



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

**Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*)
por microondas y métodos convencionales.**

Tesis:

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

I.A. Frida Rosalía Cornejo García

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Co. Directora

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez

SINODALES


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente


Dra. Elsa Gutiérrez Cortez
Secretario

Dra. Karen Esquivel Escalante
Vocal

Dra. Juana Isela Rojas Molina
Suplente

M. en C. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Noviembre 2012.
Querétaro, Qro.
México D.F.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIA NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO, CAMPUS JURQUILLA A CARGO DE
LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA ASÍ COMO EN EL LABORATORIO DE
NANOTECNOLOGÍA DE LA UAQ, CAMPUS AEROPUERTO BAJO LA SUPERVISIÓN
DE LA DRA. KAREN ESQUIVEL ESCALANTE Y EN EL LABORATORIO DE
ESTUDIOS SOBRE QUÍMICA VERDE L-122 DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN-UNAM BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA cDRA. MA.
OLIVIA NOGUEZ CÓRDOVA.**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a la **UAQ** la aceptación del proyecto FOFI-UAQ: *Bagazo de uva roja como fuente de compuestos fenólicos obtenidos mediante métodos de bajo impacto ambiental y estudio de su efecto biológico in vitro* y por la beca otorgada durante la tesis.

A la **Dra. Karen Esquivel Escalante** por todo su apoyo durante las extracciones en microondas, en el Laboratorio de Nanotecnología de la UAQ-Campus Aeropuerto. Y por sus comentarios enriquecedores en la revisión este trabajo, como miembro del jurado.

También agradezco al **Dr. René Miranda Ruvalcaba** por el todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo, abriendo las puertas de su Laboratorio de Estudios de Química Verde y por darme la oportunidad de contar con su asesoría y el apoyo de su equipo de trabajo: **Lab. Concepción Gómez Cervantes, cDra. Ma. Olivia Noguez Córdova, cDr. Joel Omar Martínez** y al **Dr. José Guillermo Penieres Carrillo**, en FESC-C1 de la UNAM.

Al **Dr. David Quintanar Guerrero** por la orientación brindada en este trabajo y su apoyo incondicional durante la concentración de los extractos obtenidos en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, de FESC-C1 de la UNAM.

Agradezco a la **M en C Konisgmar Escobar García** por el uso de equipo para la concentración de los extractos perteneciente al Laboratorio de Nutrición Animal en la FCN de la UAQ-Campus Juriquilla.

A la **Sec. Ma. Pueblito León Sánchez** por su enorme apoyo administrativo y orientación personalizada durante los estudios de Posgrado y durante el proceso de titulación. Por su enorme servicio, quien me brindo todo su apoyo para la culminación de este ciclo de vida.

A la **M en C. Mariela Camacho** por su amable atención cuando requerí el uso de Instrumentos y equipo del Laboratorio de Nutrición Humana durante los estudios de Maestría y a lo largo de la realización de este trabajo en la UAQ-Campus Juriquilla.

Agradezco a la **Téc. Acad. Flora Lázaro Torres** del laboratorio de Infrarrojo por su apoyo intelectual, práctico en el laboratorio y de su material instrumental, en la realización experimental de este trabajo de tesis en la FESC-C1 de la UNAM.

Al **Tec. Acad. Draucin Jiménez Celi**, responsable del Taller de Soplado de Vidrio de FESC C-1 de la UNAM, por adecuar y dar funcionalidad a varios instrumentos de vidrio (sistemas soxhlet, campanas de vidrio, contenedores del Liofilizador) que fueron requeridos en la etapa experimental.

Agradezco al **Biol. Josué López Martínez** su amable colaboración, flexibilidad, apoyo incondicional en el manejo de material, de equipo y muestras durante la realización de este trabajo como responsable del Laboratorio de Biología Celular en la FCN de la UAQ-Campus Juriquilla. Y por brindarme su valiosa amistad.

Al **cDr. Roberto Ferriz Martínez**, por sus contribuciones y disponibilidad, siempre que fueron requeridas, para la realización de este trabajo en el Laboratorio de Biología Celular, y por contribuir en mi formación durante mi estancia por la maestría en la FCN de la UAQ-Campus Juriquilla,

Agradezco en especial, con toda mi admiración y profundo respeto a la **Dra. Elsa Gutiérrez Cortéz**, por todas sus enseñanzas no sólo en mi formación Profesional, sino también durante los 10 años que llevo colaborando a lado de ella, en especial por contagiarme su pasión por la investigación y en particular por brindarme la libertad para elegir el camino a seguir.

Con toda mi admiración y profundo respeto agradezco a la **Dra. Teresa García Gasca** por su contribución en mi formación durante la Maestría, así mismo por invitarme a participar siempre activamente en el desarrollo de este trabajo, con la entrega, el profesionalismo, la calidad humana, la libertad y la confianza, que fueron el gran impulso para culminar una etapa más de mi vida.

DEDICATORIA

A todos les agradezco infinitamente todo lo vivido y les dedico este trabajo, que me ha dejado un grato sabor y toda una experiencia de vida.

Gracias a ti Señor por darme la oportunidad de existir en el aquí y ahora, hoy más que nunca valoro cada día de vida, agradezco esta oportunidad que me has dado y daré al mundo lo mejor de mí.

A mi Madre por amarme desde el primer día, pero principalmente por haberme inculcado principios, quien me educó con el ejemplo, quien me enseñó a ser independiente y a desenvolverme en la vida, por hacer de mí un ser humano de bien, gracias por tu confianza y apoyo para lograr estas lograr mis metas. Te amo Mamá.

A mi Padre porque después de Dios y junto con mi Madre me dieron la vida, el ser que quiero y comprendo, del cual tengo gratos recuerdos, que estuvo a mi lado en etapas muy importantes en mi vida.

A toda mi Familia por que soy parte de ustedes, nos debemos a nuestros antecesores, porque hemos estado juntos, tanto en los momentos de adversidad como en las celebraciones, Gracias por estar ahí.

Con sinceridad a todos mis Amigos: A los lejanos pero no ausentes, a los cercanos que con mucho gusto frecuento, a todos los admiro, quiero y respeto, porque hemos

compartido muchas vivencias, hemos fincado diferentes caminos y uno de estos es La Amistad. Estoy para ustedes de manera incondicional.

Un especial reconocimiento a: Ma. Guadalupe Villa R., Mijaíl Camacho S., Larissa Martínez M, Alejandra González C., Mariana Fuentes R., Héctor F Cabrera B., Edgar A Jiménez U., Carlos A Molina V., Eduardo Castro R., Cesar Campos., Génesis Fernández T., Fabián Méndez L. y Melisa Magaña, por compartir a lado de ustedes inolvidables experiencias y momentos, durante la realización de este trabajo, gracias a su colaboración el día de hoy se culmina esta etapa.

A los futuros profesionistas dedico este trabajo, porque sus contribuciones, ideas y su sinceridad son el chispazo que me impulsa a dar lo mejor de mí cada día y a seguir aprendiendo para no defraudarlos. Les ofrezco mi trascender.

A los investigadores: Tere García G., Elsa Gutiérrez C., Karen Esquivel E., J. Isela Rojas M., y Roberto A Ferriz M., por permitirme compartir a su lado estas experiencias y brindarme su mano amiga en esta aventura extraordinaria.

| ÍNDICE GENERAL | | Página |
|-----------------------|--|---------------|
| | ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| | ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| | RESUMEN | vi |
| | SUMMARY | vii |
| I | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II | ANTECEDENTES | 4 |
| | 2.1 Antioxidantes | 4 |
| | 2.1.1 Antioxidantes endógenos | 5 |
| | 2.2.1 Antioxidantes exógenos | 8 |
| | 2.2 Compuestos fenólicos | 9 |
| | 2.2.1 Fenólicos simples | 11 |
| | 2.2.2 Flavonoides | 12 |
| | 2.2.3 Taninos | 16 |
| | 2.3 Cambios estructurales y actividad biológica | 17 |
| | 2.4 Papel metabólico de los compuestos fenólicos | 19 |
| | 2.5 Bagazo de uva roja <i>Vitis vinífera</i> | 22 |
| | 2.6 Extractos de bagazo de uva | 25 |
| | 2.7 Extracción de compuestos fenólicos | 27 |
| | 2.7.1 Extracción acuosa de compuestos fenólicos | 28 |
| | 2.7.2 Extracción orgánica de compuestos fenólicos | 28 |
| | 2.7.3 Extracción Asistida por Microondas | 30 |
| | 2.8 Importancia de las extracciones en Química Verde | 31 |
| III | JUSTIFICACIÓN | 34 |
| IV | HIPÓTESIS | 35 |
| V | OBJETIVOS | 35 |
| | MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| VI | 6.1 Materiales | 36 |
| | 6.2 Métodos de extracción | 36 |

| | |
|--|----|
| 6.2.1 Método de extracción acuosa (maceración) | 36 |
| 6.2.2 Método de extracción orgánica mediante Soxhlet | 38 |
| 6.2.3 Método de extracción asistida por microondas (MAE) | 38 |
| 6.3 Cuantificación de CF | 39 |
| 6.3.1 Determinación de Fenoles Totales | 39 |
| 6.3.2 Determinación de Taninos Condensados | 41 |
| 6.3.3 Determinación de Antocianinas Totales | 42 |
| VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 44 |
| 7.1 Fenoles totales | 44 |
| 7.2 Taninos Condensados | 51 |
| 7.3 Antocianinas totales | 58 |
| VIII CONCLUSIONES | 66 |
| XI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |
| ANEXO 1. Tablas de ANOVA | 82 |

| ÍNDICE DE CUADROS | | Página |
|--------------------------|--|---------------|
| Cuadro 1 | Clases de compuestos fenólicos en plantas. | 11 |
| Cuadro 2 | Antocianinas comunes | 15 |
| Cuadro 3 | Los 12 Principios de la Química Verde | 33 |
| Cuadro 4 | Condiciones experimentales utilizadas para la extracción de los diferentes compuestos fenólicos de bagazo de uva | 37 |
| Cuadro 5 | Diluciones de ácido gálico para curva de calibración | 40 |
| Cuadro 6 | Diluciones de catequina para curva de calibración. | 41 |
| Cuadro 7 | Resumen de resultados de los CF para los diferentes métodos de extracción | 65 |

| ÍNDICE DE FIGURAS | | Página |
|--------------------------|---|---------------|
| Figura 1 | Peroxidación lipídica | 4 |
| Figura 2 | Defensa antioxidante enzimática | 5 |
| Figura 3 | Defensa antioxidante no enzimático | 7 |
| Figura 4 | Defensas antioxidantes dietarios | 8 |
| Figura 5 | Estructura de compuestos fenólicos simples | 12 |
| Figura 6 | Estructura genérica de un flavonoide | 13 |
| Figura 7 | Estructura representativas de flavonoides | 14 |
| Figura 8 | Estructura básica de una antocianina. | 15 |
| Figura 9 | Estructura química de un tanino | 16 |
| Figura 10 | Grupos de sustitución con respecto al carbonilo | 17 |
| Figura 11 | Grupos de sustitución con respecto al anillo B | 18 |
| Figura 12 | Bagazo de uva roja <i>Vitis vinífera</i> | 22 |
| Figura 13 | Estructura de (a) Epicatequina y (b) Epicatequina-3-galato | 24 |
| Figura 14 | Estructura otras catequinas | 26 |
| Figura 15 | Diagrama de la extracción asistida por microondas (MAE) | 39 |
| Figura 16 | Extracción acuosa de Fenoles Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinífera</i> por método convencional y por MAE. | 45 |
| Figura 17 | Extracción orgánica de Fenoles Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinífera</i> por método convencional y por MAE. | 47 |
| Figura 18 | Concentración de Fenoles Totales en extractos de bagazo de uva roja <i>Vitis vinífera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 49 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 19 | Rendimiento de la extracción de Fenoles Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 50 |
| Figura 20 | Extracción acuosa de Taninos Condensados de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> por método convencional y por MAE. | 52 |
| Figura 21 | Extracción orgánica de Taninos Condensados de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> por método convencional y por MAE. | 54 |
| Figura 22 | Concentración de Taninos Condensados de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 56 |
| Figura 23 | Rendimiento de la extracción de Taninos Condensados de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 57 |
| Figura 24 | Extracción acuosa de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> por método convencional y por MAE. | 59 |
| Figura 25 | Extracción orgánica de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> por método convencional y por MAE. | 61 |
| Figura 26 | Concentración de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 62 |
| Figura 27 | Rendimiento de la extracción de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja <i>Vitis vinifera</i> mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. | 63 |

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos (CF) del bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) recuperados bajo diferentes métodos de extracción: acuoso, orgánica y microondas (MAE). Se utilizó bagazo de uva roja variedad merlot, el cual se secó, se limpió se molió y se tamizó. Se establecieron las condiciones para realizar las extracciones acuosas y orgánicas por métodos convencionales y con extracción asistida por microondas (MAE). Se cuantificaron los fenoles totales (FT), taninos condensados (TC) y antocianinas totales (AT). En todos los casos se determinó el efecto de la aplicación de un tratamiento físico de ultrasonido (sonicación) previo a las extracciones. Principalmente se estandarizaron las condiciones de extracción para el método acuoso. En el caso de extracción orgánica se hizo una adaptación a la mezcla de disolventes y para la extracción asistida por microondas (MAE) se propusieron: la mezcla solventes de la extracción orgánica (etanol-acetato de etilo-agua), etanol 100%, agua 100% y mezclas etanol-agua (80:20 y 50:50) para evaluar y comparar los métodos con un enfoque de química verde. Para el caso de FT, los mejores resultados se lograron utilizando la extracción orgánica convencional y la MAE etanol-agua (80:20) por 6 min, en ambos casos con sonicación. Para TC, el mejor método fue la MAE, EtOH-H₂O en relación 80:20 por 6 min sin sonicar seguido del mismo método con sonicación previa y de la extracción con EtOH al 100%. Con respecto a AT, el mejor método fue la MAE EtOH-H₂O (50:50) por 6 min seguido de EtOH-H₂O (80:20) por 2 min, ambos con sonicación previa. Los resultados sugieren que MAE es un método con potencial para recuperar compuestos fenólicos de bagazo de uva.

Palabras clave: Bagazo de uva, Extracción Asistida por Microondas, MAE, compuestos fenólicos, *Vitis vinifera*.

SUMMARY

This study aims to evaluate the extraction performance of phenolic compounds (PC) from red grape bagasse (*Vitis vinifera*) recovered under different methods: aqueous, organic and microwave (MAE). Red grape bagasse from merlot variety was used, which was dried, cleaned, milled and sieved. Conditions were established for aqueous and organic extractions by conventional and microwave assisted extraction (MAE). Total phenols (TP), condensed tannins (CT) and total anthocyanins (TA) were quantified. In all cases, the effect of ultrasound physical treatment (sonication) prior to extractions was determined. Mainly there were standardized the extraction conditions for the aqueous method. For organic extraction the solvent mixture was adapted and for the microwave-assisted extraction (MAE) there were are proposed: the mixture of organic extraction solvent (ethyl acetate-ethanol-water), ethanol 100% , wáter 100% and mixtures of ethanol-water (80:20 and 50: 50) to evaluate and compare the methods with a focus on green chemistry. In the case of FT, best results were achieved using conventional organic extraction and extraction by MAE EtOH-H₂O (80:20) for 6 min, in both cases with sonication. For TC, the best method was MAE EtOH-H₂O (80:20) for 6 min without sonication followed by the same method with sonication prior to extraction and extraction with ethanol 100%. Regarding AT, the best methods were MAE EtOH-H₂O (50:50) for 6 min followed by MAE EtOH-H₂O 80:20) for 2 min, both with previous sonication. The results suggest that MAE is a potential method for recovering grape bagasse phenolic compounds.

Key words: Grape bagasse, Microwave Assisted *Extraction* MAE, phenolic compounds, *Vitis vinifera*.

I. INTRODUCCIÓN

El interés por las fuentes renovables y abundantes en antioxidantes naturales ha crecido por su potencial biológico y datos toxicológicos en comparación con los antioxidantes sintéticos y, por otra parte, existe también la preferencia por fuentes naturales ricas en compuestos antioxidantes y de origen residual, en particular los provenientes de las actividades agroindustriales y forestales. Lo anterior obedece a que dichas fuentes son ricas en compuestos antioxidantes, como los compuestos fenólicos (CF) (Domínguez *et al.*, 2001). En las plantas los polifenoles contribuyen a la resistencia ante microorganismos e insectos. Además, ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a ambientes estresantes como radiación UV, alta temperatura, sequía o falta de humedad, aire con sustancias tóxicas, en pocas palabras cambios climatológicos extremos (Brovillard *et al.*, 1997).

Asimismo, se ha estudiado que los compuestos fenólicos exhiben propiedades fisiológicas tales como antialérgicas, antiarterogénicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, son cardioprotectores y con efecto vasodilatador (Benavente-García *et al.*, 1997; Samman *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 2005). La actividad antioxidante de los CF se debe a su habilidad para estabilizar a los radicales libres (RL) donando átomos de hidrógeno, electrones o cationes metálicos que funcionan como agentes quelantes (Afanasév *et al.*, 1989; Amarowicz *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, se les reconoce como moléculas capaces de disminuir las enfermedades crónicas (enfermedades del corazón, infartos, cáncer, enfermedades respiratorias, diabetes) y enfermedades degenerativas (osteoartritis, enfermedades neurodegenerativas) por la edad (Heim *et al.*, 2002; Oboh *et al.*, 2007).

Los antioxidantes provenientes de frutas y vegetales disminuyen el estrés oxidativo causado por los RL protegen al cuerpo humano de especies reactivas de

oxígeno (ERO), impidiendo el daño a nivel celular ocurrido por la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos e incluso del ADN (García-Gasca *et al.*, 2009). Adicionalmente también previenen la rancidez de los lípidos en los alimentos por lo que, actualmente, se estudian los efectos biológicos de los CF de diversas fuentes en la formulación de alimentos funcionales o por sus potenciales aplicaciones en alimentos como conservadores, antioxidantes, mejoradores, entre otros (Garrote *et al.*, 2004).

La uva es un fruto con capacidad antioxidante y con potenciales efectos en la salud. El 63% de los fenoles totales (FT) de las vides de variedades tintas se encuentra en las semillas, el 34% en las pieles (orujo) y el 3% en el jugo (Meyer y Hernández, 1970; Bourzeix *et al.*, 1986). Asimismo, los extractos obtenidos de las semillas o de la piel de uva (el *pomum*) como subproductos del vino, sidra y jugos industriales han sido considerados como ricas fuentes de antioxidantes naturales (Revilla y Ryan, 2000; Wang *et al.*, 2000; Jayaprakasha *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2002; Murthy *et al.*, 2002).

El bagazo de uva está constituido principalmente por semilla y piel. Se considera una buena fuente de compuestos fenólicos ya que en el extracto de la semilla se encuentran antioxidantes hidrofílicos (las procianidinas, y una mezcla de oligoméricos) que tienen un alto poder antioxidante (Katiyar, 2008). Los CF presentes en la piel de la uva se clasifican en flavonoides (flavonoles, antocianos, catequinas, epicatequinas y resveratrol) y no flavonoides (ácido benzoico, ácido cinámico y estilbenos) (Bogs *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Muñoz (2009) observó que la cantidad de FT de bagazo de uva *Vitis vinifera* no presentó cambios a diferentes temperaturas de incubación hasta un tiempo de 96 horas, siendo los taninos condensados (TC) los que mostraron inestabilidad en función de la temperatura. Este extracto presentó efecto citotóxico en función de la concentración sobre células humanas de cáncer de mama.

Tradicionalmente, los métodos de extracción aplicados a la semilla o residuos de la uva mantiene el uso de solventes orgánicos como el metanol, etanol, acetato de etilo y acetona. El metanol es el solvente más efectivo para este tipo de procesos (Ashraf-Khorassani y Taylor, 2004). En contraparte, un estudio reciente de extracción de FT a partir de las semillas de vid, señala que el agua es un buen solvente para estos compuestos en relación a los solventes orgánicos (Paladino y Zuritz, 2011).

En el proceso orgánico convencional, la obtención de CF requiere comúnmente del uso de solventes y tiempos largos de extracción. Sin embargo, a través del tiempo se ha buscado hacer más eficientes los procesos a partir de la consideración de las propiedades físicas y químicas de las distintas moléculas en estudio. Tal es el caso de la extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción por sonicación y la extracción asistida por microondas (MAE), entre otros. La extracción asistida por microondas (MAE), con respecto a los métodos convencionales, presenta ventajas como tiempos cortos, uso de poco solvente y alta velocidad y cinética de extracción (Zheng *et al.*, 2009). Hoy en día existe una preocupación creciente por desarrollar o mejorar procesos químicos en armonía con el ambiente y, al respecto, existe poca información para la extracción de CF del bagazo de uva. Por lo tanto, el presente trabajo propone el establecimiento de condiciones de extracción mediante el empleo de las microondas como fuente alterna de energía, evaluando así la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de uva roja *Vitis vinifera*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Antioxidantes

Los alimentos vegetales han sido encontrados ricos en CF, ácido ascórbico, carotenoides, fitosteroles, antocianinos y policosanoles, todos conocidos por su efecto significativo en la salud humana por combatir y prevenir los efectos negativos de los radicales libres (RL) (Ademiluyi *et al.*, 2009), un ejemplo de ello es la peroxidación lipídica (Figura 1).

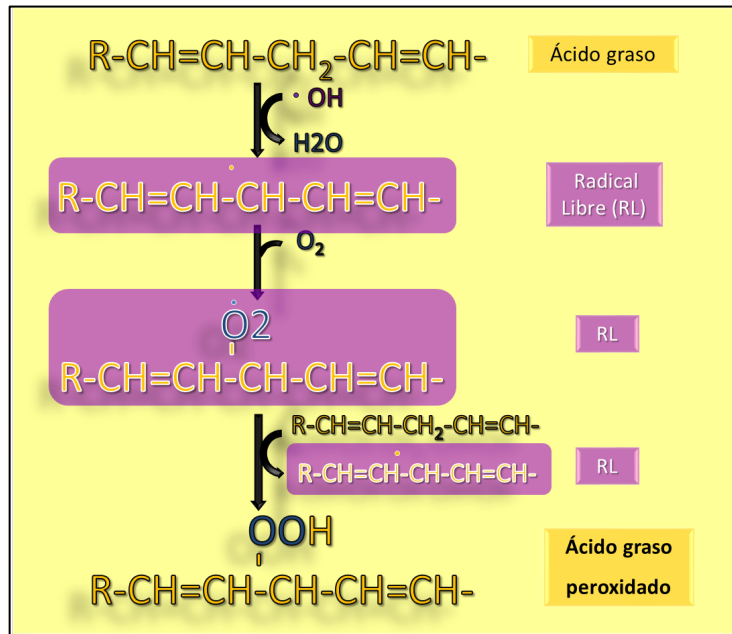


Figura 1. Peroxidación lipídica (Mathews *et al.*, 2002)

La inhibición de las reacciones iniciadas por especies reactivas de oxígeno (ERO) en los alimentos es muy importante en la preservación de la estabilidad oxidativa de éstos ya que la peroxidación de lípidos no sólo se lleva a cabo a nivel celular. En los alimentos también se presenta la peroxidación, como una escisión homolítica de peróxidos preformados y catalizadas por iones metálicos como hierro, cobre y por las proteínas hemo (Korycka-Dahl y Richardson, 1980).

Los RL junto con otros factores de riesgo relacionados dan origen en la mayoría de los casos a enfermedades crónicas como la obesidad, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular cerebral y periféricas, degeneración de paredes arteriales, hipertensión arterial, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica y de las enfermedades degenerativas por la edad como pueden ser: arteroesclerosis, parkinson, alzheimer, algunos tipos de cáncer, osteoporosis, intolerancias a los hidratos de carbono (Casanueva *et al.*, 2001; Ademiluyi *et al.*, 2009).

Los antioxidantes detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización de los RL (Mennen *et al.*, 2005). Estas defensas antioxidantes se dividen en dos grandes grupos: endógenos y exógenos (Manach *et al.*, 2004).

2.1.1 Antioxidantes endógenos: Están dotados por el propio sistema biológico, algunos ejercen un papel protector y son reemplazados por la síntesis de éstos por el propio organismo y son subdivididos en enzimáticos (Figura 2) y no enzimáticos (Mathews *et al.*, 2002).

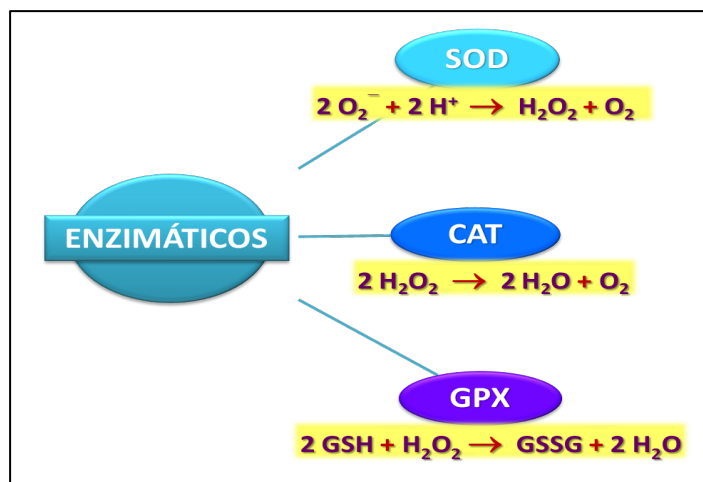


Figura 2. Defensa antioxidante enzimática (Adaptación de Manach *et al.*, 2004)

Los antioxidantes enzimáticos que están presentes en el organismo de los seres vivos protegen frente a las ERO producidas durante el metabolismo. Existen 3 sistemas principales que son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) y representan la primera barrera frente a la producción de RL (Mathews *et al.*, 2002).

La SOD pertenece a una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido (una reacción en la que las dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos suficientes), en este caso en particular una molécula de peróxido se oxida y la otra se reduce originando así el peróxido de hidrógeno y oxígeno. Existen distintas formas dependiendo del metal y del centro catalítico: I_2Zn , Cu-SOD citosólica, la Mn-SOD mitocondrial y la EC-SOD extracelular (Mathews *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004).

La CAT es una hemoproteína tetramérica con una tasa de renovación elevada, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Está presente en la mayoría de las células eucariotas localizándose a nivel de los peroxisomas (Mathews *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004).

La GPX también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero, a diferencia de la CAT que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, la GPX utiliza también el glutatión reducido (GSH) para obtener así dos moléculas de agua junto con la oxidación del glutatión (GSSG). Existen dos formas, selenio dependiente e independiente. En vertebrados, se encuentra en el citosol y en las mitocondrias. Además está la glutatión reductasa, que se encarga de mantener la proporción GSH/GSSG (Mathews *et al.*, 2002; Manach *et al.*, 2004).

Los antioxidantes no enzimáticos endógenos son compuestos que actúan tanto a nivel celular como extracelular (Figura 3).

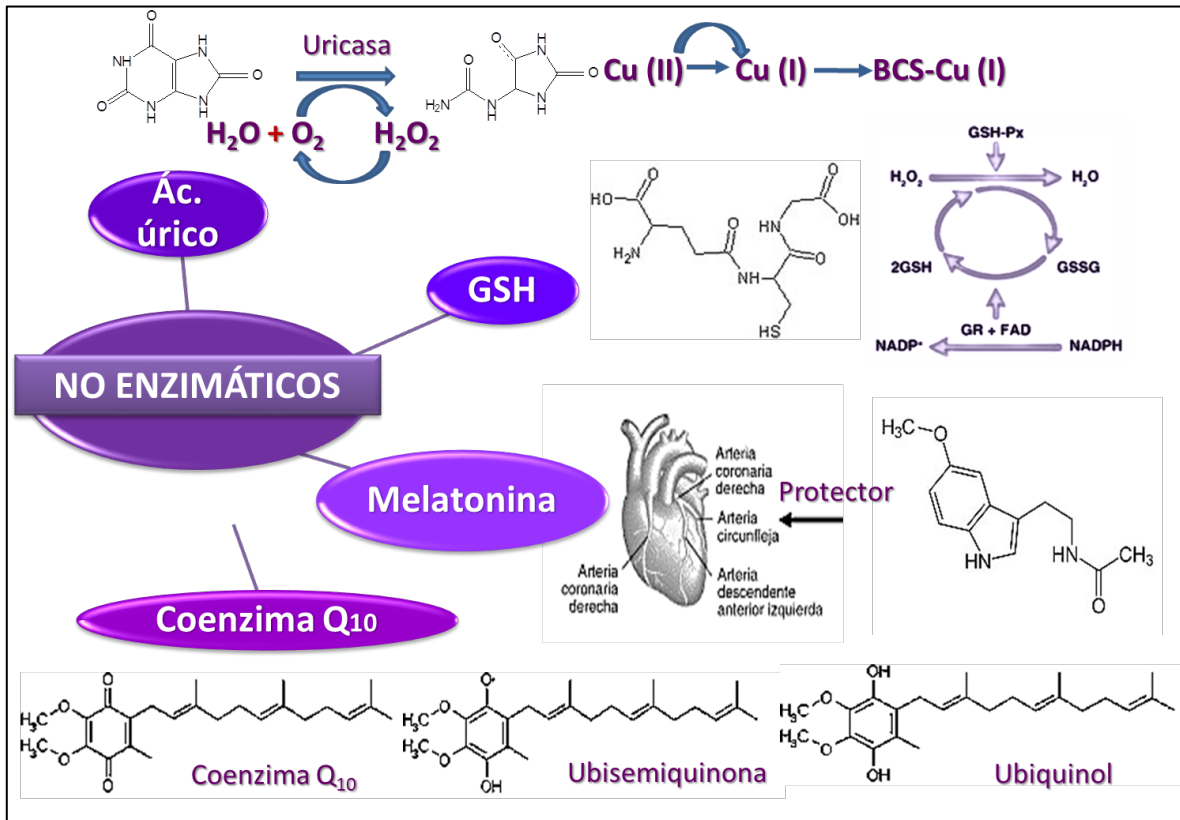


Figura 3. Defensa antioxidante no enzimática (Adaptación de Manach *et al.*, 2004; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2009)

Estos compuestos son los responsables de la actividad antioxidante de los fluidos biológicos como el plasma y dan protección a partículas y macromoléculas circulantes. Se modifican al reaccionar con RL y necesitan ser reemplazados, forman parte de la segunda barrera antioxidante (Manach *et al.*, 2004). Son moléculas reductoras de tamaños pequeños e hidrosolubles como el glutatión reducido, abundante en las células y su cometido es la protección antioxidante celular y mantiene el poder antioxidante de las enzimas dependientes del glutatión. El ácido úrico es producto del desecho del metabolismo de purinas y tiene la capacidad de unirse al peróxido e inactivarlo (Mathews *et al.*, 2002), presenta quelación ante RL así como de iones metálicos (hierro y cobre). La Melatonina es un recolector de los radicales libres, además de ser un cronobiótico

regulador fisiológico del sueño. La Coenzima Q conocida como ubiquinona o ubidecarenona, antioxidante liposoluble necesario para el funcionamiento de cada célula del organismo dado que amortigua el efecto de los RL ejerciendo así un efecto protector sobre las membranas celulares (Manach *et al.*, 2004).

2.1.2. Antioxidantes exógenos: Proviene de la dieta y para ser reemplazados se necesita ingerirlos nuevamente (Figura 4).

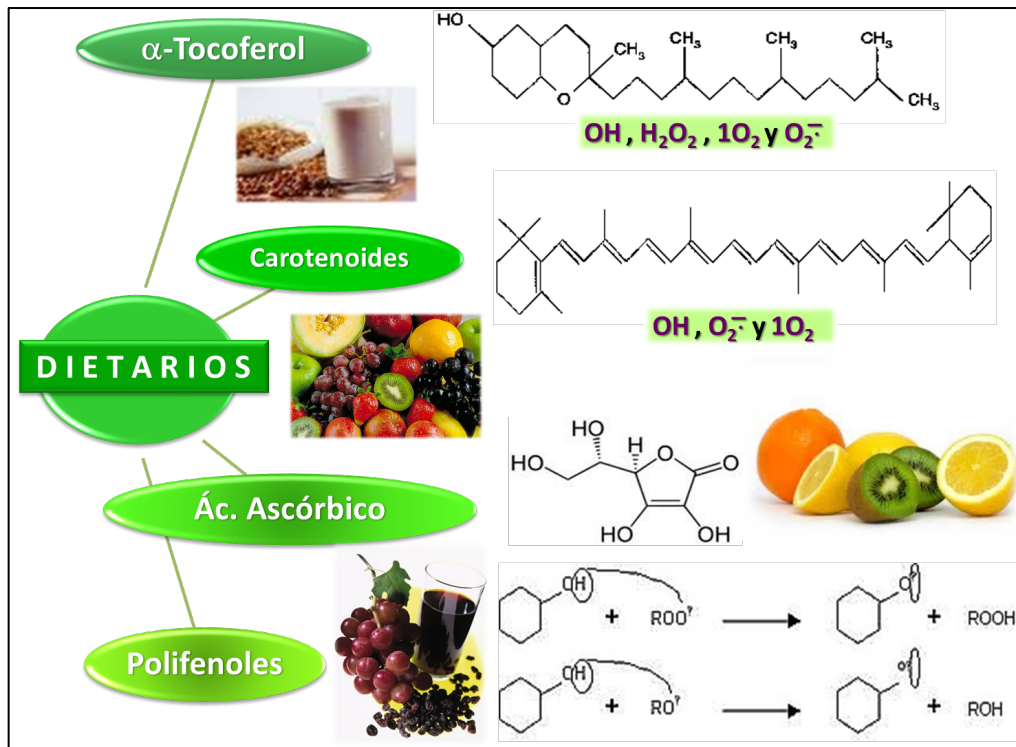


Figura 4. Defensas antioxidantes dietarias (Adaptación de Mathews *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1996)

Son llamados antioxidantes dietarios ya que retardan o previenen la oxidación (Halliwell, 1999; Manach *et al.*, 2004). Pueden actuar tanto como pro o antioxidantes ya que pueden auto-oxidarse en presencia de metales para producir ERO. Los más sobresalientes son el α -tocoferol, los carotenoides y los polifenoles que también actúan como segunda barrera frente a la peroxidación lipídica, a

diferencia de aquellos hidrofílicos como lo es ácido ascórbico que por si mismo no se considera tan efectivo (Mathews *et al.*, 2002).

Las vitaminas liposolubles como el α -tocoferol o vitamina E son capaces de impedir las reacciones en cadena producidas por los radicales hidroperóxido durante la peroxidación lipídica por que atrapa al radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y al anión superóxido (O_2^*) que neutraliza al oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El α -caroteno que ofrece una protección eficaz frente al oxígeno singulete de forma directa atrapa RL, de forma indirecta quela iones de metales de transición reduciendo así su capacidad oxidante y protegiéndolo de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y regenera también a las vitaminas E y C (Mathews *et al.*, 2002).

Por otra parte el ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante no menos importante debido a su hidrosolubilidad y su fácil oxidación a ácido deshidroascórbico. En los lípidos extracelulares las concentraciones de glutatión son menores a las del ascorbato que desempeña una protección antioxidante extracelular ante la peroxidación lipídica, más que como ácido ascórbico, que también atrapa radicales hidroxilo y anión superóxido, regenera la vitamina E y neutraliza al oxígeno singulete (Mathews *et al.*, 2002). Por su parte, la acción antioxidante de los polifenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen *et al.*, 2001; Robbins, 2003).

2.2 Compuestos fenólicos

Los polifenoles están asociados a características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), a las características nutritivas (asimilación de nutrientes y síntesis proteica) y a las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales, alelopatía y defensa ante los factores adversos del ambiente) (Kähkönen *et al.*, 2001; Robbins, 2003).

También son conocidos como Compuestos Fenólicos (CF) son subproductos del metabolismo de las plantas, y su largo número de carbonos es indicativo de que pueden sufrir varias reacciones de hidroxilación, metoxilación, glucosilación y acilación durante su biosíntesis. Metabólicamente dependen de la vía fosfato pentosa, shikimato y fenilpropanoide y su concentración varía a lo largo del ciclo vegetativo (Randhir *et al.*, 2004).

Los polifenoles presentan acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas, vasodilatadoras entre otras. Se ha demostrado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus simplex humano (VSH), inhiben a las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y a la enzima xantina monoamina oxidasa. Asimismo, la actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y de antienvjecimiento entre muchas otras (Velioğlu *et al.*, 1998; Proestos *et al.*, 2005).

En general, los polifenoles cuentan con más de 8000 especies químicas en la naturaleza, que se representan en más de 4000 compuestos diferentes (Ferro-Luzzi y Serafini, 1995; Dreosti, 1996; Bravo, 1998; Croft, 1998; King y Young, 1999). Todos ellos poseen al menos un anillo (Robbins, 2003) y se clasifican en 3 grupos principales (Ferro-Luzzi y Serafini, 1995): Grupo 1: Fenoles simples y ácidos fenólicos; Grupo 2: Flavonoides; Grupo 3: Derivados del ácido Hidroxicinámico.

Estructuralmente los CF comprenden un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (Cuadro 1), desde los fenólicos simples hasta los taninos condensados respectivamente (Bravo, 1998). Están presentes como conjugados con mono- y polisacáridos enlazados a uno o más grupos fenólicos y pueden

también ocurrir como derivados funcionales como: los ésteres de metilo (Harborne, 1989; Shahidi y Naczk, 1995; Harborne *et al.*, 1999).

Cuadro 1. Clases de compuestos fenólicos en plantas

| Clase | Estructura |
|--|-----------------------|
| Fenólicos simples, benzoquinonas | C_6 |
| Ácidos Hidroxibenzoico | $C_6 - C_1$ |
| Acetofenonas, ácidos fenilacéticos | $C_6 - C_2$ |
| Ácidos hidroxicinnámico, fenilpropanoides | $C_6 - C_3$ |
| Naptoquonas | $C_6 - C_4$ |
| Xantonas | $C_6 - C_1 - C_6$ |
| Stibanas, antraquinonas | $C_6 - C_2 - C_6$ |
| Flavonoides, isoflavonoides | $C_6 - C_3 - C_6$ |
| Neolignanos | $(C_6 - C_3)_2$ |
| Lignanos | $(C_6 - C_3)_n$ |
| Bioflavonoides | $(C_6 - C_3 - C_6)_2$ |
| Taninos condensados | $(C_6 - C_3 - C_6)_n$ |

(Harborne, 1989; Harborne *et al.*, 1999)

2.2.1 Fenólicos simples

Los ácidos hidroxibenzoicos (Figura 5a) incluyen al ácido gálico, al *p*-hidroxicinnámico, protocatequico, vainillico y ácido siríngico, que en común tienen la estructura C_6-C_1 . Los ácidos hidroxicinnámicos (Figura 5b), entre otros, son compuestos aromáticos con una cadena en el C_3 (C_6-C_3), como los ácidos cafeico, ferúlico, *p*-coumarico y sináptico siendo estos los más comunes (Bravo, 1998).

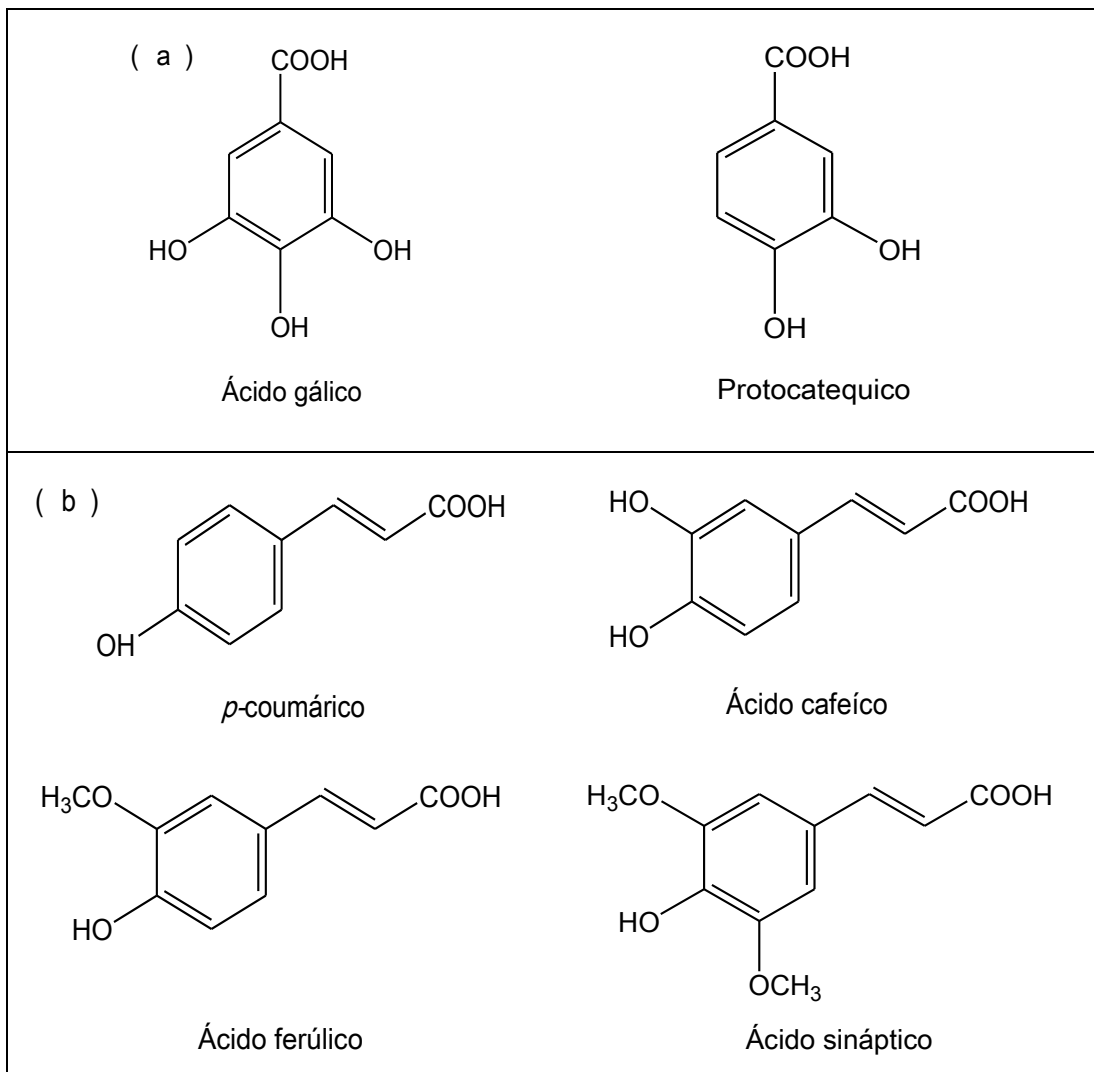


Figura 5. Estructura de compuestos fenólicos simples (Nagendran *et al.*, 2006)

2.2.2 Flavonoides

De la clasificación general de polifenoles, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, constituidos de 15 átomos de carbono, arreglados en la configuración (C₆-C₃-C₆) (Figura 6). Esencialmente la estructura general consiste en dos anillos aromáticos A y B, unidos por puente en C₃, usualmente en forma de un anillo heterocíclico C (Nagendran *et al.*, 2006).

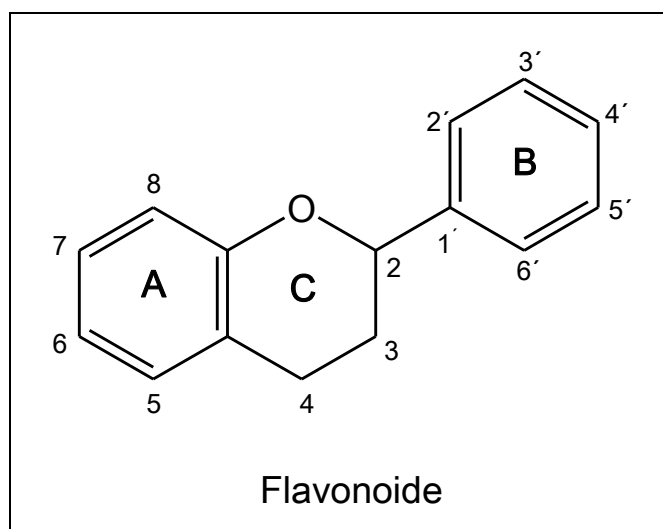


Figura 6. Estructura genérica de un flavonoide (Nagendran *et al.*, 2006)

El anillo A es derivado del metabolismo de acetato/malonato, mientras que el anillo B es derivado del fenilalanina por la vía del shikimato (Bohm, 1998; Merken y Beecher, 2000). Las sustituciones de los anillos A y B generan diferentes tipos flavonoides (Pietta, 2000). Las sustituciones de los grupos –OH, pueden incluir oxigenación, alquilación, glicosilación, acilación y sulfación (Bohm, 1998; Hollman y Katan, 1999).

Las variaciones en los modelos de sustitución para el anillo C resultan en las demás clases de flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonoles y antocianidinas (Hollman y Katan, 1999), algunas se encuentran representadas en la Figura 7, de las cuales, las flavonas y los flavonoles son los que más extensamente ocurren y son estructuralmente diversas (Harborne *et al.*, 1999).

Las antocianinas pertenecen a un gran y muy distribuido grupo de metabolitos secundarios dentro de los flavonoides y son los componentes que otorgan los colores rojo, morado y azul presente en las frutas, vegetales y granos, particularmente en frutos, flores y hojas, dichos pigmentos son solubles en agua (Lee *et al.*, 2005).

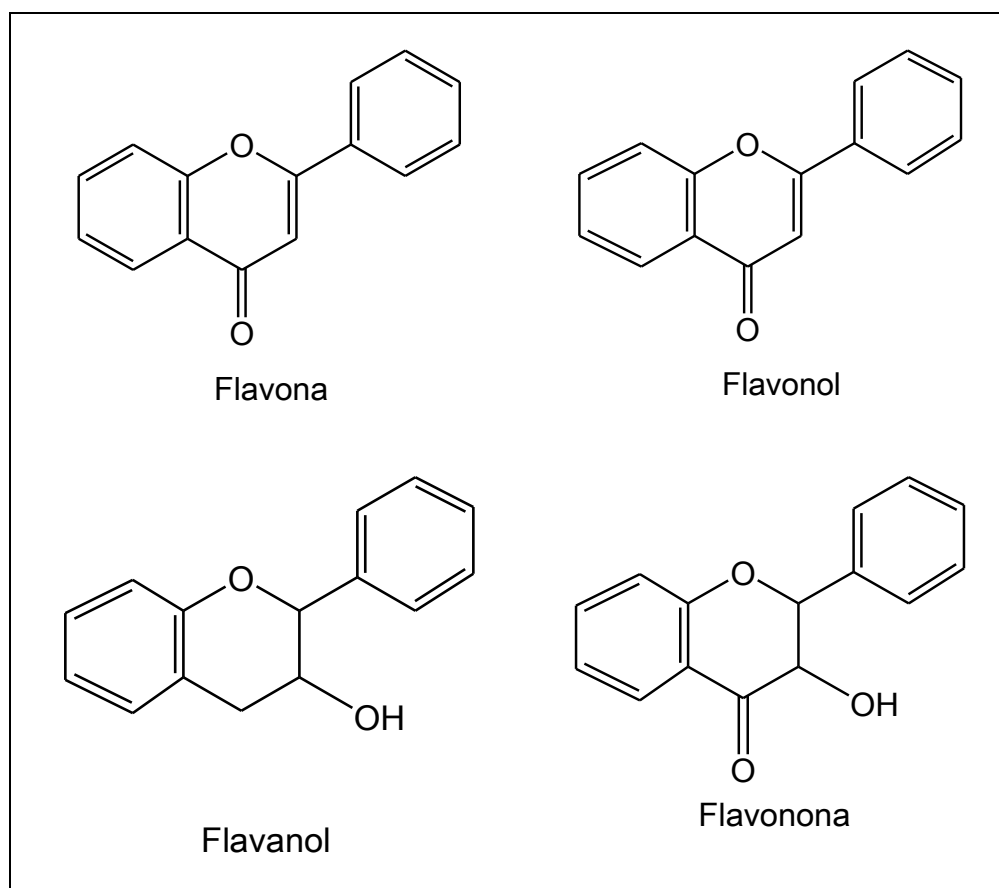


Figura 7. Estructuras representativas de flavonoides (Nagendran *et al.*, 2006)

El tipo de antocianinas naturales con 4 tipos de glucosilación son: 3-monosidos, 3-biósidos, 3,5-diglucosidos, en donde las predominantes son 3-O-glucósidos y las 3,5 di-O-glicósidos dentro de las cuales, 6 antocianinas son las más comunes (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina) (Figura 8 y Cuadro 2), después de la glucosilación, la unión, la naturaleza y el número de ácidos alifáticos y aromáticos que se unen al azúcar durante la acetilación dan mayor color y estabilidad al compuesto. Los ácidos *p*-coumarico y caféico son típicos de la acetilación de las antocianinas. Variaciones adicionales ocurren con la acilación de los grupos de azúcar con ácidos orgánicos (Steyn *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Del Carpio-Jiménez *et al.*, 2009).

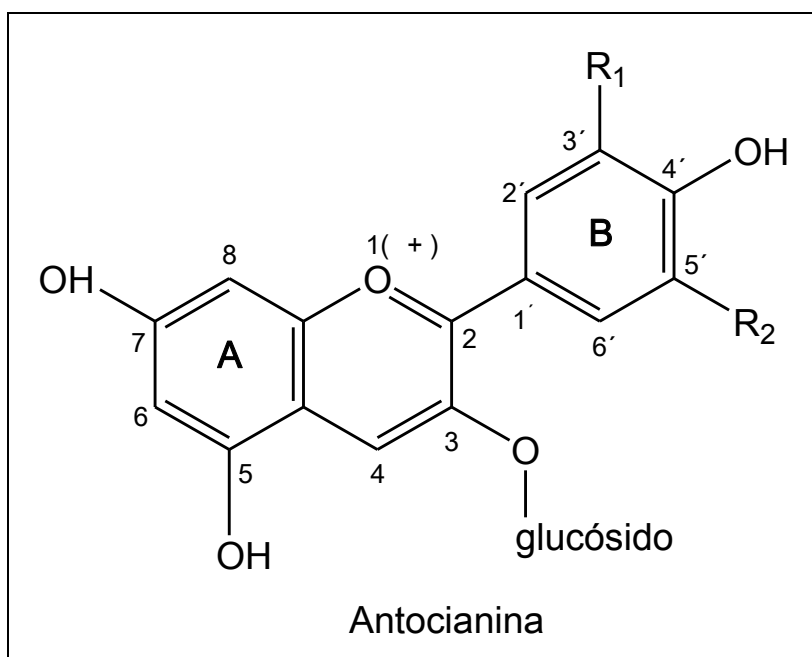


Figura 8. Estructura básica de una antocianina (Lee *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Antocianinas comunes

| Radical con su grupo sustituyente | Tipo de Antocianina |
|-----------------------------------|---------------------|
| R_1 y $R_2 = H$ | Pelargonidina (Pg) |
| $R_1 = OH$; $R_2 = H$ | Cianidina (Cy) |
| $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$ | Peonidina (Pn) |
| $R_1 = R_2 = OH$ | Delfinina (Df) |
| $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$ | Petunidina (Pt) |
| R_1 y $R_2 = OCH_3$ | Malvidina (Mv) |

(Lee *et al.*, 2005)

Durante la degradación, las polifenoloxidasas (también conocidas como tirosinasas, fenoloxidasas, monofenoloxidasas o cresolasas) catalizan la hidroxilación de monofenoles a ortodifenoles que posteriormente son oxidados a

ortoquinonas, las cuales se polimerizan dando lugar a pigmentos que presentan colores desagradables como marrón, rojo o negro (Gasull y Becerra, 2006; Espin *et al.*, 1995).

Además de su color, se ha reportado que las antocianinas tienen efectos en la salud, como potentes antioxidantes y pueden incrementar la agudeza visual. Asimismo también poseen actividad antineoplásica, vasotónica, vasoprotectora, anti-inflamatoria y hepatoprotectora, como es el caso de flavonoides como las catequinas, que son reconocidos por su actividad anticancerígena, antiartríticas, antiinflamatorias, antiulcéricas, antiagregantes, inmunoestimulantes o hepatoprotectoras (Jin-Ming y Lian-Sai, 2003).

2.2.3 Taninos

Los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se les denomina taninos (Robbins, 2003) (Figura 9).

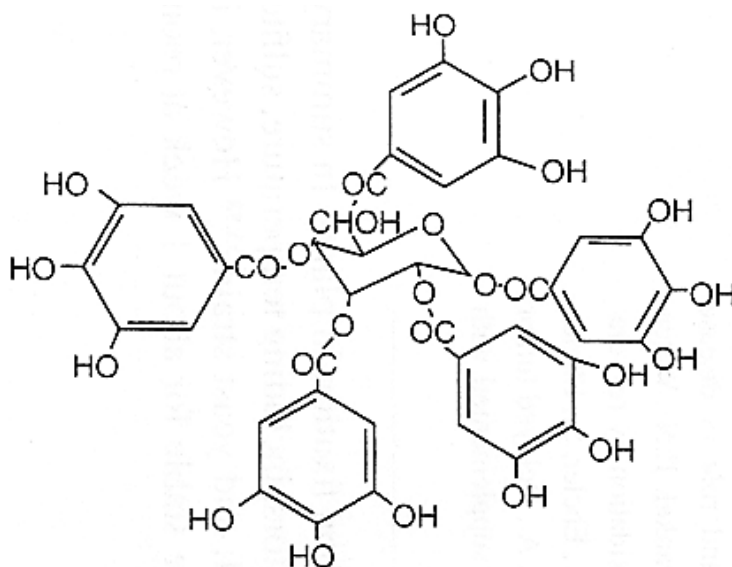


Figura 9. Estructura química de un tanino (Nagendran *et al.*, 2006).

Los taninos son relativamente de alto peso molecular (>500 uma) y se subdividen en hidrolizables y condensados. Antiguamente eran conocidos como ésteres de ácido gálico, después como proantocianinas que son polímeros de monómeros de polihidroxi-flavan-3-ol (Porter, 1989). Los no flavonoides polimerizan para formar taninos hidrolizables, mientras que ciertos flavonoides forman taninos condensados por la esterificación (ejemplo, catequinas o flavan-3-oles) (Cheynier, 2005). Presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Reed, 2010). Esto subraya la importancia de entender como sus estructuras químicas condicionan su actividad biológica (Gonçalves *et al.*, 2011).

2.3 Cambios estructurales de CF y actividad biológica

La estructura de los CF es la llave determinante de su estabilidad y de la actividad quelante de los metales. En el caso de los ácidos fenólicos por ejemplo, la actividad antioxidante depende del número y de las posiciones de los grupos hidroxilo en relación al grupo funcional carboxil, como se muestra en la Figura 10 (Rice-Evans *et al.*, 1996; Robards *et al.*, 1999).

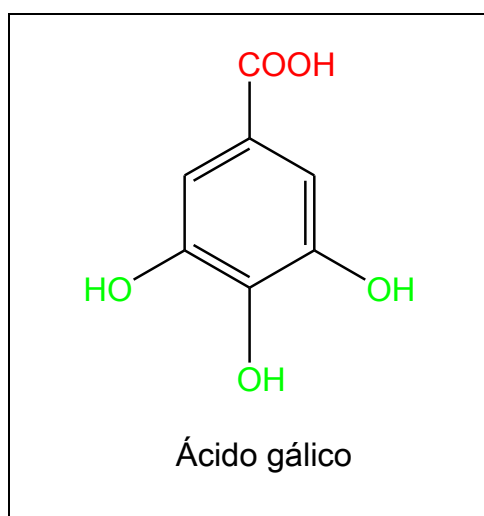


Figura 10. Grupos de sustitución con respecto al carboxilo (Nagendran *et al.*, 2006)

La actividad biológica de los ácidos fenólicos incrementa con el grado de hidroxilación por ejemplo, el ácido gálico trihidroxilado muestra una alta actividad. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilo a la posición 3 y 5 con respecto al grupo -COOH con grupos metoxilo, como lo es el ácido siríngico reduce su actividad (Rice-Evans *et al.*, 1996). El caso de los flavonoides es diferente debido a la complejidad relativa de la molécula (Figura 11).

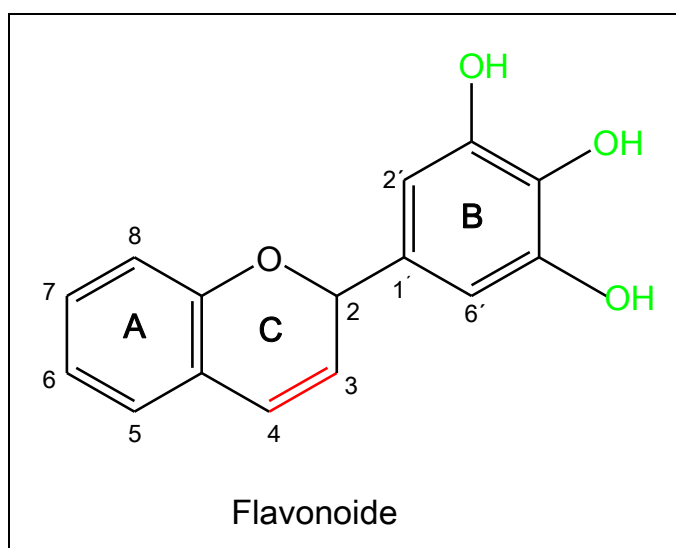


Figura 11. Grupos de sustitución con respecto al anillo B (Nagendran *et al.*, 2006).

Algunos rasgos de la estructura y la naturaleza de la sustitución en los anillos B y C, determina su actividad biológica e incluye lo siguiente:

- 1) El grado de hidroxilación y las posiciones de los grupos -OH en el anillo B, en particular una estructura *orto*-dihidroxil del anillo B (grupo catecol) resulta en actividades altas por que este confiere la más alta estabilidad del radical aroxil por la deslocalización (Van Acker *et al.*, 1996) o actos como el sitio de unión preferido (Pietta, 2000).
- 2) La presencia de grupos hidroxilo (-OH) en posiciones de los carbonos 3', 4', y 5' del anillo B (un grupo pirogalol) ha sido reportado por realzar la actividad biológica de los flavonoides comparada con aquellos que tienen un simple grupo hidroxilo. Aunque bajo las mismas condiciones, tales compuestos

pueden actuar como pro-oxidantes (Van Acker *et al.*, 1996). Seeram y Nair (2002) reportaron que la conversión de la 3',4'-dihidroxifenil a 3',4',5'-trihidroxifenil incrementa la actividad antioxidante para las antocianinas, por la disminución de la actividad por catequinas.

- 3) Un doble enlace entre $C_2=C_3$, conjugado con el grupo 4-oxo en el anillo C realza la capacidad secuestrante del radical en los flavonoides (Pietta, 2000).
- 4) Un doble enlace entre $C_2=C_3$, combinado con un 3-OH, en el anillo C, también realza la capacidad activa secuestrante de radical, visto en el caso de kaempferol (Van Acker *et al.*, 1996). La sustitución del 3-OH resulta en un incremento en el ángulo de la torsión y la pérdida de coplanaridad, y subsecuencialmente redujo la actividad antioxidante (Seeram y Nair, 2002). Los grupos metoxil alternan el potencial redox, que afecta la capacidad secuestrante radical de los flavonoides (Pietta, 2000; Seeram y Nair, 2002).
- 5) La sustitución de grupos hidroxilo en el anillo B por grupos metoxil alteran el potencial redox lo que afecta la capacidad secuestrante de radicales de los flavonoides (Pietta, 2000; Seeram y Nair, 2002).

2.4 Papel metabólico de los compuestos fenólicos

Para comprender las diversas actividades biológicas de estos compuestos en la salud es importante entender su metabolismo. La dieta humana es la fuente principal de CF. La biodisponibilidad y los niveles sanguíneos e histológicos de polifenoles son importantes para lograr las actividades biológicas. Hoy se reconoce que una fracción de los polifenoles es capturada por las células de la mucosa del sistema digestivo proximal y ellos o sus metabolitos son detectados en el plasma a concentraciones micromolares varias horas después de su administración por vía oral y así involucrarse directamente en las defensas antioxidantes *in vivo* (Manach *et al.*, 1998; Serafini *et al.*, 1998).

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 Na^+ . Las características de absorción están determinadas por la estructura del flavonoide. Sólo las agliconas 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, glucoronizadas o metabolitos sulfatados. De esta manera atraviesan la barrera intestinal y pasan al hígado donde se metabolizan (Ader *et al.*, 1996).

En general, la biodisponibilidad de los flavonoides es relativamente baja debido a la absorción limitada y por su rápida eliminación. Más aún, los flavonoides son metabolizados rápida y extensamente y por lo tanto, las actividades biológicas de sus metabolitos no son siempre las mismas que las de sus predecesores (Scalbert y Williamson, 2000; Manach *et al.*, 2004). 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 $1 \mu\text{M}$ y decrecen rápidamente (Scalbert y Williamson, 2000). Las proantocianidinas no son detectables en plasma, lo que sugiere que la absorción es muy baja (Clifton, 2004). Así mismo actúan inhibiendo la peroxidación lipídica y presentan actividades antimutágenicas (Pedreschi y Cisneros-Zevalos, 2006).

Algunos estudios indican que el hígado es el principal sitio para el metabolismo de los polifenoles aunque otros sitios como riñón o mucosa intestinal podrían estar involucrados. En el hígado estos compuestos pueden sufrir (1) metilación, (2) hidroxilación, (3) reducción del grupo carbonilo en el anillo pirano, (4) o una conjugación de reacciones (Bourne y Rice-Evans, 1997). Asimismo, los polifenoles son conocidos directamente o indirectamente por que inducen la fase II enzimática, como glutatión transferasas (GSTs), NADPH-quinonareductasas, epóxido hidrolasas y UDP-glucuronosiltransferasas (Galijatovic *et al.*, 2000;

Orzechowski *et al.*, 2002). Los polifenoles también influyen sobre las enzimas de Fase I como citocromo P450 (Ciolino *et al.*, 1999). Aunque los polifenoles no tienen una función conocida en la nutrición, muchos de ellos tienen propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias beneficiosas en la prevención de enfermedades y en la protección del genoma (Manach *et al.*, 2005) particularmente para las células epiteliales intestinales (Harborne, 1999).

En contraparte, ciertos polifenoles pueden poseer características carcinogénicas, genotóxicas o bien pueden interferir en la síntesis de hormonas tiroideas o afectar la actividad hormonal. Por ejemplo, las isoflavonas afectan la actividad estrogénica, ciertos polifenoles poseen propiedades antinutricias porque inhiben la absorción de hierro no heme, alteran la digestibilidad de las proteínas mientras que otros interactúan con agentes farmacológicos, alterando los efectos biológicos de los mismos (Mennen *et al.*, 2005). Una gran proporción de los polifenoles probablemente no son absorbidos a nivel de la luz intestinal pero, bien ellos o sus productos de degradación bacteriana, se concentran a nivel del íleon o del intestino grueso donde pueden ejercer interacciones beneficiosas con las células de la mucosa del intestino distal (Harborne, 1999).

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 al intestino vía la circulación enterohepática y alcanzar el colon en forma química diferente (Ader *et al.*, 1996). La ruta más común de degradación para los flavonoides es por conjugación con ácido glucurónico y sulfato. En suma, algunos metabolitos flavonoides pueden ser reciclados por la vía enterohepática de la ruta biliar (Bourne y Rice-Evans, 1997).

2.5 Bagazo de uva roja *Vitis vinífera*

Los efectos benéficos o adversos a la salud dependen de la fuente, del tipo de CF, de la dosis y en la población en la que se administren (Mennen *et al.*, 2005). Los CF son conocidos hoy en día también como metabolitos secundarios o fitoquímicos, debido a que se pueden encontrar unidos a otros componentes. La necesidad de buscar fuentes naturales de estos compuestos sitúa en la utilización eficiente de ciertos desechos de gran importancia no sólo para minimizar el impacto ambiental, sino también para aumentar la rentabilidad de los procesos en la industria (Ragauskas *et al.*, 2000).

La industria del vino y del jugo de uva genera cantidades importantes de bagazo de uva que generalmente no son intrínsecamente peligrosos. Sin embargo, contienen un alto contenido de materia orgánica y el hecho de que la producción se concentre en un período particular del año plantea problemas potenciales de contaminación como es la reproducción de microorganismos por su alto contenido de glúcidos. El bagazo de uva (Figura 12) representa una importante fuente de antioxidantes debido a su alto contenido de CF.



Figura 12. Bagazo de uva roja *Vitis vinífera*

Estos antioxidantes se concentran fundamentalmente en la piel u hollejo de la uva aunque también se han encontrado otros compuestos fenólicos con propiedades interesantes en las semillas de la uva (Flanzy, 2000; Sehirli *et al.*, 2008). Entre las aplicaciones del bagazo en la tecnología de los alimentos se encuentra la obtención de aceite comestible de las semillas con potente capacidad antioxidante (Goñi *et al.*, 2007; Yemis *et al.*, 2008). También se ha encontrado que los CF actúan como inhibidores de la oxidación de los lípidos en carnes congeladas. En Brasil, los fenoles extraídos del bagazo de la uva permiten aumentar la vida útil de la carne de pollo congelada o refrigerada por que retrasan la oxidación lipídica. Además, poseen propiedades antibacteriales y se han empezado a utilizar como conservadores naturales (Ozkan *et al.*, 2004; Goñi *et al.*, 2007).

La piel de la uva contiene altas concentraciones de CF, en particular proantocianidinas, con efectos antioxidantes y anticancerígenos (Clifton, 2004). Las proantocianidinas son bioflavonoides polifenólicos de tipo poliméricos y oligoméricos. Éstos actúan sobre peróxido de hidrógeno y neutralizan a los iones superóxido e hidroxilo y al radical peróxido. Su actividad antioxidante está asociada con un incremento en la supervivencia de las células y su capacidad antioxidante es superior a la vitamina E y vitamina C (Wang *et al.*, 2007; Katiyar, 2008; Kaur *et al.*, 2008).

La composición en masa de la semilla de uva es básicamente del 40% de fibra, 16% de aceites esenciales, 11% de proteína y 7% de otros complejos como compuestos fenólicos (algunos son taninos), azúcares, minerales y otras sustancias (Murga *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2008). El tallo de la uva también contiene una considerable cantidad de taninos condensados, integrados por unidades monoméricas flavan-3-ol. Los taninos condensados son químicamente reactivos, moléculas capaces de reaccionar con reactivos electrofílicos y nucleofílicos, proteínas o por medio de reacciones de autocondensación. Estos polifenoles condensados también podría convertirse en el valor añadido a ciertos productos (Pizzi, 2006).

Los CF de las semilla de uva incluyen los flavonoides (flavan-3-ol monoméricos, (+) catequina, (-) epicatequina y epicatequin-3-o-galato (Figura 13) dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros de hasta 15-16 unidades (prociandinas poliméricas) y ácidos fenólicos (gálico y elágico) y pequeñas cantidades de galocatequinas. Los polifenoles prociandínicos son los oligómeros de catequina y epicatequina. Las prociandinas diméricas son las más simples y tienen uniones de tipo C₄-C₈ entre los monómeros. Los dímeros prociandínicos más comunes son B₁, B₂, B₃ y B₄. Estos están seguidos de los isómeros con uniones C₄-C₆, tales como B₅, B₆, B₇ y B₈. Las prociandinas se localizan en su mayoría en la cubierta marrón de la semilla (Castillo et al, 2000; Yilmaz y Toledo, 2004). Todas sus prociandinas aciladas son ésteres del ácido gálico. En las semillas de uva también existen cantidades sustanciales de prociandinas altamente polimerizadas; más del 55% de las prociandinas en semillas de uva consisten en polímeros de más de 5 unidades (Saito *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2000; Jayaprakasha *et al.*, 2001; Yilmaz y Toledo, 2004).

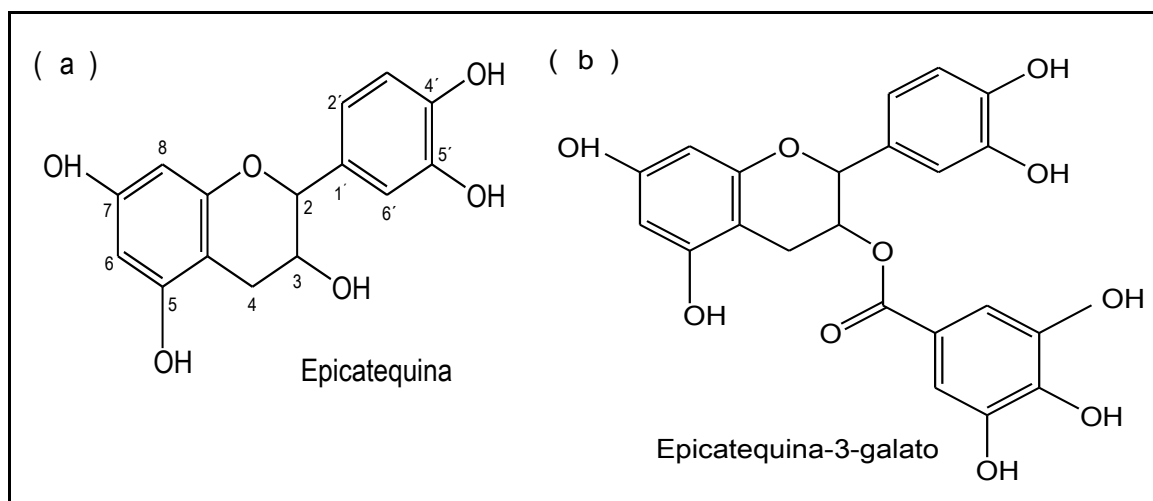


Figura 13. Estructura de (a) Epicatequina y (b) Epicatequina-3-galato (Adaptación de Bibbio y Mercadante, 2008)

Los flavan-3-oles monoméricos y poliméricos de las semillas de uva se encuentran localizados en las células del parénquima más externo de la semilla (capa blanda),

el endospermo contiene muy pocos flavan-3-oles o puede carecer de ellos (Thorngate y Singleton, 1994). Hoy en día se sabe que los taninos condensados del bagazo de uva son de tipo poliméricos y oligoméricos, al igual que los del té verde, solo que difieren en su estructura (Wang *et al.*, 2007; Katiyar, 2008; Kaur *et al.*, 2008).

2.6 Extractos de bagazo de uva

Los extractos obtenidos a partir de la semilla de uva y/o de piel contienen grandes cantidades de polifenoles monoméricos como (+)-catequinas, (-)-epicatequinas, (-)-epicatequinas-3-O-galato y procianidinas diméricas, triméricas y tetraméricas (Saito *et al.*, 1998). Los extractos de semilla de uva pueden ser explotables para la conservación de los productos alimenticios, así como para suplementos para la salud y nutracéuticos (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

El extracto de uva contiene antioxidantes hidrofílicos, las procianidinas, mezcla de oligoméricos y polifenoles (catequinas) (Figura 14). Los extractos de uva poseen un amplio espectro farmacológico, medicinal y terapéutico. En Estados Unidos se emplean como suplemento en problemas cardiovasculares (Wang *et al.*, 2007). Algunos trabajos muestran efectos favorables como disminución en la oxidación de lípidos de baja densidad (LDL), reducción de enfermedades cardiovasculares y cáncer, además de tener propiedades antimicrobianas (Sreemantula *et al.*, 2005), antiinflamatorias, antivirales, quimiopreventivas y antinociceptivas (Kaur *et al.*, 2008). A una concentración de 0.1% ha demostrado inhibir la aterosclerosis en un 30 a 50% en conejos por inhibición de la oxidación de LDL y la reducción del 25% de manoldialdehído como índice de peroxidación lipídica (Clifton, 2004).

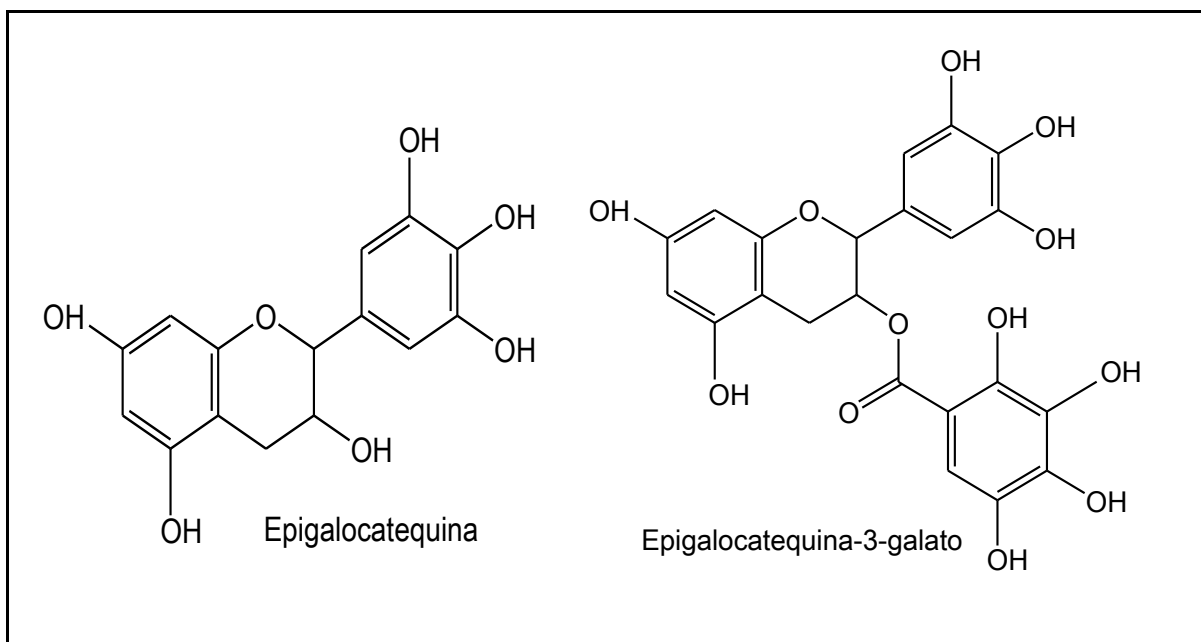


Figura 14. Estructuras de otras catequinas (Bibbio y Mercadante., 2008)

Algunas de las actividades antioxidantes de los vegetales está relacionada con los CF (Ademiluyi *et al.*, 2009). La concentración de CF del vino es en promedio de 2.57 g/L para el vino tinto y entre 0.16 y 0.30 g/L para el blanco (Díaz y Pérez, 2001). En términos del poder antioxidante, un vaso de vino tinto (150 mL) equivale a 12 vasos de vino blanco o a 2 tazas de té, 4 manzanas, 5 porciones de cebolla, 3 ½ vasos de cerveza y a 7 de jugo de naranjas (Papanga *et al.*, 1999).

La actividad de los extractos crudos ha reportado ser mayor que la de las fracciones purificadas debido a la presencia de compuestos activos en pequeñas cantidades y por los efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos que se encuentran presentes (Onyeneho y Hettiarachchy, 1992; Rodríguez de Sotillo *et al.*, 1994; Kähkönen *et al.*, 1999). Es por ello que también se ha estudiado la cuantificación de los diversos compuestos en los extractos, los polifenoles son un indicador de su actividad biológica por su relación estrecha de la cantidad y el tipo de CF.

2.7 Extracción de compuestos fenólicos

Los métodos de extracción comunes están basados en la extracción líquido-líquido (LLE) y posteriormente cuantificados e identificados en cromatografía de gases (GC) donde la determinación de CF se hace por diferentes métodos. Esto ofrece eficiencia y resultados precisos sin embargo, consume mucho tiempo y grandes cantidades de solventes orgánicos (Martínez *et al.*, 1996; Patsias y Papadopoulou-Mourkidou, 2000).

El análisis cuantitativo de algunos metabolitos de plantas debe ser revisado, en particular, el método de extracción o bien el método analítico debe ser optimizado y adaptado al problema bajo consideración (Strack y Wray, 1989). Algunos estudios reportan que las antocianinas pueden presentar muchas acilaciones por ácidos alifáticos para transformarlas a extractos suaves de pigmentos con ayuda de metanol o etanol con ácidos débiles como acético (Harborne, 1989), tartárico (Philip, 1974) o cítrico (Main *et al.*, 1978; Strack y Wray, 1986). También se utilizan pequeñas cantidades (0.5-3%) de ácidos fuertemente volátiles, trifluoroacético (TFA) para extracciones de antocianinas poliaciladas más complejas (Harborne, 1999). El proceso hidrolítico de material lignocelulósico propone principalmente la distribución selectiva de hemicelulosa para obtener azúcares u oligómeros de azúcar. Sin embargo, los CF vinculados a la pared celular también se solubilizan durante este tipo de tratamientos (Felizón *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 1994).

Existen hoy en día una variedad de métodos de extracción como los aquellos basados en la propiedades de ciertos fluidos, el muestreo headspace, métodos de solventes presurizados (extracción con fluidos supercríticos SFE, extracción subcrítica con agua SWE) y métodos selectivos aplicados a muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Así mismo, el papel de miniaturización y fases sorptivas (desorción subsecuente) o bien la participación en fase líquida (sacudida mecánica, sonicación y extracción asistida por microondas) (Rayne, 2004).

2.7.1 Extracción acuosa de compuestos fenólicos

Este tipo de extracción hace uso del agua porque ha sido considerada un solvente ecológico, no tóxico, no inflamable y polar. Sus propiedades lo hacen un líquido universal, amigable con el medio ambiente hasta ser considerada como un solvente pseudoorgánico en el lugar de solventes orgánicos convencionales (Dallinger y Kappe, 2007).

Wren *et al.* (2002) realizaron la extracción de CF a partir de semillas de uva *Vitis vinifera* secas, empleando como solvente el agua a 82° C, durante 40 min. En un trabajo realizado por nuestro grupo de trabajo se encontró que los extractos acuosos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) triturado contiene 1.86 mg equivalentes de ácido gálico y 1.036 mg equivalentes de (+) catequina por g de bagazo seco. La concentración de FT no se afectó bajo incubación a diferentes temperaturas sin embargo, la concentración de TC presentó una vida media de 19 h, 7.7 h y 4.3 h a 4° C, 25° C y 37° C, respetivamente con una energía de activación de 33 kJ/mol (Muñoz, 2009). Otro estudio con semillas de *V. vinifera*, variedad Cabernet Sauvignon probó la extracción acuosa con agua destilada a 90° C entre otras, obteniendo el mayor contenido de fenoles totales de 11.86 mg eq AG/g semilla seca, en comparación con extracciones con solventes orgánicos (Paladino y Zuritz, 2011).

2.7.2 Extracción orgánica de compuestos fenólicos

Entre los solventes utilizados en fase orgánica para la extracción de CF se encuentra la acetona (CH_3COCH_3) por su $T_{\text{eb}} = 56.5^\circ \text{C}$, y $T_{\text{fus}} = -94^\circ \text{C}$ por ser miscible con el agua. Es poco peligroso para la salud porque se excreta del organismo y una parte se oxida a CO_2 y acetato. Sin embargo, algunas de sus propiedades químicas no favorecen su uso (UNAM, 2011).

Otro disolvente es el acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) con $T_{\text{eb}} = 77^\circ\text{C}$ y $T_{\text{fus}} = -83^\circ\text{C}$, que se solubiliza en agua (1:10), es miscible en etanol, se descompone en CO y CO_2 , al estar en contacto con él provoca irritación, dolor de cabeza, pérdida de consciencia, convulsiones, congestión de hígado y riñones (UNAM, 2011).

El etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) se puede obtener de forma natural de la fermentación por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, cereales, tubérculos entre otros y luego se destila para purificarlo. Tiene una $T_{\text{eb}} = 78^\circ\text{C}$ y $T_{\text{fus}} = -114^\circ\text{C}$. Es el más empleado a nivel industrial para la obtención de solventes, síntesis de plásticos, lacas, perfumes, cosméticos, anticongelantes, combustible, antisépticos. El etanol es oxidado rápidamente en el cuerpo a acetaldehído, convertido a acetato y finalmente a CO_2 y H_2O , el que no se oxida y se excreta por la orina y sudor (UNAM, 2011).

Una recuperación selectiva de los CF a partir de hidrolizados se puede lograr mediante la extracción de tipo soxhlet con disolventes tales como acetato de etilo o éter dietílico. El acetato de etilo elimina fenólicos solubles en agua y productos de la degradación de hemicelulosa mientras que la lignina e hidratos de carbono complejos permanecen en la fase acuosa (Bouchard *et al.*, 1991).

Un estudio comparó diferentes mezclas de disolventes: acetona-agua-ácido acético (90:9.5:0.5) y acetato de etilo-etanol-agua (60:30:10) aplicado a semilla y piel de uva por separado para determinar su contenido de FT y sus actividades antibacterianas. En la semilla el contenido de FT en la relación 0:9.5:0.5 fue de 627.98 y para 60:30:10 fue de 667.87 mg eq AG/g. La piel reportó 29.55 y 45.44 mg eq AG/g respectivamente. Estos extractos a una concentración del 1, 2, 4 y 20% mostraron su efecto antibacterial, reportando inhibición de todas las bacterias empleadas excepto *B. amiloliquefaciens*, siendo el más efectivo en todos los casos el extracto de acetona-agua-ácido acético (90:9.5:0.5) al 20 % (Göktürk *et al.*, 2004).

Paladino y Zuritz (2011), compararon la eficiencia de diferentes disolventes en la extracción de compuestos fenólicos de *V. vinifera* trabajando metanol al 70% a 30° C, acetona al 75% a 30° C y etanol al 20% a 30° C, con un tiempo de tratamiento de 4 h, siendo inferiores los resultados de FT con respecto al acuoso pero mayor poder reductor en comparación con la extracción acuosa.

2.7.3 Extracción de CF Asistida por Microondas

La química de las microondas consiste en la habilidad para hacer más eficiente la reacción de la mezcla por la absorción de la energía por microondas. El aprovechamiento dieléctrico de las microondas puede ser por polarización dipolar o por mecanismos de conducción iónica. Esto produce una calefacción interna rápida (desde el centro): interacción directa de irradiación electromagnética de la muestra con las moléculas (solventes, reactivos, catalizadores) que están presentes en la mezcla de reacción (Larhed y Olofsson, 2006; Loupy, 2006; Leadbeater, 2010).

Las microondas son ondas electromagnéticas en una frecuencia de 0.3 a 300 GHz, entre menor sea frecuencia que emplee la fuente, esta radiación sólo afectará la rotación molecular y no el rompimiento de los enlaces químicos (Hoogenboom *et al.*, 2009). El calentamiento con microondas aprovecha la habilidad de algunos compuestos líquidos o sólidos para transformar la energía electromagnética en calor. La magnitud del calentamiento depende de las propiedades dieléctricas de las moléculas. La radiación de microondas es una forma de calentamiento selectivo (De la Hoz *et al.*, 2005).

Un estudio de extracción de CF de *Vitis vinifera* en semilla y piel por las técnicas de extracción sólido-líquido (SLE), extracción asistida por ultrasonido (UAE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción a alta presión y temperatura (HPTE) mostró el contenido más alto de FT, o-difenoles y flavonoides fue en semilla (108.3 de FT, 47.0 mg eq AG/g de materia seca y 47.2 mg eq Cat/g

de materia seca), en piel (34.2 de FT, 10.1 mg eq AG/g de materia seca y 21.6 mg eq Cat/g de materia seca) con HPTE, mientras que el más alto poder antiradical fue en semilla por MAE (78.6 μ L extracto/ μ g por DPPH) (Casazza *et al.*, 2010).

El método de extracción asistido por microondas (MAE) se ha ido desarrollado para la extracción de polifenoles de semillas de uva *Vitis vinífera*, obteniendo las mejores condiciones en etanol al 47.2%, en un tiempo de 4.6 min. Bajo esas condiciones los fenoles fueron determinados por el método de Folin, recuperando hasta el 92 % de FT lo que presume ser el mejor método de extracción y el más rápido (Li *et al.*, 2011).

Miranda *et al.*, (2011) señalan que este tipo de extracción evita el uso de disolventes orgánicos lo que ha sido una de las principales aportaciones ecoamigables en química, ya que la gran mayoría de los disolventes orgánicos empleados son tóxicos. Actualmente, en caso de que una reacción requiera de uso de disolvente, se debe dar preferencia al uso de agua como tal o a otros disolventes menos contaminantes (líquidos iónicos) o de condiciones de extracción menos contaminantes como los fluidos supercríticos.

Al respecto, no es menos importante el uso de fuentes alternas para la activación de reacciones (microondas, ultrasonido, infrarrojo) en lugar de la energía térmica convencional, ya que se ha podido demostrar que estas formas alternas de energía disminuyen los tiempos de reacción y llegan a ser más selectivos que por métodos térmicos, de esta forma reducen el consumo de energía eléctrica (Miranda *et al.*, 2011).

2.7 Importancia de las extracciones en Química Verde

Es evidente el incremento de contaminantes en el planeta así como los múltiples problemas que se derivan de ello. Esto ha obligado al ser humano a preocuparse por la conservación medioambiental. A partir de los años setenta se han

implementado una serie de leyes relacionadas con su protección, lo que ha despertado un gran interés por el tema. Lo anterior dio origen al concepto de Química Verde (Green Chemistry), que se integró formalmente a la agencia de Protección Ambiental (EPA) en 1991 y cuyo objetivo principal es la prevención de la contaminación (Miranda *et al.*, 2011).

La Química Verde es una filosofía de trabajo, cuyo objetivo primordial es prevenir la contaminación, no remediarla; reducir al mínimo, o de ser posible eliminar por completo la contaminación desde su inicio mediante el uso de procesos “limpios”, evitando al máximo el desperdicio o uso indiscriminado de materias primas no renovables así como el empleo de materiales peligrosos o contaminantes en la elaboración de productos químicos que atenten contra la salud o el ambiente (Morales *et al.*, 2011). Los planteamientos de la Química Verde se regulan por 12 principios (Cuadro 3), que fueron desarrollados por Anastas y Warner (1998), con el fin de contribuir a evaluar qué tan verde puede llegar a ser un proceso, producto o reacción.

Una serie de disciplinas se ven vinculadas de manera apropiada que a su vez conforman el contenido curricular resumido de la Química Verde, el cual debería ser tratado con la profundidad y el tiempo necesario de acuerdo al nivel al que se desee acceder. A partir de la sostenibilidad y de la sustentabilidad, es posible entender que varias de estas disciplinas o formas de trabajo experimental empleadas regularmente en la Química, relacionadas entre sí o de forma independiente, pueden dar lugar a la generación de productos y procesos químicos enmarcados con la etiqueta de verdes (Miranda *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Los 12 Principios de la Química Verde

| Principio | Descripción |
|---|--|
| 1. Prevención | Es preferible prevenir la generación de residuo que tratarlo o eliminarlo después de haberlo generado. |
| 2. Economía atómica | Los métodos de síntesis deberán incorporar al máximo los sustratos empujados en el proceso, en el producto final. |
| 3. Metodologías que generan productos no peligrosos | Los métodos de síntesis deberán utilizar y generar sustancias que presenten baja o nula toxicidad para el ser humano y el ambiente. |
| 4. Productos eficaces pero no tóxicos | Los productos químicos se diseñarán de manera que mantengan su eficacia y baja toxicidad. |
| 5. Uso de disolventes seguros o auxiliares | Evitar el empleo de sustancias auxiliares (disolventes, reactivos de separación, etc) o bien que sean inocuos. |
| 6. Eficiencia energética | Los requerimientos energéticos en un proceso químico se catalogan por su impacto económico y al medio ambiente. |
| 7. Materias primas renovables | La materia prima debe ser renovable en lugar de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable |
| 8. Reducir derivados | Se evitará, en lo posible, la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección-desprotección o la modificación temporal de procesos fisicoquímicos) por requerir reactivos adicionales y generan residuos. |
| 9. Catálisis | Catalizadores selectivos de origen natural. |
| 10. Sustancias biodegradables | Los productos al final de su vida útil no deberán persistir en el ambiente. |
| 11. Metodologías de análisis en tiempo real. | Metodologías analíticas desarrolladas en el momento del proceso, lo que permitirá un seguimiento y control en tiempo real previo a la formación de sustancias peligrosas. |
| 12. Potencial de accidentes químicos | Elegir las sustancias y la forma de uso en un proceso químico, para reducir el riesgo de accidentes químicos, incluyendo las emanaciones, explosiones e incendios. |

(Anastas y Warner, 1998)

III. JUSTIFICACIÓN

La uva es uno de los cultivos frutales más comunes en el mundo con más de 60 millones de toneladas producidas anualmente (FAO-STAT, 2010). Asimismo, la industria del vino constituye una parte importante de la economía de varias regiones del mundo. Esta industria genera grandes cantidades de bagazo de uva como subproducto, que hasta el momento no ha sido totalmente aprovechado.

El bagazo de uva es rico en semilla y piel que, a su vez, contienen cantidades importantes de CF. Estos compuestos presentan actividades biológicas como antioxidante, carcinogénica, antimutagénica, antialérgica, antienviejecimiento, entre otras (Moure *et al.*, 2001). Su recuperación significa una oportunidad para obtener compuestos antioxidantes a partir de desechos agroindustriales por lo que se hace necesaria la optimización de las condiciones de extracción. El empleo de extractos crudos es debida no solo a la relación estructura-estabilidad, sino también del sinergismo entre ellos y con otras moléculas, así como la afinidad de estos con solventes polares y no polares para su elución. Es importante considerar la estabilidad de los polifenoles a diversos factores como el pH, la temperatura, el oxígeno, la luz, enzimas, agentes nucleofílicos, glúcidos y copigmentos.

Por su parte, la Química Verde puede proporcionar una metodología fundamental puede representar una alternativa de menor riesgo para la salud humana y el ambiente ya que se ocupa de estudiar y modificar todos los aspectos de los procesos químicos que generen impactos negativos y lograr así un desarrollo sostenible. Por lo anterior, el presente estudio propone utilizar la extracción asistida por microondas como fuente de energía alterna basado en la Química Verde para la recuperación de los CF del bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) con la finalidad de aprovechar esta fuente natural de antioxidantes con el menor impacto ambiental.

IV. HIPÓTESIS

Dado que la extracción asistida por microondas aprovecha las propiedades fisicoquímicas de los disolventes para la extracción de compuestos de diferentes naturalezas, este método permitirá disminuir el tiempo de extracción y aumentar la recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva de forma más eficaz y sostenible en relación al método térmico convencional.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el perfil general de los compuestos fenólicos del bagazo de uva roja *Vitis vinifera* obtenidos por tres métodos extracción: extracción asistida por microondas, extracción acuosa y extracción orgánica para hacer un análisis comparativo de la recuperación de estos compuestos así como de su rendimiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las condiciones para la extracción acuosa por maceración de los compuestos fenólicos (CF).
2. Establecer nuevas condiciones para la extracción orgánica por soxhlet de CF.
3. Hacer una propuesta de mezclas de solventes y de condiciones en la extracción asistida por microondas (MAE).
4. Evaluar por separado los fenoles totales (FT), los taninos condensados (TC) y las antocianinas totales (AT) de los extractos obtenidos por los diferentes métodos.
5. Analizar la recuperación de CF en general y los rendimientos de los diferentes métodos de extracción empleados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

El bagazo de uva roja *Vitis vinifera* variedad Merlot fue donado por Freixenet-México. Se secó a 57° C en un horno de convección por 48 h. Se eliminó el tallo y el bagazo restante presentó una composición de 46.19% de semilla y el 53.81% de piel el cuál se molió en un molino de cuchillas Laboratory Will Modelo 4, con criba a la salida con una abertura de 0.5 mm, a velocidad de alimentación en la molienda constante. Se tomaron 3 muestras de 100 g para tamizar en un agitador de tamices Rotap, RX-29 mediante una serie de tamices Tyler durante 10 minutos. El análisis granulométrico mostró un diámetro promedio de la muestra $D_p=0.14224$ mm, el resto se almacenó en un lugar fresco, seco y libre de luz.

6.2 Métodos de extracción

Las condiciones generales para cada uno de los sistemas de extracción utilizados se resumen en el Cuadro 4.

6.2.1 Método de extracción acuosa (maceración)

En 12 tubos Falcon previamente pesados, cubiertos con aluminio y etiquetados, se agregaron 25 mL de agua HPLC a punto de ebullición en cada uno y 4 g de bagazo. Los primeros 6 tubos se sonicaron a 42 KHz en un equipo Branson 1510, a 40° C y finalmente todas las muestras se dejaron reposar durante 7 min. Se centrifugaron en un equipo Hermle Z 323 K, a 6000 rpm por 3 min a 21° C. El volumen de la fase acuosa obtenida se midió y filtró con papel filtro Whatman No. 40 y se congelaron a -40° C para ser liofilizados en un equipo Labconco a 75×10^{-3} Mbar y refrigerados hasta su uso.

Cuadro 4. Condiciones experimentales utilizadas para la extracción de los diferentes compuestos fenólicos de bagazo de uva.

| Método | Solvente | Relación muestra/solvente (g/mL) | Temperatura | Soniciación | Tiempo (min) |
|---------------------|---------------------------------------|---|---------------------|--------------------|---------------------|
| Convencional | Agua | 0.16 | Punto de ebullición | Si | 7 |
| Convencional | Agua | 0.16 | Punto de ebullición | No | 7 |
| Soxhlet | Etanol- Acetato de Etilo-Agua 60:35:5 | 0.16 | 60° C | Si | 480 |
| Soxhlet | Etanol- Acetato de Etilo-Agua 60:35:5 | 0.16 | 60° C | No | 480 |
| MAE | Agua | 0.158 | 58° C | Si | 2 ó 6 |
| MAE | Agua | 0.158 | 58° C | No | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol absoluto | 0.158 | 69° C | Si | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol absoluto | 0.158 | 69° C | No | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol-Agua 80:20 | 0.158 | 68.5° C | Si | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol-Agua 80:20 | 0.158 | 68.5° C | No | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol-Agua 50:50 | 0.158 | 53° C | Si | 2 ó 6 |
| MAE | Etanol-Agua 50:50 | 0.158 | 53° C | No | 2 ó 6 |
| MAE | Acetato de Etilo-Etanol-Agua 60:35:5 | 0.158 | 69° C | Si | 2 ó 6 |
| MAE | Acetato de Etilo-Etanol-Agua 60:35:5 | 0.158 | 69° C | No | 2 ó 6 |

6.2.2 Método de extracción orgánica mediante Soxhlet

Primero se seleccionó una mezcla de solventes amigable con el medio ambiente, que fue acetato de etilo, metanol y agua (EtOAc:MeOH:H₂O en 60:30:10), posteriormente se propuso cambiar el metanol por etanol, porque puede provenir de una fuente de origen natural, además de sus propiedades y su relación con el medio ambiente.

Se modificó la relación anterior a etanol, acetato de etilo y agua EtOH: EtOAc:H₂O, en relación de 65:30:5 con la finalidad de bajar la concentración de acetato de etilo para disminuir su peligrosidad y facilitar la solubilidad de compuestos fenólicos solubles en agua. Se instalaron 4 sistemas de soxhlet con una relación bagazo-solvente de 1:6, 2 fueron sonicados a 42 KHz a 40° C durante 2 min en un baño Branson 1510. Luego de colocaron en los 4 sistemas las muestras, a 60° C por 8 h. Transcurrido el tiempo de extracción se midió el volumen de extracto, se concentró en un rotavapor (Heidolph, Laborota 4000) a 40° C a 30 rpm, las muestras fueron liofilizadas en un equipo Labconco a 75×10^{-3} Mbar y finalmente se cubrieron con papel aluminio y fueron refrigeradas hasta su uso.

6.2.3 Método de extracción asistida por microondas (MAE)

En 16 viales se colocaron 38 mL de solvente puro y 6 g de bagazo por vial, 8 de ellos se sonicaron (Branson, Mod.1510) a 42 KHz a 40° C por 2 min y los siguientes 8 no fueron sonicados. Los 16 viales se colocaron dentro de las chaquetas de peek en el carrusel del equipo de microondas (Anthon Paar, Synthos 3000), a 60° C, a una presión de 0.8 bar con una potencia 1200 W. Una vez alcanzados los 60° C se mantuvieron por 2 ó 6 min, de acuerdo al tiempo de extracción establecido (la reacción en promedio alcanzó 58° C). Trascurrido el tiempo se enfriaron, se liberó la presión para recuperar los sobrenadantes que se midieron y se filtraron. Las muestras se congelaron para ser liofilizados, se cubrieron con papel aluminio y fueron refrigeradas hasta su uso.

Todas las extracciones con los diferentes solventes y sus mezclas fueron sometidos a las mismas condiciones (Figura 15).

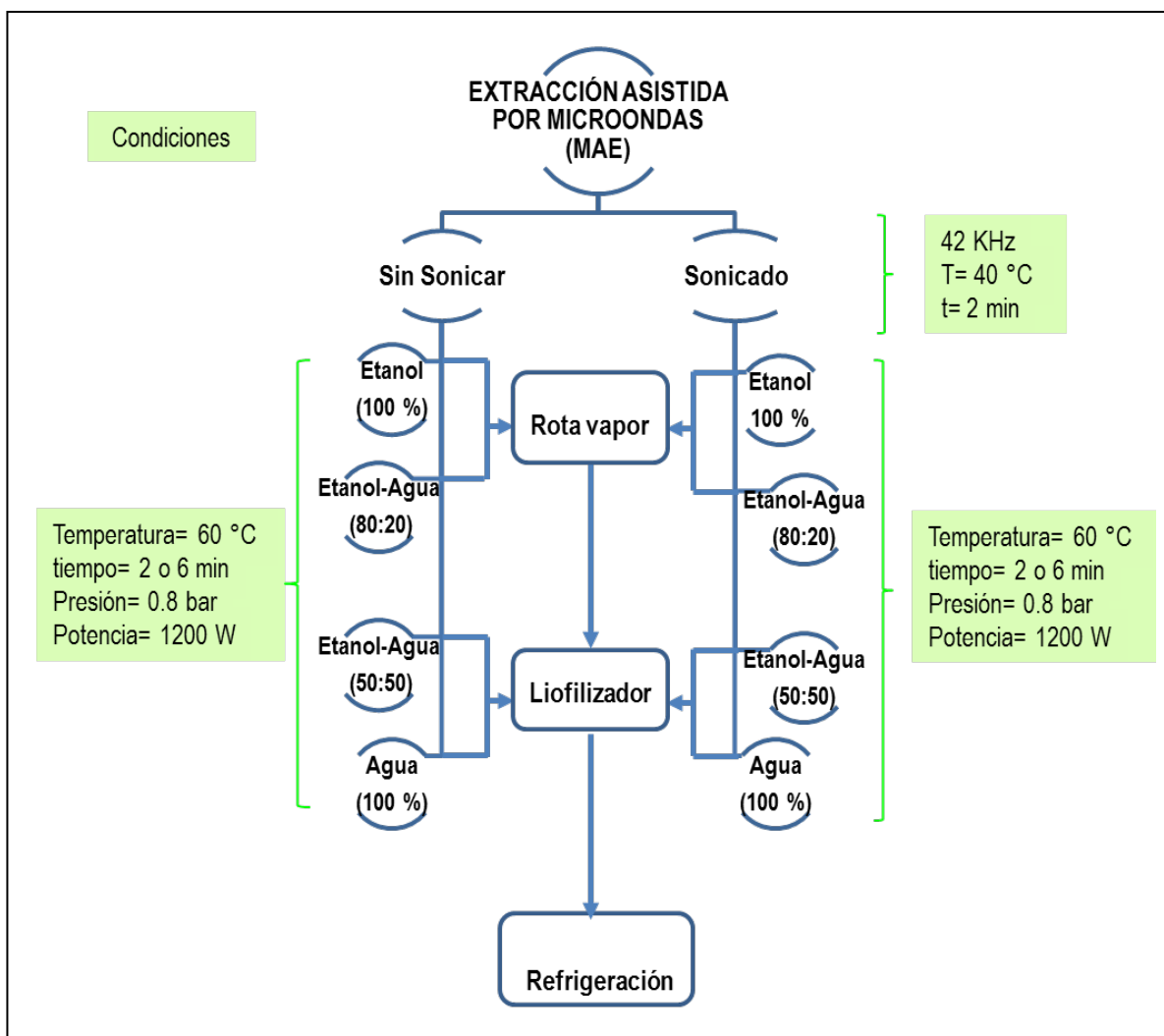


Figura 15. Diagrama de la extracción asistida por microondas (MAE)

6.3 Cuantificación de los Compuestos Fenólicos

6.3.1 Determinación de Fenoles Totales

Con el método Folin-Ciocalteu adaptado (Waterman y Mole., 1994), la concentración de polifenoles se detectó mediante formación de sales de tungsteno y molibdeno cuantificables por métodos espectrofotométricos a 760 nm. La curva

de calibración se realizó de acuerdo al Cuadro 5 utilizando viales cubiertos con papel aluminio.

Cuadro 5. Diluciones de ácido gálico para curva de calibración

| Concentración (mg/mL) | Ácido gálico (µL) | Agua HPLC (µL) |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 0.20 | 250 | 2250 |
| 0.18 | 225 | 2275 |
| 0.16 | 200 | 2300 |
| 0.14 | 175 | 2325 |
| 0.12 | 150 | 2350 |
| 0.10 | 125 | 2375 |
| 0.08 | 100 | 2400 |
| 0.06 | 75 | 2425 |
| 0.04 | 50 | 2450 |
| 0.02 | 25 | 2475 |

La cuantificación de fenoles totales se realizó por triplicado en una microplaca de 96 pozos de la siguiente forma:

- *Blanco de calibración:* Colocar en la placa 12.5 µL de agua HPLC
- *Blanco muestra:* Colocar en la placa 12.5 µL de muestra (sin reactivos)
- *Curva:* Colocar 12.5 µL de cada concentración
- *Muestra:* Colocar 12.5 µL de cada muestra

En oscuridad se adicionaron a todos los pozos 50 µL de agua HPLC con la pipeta multicanal. Se colocaron 13 µL de agua HPLC a todos los blancos y 13 µL de reactivo de Folin sólo a los de curva y muestras. Se dejó reposar la placa por 6 min protegida de la luz. Se agregaron 125 µL de Na₂CO₃ al 7% a todos los pozos (incluidos los blancos). Se agregaron 100 µL de agua de HPLC (incluidos los blancos). Se tapó, se dejó reposar 1 h 30 min a temperatura ambiente. Se leyó a 492 nm en el lector de ELISA (Thermo, Multiskacan Ascent). Se verificó la linealidad y reproducibilidad de la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (mg eq AG)/g de bagazo.

6.3.2 Determinación de Taninos Condensados

Los TC se determinaron mediante el método de Desphande y Cheryan (1985). Para elaborar la curva patrón se marcaron y cubrieron con papel aluminio 10 viales de vidrio con cada una de las concentraciones señaladas en el Cuadro 6.

La cuantificación de taninos condensados se realizó por triplicado en una microplaca de 96 pozos de la siguiente forma:

- *Blanco de calibración:* Se colocó en la placa 40 μ L de metanol
- *Blanco muestra:* Se colocó en la placa 40 μ L de muestra
- *Curva:* Se colocó 40 μ L de cada concentración
- *Muestra:* Se colocó 40 μ L de cada muestra

Cuadro 6. Diluciones de Catequina para curva de calibración

| Concentración (mg/mL) | (+) Catequina (μ L) | Metanol (μ L) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| 0.20 | 500 | 2000 |
| 0.18 | 450 | 2050 |
| 0.16 | 400 | 2100 |
| 0.14 | 350 | 2150 |
| 0.12 | 300 | 2200 |
| 0.10 | 250 | 2250 |
| 0.08 | 200 | 2300 |
| 0.06 | 150 | 2350 |
| 0.04 | 100 | 2400 |
| 0.02 | 50 | 2450 |

Se colocó en cada uno de los pozos de la placa con multicanal lo siguiente:

- *Blanco de calibración:* Se colocó en la placa 5 veces 40 μ L de HCl al 4%
- *Blanco muestra:* Se colocó en la placa 5 veces 40 μ L de HCl al 4%.

Preparar la solución (1:1) de HCl al 8% (6000 μ L) y Vainillina al 1% (6000 μ L) en una charola:

- *Curva:* Se colocaron 5 x 40 μ L de solución de HCl al 8%:Vainillina al 1%.

- *Muestra:* Se colocaron 5 x 40 µL de solución de HCl al 8%:Vainillina al 1%.

La placa protegida de la luz se colocó en el lector de ELISA (Thermo, Multiskacan Ascent) y se incubó por 20 min a 30° C.

Se tomó la lectura de absorbancia a 492 nm de longitud de onda. Se verificó la linealidad y reproducibilidad de la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg eq de (+) Catequina/g de bagazo. Todo el proceso se llevó en oscuridad.

6.3.3 Determinación de Antocianinas Totales

La cuantificación de antocianinas se realizó conforme al método desarrollado por Lee *et al.*, (2005). La reacción que se lleva a cabo durante la cuantificación se realizó a un pH de 1 con la finalidad de llevar a las antocianinas a la forma de ión flavilio colorido.

En un tubo Falcon con aluminio, se pesaron 10 mg de muestra y se añadieron 4.8 mL de etanol acidificado, se agitó en un vórtex a 8000 rpm por 30 min. Se determinó el pH del extracto y de ser necesario, se ajustó el pH a 1.0 con HCl 4 N. Se centrifugó la solución a 5000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se decantó en otro tubo y se aforó a 10 mL con etanol acidificado. Se agitó el tubo en el vortex. Se leyó la muestra a una absorbancia a 535 nm en el espectrofotómetro. La concentración de antocianinas totales en la muestra se calculó según la siguiente ecuación.

$$C = \left(\frac{A \times PM \times FD \times 1000 \text{ mg}}{\epsilon \times E \times 1 \text{ g}} \right)$$

C = Concentración de antocianinas totales (mg/L)

A = Absorbancia de la muestra

ϵ = Absortividad molar de cianidina-3-glucósido (25, 965 cm⁻¹M⁻¹L)

FD = Factor de dilución

E = Espesor de la celda

PM = Peso molecular de cianidina 3-glucósido ($449.2\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Análisis estadístico

Se calcularon las medias \pm desviaciones estándar entre las repeticiones de cada cuantificación. Se realizó una comparación de medias por ANOVA, mediante una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para encontrar diferencias estadísticamente significativas. Después se aplicó una prueba de t-student para comparar las medias entre dos tratamientos.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Fenoles Totales (FT)

En estudios previos se emplearon mezclas de bagazo de uva triturado de la cosecha 2007 (Cabernet Sauvignon/Tempranillo/Syrah en proporción 80:10:10 y se obtuvo un rendimiento de FT de 1.86 mg eq AG/g de bagazo seco (Muñoz, 2009). Posteriormente se realizó una comparación con bagazo de la cosecha 2008 de Cabernet Sauvignon/Tempranillo/Malbec (25:25:50) triturado y molido en donde se observó que el bagazo molido presentó mejores resultados que el triturado con 5.60 mg eq AG/g de muestra seca, lo que significó un rendimiento 3.5 veces mayor al obtenido con el bagazo triturado (datos no publicados). Lo anterior sugiere que el tamaño de partícula, el tipo y variedad del bagazo de uva son factores determinantes así como su proporción en semilla-piel. Además del tamaño de partícula, la agregación de las mismas y la capacidad de disolución del solvente juegan un papel importante durante la extracción para la recuperación de los CF (Luthria y Pastor-Corrales, 2006; Rocha-Guzmán *et al.*, 2007). De acuerdo a lo anterior, las condiciones de extracción en un determinado sistema así como el sistema de solventes empleado determinan la cantidad y calidad de los CF recuperados (Jayaprakasha *et al.*, 2001; Göktürk *et al.*, 2004; 2007; Paldino y Zuritz, 2011).

En pruebas preliminares se determinó la variedad a trabajar en el presente proyecto. Se decidió por el bagazo de la variedad Merlot por ser una muestra de bagazo pura, es decir que no se combinó con otras variedades y, además, presentó mayor contenido de FT y menor variación con respecto a la mezcla, tanto en el presente estudio como en los resultados obtenidos en 2009 (datos no mostrados).

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos en la recuperación de FT mediante la extracción acuosa convencional y por MAE. En todos los casos la extracción acuosa de FT por método de calentamiento convencional fue superior a la extracción mediante MAE, independientemente del tiempo de extracción.

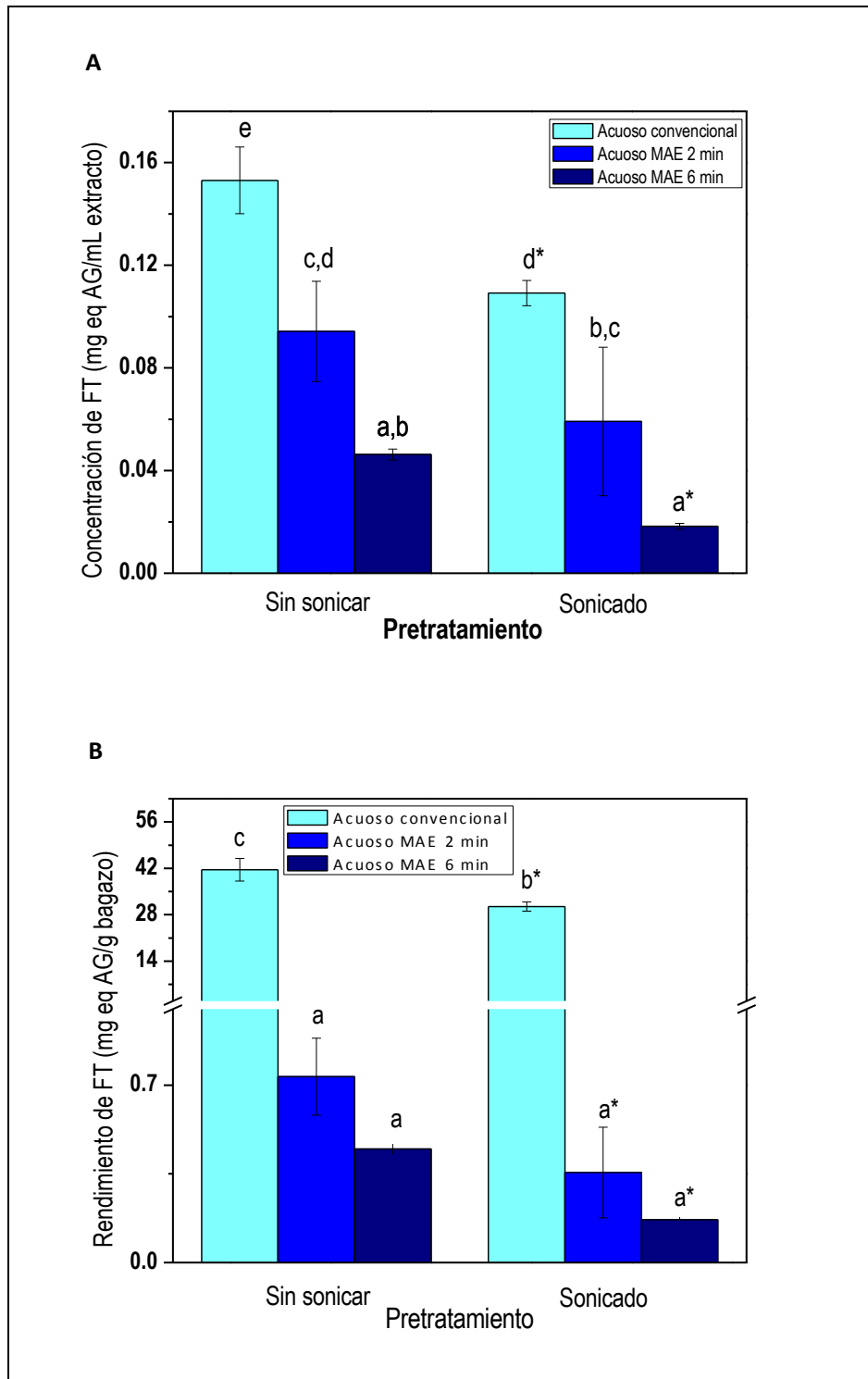


Figura 16. Extracción acuosa de Fenoles Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de FT extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

En la extracción acuosa convencional sin sonicar y sonicada se obtuvieron 0.153 y 0.109 mg eq AG/mL de extracto respectivamente, superando a lo obtenido por MAE por casi el doble. En consecuencia, el rendimiento de FT para la extracción acuosa fue la más alta con 41.597 mg eq AG/g bagazo seco sin sonicar y 30.458 mg eq AG/g bagazo seco en el caso del pretratamiento con sonicación.

Paladino y Zuritz (2011) realizaron una comparación entre distintos solventes para la extracción de FT en semilla de *Vitis vinífera*. La extracción se realizó con agua a 90° C por 20 min alcanzando 5.0 mg AG eq AG/g semilla seca. A las 3 h de tratamiento se logró extraer la máxima cantidad que fue de 11.860 y a las 4 h fue de 12.87 mg eq AG/g semilla seca. En el presente trabajo se observa que el método acuoso convencional con 41.597 mg eq AG/g bagazo seco de FT superó al estudio anterior por alrededor de 4 veces más en tan sólo 15 minutos de extracción en comparación con el tratamiento a 3 h. Lo anterior confirma que la composición y variedad del bagazo al igual que las condiciones de extracción son determinantes en la recuperación de los FT.

Los resultados obtenidos con MAE en la extracción acuosa principalmente son atribuidos a las propiedades dieléctricas del agua ya que presenta una baja tangente de delta $\text{Tan } \delta = 0.1229$ (Dallinger y Kappe, 2007). Esta resulta ser baja con respecto a otros disolventes lo que resulta en es su baja capacidad para transformar la energía eléctrica en calor. A pesar de ser una molécula de naturaleza dipolar, su polarización es la que disminuye su potencial como disolvente en la extracción asistida por microondas.

En cuanto a la extracción orgánica por soxhlet y MAE (Figura 17), se utilizó una relación de bagazo-solvente de 1:6 y una mezcla de solventes de EtOH:EtOAc:H₂O en relación de 65:30:5, respectivamente. La extracción orgánica convencional presentó la mayor cantidad de FT (0.169 y 0.186 mg eq AG/mL de extracto), un rendimiento de 4.660 y 7.994 mg eq AG/g de bagazo seco sin sonicar y sonicando, respectivamente.

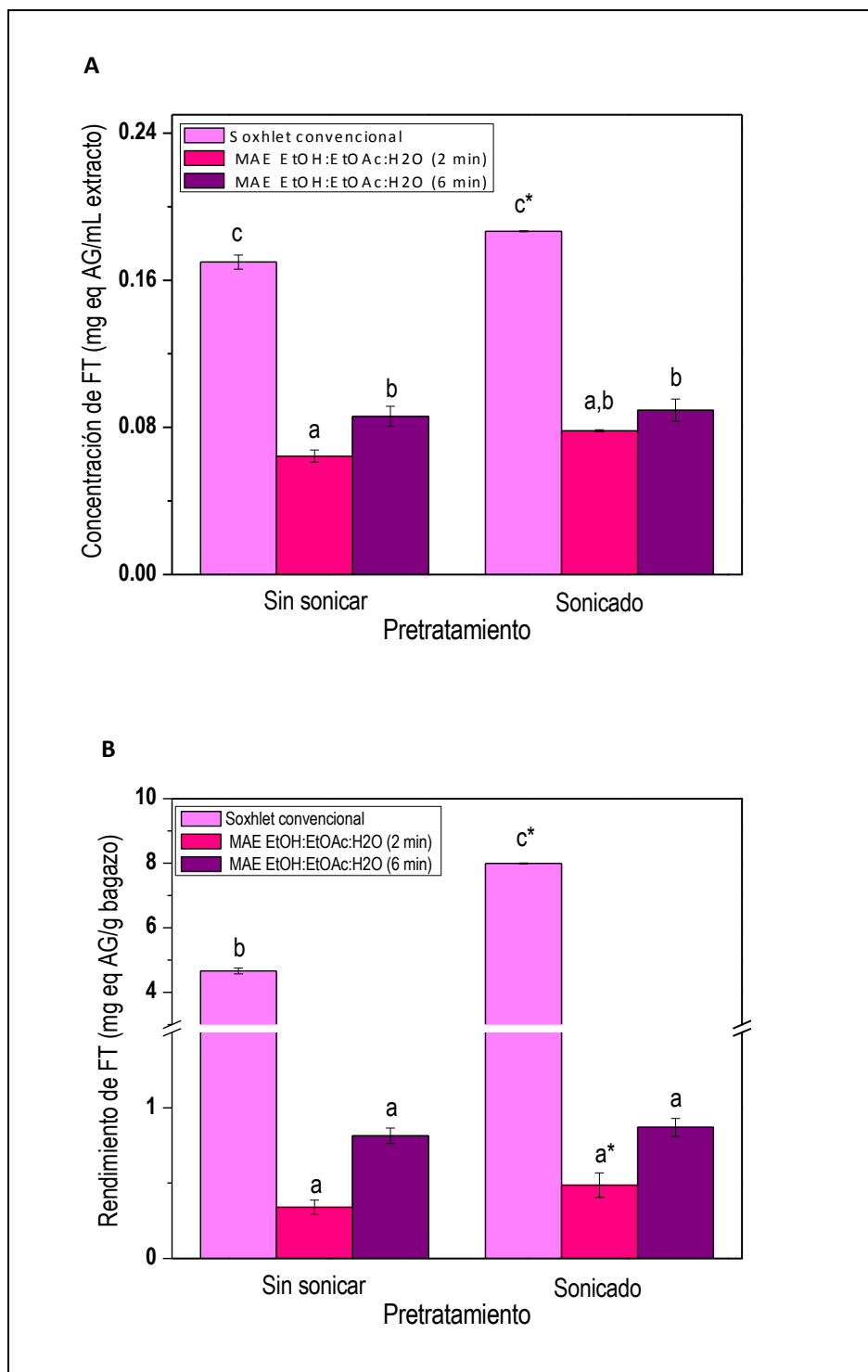


Figura 17. Extracción orgánica de Fenoles Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de FT extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

En un estudio comparativo de mezclas de solventes: acetona-agua-ácido acético (90:9.5:0.5) y acetato de etilo-etanol-agua (60:30:10), ambas en semilla y piel de uva *V. vinifera*, los mejores resultados de extracción de FT se observaron en semilla de 667.87 mg eq AG/g y en piel de 45.44 mg eq AG/g de muestra seca al con el sistema acetato de etilo-etanol-agua (Göktürk *et al.*, 2004). Estos investigadores, en un estudio posterior, evaluaron el contenido de FT, el potencial antiradical y antioxidante de estos compuestos y observaron una cantidad de FT de 704 mg eq AG/g de semilla (Göktürk, *et al.*, 2007).

La mezcla de disolventes en esta extracción orgánica presentó cambios a la recuperación de FT, siendo el etanol el disolvente mayoritario y de acuerdo a la composición del bagazo que fue del 46.19% de semilla y 53.81 % de piel. Por otra parte se sabe que los flavonoides son solubles en disolventes orgánicos como el etanol, lo que sugiere que la cantidad de FT recuperados por la extracción orgánica convencional fue principalmente de flavonoides.

La extracción por MAE fue realizada con disolventes puros y con mezclas de éstos. En las Figuras 18 y 19 se presentan los resultados para los sistemas Etanol-Acetato de etilo-Agua 65:30:5, Etanol 100%, Etanol-Agua 80:20, Etanol-Agua 50:50 y Agua 100%. La mayor recuperación de FT por MAE se obtuvo con Etanol-Agua 80:20 con 0.186 y 0.166 mg eq AG/mL de extracto, seguido de la mezcla 50:50 con 0.117 y 0.118 mg eq AG/mL de extracto sin sonicar y sonicada, respectivamente.

El tiempo de extracción y la sonicación fueron importantes para todas las extracciones por microondas ya que, de forma general y excepto para el extracto acuoso, un mayor tiempo de extracción mejoró la concentración de FT obtenida. Lo anterior puede estar relacionado con el hecho de que cuando los disolventes tienen diferencias dieléctricas que favorecen la transferencia de calor en la extracción y por lo tanto aumentar no sólo la disolución sino también la solubilidad de los compuestos fenólicos, mientras que por un método de calentamiento convencional (térmico) difícilmente se alcanzaría esto (De la Hoz *et al.*, 2005).

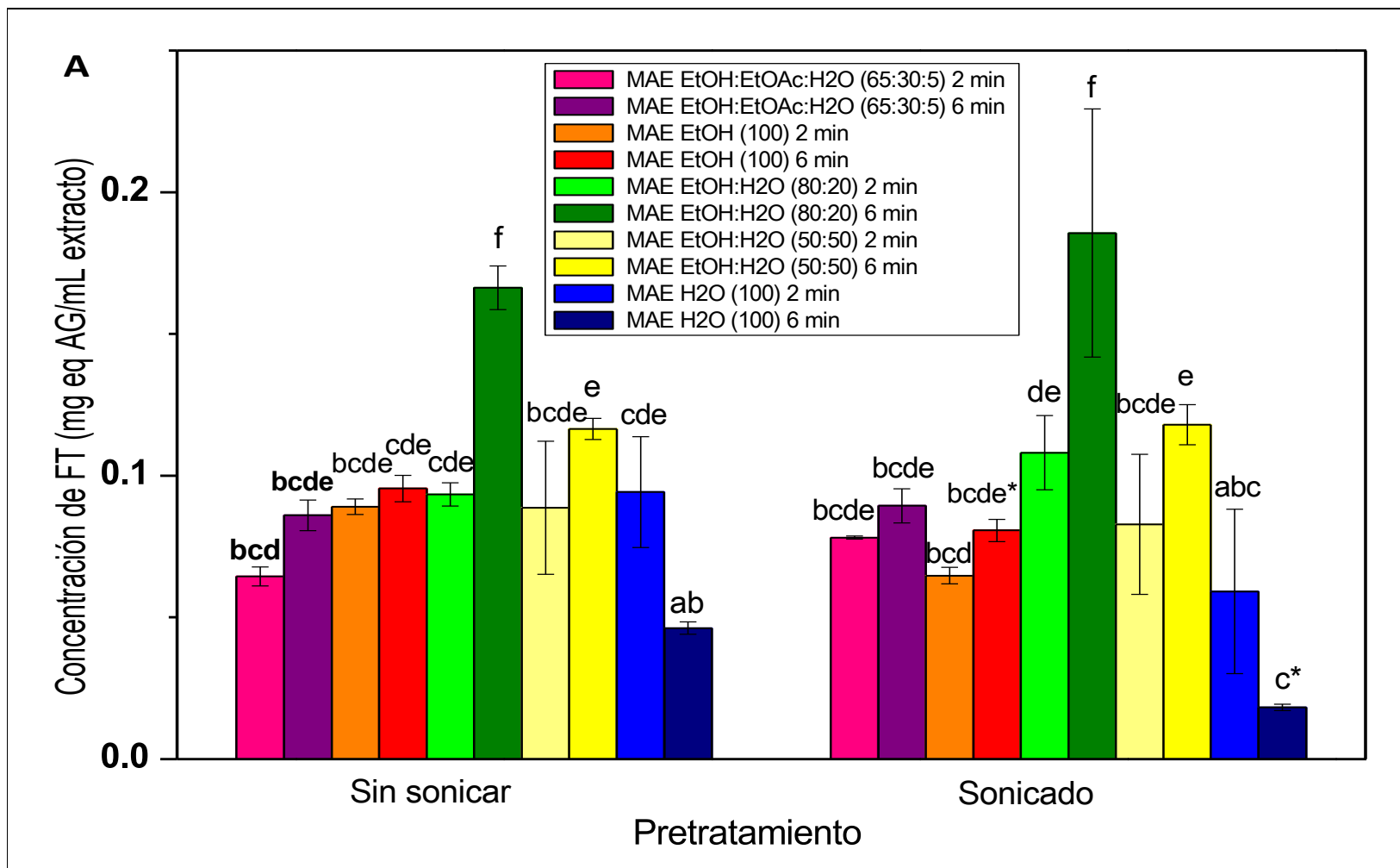


Figura 18. Concentración de Fenoles Totales en extractos de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

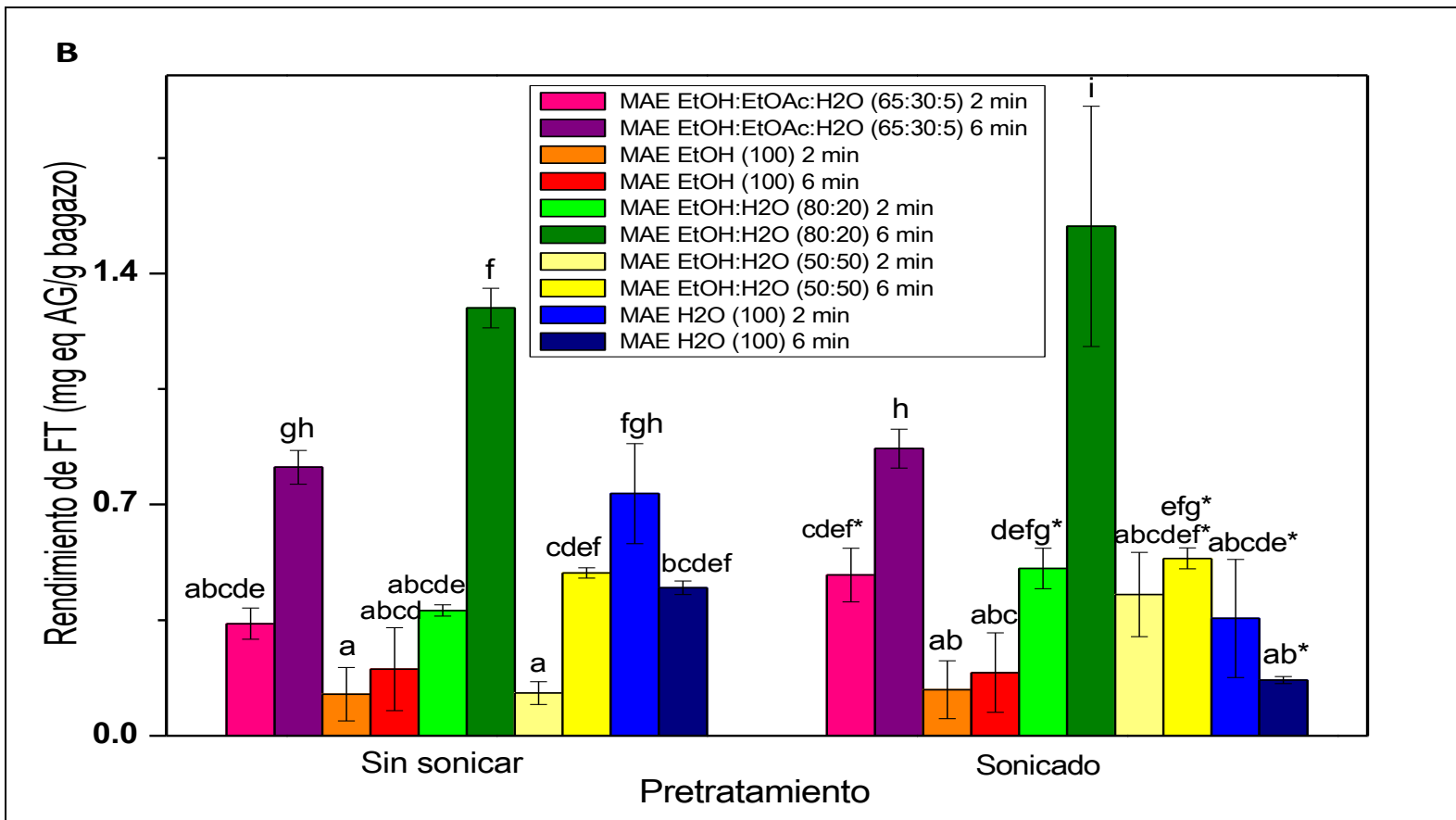


Figura 19. Rendimiento de la extracción de Fenoles Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

Casazza *et al.* (2010) probaron la recuperación de FT de semilla y/o piel utilizando la extracción sólido-líquido, extracción asistida por ultrasonido (UAE), la extracción asistida por microondas (MAE) y extracción a alta presión y temperatura (HPTE). Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de FT más alto se alcanzó en semilla con HPTE, seguido de MAE con 83 mg eq AG/g de materia seca a los 90 minutos de tiempo de extracción y en piel de 18 mg eq AG/g de materia seca.

Por su parte, Li *et al.* (2011) establecieron condiciones para el método de MAE de polifenoles de semillas de uva *Vitis vinífera*, obteniendo las mejores condiciones con etanol al 47.2%, en un tiempo de 4.6 min, logrando recuperar un 92% de FT. Lo anterior sugiere que MAE tiene posibilidades de ser utilizado como un método eficiente en la recuperación de CF y que aún las condiciones de extracción pueden ser mejoradas.

7.2 Taninos Condensados

Para el caso de la extracción acuosa (Figura 20), el método convencional presentó una baja recuperación de TC sin mostrar diferencia significativa con los extractos acuosos obtenidos con MAE sin embargo, la cantidad de extracto obtenido fue alta para este tipo de extracción lo que aumentó el rendimiento hasta 6.146 y 7.576 mg eq (+) Cat/g de bagazo seco, en la extracción acuosa convencional sin sonicado y sonicada, respectivamente. El agua no es el solvente de elección para extraer TC a pesar de que para los flavonoides y antocianinas el agua es uno de los medios en los cuales se solubilizan (Nagendran *et al.*, 2006).

El agua no es el disolvente más eficiente para extraer TC a pesar de que para algunos flavonoides, y en el caso específico de las antocianinas, el agua es uno de los mejores medios en los cuales se pueden solubilizar este tipo de compuestos (Nagendran *et al.*, 2006).

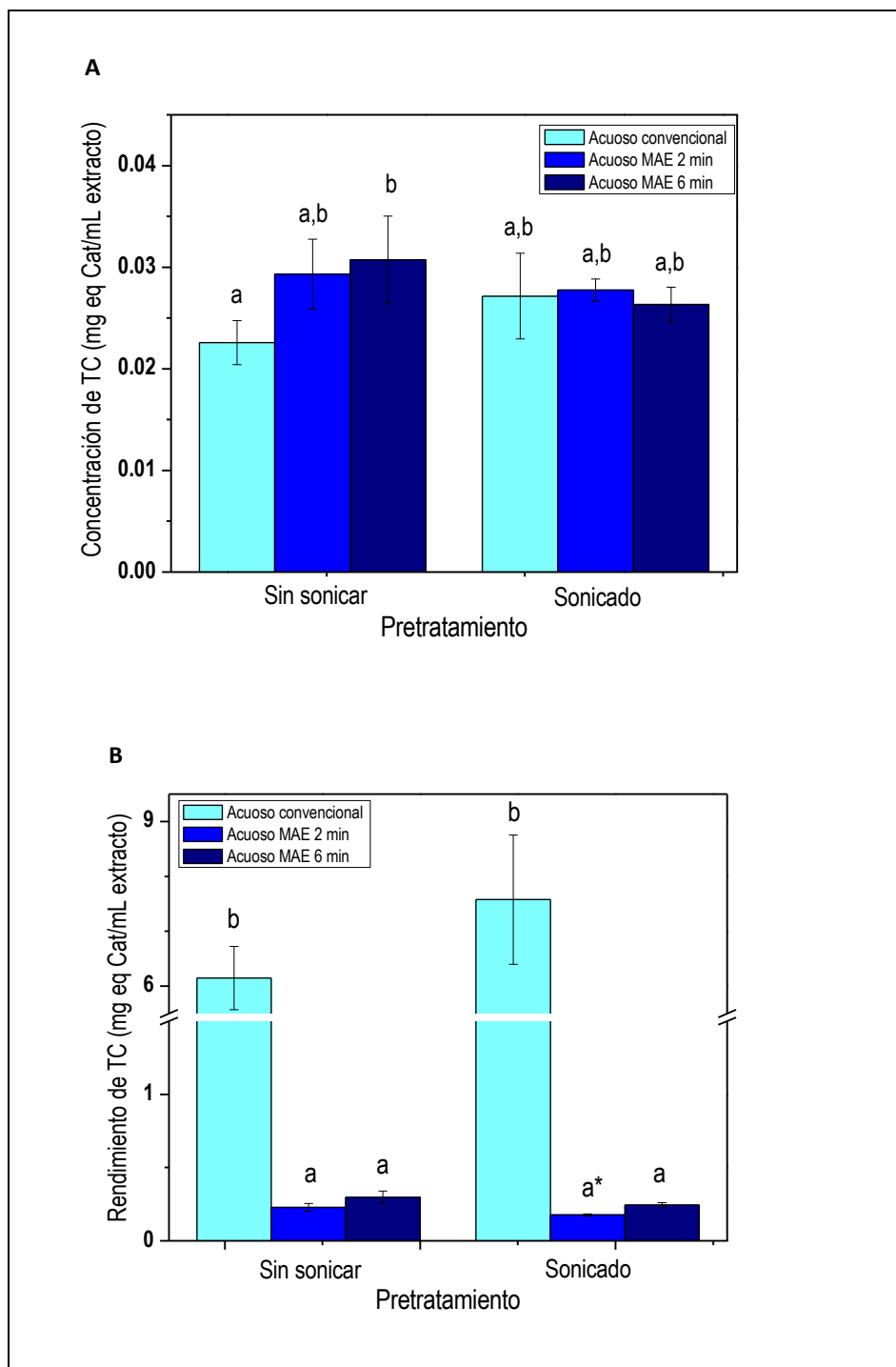


Figura 20. Extracción acuosa de Taninos Condensados de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de TC extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

En el estudio de Muñoz *et al.* (2009) la cantidad de TC de bagazo seco de uva roja fueron expresados en mg eq de (+) Cat y determinaron que la extracción máxima se logró a partir de 15 g /250 mL de agua a punto de ebullición, con un tiempo de 7 min para la extracción. La concentración obtenida fue de 1.036 mg eq (+) Cat por gramo de bagazo seco.

Los resultados alcanzados en el presente estudio superaron por más de 5 veces al estudio de Muñoz en el 2009. Lo anterior se atribuye a diversos factores como el uso e una solo variedad de uva, el bagazo compuesto de semilla y piel no contenía el raspón dado que fue eliminado previamente, el tamaño de partícula fue fino y la relación bagazo-agua fue un poco más del doble siendo esta de 4 g de bagazo seco/25mL de agua a punto de ebullición es decir en una relación de 0.16. Estas condiciones de extracción mejoraron la recuperación de TC.

Respecto a la extracción orgánica, la Figura 21 muestra los resultados para la extracción orgánica convencional y por MAE de TC. La mayor la concentración de TC se logró cuando se utilizaron las microondas como fuente de energía respecto al método convencional térmico, presentando diferencias significativas en todos los casos. Los resultados obtenidos sugieren que los taninos condensados son sensibles y pueden sufrir degradación, por tal motivo en condiciones menos extremas se conservan y esto permite su recuperación y tanto el pretratamiento con sonicación, como el tiempo de extracción pueden favorecer su extracción.

Por otra parte, se obtuvo una mayor la cantidad de extracto total por el método de extracción orgánica convencional y, en consecuencia, el rendimiento final fue superior.

Al respecto Dallinger y Kappe (2007) han señalado que para lograr mayor eficiencia en la extracción asistida por microondas, dada las limitaciones de la solubilidad de este tipo de compuestos, a menudo se emplean cosolventes orgánicos, derivación iónica, surfactantes, o grupos hidrófilos.

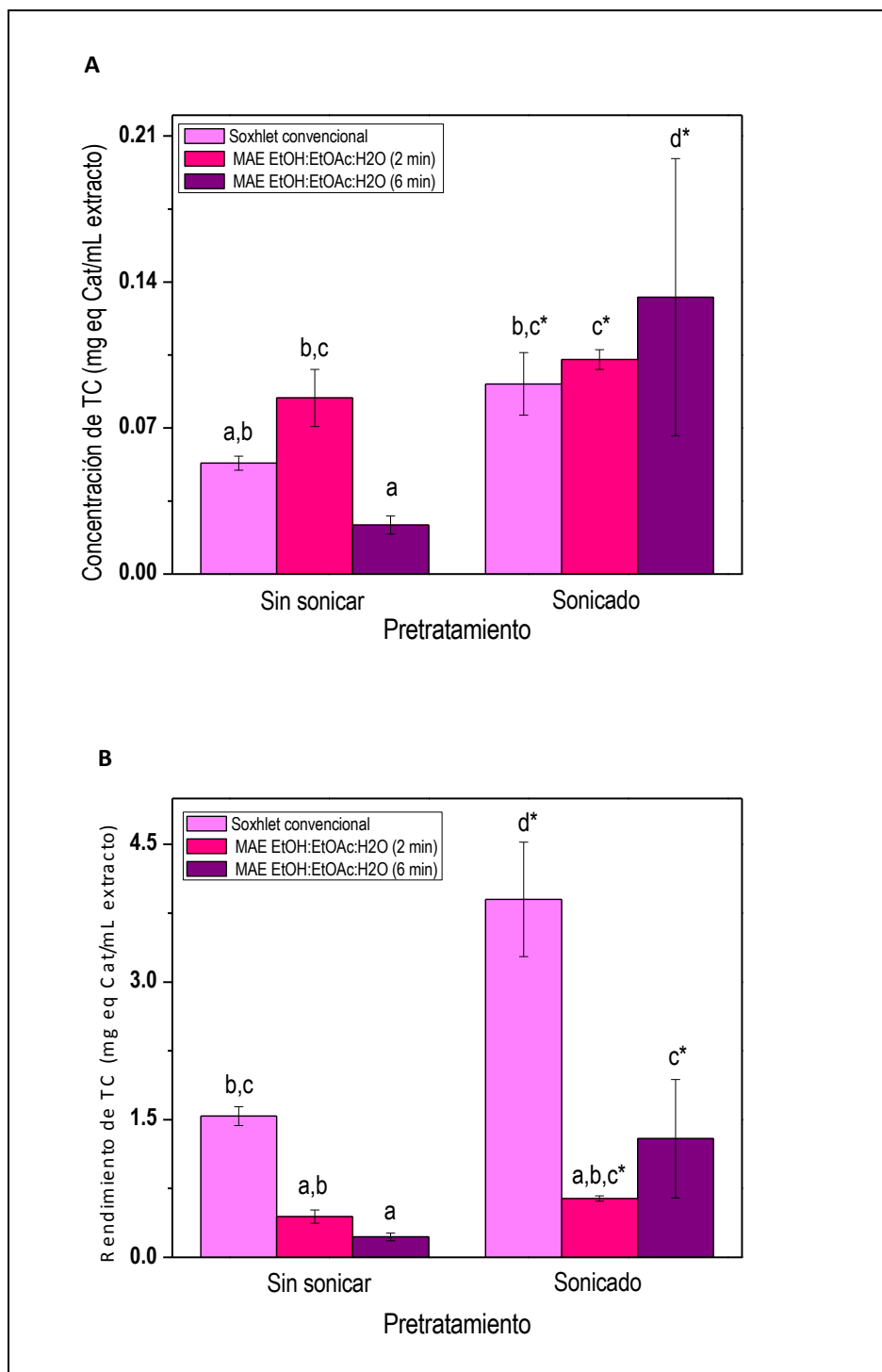


Figura 21. Extracción orgánica de Taninos Condensados de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de TC extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

El bagazo de uva utilizado (semilla-piel) permite la recuperación de los compuestos fenólicos tanto de tipo poliméricos, como los oligoméricos (Katiyar, 2008) y en forma de flavonoides (Cheynier, 2005). Sin embargo, se sugiere hacer la cuantificación de flavonoides totales por espectrometría y por cromatografía de HPLC para identificar estas así como su estabilidad y la de los estos compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos en la recuperación de TC mediante la extracción asistida por microondas con respecto a los solventes puros y mezclas de ellos se presentan a continuación en la Figura 22. La relación Etanol-Agua 80:20 por 6 min y sin pretratamiento de sonicación mostró la mayor extracción con 0.479 mg eq (+) Cat/mL de extracto, seguida de Etanol al 100% con 2 min y sin sonicación con una cantidad de 0.348 mg eq (+) Cat/mL, esta última no mostró diferencia significativa respecto al tiempo de extracción ni con respecto al pretratamiento físico. Las cantidades de extracto obtenido para cada uno de los solventes y mezclas fue diferente, por lo tanto el comportamiento del rendimiento de TC (Figura 23) fue muy variable. La relación 80:20 sobresalió del resto dado que la cantidad de extracto obtenido fue el tercero más alto de todas las extracciones por microondas.

Este resultado sugiere que las propiedades de estos compuestos favorecen su recuperación con etanol. La relación etanol-agua (80:20) fue la mayor y mejoró con el tiempo de extracción, lo que sugiere que esta relación es adecuada en el uso de las microondas como una fuente de energía al aprovechar las propiedades dieléctricas de la mezcla para favorecer la transferencia de calor y, en este caso, también podrían influir en las propiedades de los taninos condensados para poder ser recuperados.

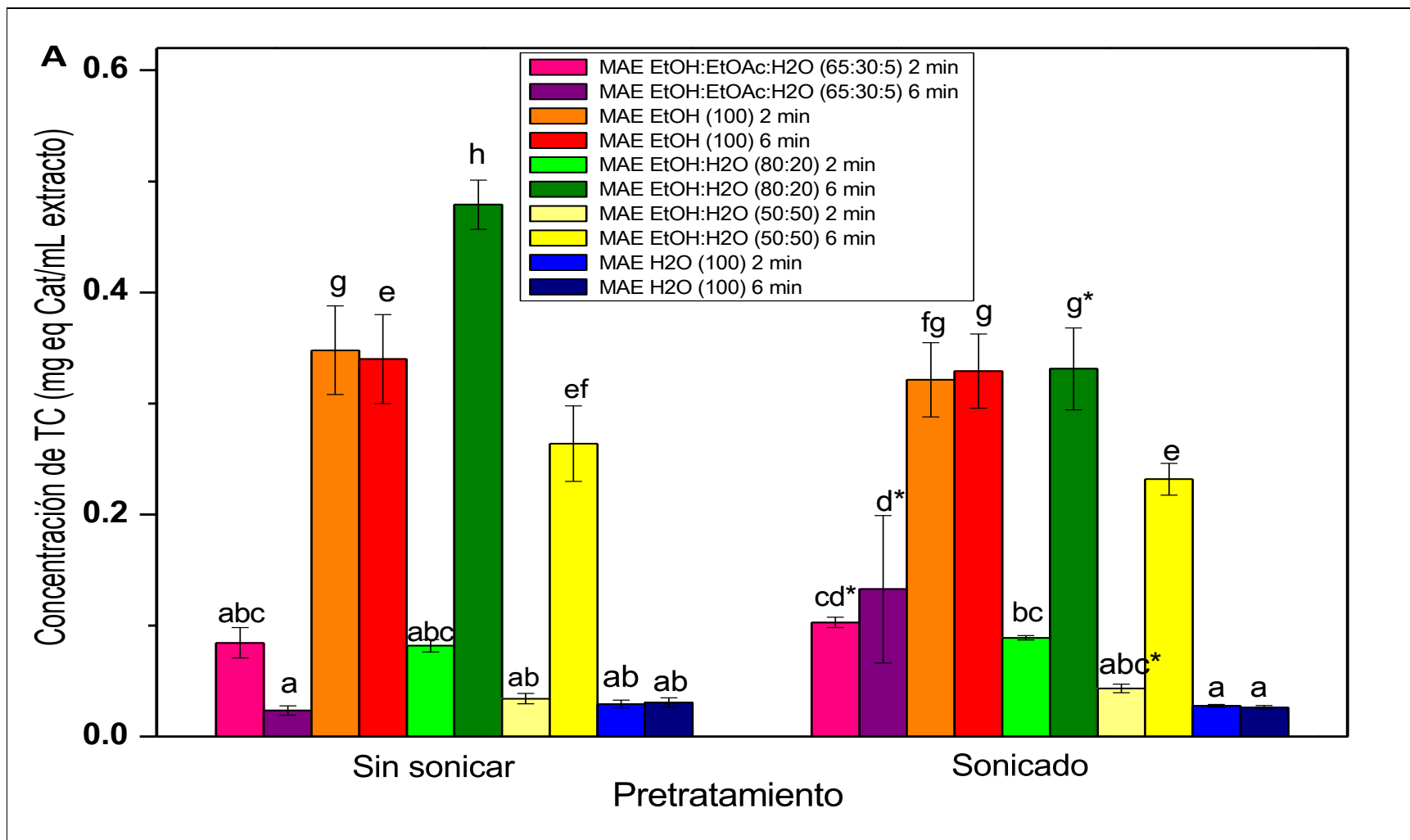


Figura 22. Concentración de Taninos Condensados en extractos de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

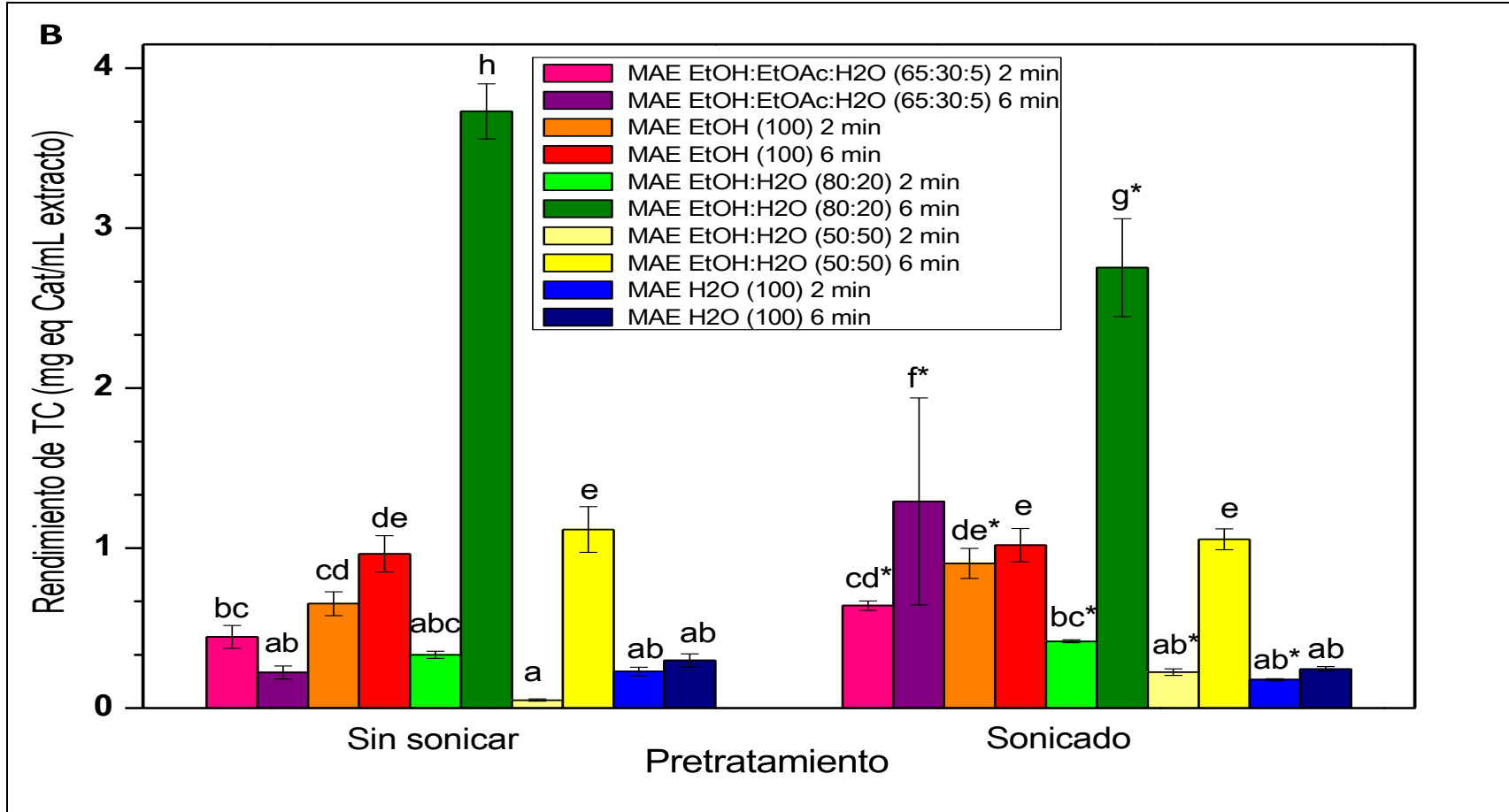


Figura 23. Rendimiento de la extracción de Taninos Condensados de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

7.3 Antocianinas Totales

Las antocianinas son altamente inestables y fácilmente susceptibles a la degradación. La estabilidad de su color es fuertemente afectada por el pH, la temperatura, la concentración de antocianinas, el oxígeno, la luz, las enzimas, sustancias como el ácido ascórbico, azúcares, sulfitos, copigmentos, iones metálicos (Bibbio y Mercadante, 2008).

En la Figura 24 se muestran los datos de antocianinas totales (AT) obtenidos en la extracción acuosa comparando los dos métodos de extracción. El método acuoso convencional presentó 1.008 y 1.293 mg de AT/L de extracto sin sonicar y sonicado, para MAE fue de 1.016 y 0.969 en 2 min y de 1.427 y 1.522 mg de AT/L de extracto para 6 min, sin sonicar y sonicado, respectivamente. Estos resultados sugieren independencia a la sonicación. El rendimiento final fue mayor para los extractos acuosos convencionales como en los casos anteriores.

En estos casos ninguno de los dos acuosos fue el mejor método de extracción en la recuperación de las antocianinas, a pesar de que estos compuestos son solubles en agua. En todos los casos se obtuvo la menor cantidad de AT cuando se extrajeron por el método convencional, probablemente debido a degradación por la temperatura elevada (Espin *et al.*, 1995; Gasull y Becerra, 2006) en el caso del acuoso convencional.

Otros factores que hacen inestables a las antocianinas pueden ser aspectos propios del extracto como algunos componentes del bagazo, otros externos como la manipulación y en especial el tipo de disolvente durante la extracción. Este último lleva a pensar que la elección del disolvente puede contribuir a la estabilidad de estos compuestos, debido a la estructura y naturaleza de cada antocianina. Además el número de grupos hidroxilo y metoxilo (grupo radical) en el anillo B no sólo diferencian al tipo de antocianina, sino que afectan el comportamiento químico de la molécula debido a la hidroxilación (Rein, 2005).

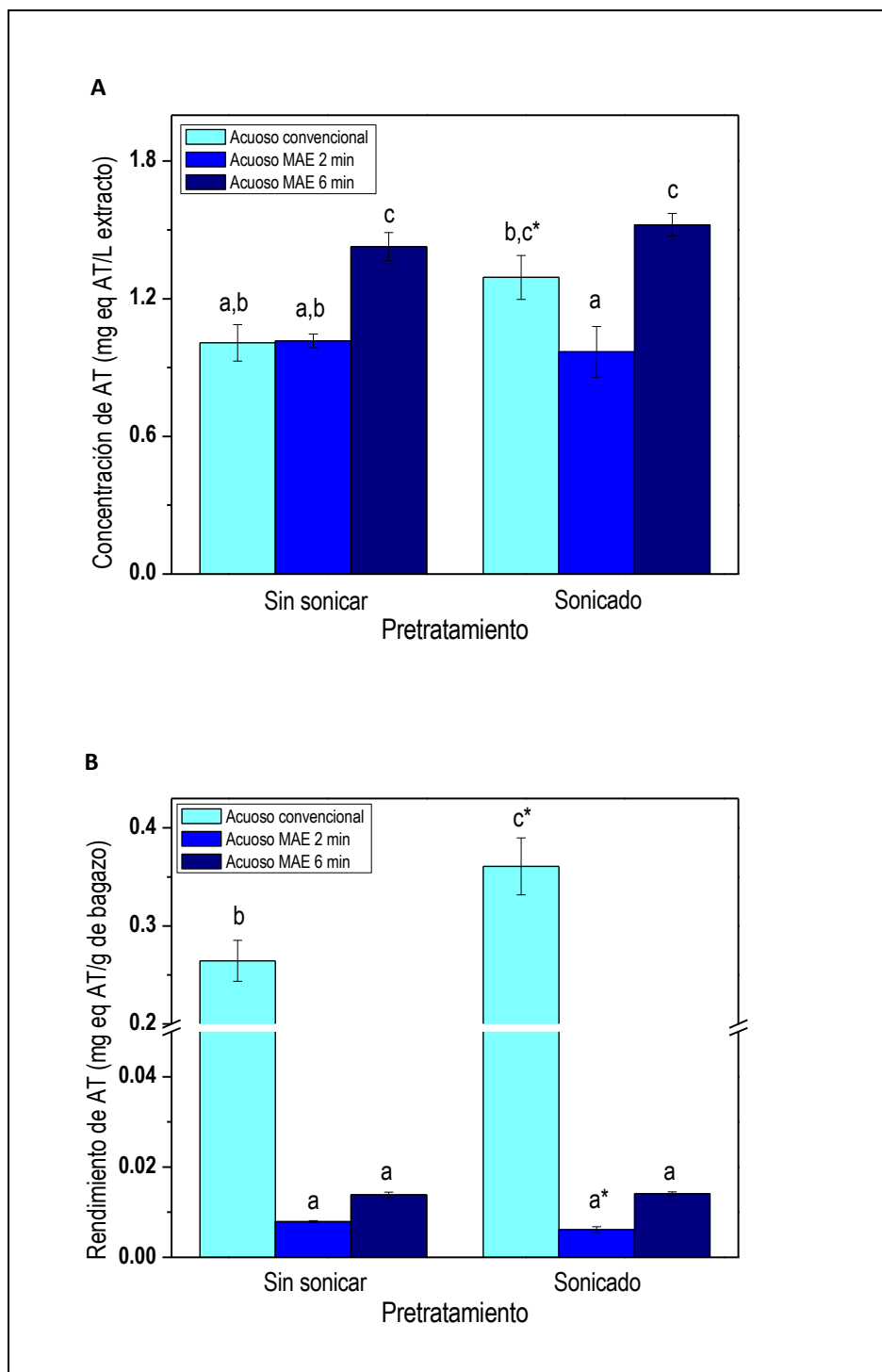


Figura 24. Extracción acuosa de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de AT extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

En la Figura 25 se presentan las concentraciones de antocianinas para las extracciones orgánicas con la mezcla de solventes EtOH-EtOAc-H₂O en la relación 65:30:5, la cual presentó el doble de cantidad con respecto a los acuosos. La cantidad de AT recuperadas por extracción orgánica convencional fue superior a la obtenida por microondas, con un valor de 3.56 y 4.031 mg AT/L de extracto para sin y con sonicación. El etanol es capaz de interactuar con estos compuestos por sus grupos radicales ya que logra formar complejos que les confiere estabilidad (Van Acker *et al.*, 1996). El mayor rendimiento se obtuvo con el método convencional con previa sonicación.

En las Figuras 26 y 27 se muestran los resultados para las extracciones con microondas. Se determinó que la mayor cantidad de antocianinas se obtuvo con la mezcla Etanol-Agua 50:50 en un tiempo de extracción de 6 min y con previa sonicación (13.563 mg AT/L de extracto) seguida de Etanol-Agua 80:20 sonificado a 2 min de extracción (10.155 mg AT/L).

Lo anterior sugiere que las mezclas EtOH-H₂O aumentan la solubilidad de las antocianinas, además de hacer un mejor empleo de la fuente de energía y de moderar la temperatura, parámetro crítico para las antocianinas. Por otra parte, parece ser que los tiempos cortos de extracción así como el resto de las condiciones no afectan la estabilidad de las antocianinas. Se reconoce que la extracción por microondas puede ser una alternativa en preservar este tipo de compuestos (Li *et al.*, 2011).

Se puede considerar a la extracción asistida por microondas (MAE) como un método susceptible de mejoras que aumente su eficiencia, que sea eficaz y que proporcione compuestos fenólicos de calidad con actividad biológica y superar los rendimientos hasta el momento alcanzados.

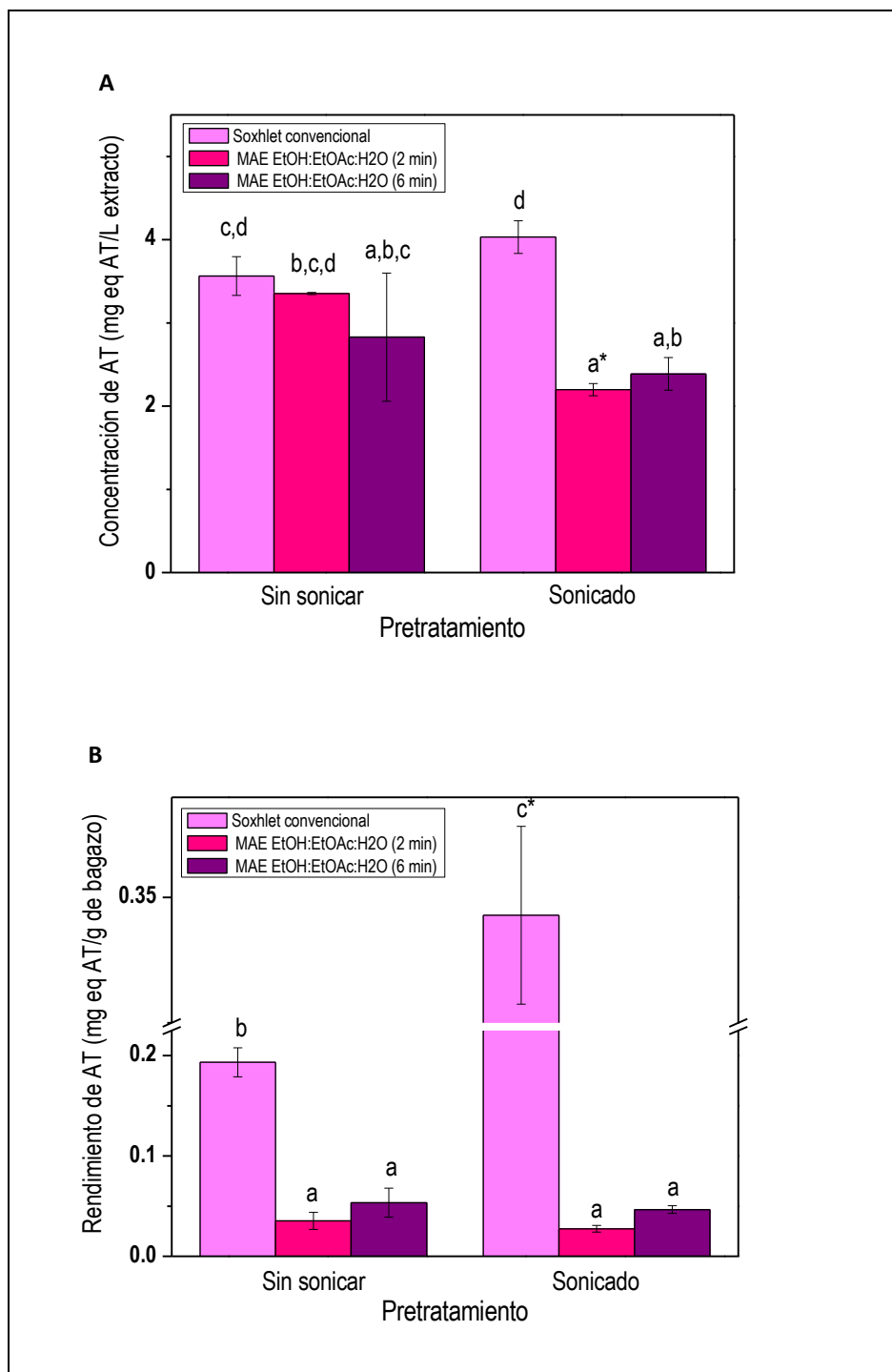


Figura 25. Extracción orgánica de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* por método convencional y por MAE. A) Concentración de TC extraída, B) Rendimiento obtenido. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

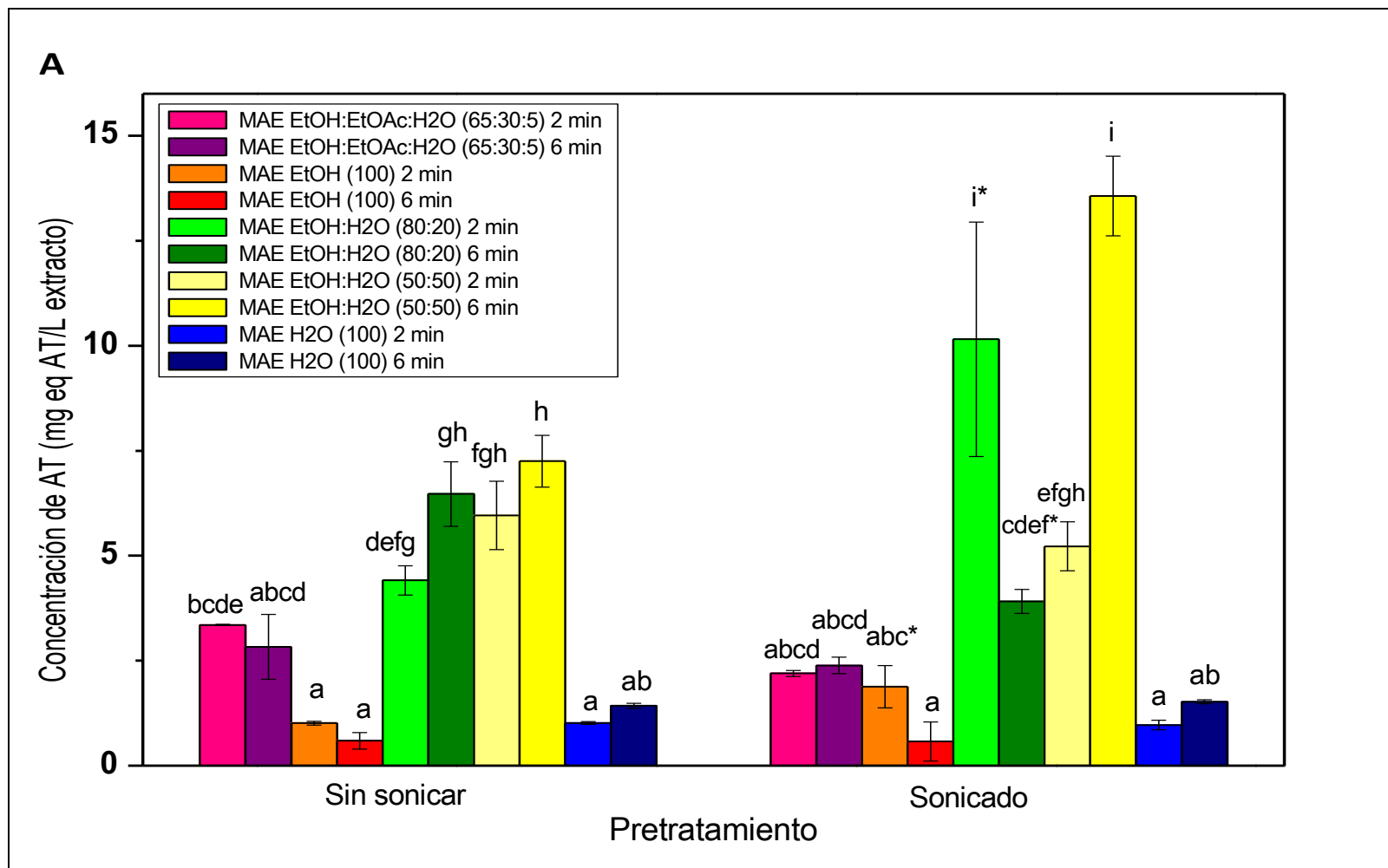


Figura 26. Concentración de Antocianinas Totales en extractos de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

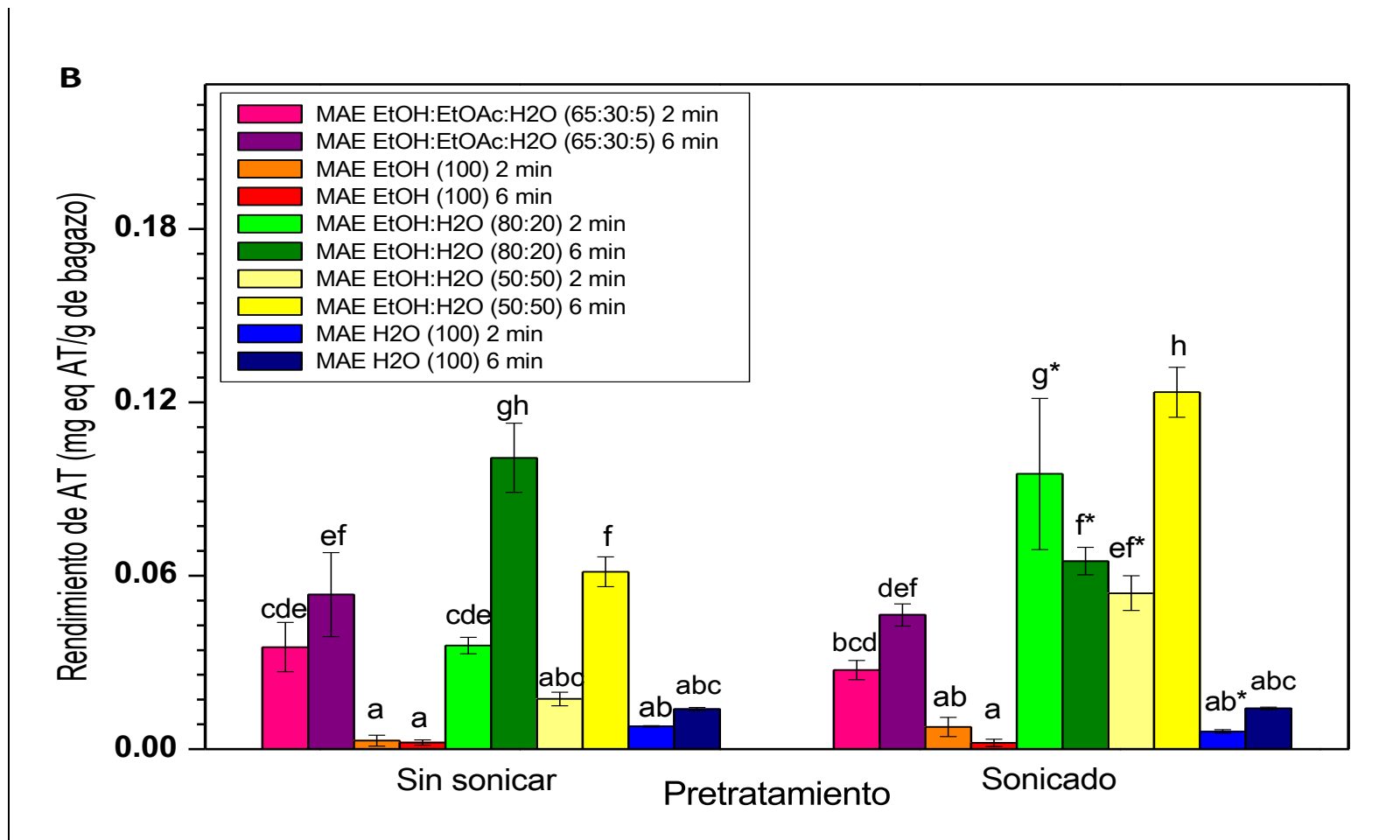


Figura 27. Rendimiento de la extracción de Antocianinas Totales de bagazo de uva roja *Vitis vinifera* mediante MAE utilizando diferentes sistemas de disolventes. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). El asterisco representa diferencia estadística significativa entre muestras extraídas por el mismo método con o sin sonicación.

A manera de comparación general y en forma de resumen, en el Cuadro 7 se muestran todos los resultados obtenidos para los diferentes métodos. Se observa que la mayor cantidad de extracto liofilizado se obtuvo al realizar la extracción acuosa convencional, lo cual puede deberse a que se extrae mayor cantidad de materia soluble en agua, que no corresponde únicamente a compuestos fenólicos. Esto ocasionó que, de manera general, el rendimiento final fuera mayor al utilizar este método a pesar de que en ningún caso fue el mejor método de extracción.

Para el caso de FT, los métodos más eficientes fueron la extracción orgánica convencional y para MAE la relación EtOH-H₂O al 80:20 por 6 min, en ambos casos con sonicación. Para TC, MAE EtOH-H₂O 80:20 por 6 min sin sonificar seguido del mismo método durante 6 min con sonicación previa así como la extracción con etanol al 100%, en este caso de forma independiente al tiempo de extracción. Con respecto a AT, la extracción fue mejor por MAE con EtOH-H₂O 50:50 por 6 min de extracción seguido por MAE EtOH-H₂O 80:20 por 2 min, ambos con sonicación previa.

Cuadro 7. Resumen de resultados de los CF para los diferentes métodos de extracción.

| Extracción | Sonicación | Tiempo de extracción | Extracto obtenido | Concentración de FT | Rendimiento de FT | Concentración de TC | Rendimiento de TC | Concentración de AT | Rendimiento de AT |
|-----------------------------------|------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | 42 KHz | min | mg ES/g BS | mg EAG/mL E | mg EAG/g BS | mg ECat/mL E | mg ECat/g BS | mg AT/L E | mg AT/g BS |
| Acuoso convencional | No | 15 | 271.39 | 0.153 ± 0.012 | 41.597 ± 3.422 | 0.023 ± 0.002 | 6.146 ± 0.577 | 1.008 ± 0.079 | 0.264 ± 0.020 |
| | Si | 15 | 278.95 | 0.109 ± 0.004 | 30.458 ± 1.361 | 0.027 ± 0.004 | 7.576 ± 1.178 | 1.293 ± 0.095 | 0.361 ± 0.029 |
| Orgánico convencional | No | 8 | 54.79 | 0.170 ± 0.003 | 4.661 ± 0.091 | 0.053 ± 0.003 | 1.539 ± 0.103 | 3.564 ± 0.232 | 0.193 ± 0.014 |
| | Si | 8 | 85.62 | 0.187 ± 0.000 | 7.995 ± 0.015 | 0.091 ± 0.014 | 3.901 ± 0.623 | 4.031 ± 0.195 | 0.346 ± 0.017 |
| Acuoso MAE | No | 2 | 7.75 | 0.094 ± 0.019 | 0.733 ± 0.151 | 0.029 ± 0.003 | 0.228 ± 0.026 | 1.016 ± 0.030 | 0.008 ± 0.029 |
| | Si | | 6.33 | 0.059 ± 0.028 | 0.355 ± 0.178 | 0.028 ± 0.001 | 0.177 ± 0.007 | 0.969 ± 0.110 | 0.006 ± 0.000 |
| | No | 6 | 9.68 | 0.046 ± 0.002 | 0.448 ± 0.020 | 0.031 ± 0.004 | 0.298 ± 0.041 | 1.427 ± 0.061 | 0.014 ± 0.000 |
| | Si | | 9.24 | 0.018 ± 0.001 | 0.169 ± 0.010 | 0.026 ± 0.001 | 0.244 ± 0.015 | 1.522 ± 0.048 | 0.014 ± 0.000 |
| Orgánico MAE | No | 2 | 10.53 | 0.064 ± 0.003 | 0.339 ± 0.047 | 0.084 ± 0.013 | 0.445 ± 0.072 | 3.352 ± 0.012 | 0.035 ± 0.008 |
| | Si | | 12.45 | 0.078 ± 0.000 | 0.487 ± 0.081 | 0.103 ± 0.004 | 0.640 ± 0.029 | 2.197 ± 0.073 | 0.027 ± 0.003 |
| | No | 6 | 18.89 | 0.086 ± 0.005 | 0.813 ± 0.050 | 0.024 ± 0.004 | 0.222 ± 0.040 | 2.829 ± 0.770 | 0.053 ± 0.014 |
| | Si | | 19.46 | 0.089 ± 0.006 | 0.870 ± 0.058 | 0.133 ± 0.066 | 1.292 ± 0.646 | 2.387 ± 0.197 | 0.046 ± 0.003 |
| EtOH:H ₂ O (50:50) MAE | No | 2 | 3.75 | 0.089 ± 0.023 | 0.129 ± 0.034 | 0.034 ± 0.004 | 0.050 ± 0.006 | 5.960 ± 0.812 | 0.017 ± 0.002 |
| | Si | | 5.62 | 0.083 ± 0.024 | 0.427 ± 0.127 | 0.043 ± 0.003 | 0.224 ± 0.020 | 5.225 ± 0.582 | 0.054 ± 0.006 |
| | No | 6 | 5.67 | 0.117 ± 0.003 | 0.493 ± 0.015 | 0.264 ± 0.033 | 1.116 ± 0.143 | 7.249 ± 0.613 | 0.061 ± 0.005 |
| | Si | | 6.18 | 0.118 ± 0.007 | 0.537 ± 0.032 | 0.232 ± 0.014 | 1.055 ± 0.065 | 13.563 ± 0.949 | 0.123 ± 0.008 |
| EtOH:H ₂ O (80:20) MAE | No | 2 | 8.12 | 0.093 ± 0.004 | 0.379 ± 0.016 | 0.082 ± 0.005 | 0.332 ± 0.022 | 4.412 ± 0.352 | 0.036 ± 0.002 |
| | Si | | 9.37 | 0.108 ± 0.013 | 0.507 ± 0.061 | 0.089 ± 0.002 | 0.417 ± 0.009 | 10.155 ± 2.790 | 0.095 ± 0.026 |
| | No | 6 | 15.57 | 0.166 ± 0.007 | 1.295 ± 0.059 | 0.479 ± 0.022 | 3.731 ± 0.173 | 6.470 ± 0.769 | 0.101 ± 0.011 |
| | Si | | 16.62 | 0.186 ± 0.043 | 1.543 ± 0.364 | 0.331 ± 0.036 | 2.753 ± 0.306 | 3.914 ± 0.287 | 0.065 ± 0.004 |
| EtOH (100) MAE | No | 2 | 2.91 | 0.089 ± 0.002 | 0.126 ± 0.080 | 0.348 ± 0.040 | 0.652 ± 0.075 | 1.012 ± 0.043 | 0.003 ± 0.001 |
| | Si | | 10.32 | 0.065 ± 0.002 | 0.139 ± 0.087 | 0.321 ± 0.033 | 0.904 ± 0.094 | 1.881 ± 0.501 | 0.008 ± 0.003 |
| | No | 6 | 8.46 | 0.096 ± 0.004 | 0.202 ± 0.125 | 0.340 ± 0.040 | 0.964 ± 0.113 | 0.593 ± 0.195 | 0.002 ± 0.000 |
| | Si | | 9.1 | 0.081 ± 0.003 | 0.191 ± 0.120 | 0.329 ± 0.033 | 1.018 ± 0.103 | 0.575 ± 0.462 | 0.002 ± 0.001 |

VIII. CONCLUSIONES

El método de extracción acuosa convencional permitió obtener la mayor cantidad de extracto liofilizado, presentando en general los mayores rendimientos con respecto al método de extracción con solventes convencional y al de la extracción asistida por microondas. Sin embargo, los contenidos en FT, TC y AT fueron bajos. Se propone poner especial atención a la temperatura de extracción.

La mezcla de disolventes Etanol-Acetato de etilo-Agua es una propuesta que puede modificarse para la recuperación de FT además de que favoreció la recuperación de TC y permitió obtener mayores cantidades de extracto en la MAE.

De acuerdo con la más alta recuperación de FT obtenida mediante MAE (Etanol-Agua 80:20), AT con Etanol-Agua (50:50) y (80:20) y para TC Etanol-Agua (80:20) se sugiere la mezcla de EtOH-H₂O para el uso de MAE para la recuperación de CF del bagazo de uva.

Se propone que el empleo de ultrasonido se estudie a profundidad como un método de extracción debido a que la sonicación en este estudio aumentó las concentraciones de CF.

En general, las condiciones de extracción mediante los diferentes métodos ofrecen distintas alternativas de recuperación donde MAE presenta potencial para ser utilizado como un método de bajo impacto ambiental.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ademiluyi AO, Akpambang VOE, Oboh G. 2009. Polyphenol contents and antioxidant capacity of tropical clove bud (*Eugenia aromatica* Kuntze). *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 86:131–137.

Afanasév IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. 38:1763–1769.

Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim Y, Park KP. 2002. Antioxidant activity of persimmon and grape seed extracts: in vitro and in vivo. *Nutrition Research*. 22:1265–1273.

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84:551–562.

Anastas PT, Warner JC. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York. p 344.

Ashraf-Khorassani M, Taylor LT. 2004. Sequential fractionation of grape sedes into oils, polyphenols and procyanidins via a single system employing CO₂-based fluids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2440-2444.

Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:4505–4515.

Bibbio FO, Mercadante AZ. 2008. Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In F.O Bobbio, y A. Z Mercadante (Eds). Food Colorants: Chemical and functional properties. Boca Raton: CRC Press. Vol 1. pp 241-276

Bogs J, Ebadi A, McDavid D, Robinson SP. 2006. Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiology*. 140:279–291.

Bohm BA. 1998. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. p 503

Bouchard J, Nguyen TS, Chornet E, Overend RP. 1991. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity. *Bioresource Technology*. 36: 121–131.

Bourne L, Rice-Evans C. 1997. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods Enzymology*, 299: 91-106.

Bourzeix M, Weyland D, Heredia N. 1986. Etude des catéquinaes et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de L'OIV*. pp 669-670, 1171-1253.

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

Brovillard R, George F, Foungerouse A. 1997. Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors*. 6(4):403-10.

Campos L, MAS, Leimann FV, Pedrosa RC, Ferreira SRS. 2008. Free Radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99:8413-8420.

Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur A, Arroyo P. 2001. Nutriología Médica. Editorial Médica Panamericana. 1era. Reimpresión. México. p 719.

Casazza AA, Aliakbarian B, Mantegna S, Cravotto G, Perego P. 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. Journal of Food Engineering, 100(1):50-55.

Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, Del Río JA. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of Flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48:1738-1745.

Cheyrier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. American Journal of Clinical Nutrition. 81: 223s-229s.

Ciolino H, Daschner P, Yeh G. 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that effect cyp 1 alpha 1 transcription differentially. Biochemical Journal. 340: 715-722.

Clifton PM. 2004. Effect of Grape Seed Extract and Quercetin on cardiovascular and Endothelial Parameters in High-Risk Subjects. Journal of Biomedicine Biotechnology. 5:272-278.

Croft, K. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoides and phenolic acids. Annals of the New York Academy of Sciences, 854: 435-442.

Dallinger D, Kappe O. 2007. Microwave-Assisted Synthesis in Water as Solvent. Chemical Reviews, 107:2563-2591.

De la Hoz A, Díaz-Ortiz A, Moreno A. 2005. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. Chemical Society Reviews. 34:164-178.

Del Carpio-Jiménez X, Serrano FC, Giui. 2009. Caracterización de las antocianinas del los frutos de *Berberis Boliviana* Lechler. Revista de la Sociedad Química del Perú. 75(1):76-85.

Deshpande SS, Cheryan M. 1985. Evaluation of Vainillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. Journal of Food Science. 50:905-910

Díaz MS, Pérez O. 2001. En la búsqueda de los compuestos polifenólicos responsables de la capacidad antioxidante del vino. Proyecto vino, ciencia y salud. 5(2):1-3.

Domínguez H, Torres JL, Núñez MJ. 2001. Antioxidant phenolics as food additives from agricultural wastes. Polyphenols Actualites. 21:26–30.

Dreosti I. 1996. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. Nutrition Reviews. 54:S51-S58.

Espin, JC, Morales M, Varon R, Tudela J, y García-Casanovas F. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenoloxidase, Analytical Biochemistry, 43:2807-2812 (1995).

FAO/STAT. 2010. www.fao.org Fecha de consulta Noviembre 2011.

Felizón B, Fernández-Bolaños J, Heredia A, Guillén R. 2000. Steam-explosion pre-treatment of olive cake. Journal of the American Oil Chemists' Society. 77:15–22.

Ferro-Luzzi A, Serafini M. 1995. Polyphenols in our diet ¿do they matter? Nutrition. 11(4):399-400.

Flanzy C. 2000. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Ediciones Mundi -Prensa. 2ª edición. Madrid, España. pp 63,114-120, 237, 258-260,659, 699-707.

Galijatovic A, Walle U, Walle T. 2000. Introduction of UDP-glucuronosyl-transferase por los flavonoides crysin and quercetina en Caco-2-cells. *Pharmaceutical Research* 17:21-26.

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. 85-104 pp.

Garrote G, Cruz JM, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. 2004. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*. 15:191-200.

Gasull E, Becerra D. 2006. Characterization of Polyphenyloxidase Extracted from Pears (cv. *Packam's Triumph*) and Apples (cv. *Red Delicious*). *Información Tecnológica*. 17(6):69-74.

Göktürk BN, Özkanb G, Sagdic O. 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts, *Food Control*. 15:335–339.

Göktürk BN, Gülcan ÖG, Yaşarc S. 2007. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food. Chemistry* 18:1131-1136.

Gonçalves R, Mateus N, Pianet I, Laguerre M, De Freitas V. 2011. Mechanisms of tannin-induced trypsin inhibition: a molecular approach. *Langmuir*. 21:13122-13129.

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. *Poultry Science* 86:508-16.

Halliwel B. 1999. Establish the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition Reviews*. 57:104-113.

Harborne JB. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics*. London:Academic Press. pp 1–28.

Harborne JB. 1999. The Flavonoids Advances in research Since 1986 (The antocyanins) E.U.A. Ed. Chapman, Hall-Crc, pp 23-34.

Harborne JB, Baxter H, Moss GP. 1999. *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor & Francis (2nd ed.) London. p 319

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572–584.

Hollman PCH, Katan MB. 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 37:937–942.

Hoogenboom R, Wilms TFA, Erdmenger T, Schubert US. 2009. Microwave-Assisted Chemistry: a Closer Look at Heating Efficiency. *Australian Journal of Chemistry*. 62:236-243.

Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*. 73(3):285-290

Jin-Ming K, Lian-Sai Ch. 2003. Analysis and biological activities of antocyanins. *Phytochemistry*. 64:923-933.

Kähkönen MJ, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauna JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:3954–3962.

Kähkönen M, Copia AI, Heinonen M. 2001. Berry fenolics and their Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:4076-4082.

Katiyar SK. 2008. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition and Food Research*. 52(Suppl 1):S71–S76.

Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. 2008. Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*. 60(Suppl 1):2–11.

Kennedy J, Troup G, Pilbrow J, Hutton D, Hewitt D, Hunter C, Ristic R, Iland P, Jones G. 2000. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 6:244-254.

King A, Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2) : 213-218.

Kong JM, Chiam LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard C. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933.

Korycka-Dahl M, Richardson T. 1980. Initiation of Oxidative Changes in Foods. *Journal of Dairy Science*. 63(7):1181-1198.

Larhed M, Olofsson K. 2006. *Microwave Methods in Organic Synthesis*. Ed. Springer, Berlin Vol. XII. pp 266, 289

Leadbeater NE. 2010. *Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry*, Ed. N E. CRC Press, Boca Raton. pp 503-517.

Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. 2005. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 88(5):1269-1278.

Li Y, Skouroumounis GK, Eley GM, Taylor DK. 2011. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed Polyphenols. *Food Chemistry*. 129:(15), 570–576.

Loupy A. 2006. *Microwaves in Organic Synthesis*. Chem. Int. Ed., Wiley-VCH, Weinheim-Alemania. 2º edición. 42: 2334–2335.

Luthria DL, Pastor-Corrales, MA. 2006. Phenolic acids profiles of beans commonly consumed in United States. *Bean Improvement Cooperative Annual Report*, 49:6-7.

Main JH, Clydedale FM, Francis FJ. 1978. Spray drying anthocyanin concentrates for use as food colorants. *Journal of Food Science*. 43:1693.

Manach C, Morad C, Crespy V, Demigne C. 1998. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidants properties. *FEBS Letters*. 426(3):331-6.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747.

Manach C, Mazur A, Scalbert A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinions in Lipidology*.16:77–84.

Martínez D, Pocurull E, Marcé RM, Borrull F, Calull M. 1996. Comparative study of the use of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for determination of phenolic compounds in water samples. *Chromatographia*, 43, 619-624.

Mathews C, Holde KE, Ahern K. 2002, *Bioquímica*. Editorial Pearson. 3ra edición. España. pp 583-621.

Mennen L, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A. 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81:326S–9S.

Merken HM, Beecher GR. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:577–599.

Meyer J, Hernández R. 1970. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *Am. Journal of Enology and Viticulture*. 21(4):184-188.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52:673–751.

Miranda R, Penieres J, Obaya A, Velasco B, Palma A, Frontana B, Nicolas M, Vargas Y, Martínez J, Hernández O, Reyes L, Llano M, Dosal M, Arroyo G, Noguez M, Ríos M, Morales M. 2011. *Química Verde Experimental*. México. UNAM. p 251

Morales M, Martínez J, Reyes-Sánchez L, Hernández O, Arroyo G, Obaya A, Miranda R. 2011, ¿Qué tan verde es un experimento? *Educación Química*. 22(3):240-348.

Moure A, Cruza JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2):145-171.

Murga R, Ruiz R, Beltrán S, Cabezas J. 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:3408-3412.

Muñoz de la Cruz FC. 2009. Caracterización fisicoquímica, nutracéutica y sensorial del extracto acuoso de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*). Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 51-52.

Murthy KNC, Singh RP, Jayaprakasha GK. 2002. Antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:5909–5914.

Nagendran B, Kalyana S, Samir S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99. 191–203.

Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT. 2007. Hot pepper (*Capsicum annuum*, *Tepin* and *Capsicum chinese*, *Habanero*) prevents Fe²⁺ + -induced lipid peroxidation in brain: *in vitro*. *Food Chemistry*. 102:178–185.

Ohta T, Yamasaki S, Egashira Y, Sanada H. 1994. Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42:653–656.

Onyeneho SN, Hettiarachchy NS. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:1496–1500.

Orzechowski A, Ostaszewski P, Jank M, Berwid SJB. 2002. Bioactive substances of plant origin in food-impact on genomics. *Reproduction Nutrition Development*. 42: 461-477

Ozkan G, Sagdic O, Göktür BN, Kurumahmutoglu Z. 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of Science of Food Agriculture*. 84(14):1807-1811.

Paladino SC, Zuritz CA. 2011. Antioxidant grape seed (*Vitis vinifera* L.) extracts: efficiency of different solvents on the extraction process. *Rev. FCA UNCUYO*. 43(1):187-199.

Papanga G, Miller N, Rice-Evans CA. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research*. 30(2):153-2.

Patsias J, Papadopoulou-Mourkidou E. 2000. Development of an automated on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices. *Journal of Chromatography*. 904:171-188.

Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. 2006. Antimutagénic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:4557-4567.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63:1035–1042.

Philip T. 1974. An anthocyanin recovery system from grape wastes. *Journal of Food Science*. 39:859-890.

Pizzi A. 2006. Recent developments in eco-efficient bio-based adhesives for wood bonding: opportunities and issues. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 20 (8):829–846.

Porter LJ. 1989. Tannins. En: *Methods in plant biochemistry: Plant Phenolics*. JB. Harborne (Ed). London:Academic Press. Vol. 1. pp 389–419

Proestos CN, Choriantopoulos GJ, Nychas E, Komaitis M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 53:1190-1195.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*.90: 494–507.

Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Souquet JM, Labarbe B, Le Guerneve C, Cheynier V, Moutounet M. 2000.

Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(4):1076–1080.

Randhir R, Lin YT, Shetty K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 13:295–307.

Rayne DE. 2004. Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry*. 78:3997-4004.

Reed J. 2010. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*. 73:1516-1528.

Rein M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanin. Doctoral dissertation. University of Helsinki, Helsinki, FI. p 87.

Revilla E, Ryan JM. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*. 881:461–469.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20:933-956.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66:401-436.

Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 51:2866-2887.

Rocha-Guzmán NE, Herzog A, González-Laredo RF, Ibarra-Pérez FJ, Zambrano-Galván G, Gallegos-Infante JA. 2007. Antioxidant and mutagenic activity of

phenolic compounds in three different color groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 103:521-527.

Rodríguez de Sotillo D, Hadley M, Holm ET. 1994. Phenolics in aqueous potato peel extract: extraction, identification and degradation. *Journal of Food Science*. 5:649–651.

Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procianidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:1460-1464.

Samman S, Lyons Wall PM, Cook NC. 1998. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In C. A. Rice-Evans & L. Packer (Eds.), *Flavonoids in health and disease* New York: Marcel Dekker. pp 469–482.

Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130:2073S-2085S.

Seeram N, Nair MG. 2002. Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:5308–5312.

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

Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. 1998. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in human. *Journal of Nutrition*. 128(6):1003-7.

Shahidi F, Naczki M. 1995. Sources, chemistry, effects, applications. *Food Phenolics*. pp 281-319.

Sreemantula S, Nammi S, Kolanukonda R, Koppula S, Boini KM. 2005. Adaptogenic and Nootropic Activities of Aqueous Extract of *Vitis Vinifera* (grape

seed): an experimental study in rat model. *Bio Med Central. Complementary and Alternative Medicine*. 5:1

Steyn WJ, Holcroft DM, Wand SJE, Cooks NC, Jacobs G. 2000. Dating Rosemarie: How to make her blush?. *Proceedings of the Cape Promological Association Symposium*. South Africa. pp 55-62.

Strack D, Wray V. 1986. *Flavonoids: Advances in research since J.B.Harborne (ed)*. Published in 1993 by Chapman & Hall, London. pp 1-22

Strack D, Wray V. 1989. *En Methods in Plant Biochemistry*. J.B.Harborne (ed). Academic Press, London, Vol 1. pp. 325-456.

Thorngate JH, Singleton V. 1994. Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45:259-262.

UNAM, Hojas de Seguridad IV. Facultad de Química. www.química.unam.mx/IMG/pdf/4acetona.pdf; [/ácidoacetico.pdf](http://www.química.unam.mx/IMG/pdf/ácidoacetico.pdf); [/acetatodeetilo.pdf](http://www.química.unam.mx/IMG/pdf/acetatodeetilo.pdf); [/etanol.pdf](http://www.química.unam.mx/IMG/pdf/etanol.pdf).

Van Acker SABE, Van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van der Vijgh WJF. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*.20: 331–342.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 46:4113-4117.

Wang C, Mehendale SR, Yuan C. 2007. Commonly Used Antioxidant Botanicals: Active Constituents and their Potential Role in Cardiovascular Illness. *The American Journal of Chinese Medicine*. 35(4):543–558.

Wang JN, Chen YJ, Hano Y, Nomura T, Tan RX. 2000. Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurensis* in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(7):633–636

Waterman PG, Mole S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. pp 44-55

Wren A, Cleary M, Frantz C, Melton S, Norris L. 2002. 90-day toxicity study of a grape seed extract(IH636) in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:2180 – 2192.

Yemis O, Bakkalbasi E, Artik N. 2008. Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. *International Journal of Food Science & Technology* 43:154–159.

Yilmaz Y, Toledo R. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, Epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:255 -260.

Zheng X, Wang X, Lan Y, Shi John, Xue SJ, Liu C. 2009. Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds. *Separation and Purification Technology*. 70(1): 34-40.

ANEXO 1. Tablas de ANOVA

Tabla de ANOVA de FT para la extracción acuosa convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| EficAcuososFT | Inter-grupos | .066 | 5 | .013 | 40.482 | .000 |
| | Intra-grupos | .007 | 22 | .000 | | |
| | Total | .073 | 27 | | | |
| RendAcuososFT | Inter-grupos | 10319.423 | 5 | 2063.885 | 302.797 | .000 |
| | Intra-grupos | 149.953 | 22 | 6.816 | | |
| | Total | 10469.376 | 27 | | | |

Tabla de ANOVA de TC para la extracción acuosa convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| EficAcuososTC | Inter-grupos | .000 | 5 | .000 | 4.054 | .009 |
| | Intra-grupos | .000 | 22 | .000 | | |
| | Total | .000 | 27 | | | |
| RendAcuososTC | Inter-grupos | 288.965 | 5 | 57.793 | 97.268 | .000 |
| | Intra-grupos | 13.072 | 22 | .594 | | |
| | Total | 302.037 | 27 | | | |

Tabla de ANOVA de AT para la extracción acuosa convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| EficAcuososAT | Inter-grupos | .797 | 5 | .159 | 11.561 | .000 |
| | Intra-grupos | .193 | 14 | .014 | | |
| | Total | .990 | 19 | | | |
| rendAcuososAT | Inter-grupos | .460 | 5 | .092 | 109.445 | .000 |
| | Intra-grupos | .012 | 14 | .001 | | |
| | Total | .472 | 19 | | | |

Tabla de ANOVA de FT para la extracción orgánica convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| EficOrganFT | Inter-grupos | .054 | 5 | .011 | 192.826 | .000 |
| | Intra-grupos | .001 | 18 | .000 | | |
| | Total | .055 | 23 | | | |
| RendOrganFT | Inter-grupos | 196.324 | 5 | 39.265 | 124.577 | .000 |
| | Intra-grupos | 5.673 | 18 | .315 | | |
| | Total | 201.998 | 23 | | | |

Tabla de ANOVA de TC para la extracción orgánica convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| EficOrganTC | Inter-grupos | .034 | 5 | .007 | 19.846 | .000 |
| | Intra-grupos | .006 | 16 | .000 | | |
| | Total | .040 | 21 | | | |
| RendOrganTC | Inter-grupos | 35.281 | 5 | 7.056 | 32.864 | .000 |
| | Intra-grupos | 3.435 | 16 | .215 | | |
| | Total | 38.717 | 21 | | | |

Tabla de ANOVA de AT para la extracción orgánica convencional y por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| EficOrganAT | Inter-grupos | 10.129 | 5 | 2.026 | 7.819 | .000 |
| | Intra-grupos | 4.664 | 18 | .259 | | |
| | Total | 14.793 | 23 | | | |
| RendOrganAT | Inter-grupos | .329 | 5 | .066 | 83.468 | .000 |
| | Intra-grupos | .014 | 18 | .001 | | |
| | Total | .343 | 23 | | | |

Tabla de ANOVA de FT para las extracciones por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-----------|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| EficMAEFT | Inter-grupos | .106 | 19 | .006 | 19.215 | .000 |
| | Intra-grupos | .017 | 60 | .000 | | |
| | Total | .123 | 79 | | | |
| RendMAEFT | Inter-grupos | 11.120 | 19 | .585 | 40.878 | .000 |
| | Intra-grupos | .859 | 60 | .014 | | |
| | Total | 11.979 | 79 | | | |

Tabla de ANOVA de TC para las extracciones por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-----------|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| EficMARTC | Inter-grupos | 1.599 | 19 | .084 | 160.363 | .000 |
| | Intra-grupos | .030 | 58 | .001 | | |
| | Total | 1.629 | 77 | | | |
| RendMAETC | Inter-grupos | 64.030 | 19 | 3.370 | 210.932 | .000 |
| | Intra-grupos | .927 | 58 | .016 | | |
| | Total | 64.956 | 77 | | | |

Tabla de ANOVA de AT para las extracciones por microondas

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-----------|--------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| EficMAEAT | Inter-grupos | 881.426 | 19 | 46.391 | 67.971 | .000 |
| | Intra-grupos | 38.221 | 56 | .683 | | |
| | Total | 919.647 | 75 | | | |
| RendMAEAT | Inter-grupos | .096 | 19 | .005 | 71.034 | .000 |
| | Intra-grupos | .004 | 56 | .000 | | |
| | Total | .100 | 75 | | | |