mama se ha observado entre 1-2 µg/L de epigalocatequín-galato (Katdare *et al.*, 1998). Se ha descrito que los fenólicos de té provocan arresto del ciclo celular o la inducción de apoptosis en células cancerígenas, posiblemente a través de su acción prooxidante (Yang *et al.*, 2000). Extractos de compuestos fenólicos de vino tinto han mostrado efectos anticancerígenos al inhibir la fase de promoción en colon (Luceri *et al.*, 2002). Compuestos fenólicos de leguminosas, como frijol, han mostrado efectos citotóxicos sobre células de cáncer cérvico-uterino (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006) y sobre células de cáncer de mama (Reyes, 2008).

Es importante hacer notar que en dosis altas, los compuestos fenólicos, así como otros antioxidantes, pueden comportarse como prooxidantes y presentar efectos contrarios, como inhibición de apoptosis y promoción de células cancerígenas ya iniciadas (Salganik *et al.*, 2000; García-Gasca *et al.*, 2009). Por lo tanto es importante considerar su ingesta a través de la dieta o suplementos adecuados. El bagazo de uva puede ser un suplemento natural, cuyas características permitan el balance y la sinergia de sus antioxidantes en cantidad y calidad adecuadas para beneficio de la salud humana.

**Tabla 11. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del liofilizado del extracto acuoso de bagazo de uva roja utilizado en el estudio *in vitro*.**

<b>Fenoles Totales</b>	1.796 $\pm$ 0.002 mg eq AG
<b>Taninos Condensados</b>	0.08 $\pm$ 0.001 mg equivalentes de (+) catequina
<b>Capacidad Antioxidante TEAC</b>	265.14 $\pm$ 14.85 $\mu$ moles equivalentes Trolox

Resultados por gramo de liofilizado del extracto acuoso de bagazo de uva roja.



**Figura 8. Efecto citotóxico del liofilizado del extracto acuoso de bagazo de uva roja sobre células de cáncer de mama.** Células ZR-75-1 fueron sometidas a 24 h de tratamiento con concentraciones entre 0.3 a 0.001 mg de FT/mL del extracto acuoso de bagazo liofilizado de uva roja en medio de cultivo. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). El asterisco representa diferencia significativa al comparar cada tratamiento con el control de células al inicio del experimento (Co) (Dunnett,  $p \leq 0.05$ ). Se muestran los resultados de al menos dos experimentos independientes.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en el presente trabajo muestran que el contenido de compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso de uva roja es comparable al de tés comerciales. Se calculó que 250 mL de extracto aportan una cantidad importante de flavonoides de acuerdo a la ingesta promedio mínima observada a nivel mundial.

La cantidad de los fenoles totales no presentó cambios a diferentes temperaturas hasta 96 horas de incubación sin embargo, los taninos condensados mostraron inestabilidad en función de la temperatura. Dado lo anterior, se sugiere evaluar el tipo de compuestos fenólicos formados o la destrucción de los mismos en función de la temperatura.

El extracto acuoso de bagazo de uva roja presentó principalmente ácidos fenólicos y taninos condensados, se sugiere incluir otros estándares tales como el del resveratrol para determinar su concentración en el extracto acuoso del bagazo.

La acidez y pH del extracto acuoso del bagazo estuvo dentro del intervalo de jugos y tés, probablemente debido al tipo de compuestos fenólicos que contiene así como el color observado. Posee un bajo contenido de azúcares disueltos generando un sabor predominantemente ácido y con tendencia desagradable al gusto. Sin embargo, la aceptabilidad aumentó al adicionar azúcar y lo mismo sucedió con el aroma.

Respecto a la capacidad antioxidante del extracto acuoso del bagazo de uva roja se observaron valores similares a los encontrados en concentrados de otras frutas incluyendo la uva sin embargo, fue menor a la reportada para vino tinto. El bagazo estudiado no incluyó los compuestos fenólicos de la semilla por lo que esta propiedad podría aumentar si se recuperan dichos compuestos.

Los compuestos fenólicos encontrados en el extracto acuoso de bagazo de uva roja mostraron efecto citotóxico sobre células humanas de cáncer de mama en

función de la concentración. Lo anterior permite el planteamiento de nuevas líneas de investigación para su estudio sobre otras líneas celulares de cáncer, así como su efecto quimioprotector en células sanas.

Debido a las grandes cantidades residuales de bagazo producido anualmente por la industria vitivinícola en México, los resultados obtenidos sugieren que el bagazo de uva roja tiene potencial para la elaboración de productos nutracéuticos o suplementos ricos en antioxidantes. Será necesario continuar con la caracterización bioquímica y de actividad biológica que permita conocer el alcance de explotación de este subproducto agro-industrial.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ader P, Grenacher B, Langguth P, Scharrer E, Wolffram S. 1996. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp Physiol* 81:943S-5S

American Type Culture Collection. <http://www.atcc.org>. Última consulta febrero del 2009.

Aparicio-Fernández X, García-Gasca T, Yousef GG, Lila MA, González de Mejía E, Loarca-Pina G. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *J Agric Food Chem* 54:2116-2122.

Arnous A, Makris D, Kefalas P. 2002. Correlation of pigment and flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines. *J Agric Food Chem* 49:5736-5742

AALPUM. Asociación Agrícola Local de Productores de Uva de Mesa <http://candex.her.itesm.mx/empresas/Aalpum/season98.HTM> Última consulta octubre del 2008.

Belitz HD, Grosh W. 1988. Química de los Alimentos. Editorial Acritia. 1º edición. Zaragoza, España.

Bengoechca ML, Sancho AL, Bartolome B, Estrella I, Gómez-Cordovés, Hernández T. 1997. Phenolic composition of industrially manufactured purees and concentrates from peach and applefruit. *J Agric Food Chem* 45:4071-4075

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70-76

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8.

Böhm V, Schlesier R, Bitsch R. 2002. Kritische betrachtung der protektiven wirkung von frucht und gemüsekonzentraten. *GIT Labor-Fachz* 44:280-282

Bravo L. 1998 Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317-333

Brand-Williams W., Cuvelier, M., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensem Wiss Technol* 28:25-30

Brown T, Escalona-García H, LeMay E, Bursten J, Burdge J, Escalona García R. 2004. Química: La ciencia central. Editorial Pearson. 9<sup>a</sup> edición. EU. 564p

Byrne D, Devaraj S, Grundy S, Jialal I. 2002. Comparison of the antioxidant effects of concord grape juice and alfa tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 76:1367-74

Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. 1998. Serum antioxidant is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 128:2383-90

Chow CK. 1979. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nutr* 32:1066-1081

Christen Y. 2000. Oxidative Stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71:621S-9S

CIE L\*A\*B\* System. <http://www.colorsysteem.com/projekte/engl/54labe.htm> Última consulta abril del 2009

Clarkson P, Thompson H. 2000. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 72:637s-642s

Clifford M. 2000. Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1063-1072

Collins A. 2005 Assay for oxidative stress and antioxidant status: Applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr* 81:261S-7S

- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O, 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40: 173-289
- Deshpande SS, Cheryan M. 1985. Evaluation of Vainillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. *J Food Sci* 50:905-910
- Dell'Agli M, Busciale A, Bosisio E. 2004. Vascular Effects of wine polyphenols. *Cardio Res.* 63:593-602
- Fantozzi P, Betschart AA. 1981. Grape seed: A potential source of protein. *J Am Oil Chem Soc* 58:1027-1031.
- Faure D, Deschamps A. 1990. Physicochemical and microbiological aspects in composting of grape pulps. *Biol Waste* 34: 251258.
- Ferguson L. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mut Res* 475:89-111
- Fernández-Pachon MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. 2004. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta* 513: 113-118
- Fernández-Pachon M, Villaño D, Troncoso A, Garcia-Parrilla M. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *ALAN* 56:1-15
- Flanzy C. 2000. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Ediciones Mundi - Prensa. 2<sup>a</sup> edición. Madrid, España. 63,114-120, 237, 258-260,659, 699-707pp.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A, 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem* 47:1035-1040

Frankel EN, Meyer AS. 1998. Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. *Pharmaceutical Biology* 36:14s-20s

Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 80:1925-1941

Fujii E, Iwase H, Ishii-Karakasa I, Yajima Y, Hotta K. 1995. The presence of 2-keto-3-deoxygluconic acid and oxoaldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 210:852-857.

García-Alonso J, Periago MJ, Vidal Guevara ML, Cantos E. 2002. Evaluación de las propiedades antioxidantes en concentrados de uva frutas rojas. *AnVet (Murcia)* 18:103-114

García-Gasca T, Salazar Olivo LA, Mendiola-Olaya E, Blanco-Labra A. 2002. The effects of a protease inhibitor fraction from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) on in vitro cell proliferation and cell adhesion of transformed cells. *Toxicol In Vitro* 16:229-233

García-Gasca T, Martínez-Dávila I, Reyes P, Mejía C. 2009. Apoptosis: The role of free radicals in physiological and pathological states. En: Pro-oxidant reactions: Physiological and Pathological Implications. Díaz-Muñoz and Santamaría del Angel Eds. Research Signpost. Kerala, India. 85-104pp

Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. 1996. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 97:1422-8.

González-Paramas AM, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC. 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J Agric Food Chem* 52:234-8.

Goñi I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebolé A, Arija I, Estevez R. 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult Sci* 86:508-16.

Hallberg L, Rossander L. 1984. Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison of adding meat, soy, ascorbic acid, citric acid and ferrous sulfate on iron absorption from a simple Latin American-type of meal. *Am J Clin Nutr* 39:577-583.

Halliwell B. 1997. Antioxidant: Current Knowledges on Nutrition. WHO. 7° edición. Washington D.C. 634-644pp

Halliwell B. 1999. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants. The biomarker concept. *Nutr Rev* 57:104-113

Halsted CH. 2003. Dietary Supplements and functional foods: 2 sides of a coin. *Am J Clin Nutr* 77:1001S-1007S

Harborne BJ, Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid research since. 1992. *Phytochemistry* 55:481-504

Harman D. 1972. Free Radicals Theory of Aging: Dietary implications. *Am J Clin Nutr* 25:839-843

Harman D. 1995. Free Radical Theory of Aging: Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Age* 18:97-119

Haslam E, Lilley TH. 1988. Natural astringency in foodstuffs. Molecular interpretation. CRC. *Crit Rev Food Sci Nutr* 27:1-25

Hertog M, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn M, Buzina R, Fidanza F, Oiampaoli S, 1996. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155:381-386

International Food Information Council Foundation. 2006. <http://IFIC.org> Última consulta octubre del 2008.

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science* 275:1649-1652.

Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J Agr Food Chem* 42:64-69

Kaplan M, Aviram M. 1999. Oxidized low density lipoprotein: Atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxanase. *Clin Chem Lab Med* 37: 777-787.

Katdare M, Osborne MP, Telang NT. 1998. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol Rep* 5:311-315

Keen CL. 2001. Chocolate: Food as medicine/medicine as food *Am J Clin Nutr* 20:436S-439S

Klauninger JE, Kamendulis LM. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:239–67

Kosmidou I, Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. 2001. Reactive oxygen species stimulate VEGF production from C2C12 skeletal myotubes through a PI3-K/Akt pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L585-L592

Lachman J, Sulc M, Hejtmankova A, Pivec V, Orsák M. 2004. Content of polyphenolic antioxidants and trans-resveratrol in grapes of different varieties of grapevina (*Vitis vinifera* L.). *Hort Sci* 31(2):63-69

Lampe WJ. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. Am J Clinical Nutr 70:475S-490S

Lesschaeve I, Noble A. 2005. Polyphenols: Factors Influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. Am J Clin Nutr 81:330s-5s

Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolara P. 2002. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors. J Nutr 132:1376-1379.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79:727-747

Martínez C, Sánchez F. 2001. Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. Nutrición Clínica: Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales. Editorial McGraw-Hill. 1<sup>a</sup> edición. Madrid, España. 91-111pp

Martínez-Flores A, González-Gallegos J, Culebras JM, Tuñón MJ. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 6:271-278

Martínez-Valverde I, Periago M, Ros G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. ALAN 50:1-26

Marx JL. 1985. Oxygen free radicals linked to many diseases. Science 235:529-531

Mennen L, Walter R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. 2005. Risks and Safety of Polyphenol Consumption. Am J. Clin. Nutr 81:326S-9S

Meré P. 2005. El Vino Cuesta Arriba. [www.tierradevinos.com.mx/tdv/index](http://www.tierradevinos.com.mx/tdv/index). Última consulta diciembre del 2008.

Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81:277s-83s

Moyer R, Humer K, Finn C, Frei B, Wrolstad R. 2002. Anthocyanidins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Waccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *J Agric Food Chem* 50:519-525

Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumara K. 2006. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-κB and JNK. *Cell Death and Differentiation*. 13:730-737

Ness AR, Powles WJ. 1997. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: A review. *Int J Epidemiol* 26:1-13

Noguera P. 1972. *Viticultura Práctica*. Editorial Dilagro. 1<sup>a</sup> edición. España. 6-7pp.

Ozkan G, Sagdic O, Baydar N, Kurumahmutoglu Z. 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *J Sci Food Agric* 84:1807-1814

Pannala AS, Chan TS, O'Brien P, Rice-Evans C. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Com* 282:1161-1168

Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das D, Tosaki A. 2002. Grape seed proanthocyanidins improves cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *Am J Clin Nutr* 75:894-9

Pérez Trueba G. 2003. Los Flavonoides antioxidantes o prooxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed* 22:48-57

Price ML, VanScyoc S, Butler LG. 1978. A Critical Evaluation of the Vainillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. *J Agric Food Chem* 26:1214-1218

Prior LR. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am J. Clin Nutr 78: 570S-8S

Ramamurthy MS, Maiti B, Thomas PT, Nair M. 1992. High performance liquid chromatography determination of phenolic acids in potato tubers (*Solanum tuberosum*) during wound healing. J Agric Food Chem 40:569-572.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Rad Biol Med 26:1231-1237

Rice-Evans CA, Miller NJ. 1996. Antioxidant activities of flavonoides as bioactive components of food. Biochemical Soc Trans 24:790-795.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 2:152-159

Rifici V, Schneider S, Khachadurian A. 2002. Lipoprotein Oxidation Mediated by J774 Murine Macrophages is inhibited by individual red wine polyphenols but not by ethanol. J Nutr 132:2532-7

Reyes Fernández PC. 2008. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de harina de frijol cocido y evaluación de su efecto citotóxico en células de cáncer de mama. Tesis Licenciatura en Nutrición. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med Milit. 30:15-20

Rueda Zavala C. 2004. Evaluación y caracterización parcial de té preparados y comerciales de plantas de uso medicinal tradicional. Tesis Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. 60-83pp

Rui HL. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Nutr* 78:517s-20s

Salganik R, Albright C, Rodgers J, Kim J, Ziesel S, Sivashinskiy M, Vandyke T. 2000. Dietary and antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice. *Carcinogenesis* 21:909-914

Salganik, R. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am College of Nutr* 20:464s.472s

Sardesai VM.1995. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract* 10:19-25

Scalbert A, Williamson G. 2000 Dietary Intake and Bioavailability of Poliphenols. *J Nutr* 130:2073S-2085S

Scalbert A, Jojson I, Saltmarsh M. 2005. Polypenols:antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81: 215s-217s.

Scott W, Good C, Gugger E, Traber M. 2004. Vitamin E bioavailability from fortified breakfast cereal is greater than that from encapsulated supplements. *Am J Clin Nutr* 79:86-92

Schramm D, Wang J, Holt R, Ensunsa J, Gonsalves J, Lazarus S, Schmitz H, German J, Keen C. 2001. Chocolate procyanidins decrease leukotriene-prostacyclin ratio in humans and aortic endothelial cells. *Am. J Clin Nutr* 73:36-40

Sehirli O, Ozel Y, Dulundu E, Topaloglu U, Ercan F, Sener G. 2008. Grape seed extract treatment reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Phytother Res* 22:43-48.

Singleton SL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158.

Singleton VL 1983. White Wine Phenolics: Varietal and Processing Differences as shown by HPLC. Am J Enol Vitic 34:27-34

Shahidi F, Naczk M. 1995. Foods phenolics. Sources, chemistry, effects, application. Technnomic, Publishing, CO. INC eds. Lancaster, Pennsylvanis EU.

Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JD. 2002. Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. J Nutr 132:3592-3598

Slater TF. 1984. Free-Radical Mechanisms in Tissue Injury. Biochem J. 222:1-15

Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review J Am Diet Assoc 96:1027-1039

Torres MA, Dang JL, Jones JD. 2002. *Arabidopsis* gp91<sup>phox</sup> homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plants defense response. Proc Natl Acad Sci USA 99:517-522

Turturro A, Duffy P, Hart RW, Dixit R, Seng J, Leakey J, Feurs R, Buffington C, Cowman G, Lewis S, Pipkin J, Li Y. 1999. Adaptative Role of Caloric Intake on the Degenerative Disease Processes. Toxicol Sci. 52:3s-12s

Ueda T., Ueda T., Armstrong D. 1996. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. Ophtalmic Res 28:184-92

Urquiaga I, Urzúa U, Leighon F. 1999. Antioxidantes naturales y su impacto en salud. 8º Congreso Latinoamericano de grasas y aceites.  
[www.tdr.cesca.es/ESIS\\_URV/AVAILABLE/TDX-0324106-120611//ESIS.pdf](http://www.tdr.cesca.es/ESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0324106-120611//ESIS.pdf).  
Última consulta diciembre del 2008.

Usaquén-Castro X, Martínez-Rubio M, Aya-Baquero H, González-Martínez G. 2006. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues.

IUFoST World Congress 13th World Congress of Food Science & Technology.  
<http://iufost.edpsciences.org>. Última consulta diciembre 2008.

USDA. 2003. US Departament of Agriculture. USDA database for the flavonoid content of selected foods March 2003.

[www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/flav.html](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/flav.html). Última consulta octubre del 2008.

USDA. 2006. Foreign Agricultural Service. <http://www.fas.usda.gov>. Última consulta agosto 2008.

Van de Wiel A, Van Golde PHM, Hart HC. 2001. Blessings of the grape European J Internal Med 12:489

Waterhouse A L, Shirley JR, Donovan JL. 1996. Antioxidants in chocolate. Lancet 384:834

Wollgast J, Anklam E. 2000. Polyphenols in chocolate; is there a contribution to human health? Food Res Interna 33:449-459.

Yang C, Chung J, Yang G, Chhabra S, Lee M. 2000. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. J Nutr 130:472s-478s

Yemis O, Bakkalbasi E, Artik N. 2008. Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. Int J Food Sci Tech 43:154–159.

Yilmaz M. 2005. The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 20:333-340

Young IS. 2001. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 54:176-186

Young JF, Nielsen S, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen S, Knuthsen P, Crozier A, Sandstrom B, Dragsted L. 1999. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. Am J Clin Nutr 69:87-94

Zeisel S. 2004. Antioxidant suppress apoptosis. J Nutr 134:3179s-3180s.

## **ANEXO 1**

## Encuesta para la evaluación sensorial.

## Datos Generales

## 1. Edad

2. Sexo F M

3. ¿Fuma? No \_\_\_\_ Si (¿Cuántos cigarros al día?) \_\_\_\_

4. ¿Acostumbra tomar té?: Nunca \_\_\_\_ Ocasionalmente \_\_\_\_ Todos los días \_\_\_\_

5. ¿Por qué? Me gusta \_\_\_\_\_ Es bueno para la salud \_\_\_\_\_ Aliviar malestares \_\_\_\_\_

6. ¿Consumiría una nueva alternativa de té por su contenido de antioxidantes?

Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

A continuación se presentarán cuatro muestras de té, iniciando de izquierda a derecha, tome la primera muestra de té y siga las indicaciones de acuerdo a las preguntas. Circule el número de acuerdo al grado de identificación, siendo

- 1) Muy desagradable
  - 2) Desagradable
  - 3) Medianamente agradable
  - 4) Agradable
  - 5) Muy agradable

	1. A la vista el té es: 1      2      3      4      5
	2. El aroma es:      1      2      3      4      5
	3. ¿Con qué tipo de aroma se identifica?
M1	4. El sabor es:      1      2      3      4      5
	5. ¿Con qué tipo de sabor se identifica mejor?
	6. ¿Detecta resabio? SI (pase a la siguiente pregunta)      NO
	7. El resabio es:      1      2      3      4      5
<i>Enjuague su boca con agua natural antes de continuar con la siguiente muestra.</i>	
	1. A la vista el té es: 1      2      3      4      5
	2. El aroma es:      1      2      3      4      5
	3. ¿Con qué tipo de aroma se identifica?
M2	4. El sabor es:      1      2      3      4      5
	5. ¿Con qué tipo de sabor se identifica mejor?
	6. ¿Detecta resabio? SI (pase a la siguiente pregunta)      NO
	7. El resabio es:      1      2      3      4      5
<i>Enjuague su boca con agua natural antes de continuar con la siguiente muestra.</i>	
	1. A la vista el té es: 1      2      3      4      5
	2. El aroma es:      1      2      3      4      5
	3. ¿Con qué tipo de aroma se identifica?
M3	4. El sabor es:      1      2      3      4      5
	5. ¿Con qué tipo de sabor se identifica mejor?
	6. ¿Detecta resabio? SI (pase a la siguiente pregunta)      NO
	7. El resabio es:      1      2      3      4      5
<i>Enjuague su boca con agua natural antes de continuar con la siguiente muestra.</i>	
	1. A la vista el té es: 1      2      3      4      5
	2. El aroma es:      1      2      3      4      5
	3. ¿Con qué tipo de aroma se identifica?
M4	4. El sabor es:      1      2      3      4      5
	5. ¿Con qué tipo de sabor se identifica mejor?
	6. ¿Detecta resabio? SI (pase a la siguiente pregunta)      NO
	7. El resabio es:      1      2      3      4      5

**Gracias por participar**