



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS
FENOLICOS DEL BAGAZO DE UVA CARIGNAN
(*Vitis vinífera* L.) PARA SU USO EN UNA MATRIZ
POLIMERICA BIODEGRADABLE.

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

SARAI AGUSTIN SALAZAR

Hermosillo, Sonora, México

22 de Enero de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS
FENÓLICOS DEL BAGAZO DE UVA CARIGNAN (*Vitis vinífera* L.) PARA SU USO
EN UNA MATRIZ POLIMÉRICA BIODEGRADABLE**

TESIS

**Para obtener el grado de:
MAESTRO EN BIOCENCIAS**

Presenta:

I.Q. SARAI AGUSTIN SALAZAR

Hermosillo, Sonora

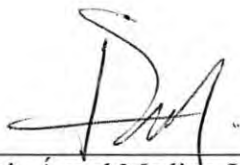
Enero de 2013.

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del bagazo de uva Carignan (*Vitis vinifera* L.) para su uso en una matriz polimérica biodegradable” presentada por I.Q. Sarai Agustín Salazar, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dra. Nohemí Gámez Meza
Directora de tesis



Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Asesor



Dra. Herlinda Soto Valdez
Asesor externo

DEDICATORIA

A mis padres: **María e Ildefonso**

Quienes con amor y cuidado me han enseñado a ser un instrumento de gloria, por su inmensurable apoyo y confianza. De todo corazón, siempre gracias.

A mis hermanos: **Eliezer y Othoniel**

Quienes han compartido conmigo las experiencias de la vida, la fidelidad y amor de una familia, y el sentido de vivir.

A todos los soñadores, que como yo, han dejado atrás las aparentes limitaciones para alcanzar aquello que ha surgido en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al único y sabio **EL OLAM** (Dios Eterno), porque hasta aquí me ha bastado Tu Misericordia y me ha sostenido Tu Diestra.

Quiero en estas líneas expresar mi más sincero agradecimiento, porque hubiese sido imposible que este trabajo tenga un buen término de no ser por las personas e instituciones que me han brindado un poco de sí mismos.

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora**, por la oportunidad de desarrollar este trabajo y la superación obtenida dentro de sus instalaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo brindado durante este período.

A mi directora de tesis, **Dra. Nohemí Gámez Meza**, por invitarme a ser parte de este proyecto, por su apoyo y confianza, y su capacidad para hacer posible la madurez en mis jóvenes ideas.

A mi asesor y coordinador del Posgrado en Biociencias, **Dr. Luis Ángel Medina Juárez**, por su apoyo y arduo trabajo durante todo el proyecto.

A mi asesora, **Dra. Herlinda Soto Valdez** (CIAD), por su invitación y confianza al invitarnos a ser parte de este proyecto.

A todos los académicos de la Universidad de Sonora, que durante mi estancia en ella me han proporcionado conocimiento y experiencias únicas.

A mis compañeros y amigos, **Dulce Molina, Francisca Manzanarez, Karina Blanco, Lucía Pérez y Sarai Rochin**, quienes conocen y compartieron conmigo el tiempo de este arduo trabajo; **Alfonso García, Hiessu García, Marco Hernández y Ramón Flores**, quienes han compartido su tiempo, risas y aventuras conmigo.

Al **Instituto de Química y Tecnología de los Polímeros**, por darme la oportunidad de trabajar junto a tantos excelentes investigadores y conocer la maravillosa Pozzuoli (Italia).

Al **Dr. Pierfrancesco Cerruti**, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por ser un gran instructor pero también un gran amigo, por todos los consejos, las sonrisas y el conocimiento que he encontrado en él. También a su maravillosa familia, que tuvo cuidado de mí durante mi estancia en la ciudad de Nápoles (Italia). A **Ana**, y sus pequeños, **Arianna** y **Alessandro**, son un recuerdo muy especial para mí.

A todo el equipo de colaboración que me ayudó durante mi estancia en Italia, **Dr. Mario Malinconico**, **Dra. Barbara Immirzi**, **Gabriella Santagata** y **Luigi Calandrelli**.

Al **Dr. Gianluca Anzelmo** por su gran apoyo en el Instituto de Química Biomolecular.

A todos los investigadores y amigos del ICTP, **Valentina Marturano**, **Roberto Avolio**, **Irene Bonadies**, **Mariacristina Cocca**, **Maria Laura Di Lorenzo**, **Donatella Duraccio**, **Giovanna Gomez d’Ayala**, **Paola Persico**, **Maria Cristina Straccia**, **Maria Emanuela Errico**, **Raffaele Corvino**, **Maria Assunta Basile**, **Antonella Marra**, **Gennaro Scarinzi**, **Lorena Affatato**, **Veronica Ambrogio**, **Mario Abbate**, **Antonio Lahoz** e **Vincenzo Di Liello**, por la fortuna de compartir con ustedes todas las jornadas, los llevo en el corazón.

A **Sendero de Vida**, mi casa en Hermosillo y al ministerio ejercido por el **Rev. Carlos Mexía Escalante**, cuyas oraciones las encuentro trascendentales en la conclusión de este trabajo y en mi propia vida.

Al **Ministerio de Secondigliano**, donde he encontrado una segunda casa. Al **Rev. Michelle Romeo**, las familias **Romeo**, **Flaminio** y **Parisi**, que junto a otros han abierto las puertas de su casa para mí con tanto amor.

A **Christian** y **Jessica**, que no son una coincidencia en mi vida, sino un milagro!

A **Gianluca** y **Loredana**, que junto a **Gianna** y familia, me han hecho sentir como una hija amada, realmente son muy especiales para mí!

A **Vanessa** y **Luana**, cuya amistad la encuentro irremplazable!

Una página no basta para mencionar a los tantos que he conocido y me han hecho avanzar un poco cada vez, sus nombres están en mi corazón, porque los llevo conmigo a donde sea que voy. Gracias!

RINGRAZIAMENTI

All'**Eterno**, perché finora mi ha sostenuto la Tua Misericordia e la Tua Destra mi salva ancora.

Voglio esprimere in queste righe la mia sincera gratitudine, perché sarebbe stato impossibile avere una buona il successo di questo lavoro se non avessi avuto persone e istituzioni che mi hanno aiutato.

Al **Dipartimento di Ricerca Scientifica e Tecnologica dell'Università di Sonora**, per l'opportunità di sviluppare questo lavoro.

Al **Consiglio Nazionale della Scienza e della Tecnologia**, per il supporto durante questo periodo.

Al mio relatore di tesi, la **Dott.ssa. Nohemí Gámez Meza**, per la fiducia nel mio lavoro e la sua capacità di ottenere la maturità dalle mie idee giovani.

Al mio consulente e coordinatore di Laurea in Bioscienze, il **Dott. Luis Ángel Medina Juárez**, per il suo supporto ed il duro lavoro nel corso del progetto.

Alla mia consulente, la **Dott.ssa. Herlinda Soto Valdez (CIAD)**, per l'invito e la fiducia data per far parte di questo progetto.

A tutto il personale dell'Università di Sonora, che durante il mio soggiorno in esso mi ha fornito conoscenze ed esperienze.

Ai miei colleghi e amici, **Dulce Molina, Francisca Manzanarez, Karina Blanco, Lucía Pérez e Sarai Rochin**, che hanno condiviso con me tanti momenti di duro lavoro. **Alfonso Garcia, Hiessu Garcia, Marco Hernandez e Ramon Flores**, che hanno condiviso il loro tempo, risate ed avventure con me.

All'**Istituto di Chimica e Tecnologia dei Polimeri (ICTP)**, per avermi dato l'opportunità di lavorare nei loro laboratori a Pozzuoli (Napoli, Italia), insieme a molti eccellenti ricercatori.

Al mio tutor, **Dott. Pierfrancesco Cerruti**, per avermi dato l'opportunità di lavorare al suo fianco, per essere un grande capo ma anche un grande amico, per tutti i consigli, i sorrisi e la conoscenza che ho trovato in lui. Ad **Anna, Arianna** ed **Alessandro**, sono un ricordo molto speciale per me.

All'intera squadra di collaborazione che mi ha aiutato durante il mio soggiorno in Italia, **Dott. Mario Malinconico, Dott.ssa. Barbara Immirzi, Dott.ssa Gabriella Santagata** e **Dott. Luigi Calandrelli**.

Al **Dott. Gianluca Anzelmo** per il grande aiuto all'**Istituto di Chimica Biomolecolare**, e per farmi conoscere un po' di Pozzuoli.

Ai tutti i ricercatori e amici all'ICTP, **Valentina Marturano, Roberto Avolio, Irene Bonadies, Mariacristina Cocca, Maria Laura Di Lorenzo, Donatella Duraccio, Giovanna Gomez d'Ayala, Paola Persico, Maria Cristina Straccia, Maria Emanuela Errico, Raffaele Corvino, Maria Assunta Basile, Antonella Marra, Gennaro Scarinzi, Lorena Affatato, Veronica Ambrogi, Mario Abbate, Antonio Lahoz** e **Vincenzo Di Liello**, per la fortuna di condividere insieme a voi tutte le giornate, vi porto nel cuore.

A **Sendero de Vida**, la mia casa in Hermosillo e anche all' ministero dell' **Past. Carlos Mexía Escalante**, le loro preghiere sono state molto importante, per la conclusione di questo lavoro e anche nella mia vita.

All' **Ministero di Secondigliano** rappresentato dall' **Past. Michelle Romeo**, dove ho trovato una seconda casa, anzi mi hanno adottato come se fossi una di loro.

Alle famiglie **Romeo, Flaminio** e **Parisi**, che insieme ad altri mi hanno ospitato e aperto per me con tanto amore la loro casa.

A **Christian** e **Jessica**, che non sono una coincidenza nella mia vita, anzi sono un miracolo.

A **Gianluca** e **Loredana**, insieme a **Gianna** e famiglia, mi avete fatto sentire come una figlia amata, sono veramente speciali per me.

A **Vanessa** e **Luana**, che sono le sorelle che non avevo mai.

Una pagina non basta per dire tutti i nomi, ma lo sa il mio cuore, perché vi porto con me dovunque vado. Voglio dire ancora grazie, Dio vi benedica grandemente.

RESUMEN

El bagazo de uva (BI) es un deshecho que se produce después del prensado o de la fermentación de la uva, generándose cantidades enormes de este subproducto sin uso eficiente. Con el fin de aprovechar este residuo industrial se planteó el siguiente objetivo: investigar el efecto de los sistemas de solventes sobre la extracción de los compuestos fenólicos, a partir del bagazo de uva y sus componentes individuales (semilla, cáscara y pedúnculo), así como su capacidad antioxidante, por métodos químicos y en un matriz polimérica de PLA. En la primera etapa del estudio se obtuvieron extractos de BI así como de sus componentes individuales. A los extractos fenólicos se les determinaron los totales de: fenoles (FT), flavonoides (FvT), antocianinas monoméricas, carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos; así como la capacidad antioxidante (CA). La segunda etapa se realizó en el Instituto de Química y Tecnología de los Polímeros (Italia), donde se analizaron los extractos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis térmico diferencial (DTA) y de termogravimetría (TG). Se elaboraron las películas de ácido poliláctico (PLA) con BI (1 y 3% p/p). Se evaluó la variación del peso molecular (Mw), propiedades mecánicas y espectroscopia infrarroja (FTIR), bajo condiciones de foto oxidación acelerada. En los resultados obtenidos, la extracción de FT mayor se obtuvo con MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) y EtOH:agua (6:4), expresado como equivalentes de ácido clorogénico (EAC). Los FT en los constituyentes de BI variaron en los intervalos 3.80-10.40 gEACkg⁻¹ para semilla, 2.71-6.51 gEACkg⁻¹ para cáscara y 2.90-5.07 gEACkg⁻¹ para pedúnculo. La mayor concentración de FvT y CA se obtuvieron con EtOH:agua (7:3) 1.2M (HCl) y MeOH:agua (6:4) 1.2M (HCl). Se encontraron en los extractos de BI y sus constituyentes al ácido clorogénico, catequina, epicatequina, resveratrol, rutina, quercetina y miricetina. La incorporación del extracto del bagazo logró reducir la velocidad de foto oxidación del PLA, por lo que se visualiza como un buen aditivo para el PLA.

ABSTRACT

The grape bagasse (BI) is a waste that occurs after pressing or the fermentation of grapes, generating enormous amounts of this product without efficient use. To take advantage of this industrial waste the following objective were proposed: investigate the effect of solvent systems for the extraction of phenolic compounds from grape bagasse (BI) and its individual constituents (seed, skin and peduncle), as well as evaluating the antioxidant capacity by chemicals methods and in a PLA polymer matrix. In the first step of this study BI extracts were obtained, without pre-treatment of drying or washing, using different solvent systems, as well from its individual constituents. Totals of phenols (TP), flavonoids (TF), monomeric anthocyanins, carbohydrates, protein and uronic acids were determined, as well as antioxidant capacity (AC). The second step was performed in the Institute of Chemical and Tecnology of Polymers (Italy), were determined the differential scanning calorimetry (DSC), differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetric (TG) . PLA films were produced adding BI (1% and 3% w/w). The films were evaluated by the variation of the molecular weight (Mw), mechanical properties and IR spectroscopy, under accelerated degradation by photooxidation conditions. In the obtained results, higher TP extraction was achieved with MeOH:water:ACE (3:3.5:3.5) and EtOH:water (6:4), expressed as chlorogenic acid equivalents (CAE). TP varied in the BI constituents in the ranges 3.80-10.40 g CAE kg⁻¹ for seed, from 2.71-6.51g CAE kg⁻¹ for skin and 2.90-5.07g CAE kg⁻¹ for peduncle. The largest concentration of TP and AC were obtained with EtOH:water (7:3) 1.2M (HCl) and MeOH:water (6:4) 1.2M (HCl). Chlorogenic acid, catechin, epicatechin, resveratrol, rutin, quercetin and myricetin were found in all extracts of bagasse and its constituents. Incorporation of bagasse extract was able to reduce the velocity of PLA photooxidation, displayed it as a good additive for PLA.

ABSTRACT (versione italiana)

La vinaccia (BI) è un prodotto di scarto che si ottiene dopo la spremitura e la fermentazione delle uve, che si genera in enormi quantità e non trova un utilizzo efficace. Per trarre vantaggio da questo tipo di rifiuto agroindustriale, (in questo studio) è stato proposto il seguente obiettivo: studiare l'effetto di differenti sistemi di solventi per l'estrazione di composti fenolici da vinaccia (BI) e dai suoi singoli componenti (semi, buccia e peduncolo), nonché la valutazione della capacità antiossidante con metodi chimici e in una matrice polimerica di acido polilattico (PLA). Nella prima fase di questo studio sono stati ottenuti estratti di BI nonché dai suoi singoli costituenti, senza pre-trattamento di essiccazione o di lavaggio, utilizzando diversi sistemi solventi. Il contenuto totale di composti fenolici (FT), flavonoidi (FvT), antociani monomerici, carboidratici, proteine e acidi uronici, è stato determinato, così come la capacità antiossidante (CA). La seconda fase è stata eseguita presso l'Istituto di Chimica e Tecnologia dei Polimeri del Consiglio nazionale delle Ricerche (Italia), dove l'estratto di BI è stato caratterizzato mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termica differenziale (DTA) e termogravimetrica (TG). Film di PLA additivato sono stati prodotti aggiungendo BI (1% e 3% p/p). I film sono stati caratterizzati mediante analisi termica, e seguendo le variazioni di peso molecolare (M_w), delle proprietà meccaniche e dell'assorbimento all'infrarosso (FTIR), in condizioni di degradazione fotoossidativa accelerata. Dai risultati ottenuti, la maggiore estrazione di FT, espresso come equivalenti di acido clorogenico (EAC), è stata ottenuta con una miscela MeOH:acqua:ACE (3:3.5:3.5) e EtOH:acqua (6:4). FT varia nei costituenti di BI negli intervalli 3,80-10,40 g EAC kg⁻¹ per i semi, 2,71-6,51g EAC kg⁻¹ per le bucce e 2,90-5,07g EAC kg⁻¹ per il peduncolo. La maggiore concentrazione di FT e CA è stata ottenuta con EtOH:acqua (7:3) 1,2M (HCl) e MeOH:acqua (6:4) 1,2M (HCl). Acido clorogenico, catechina, epicatechina, resveratrolo, rutina, quercetina e miricetina sono stati trovati in tutti gli estratti di vinaccia e dei suoi componenti. L'incorporazione dell'estratto di vinaccia è stato in grado di ridurre la velocità di fotoossidazione del PLA, dimostrandosi un buon additivo per il PLA.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RINGRAZIAMENTI	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
ABSTRAC (versione italiana)	<i>xi</i>
ÍNDICE GENERAL	<i>xii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xv</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>xvii</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
1.1 Generalidades	4
1.2 El Cultivo de Uva en México	5
1.2.1 Regiones de cultivo de uva en México	8
1.2.2 Cultivo de uva en Sonora	9
1.3 La Uva: Fuente de Antioxidantes	11
1.3.1 La pulpa	13
1.3.2 La semilla	13
1.3.3 La cáscara	14
1.3.4 El pedúnculo	15
1.4 Interacción de los Compuestos Fenólicos con los Polisacáridos	15
1.5 La Industria Vitivinícola	17
1.5.1 La Industria Vitivinícola en México	21
1.6 Residuos de la Industria Vitivinícola	23
1.6.1 El bagazo de uva	25
1.6.2 Antioxidantes presentes en el bagazo de uva	29
1.7 Uso de Antioxidantes Provenientes de Residuos Industriales	34

1.8 Polímeros Biodegradables y Compuestos Antioxidantes	38
1.9 Ácido Poliláctico (PLA)	39
1.9.1 Estabilidad oxidativa del PLA	41
II. HIPOTESIS	49
III. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo General	50
3.2 Objetivos Específicos	50
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1 Materia Prima	51
4.2 Reactivos	51
4.3 Extracción de Compuestos Fenólicos	52
4.4 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (FT)	53
4.5 Ensayo de Flavonoides Totales (FvT)	53
4.6 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Individuales	53
4.7 Evaluación de la Capacidad Antioxidante (CA)	54
4.7.1 Capacidad Antioxidante por el Radical Catiónico ABTS ^{•+}	54
4.7.2 Capacidad Atrapadora de Radicales Libres por DPPH [•]	55
4.8 Determinación de Antocianinas Monoméricas Totales	55
4.9 Determinación de Carbohidratos Totales	56
4.10 Determinación de Proteínas Totales (Bio-Ray Protein Micro-Assay)	57
4.11 Determinación de Ácidos Urónicos Totales	57
4.12 Impregnación de PLA con el Extracto de Bagazo de Uva	58
4.13 Elaboración de las Películas de PLA Impregnadas con EB	58
4.14 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	61
4.15 Análisis Térmico Diferencial (DTA) y de Termogravimetría (TG)	61
4.16 Acondicionamiento de las Películas de PLA	62
4.17 Envejecimiento Acelerado: Foto-oxidación	62
4.18 Variaciones en el Peso Molecular (M_w)	66

4.19 Medición de las Propiedades Mecánicas	66
4.20 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	67
4.21 Diseño Experimental y análisis Estadístico	67
V. RESULTADOS Y DISCUSION	70
5.1 Fenoles y Flavonoides Totales	70
5.2 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Individuales por HPLC	74
5.3 Capacidad Antioxidante (CA)	81
5.4 Selección de un Sistema de Solventes y Comparación entre el Bagazo Industrial (BI) y el Bagazo de Laboratorio (BL)	83
5.5 Determinación de Antocianinas, Carbohidratos, Proteínas y Ácidos Urónicos, Totales	85
5.6 Calorimetría Diferencial de barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TG) y Térmico Diferencial (DTA)	89
5.7 Variaciones en el Peso Molecular (Mw)	98
5.8 Propiedades Mecánicas	103
5.9 Espectroscopia al Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)	108
VI. CONCLUSIONES	119
VII. RECOMENDACIONES	121
VIII. REFERENCIAS	122

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Principales países productores de uva para consumo en fresco.	6
2. Corte de una baya de uva roja.	12
3. Uva Carignan (Pedro Domecq de Hermosillo, Sonora, México).	19
4. Estrujado y despalillado de uva Carignan (Pedro Domecq de Hermosillo, Sonora, México).	20
5. Descube del mosto (primera etapa de fermentación) (Hermosillo, Sonora, México).	22
6. Principales ácidos fenólicos en bagazo de uva.	31
7. Ruta general de biosíntesis de los flavonoides.	32
8. Estructura de los principales flavonoides en bagazo de uva.	33
9. Principales flavonoides en bagazo de uva.	35
10. Estructura química del PLA.	39
11. Mecanismo de foto-oxidación del PLA.	43
12. Esquema del proceso de impregnación de PLA con el extracto de bagazo de uva.	59
13. Esquema de elaboración por extrusión de las películas de PLA adiciones con el extracto de bagazo de uva Carignan.	60
14. Esquema general de TG y DSC del extracto de bagazo de uva y las películas de PLA.	63
15. Mapa de radiación dentro de la cámara de foto-oxidación.	64
16. Análisis en los especímenes de PLA foto-oxidados.	65
17. Cromatograma de los compuestos fenólicos presentes en el BI obtenido con detector de arreglo de diodos a 320 nm.	75
18. Cromatogramas de catequina y epicatequina presentes en el BI obtenido con un detector de fluorescencia a 280 nm de excitación y 310 nm de emisión.	76
19. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales presentes en el BI extraídos con diferentes sistemas de solventes.	78
20. Compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos de BL obtenidos con EtOH:agua (6:4).	86

21. Termo-gramas DSC de las películas de PLA adicionadas con extractos de EB.	90
22. Termo-gramas DSC de las películas de PLA adicionadas con resveratrol.	92
23. Curvas TG y DTA de EB y resveratrol, bajo atmósferas de nitrógeno y aire.	94
24. Curvas TG y DTA para PLA _{0%} , PLA _{1%} y PLA _{3%} , en atmósferas de a) nitrógeno y b) aire.	95
25. Curvas TG y DTA para PLA ₇ , PLA ₁₀ y PLA ₁₁ , en atmósferas de a) nitrógeno y b) aire.	99
26. Variaciones en Mw de las películas de PLA a diferentes tiempos de foto-oxidación.	101
27. Variaciones de elongación (a), módulo de tensión (b), resistencia a la tracción (c) y límite elástico (d) para las películas de PLA a diferentes tiempos de foto-oxidación.	107
28. Espectros IR de PLA aditivado con EB a tiempo cero de foto-oxidación.	109
29. Espectros IR de PLA aditivado con EB, en el dominio 3800–2800 cm ⁻¹	110
30. Espectros IR de PLA aditivado con resveratrol, a tiempo cero de foto-oxidación.	112
31. Espectros IR de PLA aditivado con resveratrol en el dominio 3800–2800 cm ⁻¹ .	113
32. Espectros IR de PLA _{0%} a diferentes tiempos de foto-oxidación.	114
33. Espectros IR de PLA _{0%} sustraídos (F _x -F ₀), dado por la foto oxidación (dominio 1920-1800 cm ⁻¹).	115
34. Espectros IR de PLA _{0%} , PLA _{1%} y PLA _{3%} en el dominio 1900-1820 cm ⁻¹ a 305h de foto-oxidación.	117
35. Evolución de la banda de absorción a 1850 cm ⁻¹ en las películas de PLA (F _x -F ₀) por efecto de la foto-oxidación.	118

INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Cultivo de uva en México.	7
2. Regiones de cultivo de uva en el Estado de Sonora.	10
3. Comparación de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante (CA) en residuos de la industria vitivinícola.	28
4. Estudios sobre el efecto de la foto-oxidación en PLA.	46
5. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante en el BI por diferentes sistemas de solventes.	71
6. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante de los constituyentes de BI obtenidos por tres sistemas de solventes metanólicos.	73
7. Concentración de los principales compuestos fenólicos presentes los constituyentes de BI, obtenidos con diferentes sistemas de solventes (mg kg^{-1} pf).	79
8. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante en BI y BL.	84
9. Composición del extracto de bagazo de uva roja Carignan (EB)	87
10. Propiedades térmicas de las películas de PLA adicionadas con EB.	91
11. Propiedades térmicas de películas de PLA adicionadas con resveratrol.	91
12. Temperatura del 5% de pérdida de peso ($T_{5\%}$), temperatura máxima en DTA (T_{max1} y T_{max2}) y rendimiento de carga a 600°C (Char_{600}) para PLA adicionado con EB.	97
13. Temperatura del 5% de pérdida de peso ($T_{5\%}$), temperatura máxima en DTA (T_{max1} y T_{max2}) y rendimiento de carga a 600°C (Char_{600}) para PLA adicionado con resveratrol.	100
14. Valores de elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) de las películas de PLA antes su acondicionamiento térmico.	104

15. Valores de elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) para PLA0%, PLA1% y PLA3% con acondicionamiento térmico, a tiempo cero de foto-oxidación. 105
16. Valores de elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) para PLA7, PLA10 y PLA11 con acondicionamiento térmico, a tiempo cero de foto-oxidación. 106

INTRODUCCIÓN

El bagazo de uva es un subproducto de la industria vitivinícola. Este se obtiene después del prensado de la uva triturada en la elaboración del vino blanco o después de la maceración y fermentación para vino tinto. La tecnología de vinificación genera cantidades importantes de bagazo de uva sin uso sustentable (Rivera *et al.*, 2007).

Sin embargo, estudios recientes demuestran el interés por el aprovechamiento de desechos agrícolas (tal como los residuos de vinificación) como una fuente de antioxidantes de bajo costo (Spigno y De Faveri, 2007).

El bagazo de uva representa aproximadamente el 20% en peso de la uva procesada por la industria vitivinícola (De Campos *et al.*, 2008; Hogan *et al.*, 2010). En el año 2011, a nivel mundial se generaron más de 13 834 millones de toneladas (OIV, 2012). Tan solo en México, se estimó que durante el 2010 se obtuvieron 56 228.99 toneladas de bagazo (FAOSTAT, 2012).

Diversos estudios han demostrado que el bagazo de uva es una fuente natural de compuestos antioxidantes con efecto potencial como anti-hiperglucémico y anti-inflamatorio, además de efectos positivos contra diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y varios trastornos dérmicos, agentes profilácticos en caso de los déficits de memoria y bacteriostáticos (Yilmaz y Toledo, 2004b; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Huntley, 2007; Sánchez *et al.*, 2009; Hogan *et al.*, 2010; Jamshidzadeh *et al.*, 2010; Nishiumi *et al.*, 2012).

A fin de extraer los compuestos fenólicos con actividad antioxidante, se han probado diversos sistemas de solventes, encontrando que el sistema de solvente afecta significativamente el rendimiento de la extracción, el contenido fenólico y capacidad biológica de los materiales vegetales. Además, se consideran otros factores, tal como la temperatura, proporción sólido/solvente, presión y tamaño de partícula, que pueden afectar la extracción de los compuestos antioxidantes (Pinelo *et al.*, 2005a; Yilmaz y Toledo, 2004a, 2006; Pinelo *et al.*, 2006a; Pinelo *et al.*, 2006b; Rubilar *et al.*, 2007; Spigno y De Faveri, 2007; Spigno *et al.*, 2007; Guerrero *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009).

Debido a esto, no existe un conocimiento claro sobre el sistema de solventes más eficaz en la extracción de contenido fenólico de diferentes materiales así como el efecto sobre la capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, un procedimiento simple como un sólo sistema de solventes (un paso de extracción) puede dar resultados comparables a los resultados obtenidos con otros sistemas similares o más complejos (Spigno y De Faveri, 2007).

La capacidad antioxidante de extractos naturales se ha enfocado en pruebas por métodos químicos y biológicos, y su efecto como antioxidante en productos alimenticios. Actualmente se ha generado un interés por la posible aplicación de los compuestos antioxidantes de estos extractos naturales en matrices poliméricas (Cerruti *et al.*, 2009; Basile *et al.*, 2010; Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011).

En el mercado de los polímeros biodegradables utilizados para la fabricación de envases, el ácido poliláctico (PLA) es sin duda uno de los más prometedores para futuros desarrollos, ya que es biodegradable y también bio-renovable, produciéndose a partir de recursos renovables, como la remolacha azucarera y el almidón de maíz (Gardette *et al.*, 2011).

Estudios recientes muestran que estos envases pueden ser elaborados con antioxidantes naturales aditivados, con el fin de controlar las reacciones de oxidación del producto envasado (Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012).

En base a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue investigar cómo afecta el sistema de solventes a la extracción de compuestos fenólicos y a la capacidad antioxidante del bagazo de uva, así como de sus componentes individuales: semilla, cáscara y pedúnculo; además, conocer la composición fenólica del bagazo industrial en comparación con el bagazo de uva obtenido en el laboratorio; y estudiar el efecto antioxidante de los extractos fenólicos del bagazo industrial sobre una matriz polimérica biodegradable (PLA).

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

La vid pertenece al reino *Plantae* (plantas), subreino *Tracheobionta* (plantas vasculares), superdivisión *Spermatophyta* (plantas de semilla), división *Magnoliophyta* (plantas de flores), clase *Magnoliopsida* (dicotiledóneas), subclase *Rosidae*, orden *Rhamnales*, familia *Vitaceae* (familia de uvas) y género *Vitis* L. (uva) (USDA, 2012).

Las plantas de vid están constituidas en dos secciones distintivas: Sección sobre suelo (tronco, bastones y follaje) y sección subterránea (raíces) (Skelton, 2007). Tan solo en Norte América se distinguen 24 especies de *Vitis* que se diferencian de otros géneros de la familia *Vitaceae* en que los pétalos florales se mantienen unidos en el ápice separándose en la base para formar una cofia. El fruto es una baya ovoide y jugosa, es comestible y materia prima para la fabricación de vino y otras bebidas alcohólicas (USDA, 2012).

La vid se adapta a diferentes tipos de suelos. Sin embargo, las tierras ligeras, pedregosas y drenadas son las más favorables. En principio, las variedades de vid pueden agruparse en 2 grupos: viníferas y uvas de mesa. Sin embargo, algunas variedades son de utilización de forma mixta, por lo que se les pueden clasificar en tres tipos (INFOCIR, 2008):

- Uva de mesa.- se cultivan para consumo directo.
- Uva seleccionada.- cultivo cuidado para la producción de vino terminado.

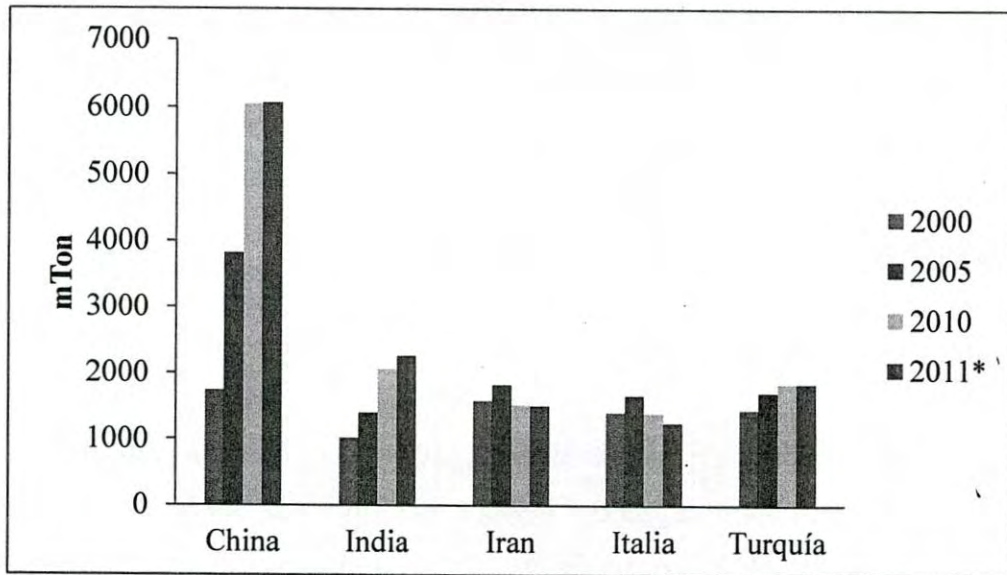


Figura 1. Principales países productores de uva para consumo en fresco. (OIV, 2012).

- Uva industrial.- destinada a la producción de brandy o vino semi-terminado.

La producción de uva en el mundo es una de las actividades agrícolas más importantes. Para el 2011 los viñedos en el mundo cubrían una superficie de 7 848 000 ha (incluyendo áreas aún no cosechadas o en producción). Dentro de los principales países productores de uva para consumo en fresco destacan China e India en la última década (Figura 1), mientras que el primer lugar en producción de uva pasa es ocupado por Turquía.

1.1 Cultivo de Uva en México

Según datos de la FAO (FAOSTAT, 2012) en México durante el año 2010, se cosechó un área total de 27 104 ha, produciendo 307 147 ton de uva. La cosecha de uva en México se destina principalmente a la producción de vinos, con una superficie sembrada de 27 830.86 ha y una producción de 281 144.98 ton en 2011 (Tabla 1), donde se incluye la producción de uva de mesa, uva industrial y uva para pasa.

De acuerdo con la SAGARPA las variedades de la uva en México son clasificadas según su uso (SAGARPA, 2012):

1. Para la industria vitivinícola (brandy y vino de mesa).
 - a. Variedades rojas: Pinot Negro, Ruby Cabernet, Petite Sirah, Garnatxa, Malber, Cabernet Sauvignon, Carignan y Zinfandell.
 - b. Variedades blancas: Sauvignon Blanc, Palomino, Chenin Blanc, San Emilión, Pinot Blanc, White Riesling.
2. Para consumo en fresco: Barlinka, Italia, Rish Baba, Emperador, Exotic, Cardinal, Thompson Seedles, Tokay, Malaga, Flame, Superior, Ribier, Red Malaga, Oliver Blanch, Dattier de Beirut, Blas Monukka, Rosa del Perú, Red Globe y Queen.

Tabla 1. Cultivo de uva en México.

Uso del Cultivo	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor Producción (miles de pesos)
Fruta	16 541.65	16 430.42	198 307.61	4 262 961.35
Industrial	7 352.21	6 944.33	71 022.61	378 429.87
Pasa	3 937.00	3 835.00	11 814.76	95 438.36
Total	27 830.86	27 209.75	281 144.98	4 736 829.58

(SIAP, 2012).

1.2.1 Regiones de cultivo de uva en México

El cultivo y producción de uva en México se ubica principalmente en cuatro regiones con celajes blancos y tintos, y con épocas de cosecha distintas (INFOCIR, 2008). Estas regiones se caracterizan principalmente por sus diferencias de clima y suelo, así como el destino que le dan a la producción de sus viñedos.

Baja California. Es la región más antigua de México en el cultivo de la vid, se distingue por la gran superficie de territorio que se dedica a la siembra y su potencial enológico (es la entidad donde se elabora un mayor número de vinos de calidad). Se divide en cuatro valles cercanos a Ensenada, con características propias: San Vicente, Santo Tomás, San Antonio de las Minas y Valle de Guadalupe.

Sonora. El cultivo de la uva en esta zona comenzó en la primera mitad de los años sesenta y en la actualidad es la entidad que mayor número de superficies dedica al cultivo de uva de mesa.

Zona de la Laguna. Se ubica en Durango y Coahuila, en el Valle de Parras con un microclima ideal para el desarrollo de la vid. La producción total de la zona se concentra en dos usos, destilación y uva de mesa.

Zona Central. Aunque su cultivo es de los más antiguos (1505), su desarrollo ha sido limitado. La componen los Estados de Aguascalientes, Zacatecas y Querétaro, siendo esta última zona vinícola de las más prósperas del país. Aguascalientes destina la mayoría de su producción a la elaboración de brandis.

1.2.2 Cultivo de uva en Sonora

En Sonora se cosecha el 74.7% de la producción nacional de uva, lo que equivale a 210 038.22 ton y el 92% de la uva de mesa (SIAP, 2012). La uva se cosecha en tres municipios del Estado de Sonora, incluyendo Caborca, Hermosillo y Guaymas (uva de mesa); Hermosillo y Caborca son conocidas como zonas vitícolas (Tabla 2). La uva de uso industrial se destina a la producción de brandy y la zona de Caborca se caracteriza por su producción de uva pasa.

Las variedades de uva de mesa se cosechan en el orden siguiente:

- Perlette. Es la primera uva de la temporada, de bayas redondas sin semilla color blanco cristalino en racimos grandes. Su nombre proviene del francés y significa "pequeña perla", fundamentalmente por su redondez y es el resultado de múltiples combinaciones de uvas europeas.
- Flame. Esta uva es la más popular por su forma redonda sin semilla de color rojo en racimos grandes.
- Sugar One. Conocida también como "Superior", con bayas grandes y alargadas sin semilla de color verde claro y racimos abundantes.
- Red Globe. Es una variedad de gran tamaño, firme, cáscara y cuerpo tierno de semillas grandes. Su estado de maduración se caracteriza por su color rojo oscuro y un brillo ligero.

Tabla 2. Regiones de cultivo de uva en el Estado de Sonora.

Cultivo	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor Producción (miles de pesos)
Caborca				
Fruta	3 792.00	3 792.00	56 131.00	1 125 391.30
Industrial	528.00	528.00	5 538.96	10 509.58
Pasa	3 583.00	3 583.00	9 136.26	81 771.16
Guaymas				
Fruta	200.00	200.00	3 200.00	38 400.00
Hermosillo				
Fruta	10 276.00	10 276.00	123 312.00	2 945 447.99
Industrial	636.00	636.00	12 720.00	30 782.40

(SIAP, 2012).

En Hermosillo la uva Carignan es considerada uva industrial y tiene dos destinos:

1. Producción de aguardiente (brandy). Se requiere de 72 h de fermentación.
2. Producción de vino semi-terminado. Sirve de base para diferentes bebidas alcohólicas comerciales como: Vino Padre Kino (base), Brandy Don Pedro y Brandy Presidente (18 meses de fermentación), y Brandy Añejo (requiere más de 18 meses de fermentación).

1.3 La Uva: Fuente de Antioxidantes

Durante la maduración de las uvas, los factores medioambientales y enzimas endógenas promueven cambios que afectan la composición y estructura de azúcares y compuestos fenólicos contenidos en las bayas (Pinelo *et al.*, 2006a).

La uva es una fuente natural de notables compuestos bioactivos, particularmente antioxidantes como los compuestos fenólicos (Hogan *et al.*, 2010), que se caracterizan por un rango amplio de estructuras diversamente distribuidas en cada parte de la uva (Figura 2).

La baya consiste en cuatro constituyentes principales: pulpa, cáscara, semilla y pedúnculo. Estos constituyentes contienen compuestos fenólicos que pueden o no, ser de naturaleza similar. El 90% de los compuestos fenólicos presentes en una baya de uva corresponden a los flavanoles, a su vez, en las semillas casi el 100% de los compuestos presentes son flavonoides mientras que en la pulpa el 60% y en la cáscara del 78 al 93% (Mané *et al.*, 2007).

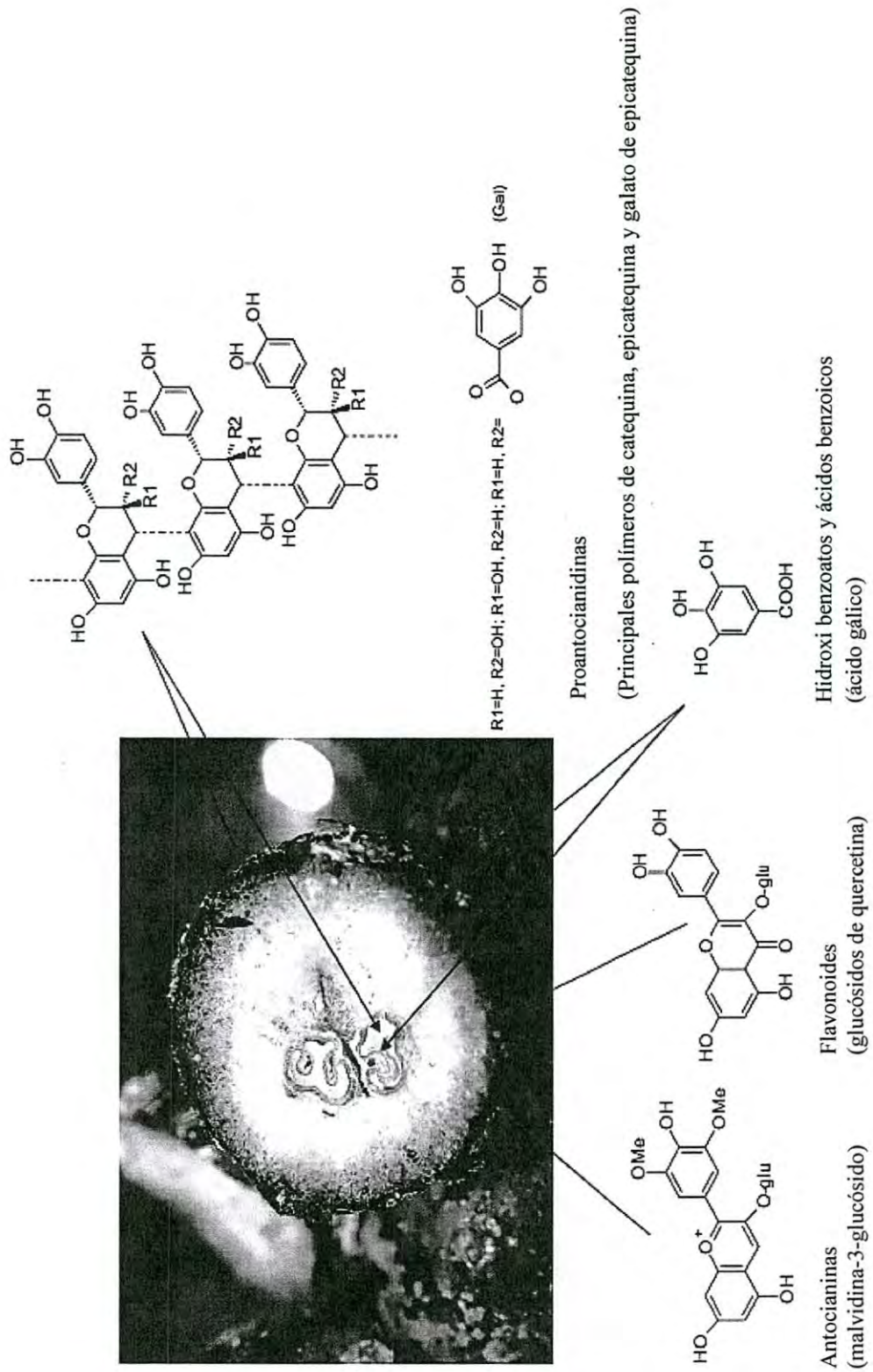


Figura 2. Corte de una baya de uva roja. Fuente: Pinelo *et al.*, 2006a.

1.3.1 La pulpa

Es la parte en mayor proporción en la uva, la cual provee de compuestos fenólicos a jugos y vinos, además de azúcares. Trazas de monómeros y oligómeros han sido reportados en pulpa de uva (Mané *et al.*, 2007).

1.3.2 La semilla

Los taninos en las semillas tienen las mismas unidades constitutivas como la cáscara pero con diferente grado de polimerización ya que en las semillas tienden a estar en su forma monomérica y su cantidad decrece remarcablemente durante la maduración, consisten principalmente en unidades de epicatequina unidas a pequeñas cantidades de catequina, galato de epicatequina, epigalocatequina (Souquet *et al.*, 2000); mientras que los niveles de galatos son más del 30% mayor que en la cáscara y el pedúnculo, además, procianidinas B1 y B2 han sido detectadas en las semillas así como epigalocatequina y ácido gálico (Pinelo *et al.*, 2006a).

Otros compuestos identificados en las semillas son quercetina-3-glucoronido, catequina, ácido caftárico y estilbenos (Souquet *et al.*, 2000). Además de los compuestos fenólicos, el contenido de aceite en las semillas de uva varía del 12.35 a 16%, el cual contienen grandes cantidades de ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico) e insaturados (oleico, linoléico y linolénico), tocoferoles (alfa, gama y delta) y compuestos fenólicos (Göktürk-Baydar *et al.*, 2007).

Las semillas de uva en sí mismas constituyen una fuente de compuestos saludables útiles en la prevención de enfermedades donde se implican los radicales libres (Li *et al.*, 2008).

1.3.3 La cáscara

Actúa como una barrera hidrofóbica protectora. Los compuestos fenólicos pueden variar como función de la variedad y las condiciones de cultivo, la cáscara contiene grandes cantidades de taninos, los cuales difieren de las otras fracciones de la uva por su alto grado de polimerización, y pocas cantidades de galatos. Catequina, epicatequina y galato de epicatequina son los principales constituyentes de los taninos de la cáscara, sin embargo, galocatequina y epigalocatequina también están presentes aunque en menores cantidades (Pinelo *et al.*, 2006a). Los taninos de la cáscara de uva, localizados en las vacuolas y pared celular son más fácilmente extractables durante el proceso de vinificación en comparación con los taninos de las semillas (Mané *et al.*, 2007).

Las antocianinas son las responsables del color en las uvas rojas y vinos, entre las cuales se incluyen delfinina-3-glucósido, cianidina, pentunidina, peonidina y malvidina, 3-(6-acetil)-glucósidos y 3-(6-p-cafeoil)-glucósidos, además de algunos piruvatos. Los glucósidos y glucurónidos de quercetina y canferol, ácido gálico y sus glucósidos, resveratrol, ácido caftárico, ácido clorogénico y ácido cumárico completan la composición fenólica de la cáscara de uva (Pinelo *et al.*, 2006a).

La cáscara de uvas de mesa rojas y verdes, presentan una importante capacidad antioxidante, atribuida principalmente al alto contenido de compuestos fenólicos, los cuales se relacionan directamente en la estabilización de radicales como el ABTS^{•+}, en la que la cáscara de uva carignan presenta mayor contenido de FT y FvT así como mayor CA (Molina-Quijada *et al.*, 2010).

1.3.4 El pedúnculo

El pedúnculo de uva, también llamado “palillo” en la industria vitivinícola, es también una atractiva fuente de compuestos fenólicos. Se conoce que los vinos hechos de bayas de uva no “despalillada” contienen niveles más altos de compuestos fenólicos que aquellos preparados con el pedúnculo totalmente removido de la uva (Pinelo *et al.*, 2006a).

Los taninos son los compuestos más abundantes en el pedúnculo de uva (80% en peso). Sin embargo su grado de polimerización es menor comparado con los taninos en cáscara y semilla, encontrándose en una posición cualitativa intermediaria. Ácidos fenólicos, flavonoles, monómeros de flavanoles y taninos condensados han sido identificados en el pedúnculo (Souquet *et al.*, 2000).

La presencia de pigmentos antociánicos es la principal diferencia en el perfil fenólico de uvas blancas y rojas, por lo que existen un mayor número de estudios sobre uvas de variedades rojas (Luque-Rodríguez *et al.*, 2007; Rubilar *et al.*, 2007; Spigno y De Faveri 2007; Spigno *et al.*, 2007; De Campos *et al.*, 2008; Hogan *et al.*, 2010).

1.4 Interacción de los Compuestos Fenólicos con los Polisacáridos

El interés en los compuestos fenólicos está relacionado primeramente a su actividad antioxidante, pero también muestran una importante actividad biológica *in vivo*. Pueden ser benéficos combatiendo enfermedades relacionadas a la formación excesiva de radicales oxígeno que exceden la capacidad de defensa antioxidante en el cuerpo humano. Específicamente por su capacidad de donar un átomo de hidrógeno al radical lípido formado durante la propagación de la oxidación lipídica (Göktürk-Baydar *et al.*, 2007).

También existen estudios en los que se demuestra que la fibra dietética del bagazo de uva blanca posee propiedades funcionales útiles como ingrediente natural en alimentos por su alta capacidad de retención de agua y lípidos (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007).

La retención de los compuestos fenólicos en las plantas, tal como sucede en las bayas de uva, depende de parámetros en la pared celular como la conformación estereoquímica, flexibilidad, peso molecular o el porcentaje de grupos galoil en la molécula fenólica. Además, la estructura física de la pared celular como la topografía superficial, porosidad, y la composición química también puede influir en la agregación eventual entre conformaciones de polisacáridos de la pared celular y los compuestos fenólicos para formar complejos.

La formación de los complejos polisacáridos-fenólicos puede explicarse mediante dos mecanismos (Pinelo *et al.*, 2006a):

1. Los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles y los átomos de oxígeno del éter de polisacáridos presentes en la pared celular. De esta manera los geles de dextrano pueden encapsular fenoles dentro de sus poros.
2. Las interacciones hidrofóbicas que ocurren como resultado de la capacidad de algunos polisacáridos para desarrollar estructuras secundarias, es decir, nanotubos o geles, que resultan en las regiones hidrofóbicas. Las cavidades hidrofóbicas formadas pueden encapsular o formar complejos fenólicos, tal como sucede entre la β -ciclodextrina y diferentes compuestos fenólicos como ácido cafeoilquínico y los flavonoides.

Según una revisión expuesta por Pinelo *et al.* (2006a), la celulosa se compone de cadenas de (1→4) β-D-glucosa. Los enlaces de hidrógeno contienen cerca de 40 de estas cadenas de glucanos, que juntos forman una microfibrilla de celulosa. En la pared celular de la cáscara de uva, los polisacáridos consisten principalmente de hemicelulosa de xiloglucanos cuyas estructuras están basadas en una columna vertebral (1→4) β-D-glucano cualitativamente idéntica a la celulosa, pero a diferencia de la celulosa, cerca del 75% de los residuos de glucosa llevan residuos de (1→6) α-D-xilosa, de los cuales aproximadamente 35% están sustituidos con residuos de galactosa, muchos de estos son fucosilados.

Otros azúcares neutros como mananos (columna vertebral de manosa-glucosa con unidades de galactosa), xilanos (esqueleto de xilosa con unidades de arabinosa), y arabino-galactanos (cadenas de arabinosa y galactosa) también se han detectado en pequeñas cantidades en la pared celular de cáscara de uva.

Los principales polisacáridos de pectinas se encuentran en la uva, tal como el homogalacturonano, que consiste en un esqueleto de ácido galacturónico unido a unidades de glucosa y xilosa; ramnogalacturonano I, que lleva unidades de arabinanos, galactanos y ramificado altamente por arabino-galactanos vinculados a los residuos de ramnosil para formar una red ramificada de pectina; y ramnogalacturonano II que consiste en un esqueleto de ácido galacto-piranosil urónico unido a sustituyentes de ramnosa, glucosa, arabinosa y galactosa, y un enlace covalentemente capaz, reticulado entre sí a través de dímeros de diéster de borato.

1.5 La Industria Vitivinícola

Las uvas son el elemento esencial por el cual se elabora finalmente el vino así como otras bebidas fermentadas. El cultivo de uva para la industria

vitivinícola, se distribuye mayoritariamente en ciertas latitudes geográficas asociadas a isothermas climáticas anuales con temperaturas que varían generalmente entre los 10°C y 20°C, aunque también existen cultivos con elevaciones de temperatura superiores a los 25°C (Jackson, 2008).

El vino es un producto de características particulares, reconocidas desde la antigüedad, y una de las bebidas fermentadas más consumidas en el mundo y de gran importancia comercial, el cual se elabora a partir de un cultivo de uva cuidado, es decir, con uva seleccionada especialmente para su destino. Otras bebidas de importancia comercial como el brandy, se elaboran a partir de uva denominada “uva industrial”, cultivada bajo condiciones menos rigurosas (INFOCIR, 2008).

La elaboración de las bebidas fermentadas como el vino tinto, se realiza a partir del mosto de uvas rojas, tal como la uva Carignan (Figura 3), junto con las partes sólidas de la uva (pedúnculo, cáscara y semillas).

La pasta que resulta del estrujado (Figura 4) se lleva a un depósito donde se separa la uva del “raspón” (palillo y hojas) para que durante la maceración no se transmitan olores y sabores desagradables. A esta parte del proceso se conoce como *despalillado* (INFOCIR, 2005).

En el proceso de elaboración de vino, se llevan a cabo dos tipos de fermentaciones. La primera, la fermentación alcohólica o tumultuosa en la que los azúcares se convierten en alcoholes y desprenden anhídrido carbónico mientras los compuestos colorantes (flavonoides y taninos) provenientes principalmente de la cáscara, se transfieren al mosto. La agregación de las antocianinas a las paredes celulares de la levadura durante la fermentación de diferentes vinos tintos también se ha explicado como resultado de interacciones hidrofóbicas entre los azúcares y los fenoles, aunque esta adsorción de fenoles a las células de levadura se ha

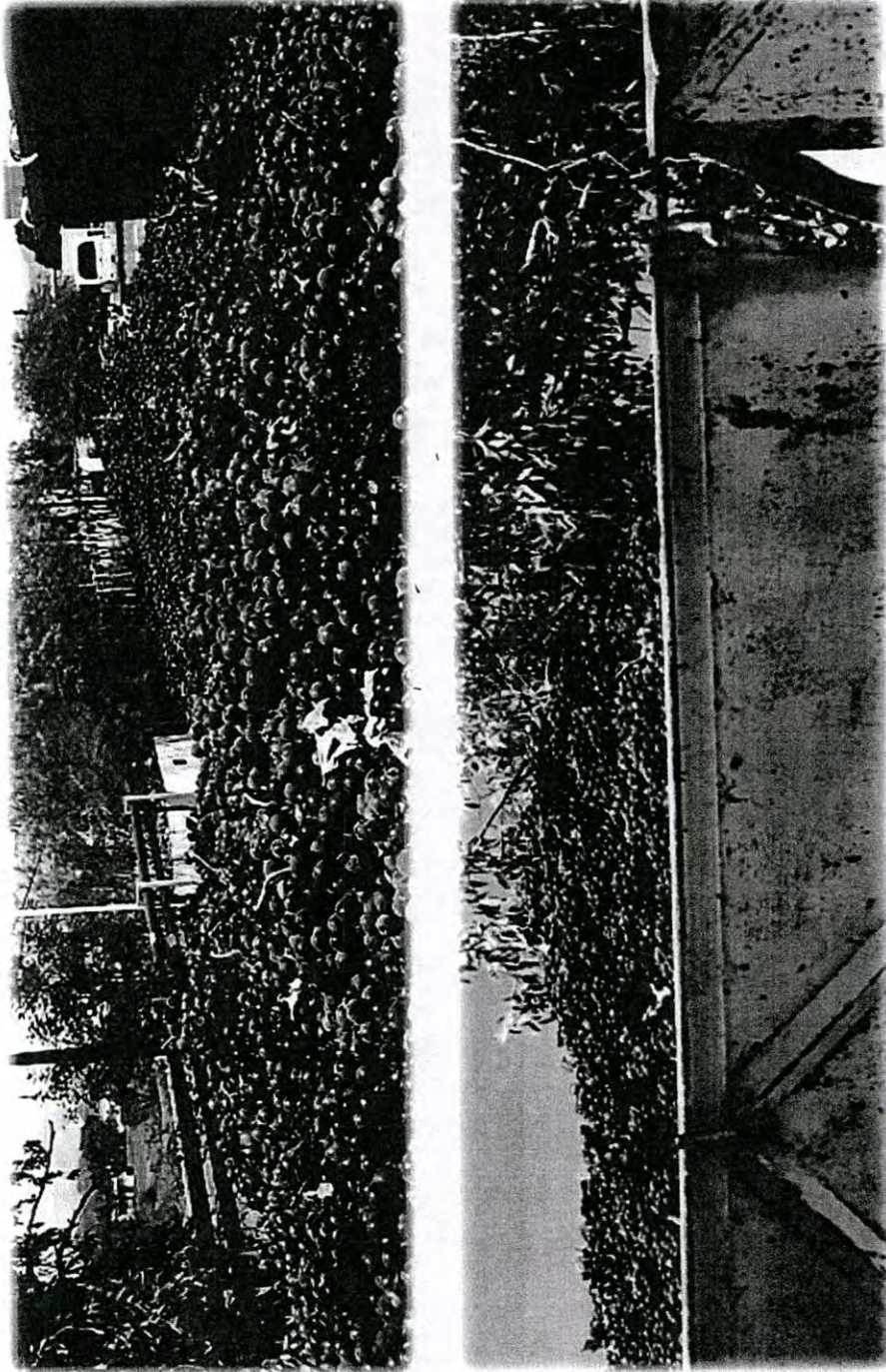


Figura 3. Uva Carignan (Pedro Domecq de Hermosillo, Sonora, México).

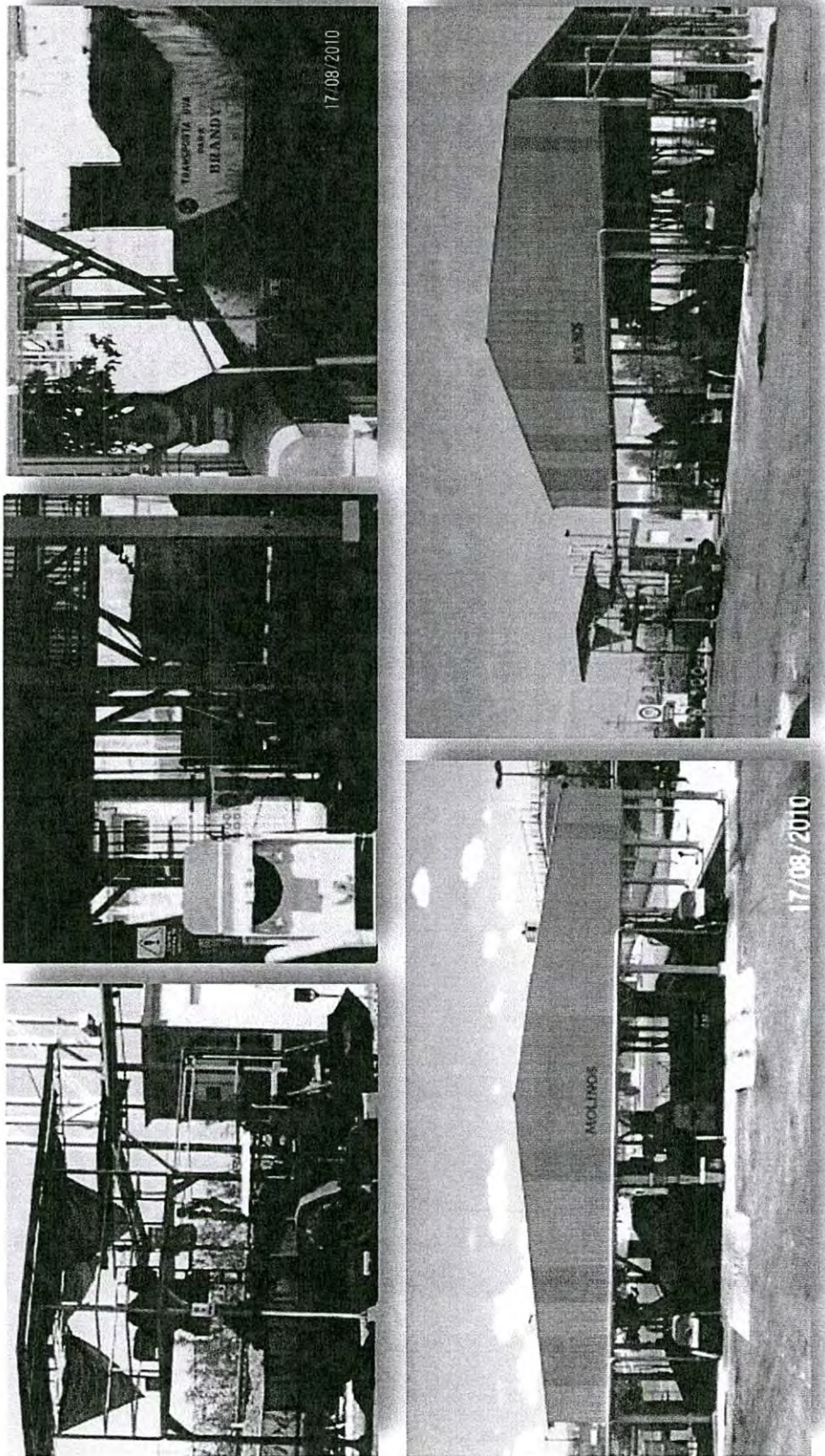


Figura 4. Estrujado y despalillado de uva Carignan (Pedro Domecq de Hermosillo, Sonora, México).

encontrado que dependen fuertemente del grado de metoxilación y acilación de los compuestos (antocianinas) (Pinelo *et al.*, 2006a).

El bióxido de carbono producido durante la fermentación empuja hacia arriba los hollejos que forman una barrera superior conocida como “sombbrero”, esta capa se remoja con el mosto para activar la extracción del color o “remontado”. Después se lleva a cabo el “bazuqueo”, que consiste en remover periódicamente el hollejo.

Una vez que se consigue el color, se procede al “descube” separando el líquido en un depósito donde se realizará la segunda fermentación (Figura 5), la maloláctica, la cual proporciona al vino finura y suavidad.

En la producción de vino, en el mundo destacan países como Francia (49' 633 000 hL), Italia (41' 580 000 hL) y España (33' 397 000 hL) mientras que entre los principales países consumidores se encuentran Francia (29' 936 000 hL), USA (28' 500 000 hL) e Italia (23' 052 000), según datos del año 2011 (OIV Experts, 2012).

En el año 2011, los viñedos cultivados en el mundo cubrían una superficie de 7 585 mil hectáreas, con lo que la producción de uva ascendió a 67.96 millones de toneladas, obteniéndose un marcado incremento del 6.77% durante los últimos diez años (OIV, 2012).

1.5.1 La Industria vitivinícola en México

En México, la situación actual del vino se ha mantenido durante los últimos años. La producción de vino en México en 2010 fue de 37 929 ton (FAOSTAT, 2012). México es considerado el productor más antiguo de vino en Latinoamérica, posee una importante industria vitivinícola, integrada por los productores de uva de mesa, uva pasa, jugo de uva concentrado, vino

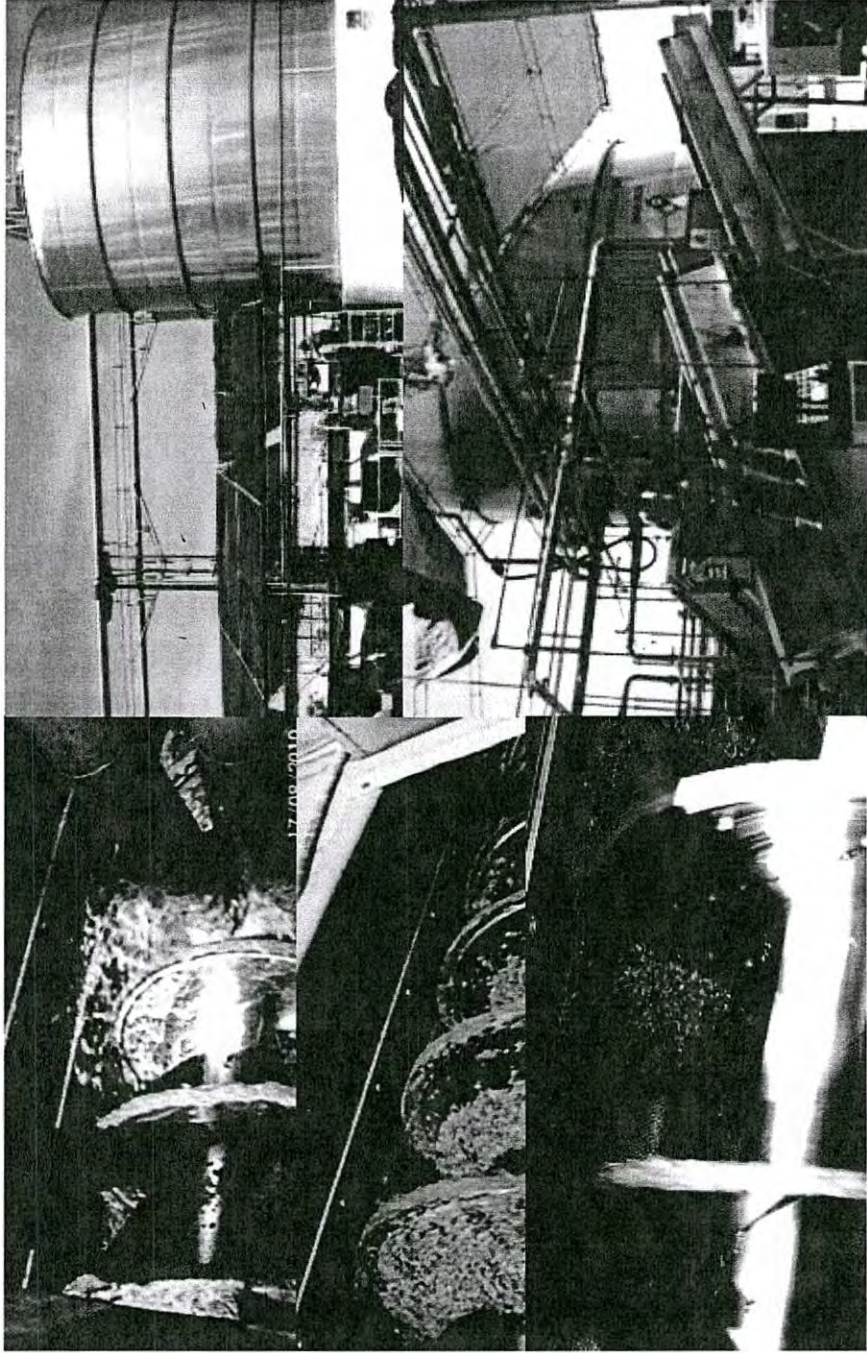


Figura 5. Descube del mosto (Primera Etapa de Fermentación) (Hermosillo, Sonora, México).

y licores de uva (brandy). La industria vitivinícola mexicana produce más de 1.5 millones de cajas de vino al año, de las cuales 1.2 millones se quedan en el mercado nacional y más de 300 mil se exportan (SAGARPA, 2012). La industria nacional exporta cerca del 25% de su producción vitivinícola, el mayor porcentaje al mercado europeo (SAGARPA, 2012).

La producción de vino en México sigue siendo inferior a la cantidad de vino importado. Aproximadamente, el 65% del vino que se consume en México procede del exterior. El consumo de vino en México ha aumentado en los últimos años, (500 mL *per cápita*), aunque es reducido en comparación con otros países como España, Italia o Francia. Sin embargo, muchos de los expertos estiman una tasa de crecimiento anual de consumo aproximada del 13% para los próximos años, por lo que el valor de su comercialización alcanzaría los 137 millones de dólares, en donde la mitad de la producción es mexicana y el resto se importa de Chile, España, Estados Unidos y Alemania.

México exporta sus vinos a 21 países, entre los cuales destacan Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, Japón, Francia y España. En 2011 la venta de vino siguió creciendo entre los consumidores mexicanos. Se alcanzaron ventas de 67 millones de litros, y aumentó así un 6% con respecto al año 2010 (Hervás-Serra, 2012). Se puede considerar entonces al mercado del vino en México como un mercado totalmente en crecimiento, donde cada año aumenta tanto la producción nacional de vino e importaciones de vino extranjero, así como el consumo de vino.

1.6 Residuos de la Industria Vitivinícola

De la producción mundial de uva, el bagazo de uva es aproximadamente el 20% en peso (Hogan *et al.*, 2010), lo cual representa

9 125.48 millones de toneladas en 2011 (OIV, 2012). Tan solo en México, se estima que durante 2010 se obtuvieron 14 204 toneladas de bagazo (FAOSTAT, 2012).

Este subproducto se produce después del prensado de la uva triturada en la elaboración del vino blanco o después de la maceración y fermentación para vino tinto. Generalmente se utiliza principalmente para la obtención de etanol utilizado para producir licores. La tecnología de vinificación genera grandes cantidades de bagazo de uva sin uso eficiente después del proceso de elaboración del vino (Rivera *et al.*, 2007).

Este residuo es rico en nutrientes, principalmente nitrógeno y potasio, esenciales para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de los cultivos por lo que se ha propuesto su empleo como materia orgánica compostable (Bertran *et al.*, 2004; Flavel *et al.*, 2005); sin embargo, su composición rica en taninos y compuestos fenólicos, pueden inhibir el crecimiento de las raíces, por lo que es inadecuado para las plantas (Inbar *et al.*, 1992), por lo que la presencia de estos compuestos fenólicos, así como su capacidad antioxidante, no sería aprovechada al máximo.

Otro uso propuesto para los residuos de la industria vitivinícola, es como ingrediente alternativo para la formulación de dieta animal; aunque su alto contenido de fenoles ha hecho que su utilización sea despreciada a causa de que los taninos tienen la propiedad de precipitar la proteína que se asocia con la inhibición de tripsina así como por el rechazo a la ingestión por su falta de gustosidad. Exitosamente, la harina de bagazo de uva rica en fenoles no presenta efectos negativos en el crecimiento de los juveniles de trucha arcoíris (Peña *et al.*, 2007).

1.6.1 El bagazo de uva

El bagazo de uva es rico en compuestos fenólicos, por lo que es notable el incremento del procesamiento de desechos agrícolas (tal como los residuos de vinificación) como una fuente de antioxidantes de bajo costo (Spigno y De Faveri, 2007). Estudios realizados a partir de extractos de bagazo de uva, han mostrado que es una fuente natural de compuestos antioxidantes con efectos potenciales en la salud (anti-hiperglucémicos y antiinflamatorios), contra diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y varios trastornos dérmicos, además de ser agentes profilácticos en caso de déficit de memoria y bacteriostáticos (Yilmaz y Toledo, 2004b; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Huntley, 2007; Sánchez *et al.*, 2009; Hogan *et al.*, 2010; Jamshidzadeh *et al.*, 2010; Nishiumi *et al.*, 2012).

Los bagazos de uvas rojas han sido estudiados con mayor frecuencia, debido a la presencia de pigmentos antocianicos, principal diferencia entre el perfil fenólico de uvas blancas y rojas (Luque-Rodríguez *et al.*, 2007; Rubilar *et al.*, 2007; Spigno *et al.*, 2007; Spigno y De Faveri, 2007; De Campos *et al.*, 2008; Hogan *et al.*, 2010). Por lo tanto, las antocianinas (malvidinas) y los flavanoles (catequinas y quercetina) podrían ser principalmente responsables de la inhibición de la peroxidación lipídica (Luque-Rodríguez *et al.*, 2007; Rubilar *et al.*, 2007; Guerrero *et al.*, 2008). La importancia de estas propiedades han motivado un creciente interés en la obtención de estos compuestos, lo que ha llevado al desarrollo de los procesos de extracción de fenoles a partir del orujo de uva, incluyendo la extracción supercrítica (Mantell *et al.*, 2003) o extracción asistida por enzimas (Kammerer *et al.*, 2006).

Se conoce que el sistema de solventes afecta significativamente el rendimiento de la extracción, el contenido fenólico y la capacidad biológica de los materiales vegetales; además del efecto de la temperatura, proporción

sólido-solvente, presión, tamaño de partícula, entre otros (Yilmaz y Toledo, 2004a, 2006; Pinelo *et al.*, 2005a,b; Pinelo *et al.*, 2006a,b; Rubilar *et al.*, 2007; Spigno *et al.*, 2007; Spigno y De Faveri, 2007; Guerrero *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos más débilmente ligados a la estructura de la pared celular así como aquellos que están contenidos en las vacuolas, son presumiblemente más propensos a ser afectados por las variables involucradas en la extracción, capaces de modificar las condiciones de equilibrio y de transferencia de masa en la extracción sólido-líquido (Pinelo *et al.*, 2006a,b).

La temperatura es una de las variables más importantes que afectan a la liberación de fenoles a partir de la cáscara de uva. El incremento de la temperatura en la extracción de los compuestos fenólicos favorece la solubilidad del soluto y el coeficiente de difusión; causando un aumento de fenoles extraídos. Sin embargo, la temperatura no se puede aumentar indefinidamente, ya que la inestabilidad de los compuestos fenólicos y la desnaturalización de las membranas celulares puede tener lugar a temperaturas superiores a 50°C (Pinelo *et al.*, 2005b; Pinelo *et al.*, 2006a; Spigno y De Faveri, 2007).

Se ha observado el aumento en la relación solvente-sólido t como una variación positiva para mejorar los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos. Sin embargo, un equilibrio entre el uso de altas y bajas relaciones solvente-sólidos, implican un equilibrio entre los costos y desechos de solventes (Pinelo *et al.*, 2005b).

El tipo de solvente es también una de las variables que influyen mayoritariamente en el proceso de extracción, solventes como metanol, etanol y agua, han sido los más utilizados para la extracción de compuestos

fenólicos, especialmente de cáscara y bagazo de uva. Entre estos disolventes, el metanol presenta la mayor capacidad para extraer compuestos fenólicos, seguido de etanol y agua (Pinelo *et al.*, 2005a; Pinelo *et al.*, 2005b; Pinelo, *et al.*, 2006a; Pinelo *et al.*, 2006b; Spigno y De Faveri 2007; Spigno *et al.*, 2007).

Respecto a las condiciones de extracción, algunos trabajos han tratado de optimizar parámetros del proceso (tipo de solvente, tamaño de partícula y tiempo de extracción) (Göktürk-Baydar *et al.*, 2007). La Tabla 3 muestra una comparación de compuestos fenólicos (FT y FvT) y capacidad antioxidante de residuos de la industria vitivinícola.

Solo han sido incluidos aquellos reportes en los que la cuantificación total de la CA ha sido expresada como μMol equivalentes Trolox (ET) por gramo de muestra. Sin embargo, el mecanismo por el cual han sido evaluados, es diferente. El método ABTS evalúa la capacidad antioxidante por la reacción colorimétrica del radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), expresada como equivalentes trolox, denominada también como TEAC (capacidad antioxidante total), ya que puede ser estabilizado tanto por la donación de electrones individuales como por ganancia de un átomo de hidrógeno y es soluble en solventes orgánico y acuoso.

El ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (β -ficoeritrinao fluoresceína), cuándo la molécula se daña (por calentamiento o presencia de oxígeno reactivo) se producen tres radicales, el peróxilo (ROO^{\bullet}), hidroxilo (OH^{\bullet}) y Cu_2^+ (metal de transición); por lo que la molécula pierde su capacidad de flourescer al oxidarse. El antioxidante actúa estabilizando estos radicales y por preservandose la fluorescencia de la molécula (Prior *et al.*, 2003).

Tabla 3. Comparación de fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante (CA) en residuos de la industria vitivinícola.

Materia prima	Condiciones de extracción	FT (mg g ⁻¹)	FvT (mg g ⁻¹)	CA (µMol ET g ⁻¹)	Referencia
caña de uva	100 g 1000 mL HCl 1 N /MeOH/agua (1:80:19) 20°C	76-224 (EAG)	33-147 (EQ)		Zhang <i>et al.</i> (2011b)
bagazo de uva roja	500 g EtOH 80% (1:10 m/v)	30 (EAG)	22 (ER)	245 (ORAC)	Hogan <i>et al.</i> (2010)
bagazo de uva blanca	EtOH 80%	24 (EAG)	16 (ER)	198 (ORAC)	
bagazo de uva blanca	30 g 4.7 mL min ⁻¹ 30 min agua tamaño de partícula: 1 mm	8 (EAG)			Sánchez <i>et al.</i> (2009)
semilla de uva roja	0.4 g 20 mL EtOH70% 45°C	25 (EAG)		673 (ABTS) 1380 (CUPRAC)	Li <i>et al.</i> (2008)
	MeOH	20 (EAG)		664 (ABTS) 1328 (CUPRAC)	
	agua	7.5 (EAG)		88 (ABTS) 470 (CUPRAC)	
	ACE70%	29 (EAG)		659 (ABTS) 1668 (CUPRAC)	
semilla de uva	100 g 200 mL ACE:agua:ACA (90:9:5:0.5) 60°C	704 (EC)			Göktürk-Baydar <i>et al.</i> (2007)
bagazo de uva blanca	AE:MeOH:agua (60:30:10) AE:MeOH:agua (60:30:10)	671 (EC) 24 (EC)			

MeOH: metanol, EtOH: etanol, ACE: acetona, AE: acetato de etilo, ACA: ácido acético, EGA: equivalentes ácido gálico, EQ: equivalentes quercetina, ER: equivalentes rutina.

El método CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) se basa en la medición de la absorbancia de Cu (I)-neocuproína (Nc) en su forma quelada, como resultado de la reacción redox del rompimiento de enlaces en la cadena de antioxidantes por la transferencia de electrones, a la longitud de onda de absorción de luz máxima de 450 nm (Özyürek *et al.*, 2011).

Generalmente, la literatura existente, sobre la optimización de los rendimientos de extracción de los compuestos fenólicos, su pureza y su capacidad antioxidante, no es suficiente. Entonces, no es claro qué sistema de solvente es más eficaz en la extracción del contenido fenólico según el tipo de material, así como en la evaluación de la capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, un procedimiento simple como un solo sistema de solventes (un paso de extracción) puede dar resultados de extracción comparables a los resultados obtenidos con otros sistemas similares o más complejos (Spigno y De Faveri, 2007).

1.6.2 Antioxidantes presentes en el bagazo de uva

El estrés oxidativo sucede principalmente en los tejidos de los alimentos, donde intervienen principalmente los radicales libres, especies reactivas de oxígeno y pro-oxidantes generados de manera tanto exógena (calor y luz) como endógena (H_2O_2 y metales de transición). Por esta razón, se han desarrollado sistemas antioxidantes para controlar a los radicales libres, catalizadores de oxidación de lípidos, productos intermedios de oxidación y productos secundarios de degradación (Brewer, 2011).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos en las plantas y son los antioxidantes naturales más abundantes en la naturaleza (Zhang *et al.*, 2011a). Estos compuestos antioxidantes incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides y tocoferoles, que pueden

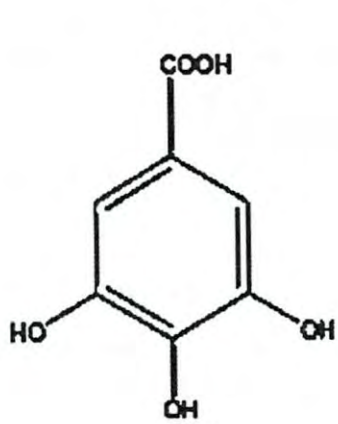
inhibir la formación de Fe^{3+} por oxidación inducida, neutralizar los radicales libres y actuar como agentes reductores (Brewer, 2011).

Los principales antioxidantes fenólicos vegetales pueden ser divididos en 4 grupos generales: ácidos fenólicos (ácidos gálico, protocatéquico, cafeico, y rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol y ácido carnósico), flavonoides (quercetina y la catequina) y aceites volátiles (eugenol, carvacrol, timol y mentol) (Brewer, 2011).

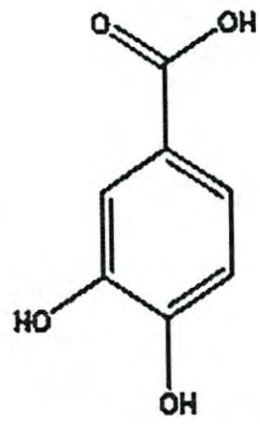
Los ácidos fenólicos se clasifican como derivados del ácido benzoico ($\text{C}_6\text{-C}_1$) o del ácido cinámico ($\text{C}_6\text{-C}_3$) que surgen de la ruta de los ácidos malónico y siquímico (Figura 6) (Carrasco Pancorbo *et al.*, 2004; Garzón, 2011). Los ácidos fenólicos generalmente actúan como antioxidantes estabilizadores de radicales libres (Brewer, 2011). Dentro de este grupo se encuentran principalmente los ácidos gálico, cafeico, vanílico, ferúlico, siríngico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, protocatéquico, sinápico, benzoico y *p*-hidroxibenzoico (Figura 6).

Los flavonoides, además de estabilizar radicales libres, también pueden quelar metales. La característica común de los flavonoides es la base C_{15} de su estructura flavan ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) (Figura 7). Estos átomos de carbono están dispuestos en 3 anillos (A, B, y C), por lo que las clases de flavonoides difieren en el nivel de saturación del anillo C, pero los compuestos individuales dentro de una clase difieren del patrón de sustitución de los anillos A y B que influyen en la estabilidad del radical fenoxi y las propiedades antioxidantes de las sustancias (Figura 8).

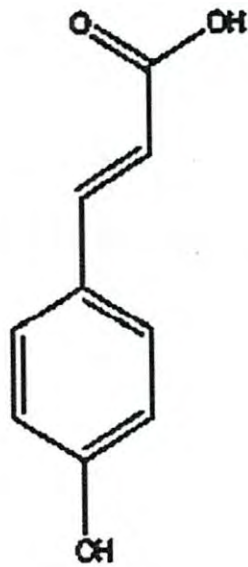
El potencial eliminador de radicales libres de los compuestos fenólicos naturales parece depender del patrón (número y ubicación) de los grupos -OH libres en el esqueleto de los flavonoides, donde el patrón de sustitución del anillo B es especialmente importante para la capacidad de



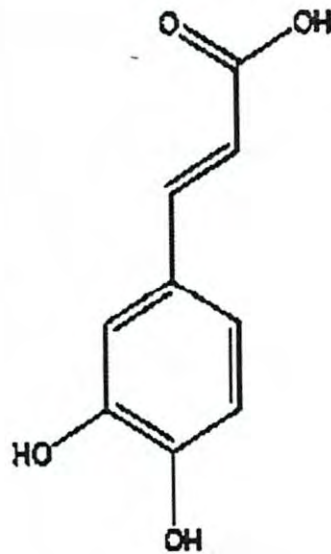
Ácido Gálico



Ácido Protocatequico



Ácido *p*-Cumárico



Ácido Cafeico

Figura 6. Principales ácidos fenólicos en bagazo de uva.
Fuente: Liazid *et al.*, 2010; Brewer, 2011.

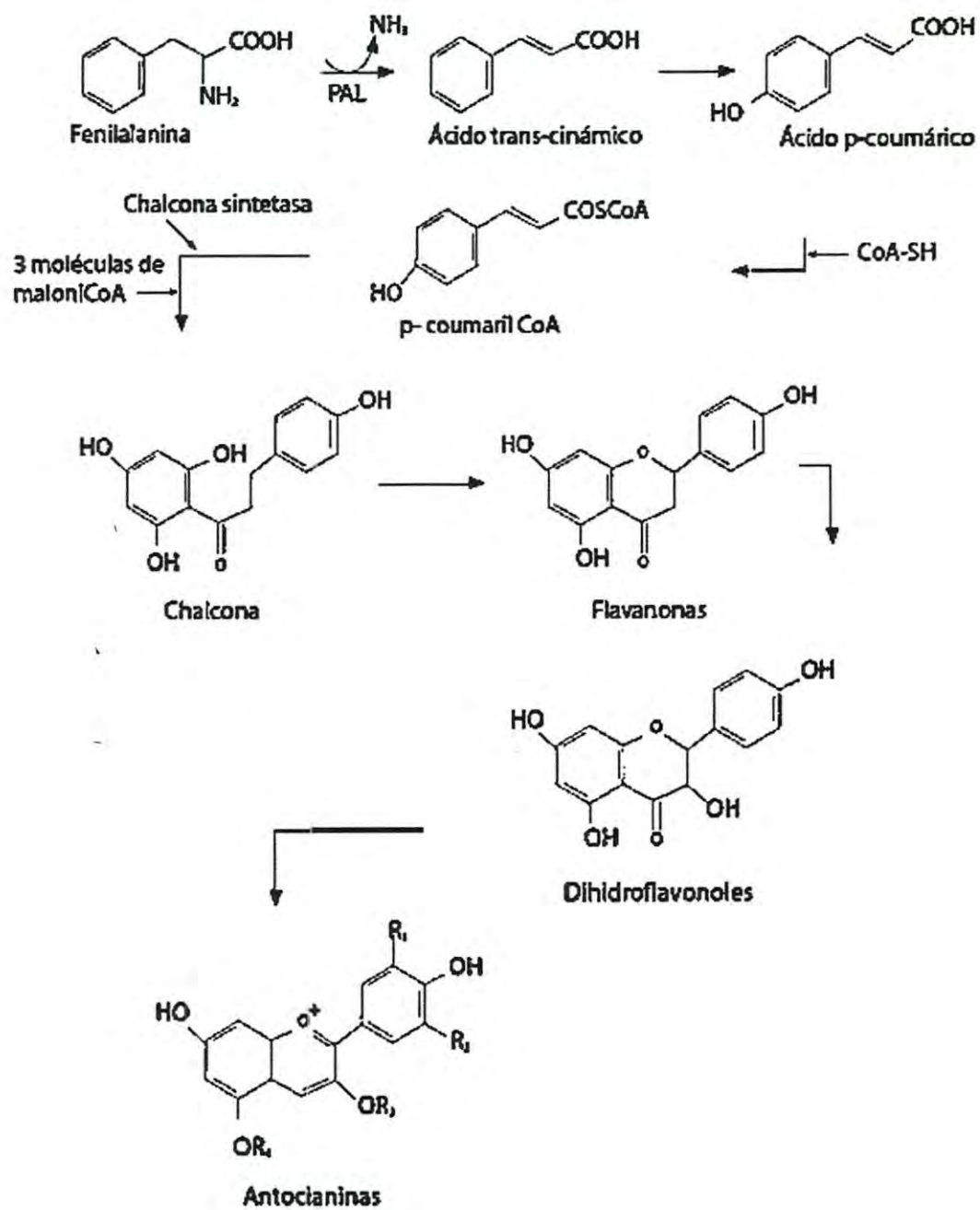


Figura 7. Ruta General de biosíntesis de los Flavonoides.
 Fuente: Garzón, 2011.

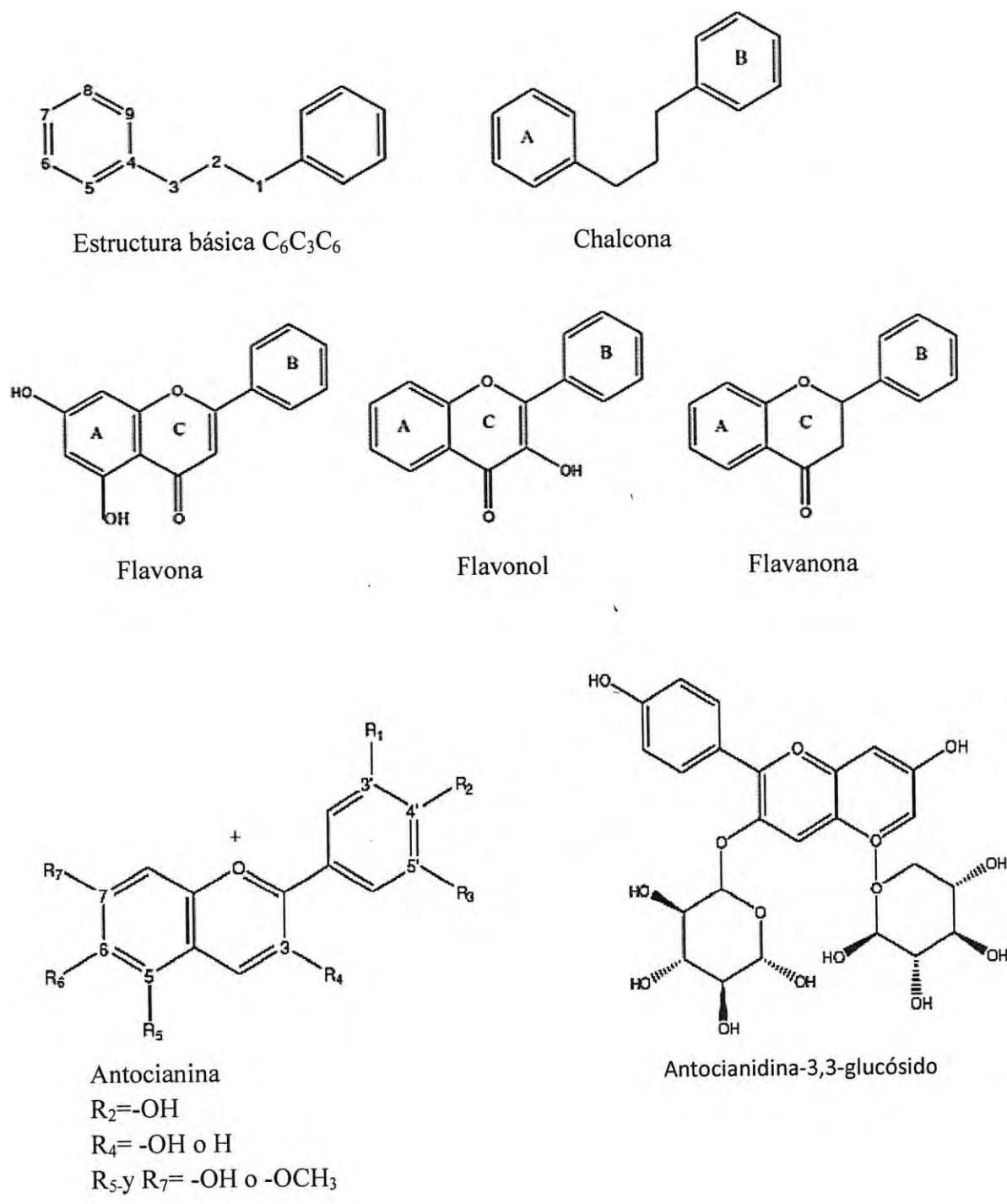


Figura 8. Estructuras de los principales flavonoides en bagazo de uva.
 Fuente: Brewer, 2011.

captación de los radicales libres de flavonoles. La presencia de la estructura orto-3,4-dihidroxi incrementa la CA.

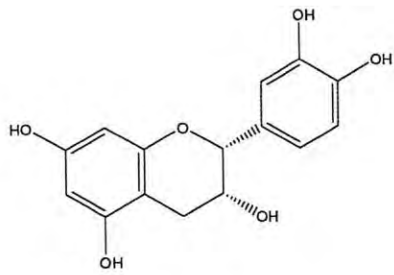
La Figura 9 muestra los principales flavonoides encontrados en bagazo de uva (Brewer, 2011). Muchos de los flavonoides antioxidantes son pigmentos naturales, dentro de estos, las antocianinas son glucósidos derivados de polihidroxi o polimetoxi del catión flavilium. La hidrólisis de la fracción de azúcar produce una aglicona, la antocianidina.

Algunos fenoles pueden polimerizarse en polifenoles que pueden unirse a minerales, esta polimerización ocurre también en las proantocianidinas presentes en el bagazo de uva, formándose oligómeros o polímeros de los flavonoides monoméricos, polihidroxi-flavan-3-oles como [+]catequina y [-]epicatequina (Brewer, 2011).

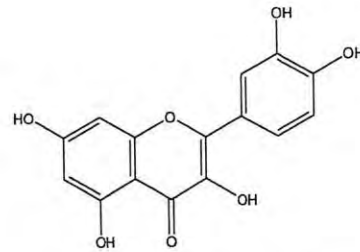
Las procianidinas poliméricas son mejores antioxidantes que los monómeros correspondientes, catequina y epicatequina. La catequina y la epicatequina se pueden combinar para formar ésteres, tales como galato de catequina/epicatequina, o enlaces con azúcares y proteínas para rendir glucósidos y proteínas polifenólicas. La glucosilación de los flavonoides en los 3 grupos -OH por lo general disminuye la actividad antioxidante debido a la reducción del número de grupos fenólicos (Brewer, 2011).

1.7 Uso de Antioxidantes Provenientes de Residuos Industriales

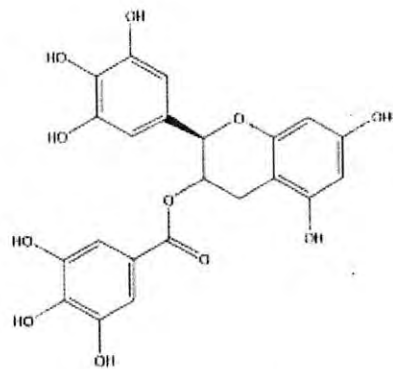
Las antocianinas y antocianidinas exhiben color visual debido a la extrema movilidad de los electrones dentro de la estructura molecular (dobles enlaces) en respuesta a la luz en el espectro visible (400–700 nm). Estos pigmentos son solubles en agua y los 4 grupos -OH están unidos a los anillos aromáticos, por lo que el pH tiene un efecto significativo en los pigmentos de antocianinas. Estos grupos -OH pueden donar un H⁺ (en



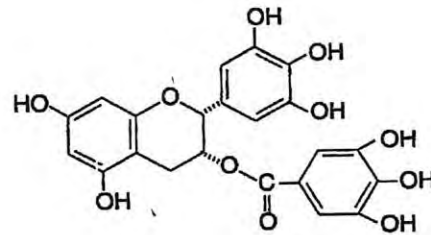
Epicatequina



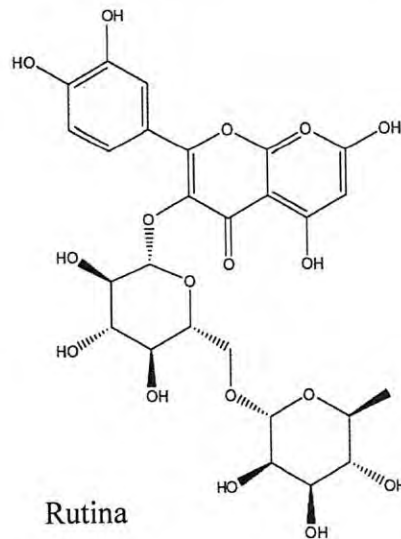
Quercetina (flavanol)



Galato de epicatequina



Galato de epigallocatequina



Rutina

Figura 9. Principales flavonoides en bagazo de uva.
Fuente: Brewer, 2011.

solución básica) o un H^{\bullet} a un lípido en oxidación (ROO^{\bullet}). Las proantocianidinas también contienen múltiples grupos $-OH$ que pueden: donar un hidrógeno, reprimir un $O_2^{\cdot-}$ y quelar metales (Brewer, 2011).

Los estudios, se han enfocado en mostrar la relación de los compuestos antioxidantes y los diferentes tipos de enfermedades degenerativas, conociéndose como promotores de la salud. Por lo que la utilidad de los compuestos fenólicos ha sido promovida principalmente en aplicaciones dentro de la industria alimentaria para conservación de alimentos (Yilmaz y Toledo, 2004b; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Huntley, 2007; Sánchez *et al.*, 2009; Hogan *et al.*, 2010; Jamshidzadeh *et al.*, 2010; Nishiumi *et al.*, 2012).

Sin embargo el uso de los antioxidantes naturales no se limita a su aplicación en la industria alimentaria, ya que también son útiles en aplicaciones tales como estabilizadores en combustibles y lubricantes para prevenir la oxidación, aditivos en gasolina para prevenir la polimerización que conduce a la formación de residuos en los motores, prevención de la degradación oxidativa de plásticos (pérdida de la fuerza y flexibilidad), además de su uso en cosméticos a base de grasa tales como lápices labiales y cremas hidratantes para prevenir la rancidez (Mandall, 2013).

El material de desecho del procesamiento industrial representa un costo para las empresas agroalimentarias; estos residuos contienen productos químicos y materias primas que hasta ahora se han explotado sólo parcialmente (Cerruti *et al.*, 2009).

Un ejemplo de esta situación es el bagazo de uva, resultado de la industrialización de la uva en la producción de vinos. Diversos estudios han evidenciado que el bagazo de uva es rico en nutrientes por lo que se ha propuesto su empleo como materia orgánica compostable (Bertran *et al.*,

2004; Flavel *et al.*, 2005). Además, el bagazo de uva posee nutrientes suficientes para ser procesado como ingrediente alternativo para la formulación de dieta animal (Peña *et al.*, 2007).

Aunado a esto, el principal interés en el bagazo de uva es como una fuente natural y de bajo costo para la obtención de compuestos fenólicos (Yilmaz y Toledo 2004b; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Huntley, 2007; Sánchez *et al.*, 2009; Hogan *et al.*, 2010; Jamshidzadeh *et al.*, 2010; Nishiumi *et al.*, 2012).

Los componentes químicos presentes en los extractos de subproductos agrícolas (desechos de tomate, nueces, uva, etc.) son principalmente, taninos y compuestos fenólicos, que representan la principal familia tanto de antioxidantes naturales como sintéticos, estos son análogos químicos de los estabilizadores sintéticos ampliamente utilizados en la industria del plástico. Su efecto antioxidante está relacionado con la naturaleza donante de electrones y el efecto estérico de los sustituyentes (Cerruti *et al.*, 2009).

El efecto donador de electrones puede aumentar la densidad electrónica en el oxígeno del fenol, aumentando la velocidad de captura de radicales, mientras que el efecto estérico evita radicales fenoxi de acoplamiento, que puede dar lugar a un aumento en el número de radicales peroxi atrapados (Cerruti *et al.*, 2009).

La capacidad antioxidante de extractos naturales se ha evaluado casi exclusivamente sobre la base de pruebas químicas *in vitro* y los trabajos en cuanto a la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos naturales dispersados en matrices poliméricas son escasos, enfocándose al uso de los antioxidantes para la obtención de envases activos, es decir, con el fin de alcanzar el efecto antioxidante sobre el material envasado, pero no sobre la propia matriz polimérica (Cerruti *et al.*, 2009; Manzanarez-López

et al., 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012).

1.8 Polímeros Biodegradables y Compuestos Antioxidantes

Dentro de los polímeros, aquellos que son biodegradables representan una alternativa válida a los tradicionales derivados del petróleo utilizados en embalaje y aplicaciones agrícolas, para reducir el impacto ambiental y el desarrollo eco-sostenible con costos competitivos de productos.

Los polímeros biodegradables, sintéticos o naturales, que son depositados en entornos bioactivos, son degradados por la acción enzimática de los microorganismos, tales como bacterias, hongos y algas convirtiéndose en biomasa, CO₂, CH₄, agua y otras sustancias naturales. Los polímeros biodegradables de origen natural son también llamados biopolímeros, entre los cuales se incluyen polisacáridos, proteínas y poliésteres producidos por microorganismos, mientras que el alcohol polivinílico y los poliésteres son los más representativos entre los polímeros biodegradables sintéticos (Cerruti *et al.*, 2011).

El uso y desarrollo industrial de polímeros biodegradables está limitado debido a sus propiedades fisicoquímicas deficientes, propiedades mecánicas inadecuadas y de procesabilidad difícil; por lo tanto, la investigación se ha centrado en una creciente atención en los sistemas de polímeros biodegradables, tales como materiales compuestos y mezclas, en la que está asociada la matriz polimérica biodegradable con fibras de refuerzo, aditivos orgánicos e inorgánicos y polímeros degradables o no degradables (Cerruti *et al.*, 2008, 2009; Basile *et al.* 2010; Cerruti *et al.*, 2011; Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012). Los aditivos naturales obtenidos de residuos o subproductos de la industria agroalimentaria merecen especial

atención, ya que podrían mejorar el rendimiento de procesamiento y las propiedades fisicoquímicas (Cerruti *et al.*, 2011).

En la actualidad, los bio-residuos son producidos por la industria de transformación agroalimentaria y su disposición tiene un impacto significativo en el medio ambiente. Los subproductos generados durante la cosecha, procesamiento y almacenamiento de vegetales contienen sustancias biológicamente activas, que pueden ser útiles y cuya extracción proporcionaría un valor agregado.

1.9 Ácido Poliláctico (PLA)

En el mercado de los polímeros biodegradables, el ácido poliláctico (PLA) es sin duda uno de los candidatos más prometedores para futuros desarrollos, ya que no sólo es biodegradable sino que también se produce a partir de recursos renovables, como la remolacha azucarera y el almidón de maíz (Gardette *et al.*, 2011). El PLA es un poliéster derivado de la polimerización del ácido láctico (Figura 10) y ha demostrado ser biocompatible y biodegradable bajo condiciones compostables específicas (Auras *et al.*, 2004).

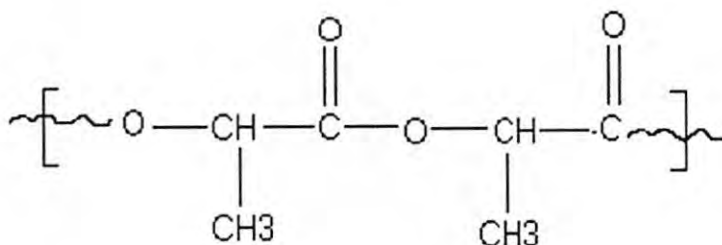


Figura 10. Estructura química del PLA. Fuente: Dong *et al.*, 2012.

Debido a sus características, el PLA está recibiendo una atención considerable para aplicaciones convencionales, tales como envases, fibras textiles y materiales nano-compuestos para aplicaciones técnicas (Basile *et al.*, 2010; Bocchini *et al.*, 2010; Mascheroni *et al.*, 2010; Gardette *et al.*, 2011; Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Therias *et al.*, 2012).

Actualmente, el PLA puede ser procesado por extruido para formar películas, co-extruido para películas multicapa y bandejas termo-formadas, moldeado por inyección o estirado por soplado para formar botellas (Auras *et al.*, 2004; Gardette *et al.*, 2011; Manzanarez-López *et al.*, 2011).

Sin embargo, los enlaces éster en el PLA son sensibles tanto a hidrólisis enzimática como química, lo que representa un desafío a la estabilidad durante el almacenamiento, y que al mismo tiempo, ésta cualidad es importante en la promoción de su biodegradación después de su deshecho. La velocidad de degradación del PLA depende de su estructura molecular y morfológica, así como de factores relacionados con el medio ambiente en el que se deposite (Manzanarez-López *et al.*, 2011).

De esta manera, uno de los inconvenientes del uso del PLA en la fabricación de envases, es el coeficiente de permeabilidad al oxígeno relativamente alto, lo que significa que los productos alimenticios susceptibles a la oxidación se exponen al oxígeno cuando están contenidos en envases de PLA, por lo tanto, es necesaria la reducción de la cantidad de oxígeno entrante en el envase. Ésta reducción puede ser obtenida a través de dos formas, mejora de la barrera de oxígeno del PLA o el uso de aditivos para incrementar la tortuosidad en la ruta de oxígeno cuando se difunde a través del envase (Iotti *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Manzanarez-López *et al.*, 2011).

Las investigaciones recientes se han enfocado al estudio del efecto protector del envase mediante la adición de antioxidantes en su elaboración, a fin de controlar las reacciones de oxidación, a esto se le conoce como envase activo (Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012).

Las propiedades físicas de las películas de PLA se pueden adaptar cambiando la composición y las condiciones de procesamiento. Los estudios sobre la carga y liberación de compuestos químicos diferentes de PLA incluyen la adición de compuestos antioxidantes tales como resveratrol, α -tocoferol y BHT (Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011).

Para llegar al uso del PLA en la fabricación de envases activos, es importante disponer de información acerca de su estabilidad o modificaciones durante el procesamiento o envejecimiento bajo diferentes condiciones. El envejecimiento por resistencia a la luz, especialmente UV, es un factor clave para las aplicaciones al aire libre de los materiales poliméricos debido a que la degradación por lo general reduce la vida útil de los productos con base polimérica (Gardette *et al.*, 2011).

Tras numerosas aplicaciones de materiales a base de PLA, un importante número de investigaciones se han dedicado al estudio de PLA y productos derivados del PLA bajo diferentes condiciones de degradación como hidrolíticas, microbiológicas, por irradiación UV y envejecimiento natural (Gardette *et al.*, 2011).

1.9.1 Estabilidad oxidativa del PLA

Por sus propiedades, específicamente del tipo mecánico, el PLA aún queda en desventaja frente a los polímeros convencionales, ya que es

térmicamente inestable provocándose pérdidas rápidas del peso molecular, debido a que los enlaces de éster de PLA tienden a degradarse durante el proceso térmico o bajo condiciones hidrolíticas (Auras *et al.*, 2004).

Además de la degradación hidrolítica del PLA, el comportamiento foto-químico que describe el mecanismo de oxidación por radicales formados en la estructura del PLA, en su forma natural, ha sido objeto de estudio (Bocchini *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2012; Therias *et al.*, 2012).

La absorción de luz ultravioleta por el PLA, excita al electrón (e^-_{cb}) en la banda de conducción, lo que deja un espacio vacío positivo (h^+_{vb}) en la banda de valencia. El estado excitado de los electrones en la banda de conducción y los espacios vacíos en la banda de valencia puede recombinarse y disipar la energía de entrada con los donantes y aceptores de electrones adsorbidos sobre la superficie del PLA que funciona como un semiconductor (debido a la adición de compuestos de esta naturaleza) o dentro de la doble capa eléctrica que rodea las partículas cargadas sobre la superficie del polímero.

El e^- excitado resultante de la irradiación reaccionará con los grupos hidroxilo de la superficie del PLA para formar un radical hidroxilo. Los aniones de oxígeno también son producidos durante la irradiación del PLA, los cuales son adsorbidos sobre la superficie polimérica produciendo radicales perhidroxilo activos. Las especies reactivas de oxígeno pueden iniciar la reacción de degradación, atacando las cadenas poliméricas vecinas. Por lo tanto, la foto-oxidación provoca un rompimiento de las cadenas en la estructura del PLA, a las cuales se debe la formación de productos de bajo peso molecular. La Figura 11 describe el mecanismo completo de foto-oxidación del PLA.

Este mecanismo implica una abstracción de un hidrógeno del esqueleto polimérico en el carbono terciario en la posición α del enlace éster, formando macroradicales (R0). Estos macro-radicales reaccionan con el oxígeno, dando lugar a los radicales peroxi de los que se originan los hidroperóxidos por abstracción de un átomo de hidrógeno lábil, que se propaga en la reacción de oxidación.

Una vez formados los hidroperóxidos, estos se pueden descomponer permitiendo la formación de radicales alcoxi e hidroxilo. El radical hidroxilo fácilmente propaga la oxidación de la cadena por abstracción de un hidrógeno en el carbono terciario, produciendo agua y un macroradical alquilo (R0). El macroradical alcoxi (R1) es el intermedio clave en la reacción y puede descomponer a través de una escisión β .

Entre las tres diferentes escisiones β que pueden ocurrir, solamente una reacción produce anhídridos (P1): lo que implica la homólisis del enlace C-C en la cadena macromolecular, la escisión del enlace C-CH₃, produciría un radical metilo CH₃ que puede ser oxidado para formar metanol. Esta reacción se considera el mecanismo principal que ocurre durante la foto-oxidación del PLA bajo irradiación a longitudes de onda superiores a 300 nm.

La hidrólisis del anhídrido macromolecular (P₁) formado por la escisión β del macroradical alcoxi (R₁) produce ácido acético y cadenas terminadas de ácidos. La oxidación en el carbono terciario del anhídrido P₁ puede producir un radical alcoxi por un mecanismo similar al que conduce a R₁. Una escisión β de este radical por homólisis del enlace C-C produce el radical R₂ y el anhídrido macromolecular P₁.

Este mecanismo explica por qué el anhídrido P₁ macromolecular es el producto principal observado durante el análisis de IR de las películas de

PLA. Esta reacción progresivamente acorta la cadena macromolecular. El radical R_2 puede abstraer un átomo de hidrógeno en la cadena principal macromolecular para formar R_0 y un anhídrido molecular P'_1 .

La hidrólisis de P'_1 produce ácido acético y ácido fórmico. El radical R_2 también puede evolucionar por descarbonilación. La pérdida de CO produce un radical R'_2 que puede conducir a la formación de ácido acético y de acetato de metilo por reacción con un radical metilo CH_3 . El acetato de metilo también podría obtenerse por la reacción de metanol con P_1 , mientras que el radical R_1 también puede descomponerse por una escisión β por homólisis del enlace C-O. Esta reacción produce radicales P_4 y R_3 .

La abstracción de un átomo de hidrógeno en la cadena macromolecular por radicales R_3 propaga la reacción en cadena y forma ácido carboxílico (P_5). La oxidación de P_5 a través del mecanismo clásico produce un radical alcoxi (R_4), donde la escisión β del enlace C-C conduce a R_5 y permite la formación de P_1 nuevamente. La dimerización de R_5 produce ácido oxálico y la reacción de R_5 con radicales hidroxilo -HO produce ácido carbónico.

La tendencia actual en la investigación conduce al conocimiento de los efectos ambientales y de procesamiento en el PLA, específicamente el efecto que causa la luz en los polímeros ha sido objeto de estudio, siendo la resistencia a luz UV un factor clave para la mayoría de aplicaciones de los materiales poliméricos (Bocchini *et al.*, 2010; Gardette *et al.*, 2011; Therias *et al.*, 2012).

La Tabla 4 muestra algunas investigaciones respecto a la foto-oxidación de películas de PLA nanocompuestas, donde el efecto obtenido sobre el PLA no es diferente o donde los nanocompuestos actúan como pro-degradantes. Se incluyen parámetros importantes acerca de las propiedades

Tabla 4. Estudios sobre el efecto de la foto-oxidación en PLA.

Materia prima	Condiciones de procesamiento e irradiación	Parámetros evaluados	Referencia
Poli (L,L-láctido) (4032D)	0% ZnO (nano partículas) Lámpara de mercurio (4) en posición vertical extrusoras de doble tornillo $\lambda: 295$ $T_s: 60^\circ\text{C}$ $t_i > 300\text{h}$ $T_p: 185-190^\circ\text{C}$ $E_p: 140\mu\text{m}$ 1% ZnO 3% ZnO	FTIR: 3 420, 1 845 cm^{-1} $M_w: 207-162$ PDI: 1.8 FTIR: 3 420, 1 845 cm^{-1} $M_w: 150-101$ PDI: 1.7-1.8 FTIR: 3 420, 1 845 cm^{-1} $M_w: 162-69$ PDI: 1.7-2	Therias <i>et al.</i> (2012).
Poli (L,L-láctido)	0% CaSO4 0.5H2O moldeo por compresión (150bars) $T_p: 200^\circ\text{C}$ $E_p: 150\mu\text{m}$ 40% CaSO4 0.5H2O	Lámparas de mercurio (400W) $\lambda: 300\text{nm}$ $T_s: 60^\circ\text{C}$ $t_i > 500\text{h}$ FTIR: 1 845 cm^{-1} $T_g: 60^\circ\text{C}$ $T_c: 115-118^\circ\text{C}$ $T_m: 149-151^\circ\text{C}$ FTIR: 3 400, 1 845, 1 670, 1624 cm^{-1} $T_g: 58-57^\circ\text{C}$ $T_c: 110-102^\circ\text{C}$ $T_m: 147-152^\circ\text{C}$	Gardette <i>et al.</i> (2011).
Ácido poliláctico (2002D)	5% (CLOSITE NA/CLOSITE 20A/PANGEL S9/HDK N20) prensa hidráulica de plato caliente (100bars) $T_p: 190^\circ\text{C}$ $E_p \leq 40-50\mu\text{m}$	Lámpara de mercurio (4) $\lambda > 300\text{nm}$ $T_s: 60^\circ\text{C}$ $T_i > 670\text{h}$ FTIR: 1845 cm^{-1} $T_g: 58-57^\circ\text{C}$ $T_c: 110-102^\circ\text{C}$ $T_m: 147-152^\circ\text{C}$	Bocchini <i>et al.</i> (2010).

T_p : temperatura de procesamiento, E_p : espesor de película, λ : longitud de onda, T_s : temperatura de superficie, M_w : peso molecular, FTIR: espectro infrarrojo, PDI: índice de polidispersión, T_g : temperatura de transición vítrea, T_c : temperatura de cristalización, T_m : temperatura de fusión, t_i : tiempo de irradiación.

del PLA y de los posibles cambios involucrados en los distintos procesos llevados a cabo, no solo debidos a la foto-oxidación, si no también posiblemente debidos a las condiciones de procesamiento para la obtención de las películas y por la adición de los nanocompuestos.

La temperatura de transición vítrea (T_g), se refiere a la temperatura a la cual se da una pseudotransición termo-dinámica en algunos materiales, es decir, un punto de temperatura intermedio entre el estado fundido y el estado rígido. En los polímeros, la temperatura de transición vítrea aumenta la densidad, dureza y rigidez; es decir, es un indicador del trabajo del plástico. Todos los polímeros termo-plásticos presentan una T_g , ya sean estos amorfos o semicristalinos.

Los polímeros amorfos al calentarse presentan solamente una transición (T_g); mientras que los polímeros semicristalinos presentan dos, además de la T_g , la temperatura de fusión (T_m), la cual indica el paso del estado sólido a líquido (fundido). Esto sólo se aprecia en polímeros cristalinos o semicristalinos.

Por otro lado, la temperatura de cristalinización (T_c) indica un punto intermedio de temperatura entre T_g y T_m , donde el descenso de la cantidad de calor perdida, por cada grado representa el descenso de energía por la cristalización.

Los estudios acerca de los efectos de la adición de extractos naturales, provenientes de residuos agroindustriales, han mostrado que la presencia de los compuestos fenólicos ejercen un efecto plastificante y aumentan la biodegradabilidad de películas a base de almidón (Cerruti *et al.*, 2011); mientras que a películas de polipropileno proveen estabilidad contra la oxidación térmica. Las pruebas mecánicas indican que estos compuestos antioxidantes proveen estabilidad al polímero durante el

procesamiento, específicamente, los extractos de bagazo de uva (Cerruti *et al.*, 2009). En condiciones de foto-oxidación, no se han reportado estudios.

Estudios muestran que existen ligeras variaciones en algunas propiedades (Tg, Tm) del PLA cuando se utilizan antioxidantes como aditivos, tal como el resveratrol y el α -tocoferol (Manzanarez-López *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto en las propiedades mecánicas o la foto-oxidación con la adición de antioxidantes, no ha sido evaluado.

De aquí surge el interés de utilizar compuestos antioxidantes que protejan la estructura del PLA contra la termo-oxidación o foto-oxidación. Es importante considerar que los antioxidantes, a fin de ser incorporados a la matriz de PLA, deben ser de origen natural para mantener el sistema como un biopolímero y en cantidad suficiente para asegurar la protección antioxidante eficaz.

En vista de la composición fenólica de los extractos de bagazo de uva y su escaso aprovechamiento, para este estudio, se ha propuesto la utilización de los extractos de bagazo de uva industrial Carignan como una fuente de compuestos antioxidantes que brinden estabilidad a la estructura del PLA, un polímero biodegradable de origen natural.

II. HIPOTESIS

Los compuestos fenólicos contenidos en el bagazo de uva roja Carignan (*Vitis vinifera* L.), proveniente de un proceso de extracción y fermentación de jugo a nivel industrial, poseen capacidad antioxidante para proteger a una matriz polimérica biodegradable al ser incorporados.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Identificar los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de uva roja Carignan (*Vitis vinífera* L.) y determinar su capacidad antioxidante, para su uso en una matriz polimérica biodegradable.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos presentes en los extractos del bagazo de uva Carignan (*Vitis vinífera* L.) y en sus constituyentes (cáscara, semilla y pedúnculo).
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos del bagazo de uva Carignan (*Vitis vinífera* L.) y de sus constituyentes (cáscara, semilla y pedúnculo), por métodos químicos.
- Seleccionar un sistema de solventes adecuado para la extracción de los compuestos fenólicos y comparación entre el bagazo industrial y un bagazo de laboratorio.
- Determinar el contenido de antocianinas, carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos totales en el extracto de bagazo de uva roja Carignan (*Vitis vinífera* L.).
- Incorporar el extracto de bagazo de uva Carignan (*Vitis vinífera* L.) en una matriz polimérica de PLA y evaluar los cambios en el polímero mediante propiedades térmicas.
- Estudiar el efecto del extracto de bagazo de uva sobre la estabilidad foto-oxidativa del PLA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materia Prima

El bagazo industrial (BI) de uva roja Carignan (*Vitis vinífera* L.), fue colectado en el mes de julio de 2010, procedente de la empresa vitivinícola Pedro Domecq (Pernod Ricard México). El bagazo se recolectó inmediatamente después del proceso de destilación (72 h de fermentación, 8.5°Bx), el cual fue prensado manualmente para eliminar el exceso de agua y almacenado a -20°C.

El BI fue separado en sus constituyentes individuales (semilla, cáscara y pedúnculo). Como control, se tomó del mismo lote una muestra de uva fresca Carignan, que fue prensada para obtener un bagazo de laboratorio (BL). Los BI y BL se almacenaron bajo las mismas condiciones.

El ácido poliláctico (94% L-PLA) granular (Ingeo™ PLA 4043D) se obtuvo de NatureWorks LLC (Blair, NE, EE.UU.).

4.2 Reactivos

Los solventes y reactivos empleados para la extracción fueron de grado analítico. Todos los reactivos, solventes y estándares se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Los solventes utilizados para los análisis en HPLC fueron metanol y ácido fórmico (grado HPLC) y agua miliQ. Las curvas de calibración se llevaron a cabo para catequina, epicatequina, ácido clorogénico, resveratrol, rutina, quercetina y miricetina.

4.3 Extracción de Compuestos Fenólicos

Los sistemas de solventes evaluados para el BI son expresados en proporciones de volumen (v:v o v:v:v): metanol (MeOH):agua (6:4), MeOH:agua (7:3), MeOH:agua (9:1), MeOH:agua:acetona (ACE) (3:3.5:3.5), MeOH:agua (6:4) 1.2 M (HCl), etanol (EtOH):agua (6:4), EtOH:agua (7:3), EtOH:agua (8:2), EtOH:agua (9:1), EtOH:agua (7:3) 1.2 M (HCl) y EtOH:agua (7:3) 2.4 M (ácido acético, ACA). BI fue separado en sus constituyentes individuales: semilla, cáscara y pedúnculo. Los compuestos fenólicos de los constituyentes de BI se extrajeron con MeOH:agua (6:4), MeOH:agua (7:3), MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5).

Los extractos de BI y BL se obtuvieron utilizando EtOH:agua (6:4). Los compuestos fenólicos en el bagazo se extrajeron como describe Molina-Quijada *et al.* (2010), con algunas modificaciones. La temperatura (25°C), presión (1 Bar) y tamaño de partícula (3-5 mm) permanecieron constantes. La muestra en peso fresco (5 g) fue extraída en dos etapas con 10 mL del sistema de solventes. Posteriormente, los extractos fueron filtrados con papel Whatman N° 2 para su posterior análisis.

En las pruebas preliminares se consideraron varias extracciones para obtener la mayor eficiencia de extracción de compuestos fenólicos. Después de la segunda extracción no se observó una variación en el contenido de los compuestos fenólicos (<1%).

Los extractos de bagazo fueron evaporados en un evaporador rotatorio (Modelo 78892-00, Labconco Co. Kansas City, Missouri) a 40°C durante 2 h. Una vez evaporada la parte alcohólica, el extracto se liofilizó, para facilitar su manejo y transporte, hasta la elaboración de las películas adicionadas. Para los análisis de antocianinas, carbohidratos, proteínas y

ácidos urónicos, así como para la agregación a la matriz polimérica, los extractos de bagazo liofilizados (EB) fueron disueltos en EtOH:agua (6:4).

4.4 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (FT)

Una muestra de 0.05 mL de extracto se mezcló con 3 mL de agua destilada y 0.25 mL de solución Folin-Ciocalteu 1 N. Después de 5 min, 0.75 mL de carbonato sódico seguido de 0.95 mL de agua destilada. La absorbancia se midió después de 30 min a 765 nm con un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Australia Pty Ltd, Australia, modelo Cary 100) (Tundis *et al.*, 2011). Una curva de calibración con ácido clorogénico como estándar fue utilizada para obtener una relación entre la absorbancia de la muestra y la concentración de ácido clorogénico. El contenido de FT en las muestras se expresó como g equivalentes de ácido clorogénico (EAC) kg^{-1} de bagazo de uva en peso fresco (pf).

4.5 Ensayo de Flavonoides Totales (FvT)

Los FvT se determinaron de acuerdo a Molina-Quijada *et al.* (2010). A 1 mL de extracto en 4 mL de agua destilada se añadió 0.3 mL de NaNO_2 (5%) y 0.3 mL de AlCl_3 (10%). Después de mezclar, 2 mL de NaOH (5% p/v) se añadieron, el complejo resultante se leyó a 352 nm (Cho *et al.*, 2004). Se utilizó quercetina dihidratada como estándar. Los resultados se expresaron como g equivalentes de quercetina (EQ) kg^{-1} de bagazo de uva pf (Zamani *et al.*, 2011).

4.6 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Individuales

La identificación y separación de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en un equipo HPLC (Varian 9012,

México, DF, México) equipado con una columna Supelcosil LC18 (30 cm x 0.4 cm x 5 m, Supelco, Bellefonte, PA) y un detector de arreglo de diodos (Varian Prostar 335 México, DF, México) considerando las longitudes de onda a 320, 360 y 370 nm. Se empleó metanol:ácido fórmico (9.5:0.5) como fase móvil a un flujo de 1.2 mL min⁻¹ considerando el siguiente gradiente: 98:02 a 68:32 en 30 min, 68:32 a 60:40 en 10 min y 60:40 a 05:95 en 10 min. El sistema volvió a 98:02 en 10 min a la misma velocidad de flujo (Cantos *et al.*, 2000).

Los compuestos fenólicos presentes en el extracto se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención de sus respectivos estándares. Para confirmar la identificación, se realizaron adiciones de cada compuesto (spiking). Se utilizaron curvas de calibración (5-30 µg mL⁻¹) para la cuantificación de ácido clorogénico, *trans*-resveratrol, rutina, quercetina y miricetina, con un límite mínimo de cuantificación (LMC) de 0.5 µg mL⁻¹.

La catequina y la epicatequina se identificaron y cuantificaron con un detector de fluorescencia (Varian 9075, México, DF, México) a 280 nm de longitud de onda de excitación y 310 nm de longitud de onda de emisión con un LMC= 10 µg mL⁻¹. Una columna Microsorb C18 (100 x 4,6 mm) (Varian, México, DF, México) se empleó y una elución isocrática con la misma fase móvil (90:10) a un flujo de 1 mL min⁻¹. El contenido fenólico se expresó como mg kg⁻¹.

4.7 Evaluación de la Capacidad Antioxidante (CA)

4.7.1 Capacidad Antioxidante por el Radical Catiónico ABTS^{•+}.

Este método se basa en la reducción del color verde/azul del radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), de acuerdo con

la capacidad de las moléculas antioxidantes para extinguir la vida del radical $ABTS^{•+}$, en comparación con Trolox, análogo de la vitamina E. Una solución estable se obtuvo con 19.2 mg del reactivo de ABTS en 5 mL de agua destilada. Un volumen de 0.088 mL de solución de persulfato de potasio (37.8 mg K_2SO_4 en 1 mL de agua destilada) se mezcló con la solución de ABTS. La mezcla se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso (Pellegrini *et al.*, 2003). La solución de trabajo del radical $ABTS^{•+}$ se obtuvo mediante la dilución en etanol de la solución madre medida a una absorbancia de 0.70 ± 0.1 unidades de absorbancia a 734 nm a 1 min de reacción. La reacción se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Australia Pty Ltd, Australia, modelo Cary 100). Los resultados se expresaron como μmol equivalente Trolox (ET) g^{-1} de bagazo de uva pf (Molina-Quijada *et al.*, 2010).

4.7.2 Capacidad Neutralizadora de Radicales Libres por DPPH[•].

Este método se basa en la capacidad del antioxidante para estabilizar el catión radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). A una alícuota de 0.1 mL de extracto de la muestra se añadieron 3.9 mL de reactivo de DPPH (0.025 mg mL^{-1}) y se agitó vigorosamente. La reacción se incubó en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. El cambio de coloración se leyó a 515 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Australia Pty Ltd, Australia, modelo Cary 100) (Molina-Quijada *et al.*, 2010). La CA de las muestras se expresaron como μmol equivalente Trolox (TE) g^{-1} de bagazo de uva pf (Sreeramulu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010).

4.8 Determinación de Antocianinas Monoméricas Totales

Este método se determina con soluciones amortiguadoras de diferentes valores de pH. La concentración se determina por un diferencial de absorbancias a 520 nm y 700 nm (Giusti y Wrolstad, 2001; Del Carpio *et*

al., 2009). Para calcular la absorbancia de la muestra diluida, se utilizó la siguiente fórmula:

$$Abs_f = (Abs_{520} - Abs_{700})_{\pi H1} - (Abs_{520} - Abs_{700})_{\pi H4.5} \quad (1)$$

Dónde:

Abs_f= valor de la absorbancia final.

Abs₅₂₀= valor de absorbancia medida a dicha longitud de onda para cada solución (indicada por el valor de pH).

La concentración de las antocianinas monoméricas totales fue determinada con la siguiente ecuación:

$$ATM = \frac{(Abs_f \times PM \times FD \times 1000)}{(\epsilon)} \quad (2)$$

Dónde:

AMT= antocianinas monoméricas totales.

Abs_f= absorbancia final.

PM= peso molecular de la antocianina predominante.

ε= absortividad molar de la antocianina predominante.

FD= factor de dilución (volumen total/volumen extracto).

Los resultados fueron expresados como mg de malvidina-3-glucósido (Mv-3-gl) g⁻¹ de extracto peso seco (ps) (Cantos *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 2004; Goupy *et al.*, 2009).

4.9 Determinación de Carbohidratos Totales

Este método es general y puede ser aplicado para la determinación de azúcares reductores y no-reductores y para otras clases de carbohidratos, incluyendo los oligosacáridos. Se basa en la formación de un complejo aromático dado por la reacción del fenol y del ácido sulfúrico con los

carbohidratos presentes en la muestra. Esta reacción causa la ruptura de las ligaduras glucosídicas formando un complejo.

Para la medición, se tomaron 100 μL de extracto y se llevó a un volumen final de 850 μL con agua destilada, para después añadir 2.5 mL de ácido sulfúrico 96% y 150 μL de fenol 13.3%. El complejo formado se dejó reposar por 30 min para luego ser leído a 490 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Beckman Coulter Modelo DU730 (Brea, USA). El contenido de carbohidratos totales se expresó como mg equivalentes de glucosa (EG) g^{-1} extracto ps (Giusti y Wrolstad, 2001).

4.10 Determinación de Proteínas Totales (Bio-Ray Protein Micro-Assay)

El ensayo Bio-Ray se basa en una reacción colorimétrica en respuesta a la variación de la concentración de proteína en la solución ácida del ensayo, la cual contiene Coomassie® Brilliant Blue G-250. Para determinar el contenido de proteínas, se tomaron 800 μL del extracto y se añadieron 200 μL de reactivo Coomassie®. Después de agitar vigorosamente, se incubó a temperatura ambiente por al menos 5 min. La absorbancia fue medida a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Beckman Coulter Modelo DU730 (Brea, USA). La concentración de proteína fue expresado como mg albumina de suero bovino (BSA) g^{-1} extracto ps (Cerna *et al.*, 2010).

4.11 Determinación de Ácidos Urónicos Totales

El ácido urónico en la forma del ácido galacturónico es el componente principal del polisacárido pectínico del ramo galacturano presente en la pared celular de los vegetales (Pinelo *et al.*, 2006a). La determinación de ácidos urónicos totales es una determinación colorimétrica (Filisetti-Cozzi y Carpita, 1991). Para llevar a cabo el ensayo,

se tomaron 400 μL de extracto y se añadieron 2.4 mL de $(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O})$ 75 mM (1.501 g en 100 mL) de ácido sulfúrico concentrado. Una vez agitada la solución, se colocó en baño a 100°C por 20 min. Después de enfriada la solución se añadieron 80 μL de NaOH 0.5% solo a la solución control y se agito para ver el cambio de coloración (a rosa). Después de 10 min de reposo se leyó la absorbancia a 525 nm, utilizando como blanco la solución control con NaOH, en un Espectrofotómetro UV-VIS Beckman Coulter Modelo DU730 (Brea, USA). Los resultados se expresan como mg ácido galacturónico (EAU) g^{-1} extracto ps.

4.12 Impregnación de PLA con el Extracto de Bagazo de Uva

El extracto liofilizado fue disuelto en 100 mL de EtOH:agua (6:4). Una cantidad apropiada de PLA granulado fue puesta en la solución etanólica. El PLA fue impregnado con 1, 3 y 5% p/p de extracto (Soto-Valdez *et al.*, 2011). Las mezclas fueron agitadas por 22 h hasta obtener una impregnación homogénea, después se evaporó el solvente en un horno de vacío a 30°C a 22 h (Figura 12).

4.13 Elaboración de las Películas de PLA Impregnadas con EB

Las películas de PLA fueron obtenidas utilizando un extrusor Teach-Line E20T (Ebesberg, Germany) equipado con una unidad de rodillos de enfriamiento Collin Teach-Line CR 727. El perfil de temperaturas es el siguiente (desde la tolva hasta la salida): 165, 170, 170, 170°C con un espesor de película de $75 \pm 10 \mu\text{m}$ (Manzanarez-López *et al.*, 2011). Se obtuvieron 3 lotes según el porcentaje de adición del extracto y se nombraron como: PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%} (Figura 13).

A fin de comparar el efecto por la adición del extracto en la matriz polimérica, se obtuvieron películas de PLA adicionadas con resveratrol, un

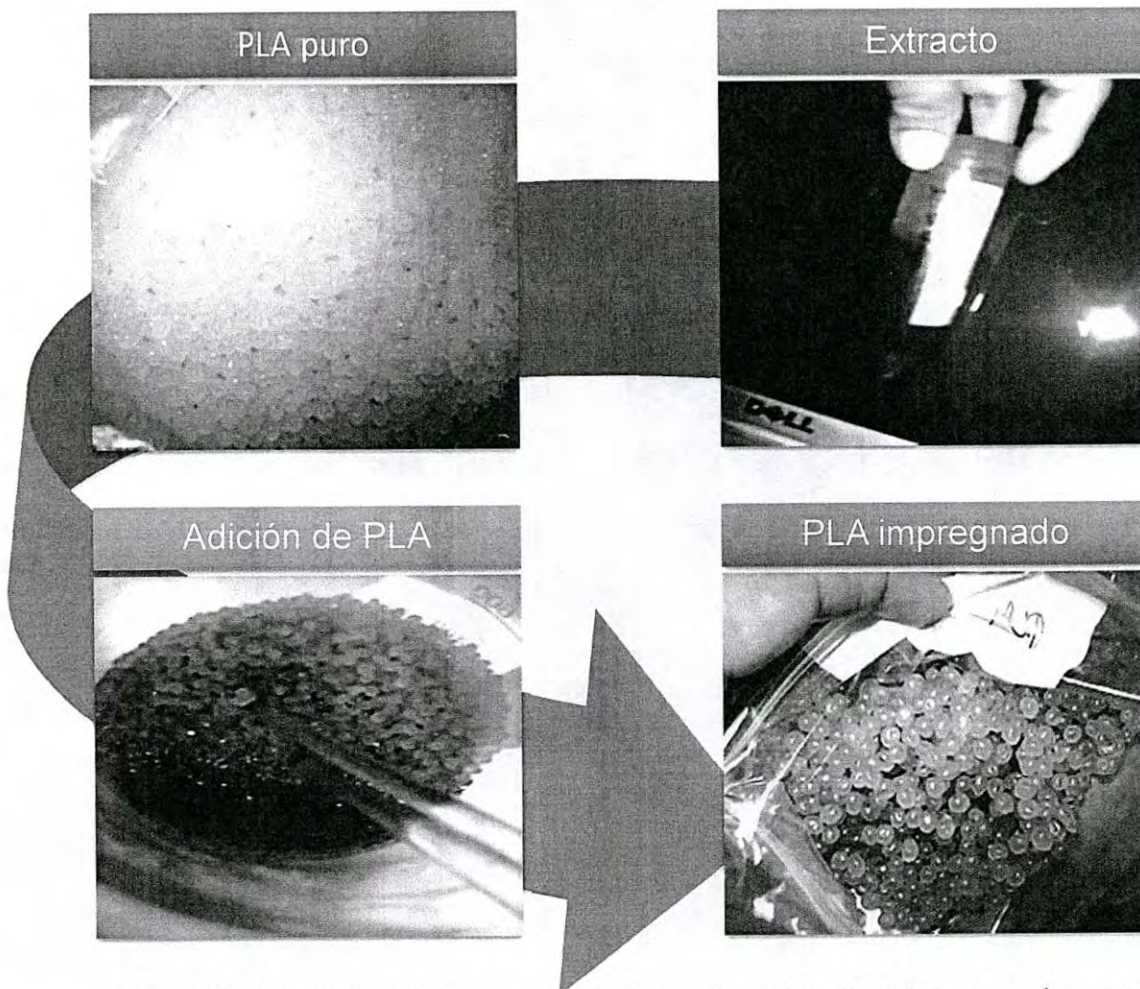


Figura 12. Esquema del proceso de impregnación de PLA con el extracto de bagazo de uva.

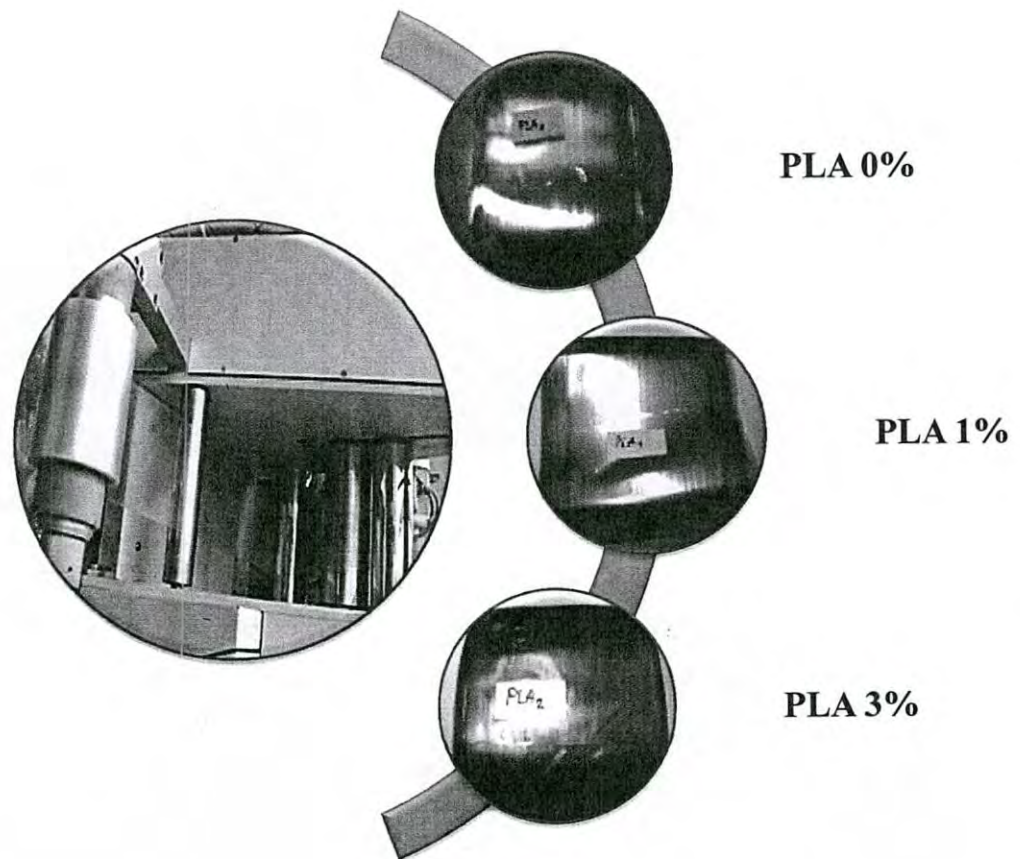


Figura 13. Esquema de elaboración por extrusión de las películas de PLA adiciones con el extracto de bagazo de uva Carignan.

antioxidante presente en los extractos de bagazo de uva roja Carignan. Las películas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Envases del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (C.I.A.D A.C.).

Estas películas, a las que se nombran como: PLA₇, PLA₁₀ y PLA₁₁, conteniendo 0, 1 y 3% en peso de resveratrol, se extruyeron con un equipo de extrusión por soplado a escala piloto (Beutelespacher, México) con un espesor de 50.8 μm (Soto-Valdez *et al.*, 2011).

4.14 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para medir las características térmicas de las películas, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo DSC822), a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ desde 0 hasta 250°C . Los eventos de interés, es decir, la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de cristalización en frío (T_c) y el porcentaje de cristalinidad (χ_c) fueron determinados en el segundo calentamiento. χ_c se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación (Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011):

$$\chi_c(\text{wt}\%) = 100 \times \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m(1-x)} \quad (3)$$

Dónde:

ΔH_c = entalpía de cristalización en frío.

ΔH_m = entalpía de fusión.

ΔH_m° =calentamiento de fusión cristalina del PLA puro (93.7 J g^{-1})

x = peso de la muestra.

4.15 Análisis Térmico Diferencial (DTA) y de Termo-gravimetría (TG)

Las pruebas de termo-gravimetría fueron realizadas al extracto del bagazo de uva, al estándar de resveratrol y a todos los lotes de películas

antes de la aplicación de cualquier tratamiento. El TG fue realizado en atmósferas de aire y nitrógeno desde 90°C a 600°C con incrementos de 10°C min⁻¹, en un equipo Perkin Elmer Pyris Diamond differential thermal analyzer (Waltham, USA) (Cerruti *et al.*, 2009; Cerruti *et al.*, 2011). Para eliminar el agua que pudiera ser absorbida por la muestra, se sometió a un tratamiento isotérmico a 90°C por 30 min antes del correr el calentamiento de prueba. El esquema general de TG así como de DSC se muestra en la Figura 14.

4.16 Acondicionamiento de las Películas de PLA

Las películas fueron colocadas entre dos placas metálicas en un horno de vacío a 60°C para acondicionarlas térmicamente e impedir la deformación de la superficie durante la oxidación, para después obtener los especímenes de PLA que serían sometidos a las condiciones de foto-oxidación acelerada (Cerruti *et al.*, 2009; Cerruti *et al.*, 2011)

4.17 Envejecimiento Acelerado: Foto-oxidación

Los especímenes fueron irradiados ($\lambda > 250$ nm) en una cámara climática Angelantoni Sunrise 250 (Massa Martana, Italy), equipada con una lámpara de mercurio-UV. La Figura 15 muestra el mapa de radiación ($\mu\text{W cm}^{-2}$) dentro de la cámara climática. Los especímenes fueron constantemente removidos dentro de la cámara a fin de uniformizar la radiación y ser colectados a diferentes tiempos (horas) a fin de seguir los cambios en las propiedades mecánicas y el espectro al infrarrojo (FTIR) (Bocchini *et al.*, 2010).

La Figura 16 muestra esquemáticamente los análisis a los que fueron sometidos los especímenes una vez llevada a cabo la foto-oxidación.

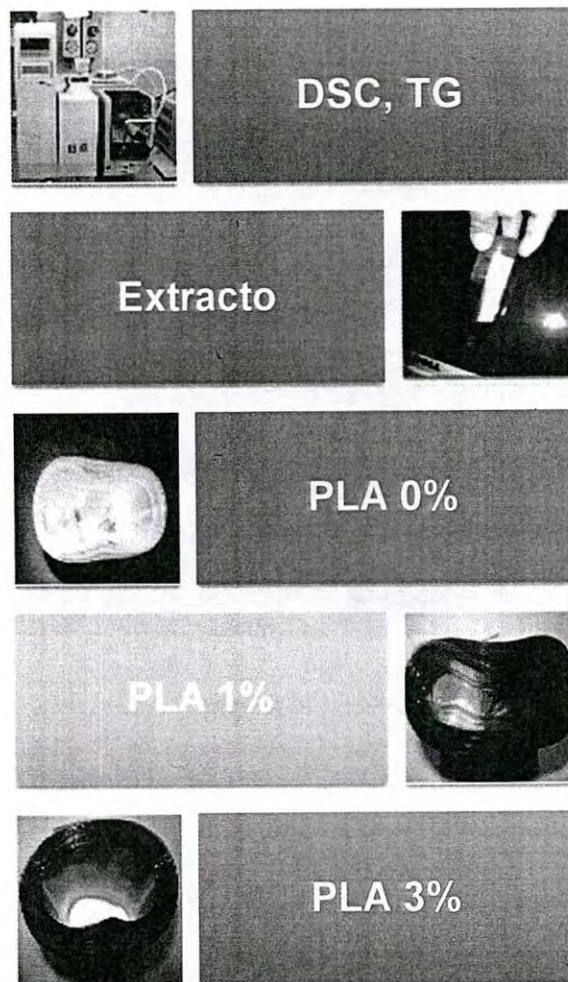


Figura 14. Esquema general de TG y DSC del extracto de bagazo de uva y las películas de PLA.

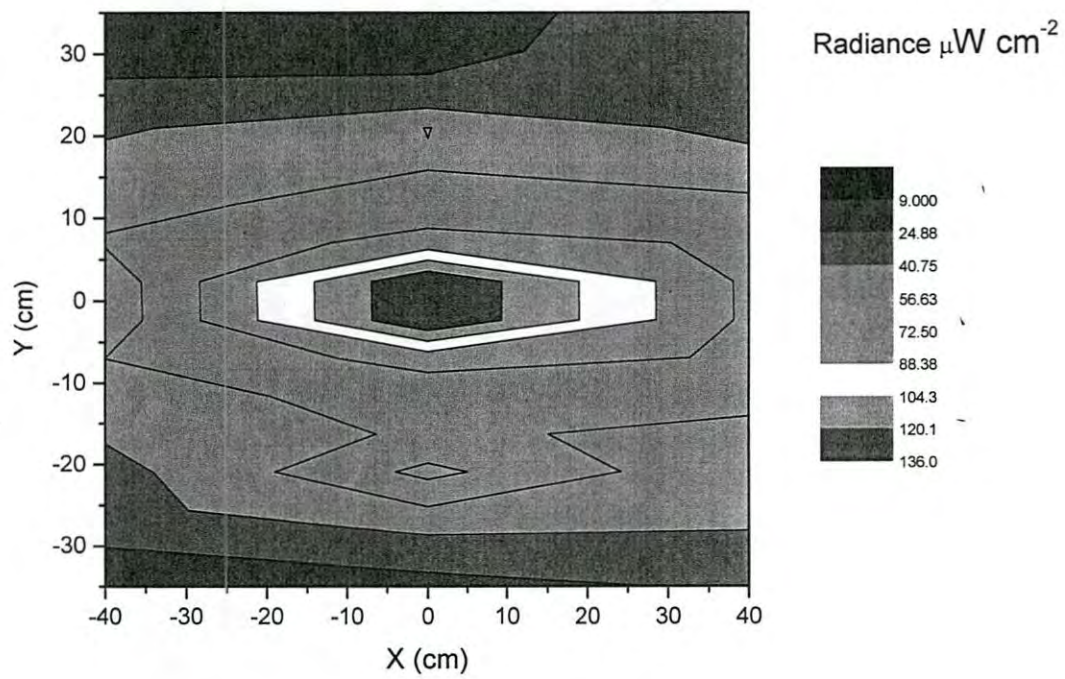


Figura 15. Mapa de radiación dentro de la cámara de foto-oxidación.

Foto-oxidación

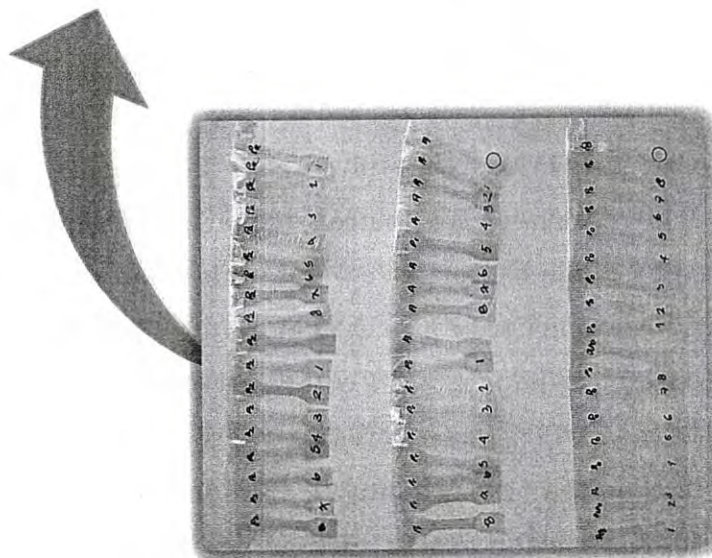
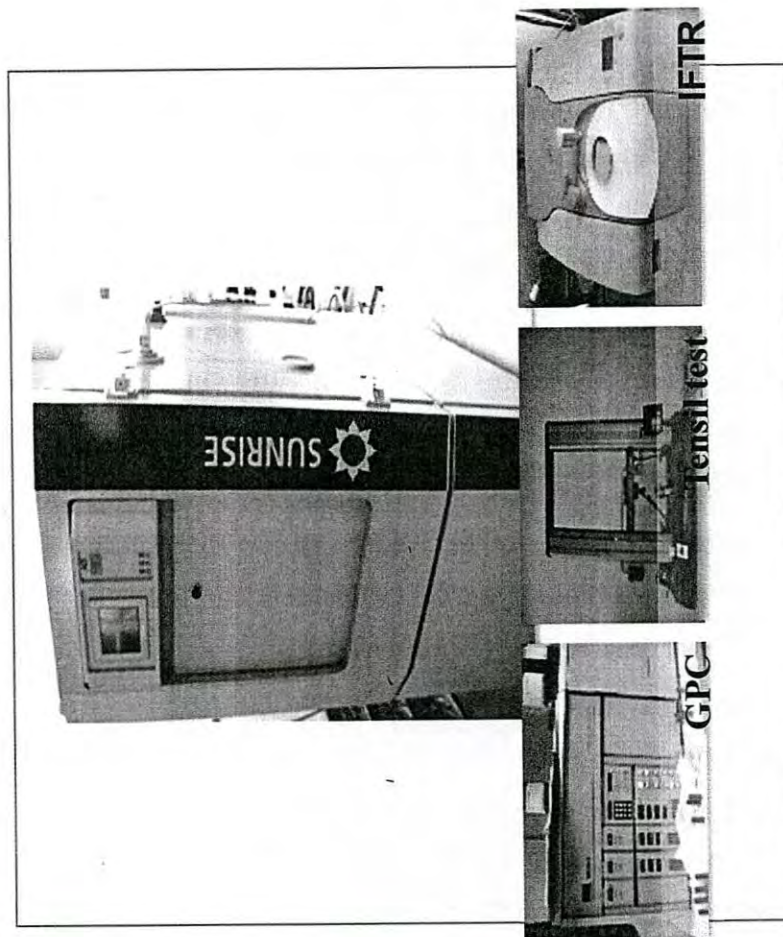


Figura 16. Análisis en los especímenes de PLA foto-oxidados.

4.18 Variaciones en el Peso Molecular (M_w)

Se siguió la variación del peso molecular en la estructura del PLA debido a la adición del extracto del bagazo de uva mediante un sistema GPC Waters 150 C (Milford, EE.UU.), equipado con un detector de dispersión de luz por evaporación (LSE), a 25°C. Este detector funciona por nebulización de flujo del disolvente de un sistema de cromatografía de líquidos por arrastre y las gotas resultantes en una corriente de gas. Cuando un analito es menos volátil que la fase móvil, se mantiene en la corriente de gas como partículas de soluto y fluye hacia el detector ELS, una vez allí, las partículas dispersan el haz de luz. La cantidad de luz dispersada se mide y tiene relación con la concentración de material de elución. Se utilizaron dos columnas consecutivas (Polymer Laboratories).

Las películas foto-oxidadas se disolvieron en THF (mg mL^{-1}), que también se utilizó como fase móvil a un flujo de 1 mL min^{-1} . Las curvas de calibración para el análisis de GPC se obtuvieron usando diez patrones de poliestireno con pesos moleculares desde 0.5 hasta 3,000 KDa. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.19 Medición de las Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas se midieron en base a los ensayos de tracción, utilizando un dinamómetro Instron model 5564 (Instron Canton, USA) equipado con una celda de carga de 1 kN (velocidad de separación de la trampa 5 mm min^{-1}), de acuerdo a la ASTM D882-02 a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $45 \pm 5\%$ RH. Los ensayos fueron llevados a cabo a los diferentes tiempos de foto-oxidación (Cerruti *et al.*, 2011). Los efectos de interés, es decir, elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), Modulo de tensión (M) y límite elástico (Y), son reportados como una función del tiempo de foto-oxidación.

4.20 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

Para medir los cambios en el espectro al infrarrojo, se utilizó un equipo FT-IR Perkin-Elmer 176 100 espectrómetro (Waltham, USA). Los espectros fueron realizados en modo transmisión con 32 lecturas en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} (resolución 4 cm^{-1}) (Cerruti *et al.*, 2011). El cambio en la concentración de los grupos funcionales fue medido como la diferencia de área a los diferentes tiempos de foto-oxidación bajo la banda de absorbancia y en comparación con las películas no sometidas a foto-oxidación, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\Delta A = A_0 - A_i \quad (4)$$

Dónde:

ΔA = cambio total en el área del grupo funcional.

A_0 =área a tiempo cero.

A_i =área a tiempo i .

4.22 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para evaluar la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, un diseño completamente al azar fue utilizado. La variable respuesta fue Y_{ij} (concentración de los compuestos extraídos y la capacidad antioxidante). Los extractos de semilla, cáscara y pedúnculo se compararon con el extracto de BI cuando se utilizaron los mismos sistemas de disolventes. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_{ij} + \epsilon_{ij} \quad (5)$$

Dónde:

Y_{ij} = valor de la concentración de compuestos bioactivos (FT, FvT y capacidad antioxidante).

μ = efecto de la media general.

β_i = efecto del sistema de solventes.

\mathcal{E}_{ij} = error experimental.

Los datos se analizaron por ANOVA de una vía con el paquete estadístico SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Las diferencias significativas entre las medias se analizaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los resultados experimentales son medias \pm SD de tres mediciones paralelas y análisis.

Para evaluar el efecto de la adición de los extractos de bagazo de uva o de la adición del resveratrol en la matriz de PLA, se consideró un diseño experimental de bloques (adición del extracto de bagazo de uva y adición del resveratrol) con dos tratamientos (concentración del extracto de bagazo de uva y concentración del resveratrol), donde la variable de respuesta (Y'_{ij}) se define como el valor de las propiedades evaluadas en los análisis de DSC, TG, GPC y pruebas mecánicas, dada según la siguiente ecuación:

$$Y'_{ij} = \mu' + \tau_{ij} + \beta'_{ij} + \varepsilon'_{ij} \quad (6)$$

Dónde:

Y'_{ij} = valor de las propiedades evaluadas en los análisis de DSC, TG, GPC y pruebas mecánicas.

μ' = efecto de la media general.

τ_{ij} = efecto del bloque (adición del extracto de bagazo de uva y del resveratrol).

β'_{ij} = efecto de la concentración del aditivo (extracto de bagazo de uva y del resveratrol).

\mathcal{E}'_{ij} = error experimental.

Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías con el programa estadístico SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Las diferencias significativas entre las medias se analizaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Los resultados experimentales son medias \pm SD de tres mediciones paralelas y análisis.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fenoles y Flavonoides Totales

El contenido de FT en los extractos del bagazo de variaron de 1.74 a 7.65 g EAC kg⁻¹ de bagazo pf (Tabla 5). La mayor extracción de FT se obtuvo con los sistemas MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) (7.65±0.16g EAC kg⁻¹ de bagazo pf) y EtOH:agua (6:4) (7.24±0.32g EAC kg⁻¹ de bagazo pf). Después del sistema MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5), el orden de la eficiencia de la extracción de FT fue para los sistemas etanólicos seguidos por los sistemas que contienen agua. Por lo tanto, la proporción de alcohol más alta presentó la menor eficiencia de extracción.

Las concentraciones mayores de FvT se extrajeron tanto con EtOH:agua (7:3) 1.2 M (HCl) (3.37±0.09 g EQ kg⁻¹ de bagazo pf) como con MeOH:agua (6:4) 1.2 M (HCl) (3.18±0.10 g EQ kg⁻¹ bagazo pf), como se observa en la Tabla 5. La hidrólisis ácida permite la liberación de los compuestos fenólicos unidos a azúcares de hemicelulosa y glucosa, pero simultáneamente, una mezcla compleja de toxinas se pueden formar mediante la producción de subproductos no deseados de la reacción (tal como ácido acético liberado a partir de grupos acetilo, así como el furfural y el hidroximetilfurfural generados por la deshidratación de azúcares) (Rivera *et al.*, 2007).

Existen escasos estudios que informan sobre extracciones con estos sistemas de solventes acidificados, especialmente cuando se realizan extracciones para la obtención de extractos para la aplicación en la industria alimentaria.

Tabla 5. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante en el BI por diferentes sistemas de solventes.

Sistema de solvente	FT		FvT	DPPH		ABTS	
	g EAC kg ⁻¹	g EQ kg ⁻¹		μMol ET/g	μMol ET/g		
MeOH:agua (6:4)	3.09±0.12 ^c	2.62±0.01 ^e	89.38±0.43 ^g	40.06±1.70 ^e			
MeOH:agua (7:3)	5.56±0.02 ^e	2.55±0.01 ^d	80.16±0.07 ^f	30.73±0.42 ^d			
MeOH:agua (9:1)	1.74±0.04 ^a	1.25±0.26 ^a	8.01±1.44 ^a	19.43±1.42 ^a			
MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	7.65±0.16 ^h	2.56±0.07 ^{de}	101.81±2.84 ^h	69.06±1.26 ^g			
MeOH:agua (6:4) 1.2 M (HCl)	6.55±0.18 ^f	3.18±0.10 ^g	145.74±1.52 ⁱ	48.52±0.47 ^f			
EtOH:agua (6:4)	7.24±0.32 ^{gh}	2.44±0.06 ^c	12.41±0.18 ^d	25.30±0.50 ^c			
EtOH:agua (7:3)	7.09±0.01 ^g	2.39±0.07 ^b	11.26±0.36 ^c	26.10±0.10 ^c			
EtOH:agua (8:2)	6.57±0.01 ^f	2.42±0.09 ^{bc}	10.45±.042 ^b	22.13±0.24 ^b			
EtOH:agua (9:1)	2.55±0.09 ^b	2.31±0.02 ^b	6.96±0.11 ^a	18.31±1.83 ^a			
EtOH:agua (7:3) 1.2 M (HCl)	7.08±0.23 ^g	3.37±0.09 ^g	153.87±2.88 ^j	78.51±1.88 ^h			
EtOH:agua (7:3) 2.4 M (ACA)	5.34±0.18 ^d	2.90±0.02 ^f	31.83±0.08 ^e	21.02±1.74 ^{ab}			

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

En cuanto a los constituyentes de BI, las extracciones de los compuestos fenólicos fueron realizadas con los sistemas MeOH:agua (6:4), MeOH:agua (7:3) y MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) (Tabla 6). Existe una amplia variedad de estudios sobre extracciones con sistemas metanólicos, ya que el metanol es uno de los solventes más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos (Spigno y De Faveri, 2007; Song *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2011b).

Las concentraciones más altas de FT se obtuvieron utilizando MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) para todos los constituyentes como para los extractos de BI. El contenido de FT en los constituyentes de BI, variaron entre los diferentes extractos de 3.80 a 10.40 g EAC kg⁻¹ de semilla pf, de 2.71 a 6.50 g EAC kg⁻¹ de cáscara pf y de 2.90 a 5.07 g EAC kg⁻¹ de pedúnculo pf (Tabla 6). Por otro lado, los FvT estuvieron en el rango de 2.15 a 2.72 g EQ kg⁻¹ pf. Los valores de FvT utilizando MeOH:agua (6:4), MeOH:agua (7:3) y MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) fueron similares ($p>0.05$) en cada constituyente.

Pinelo *et al.* (2006a) publicaron una compilación de diversos estudios en uva y sus constituyentes, reportando las concentraciones de compuestos fenólicos en rangos de 0.37–4.88 g kg⁻¹ de bagazo, de 0.60–4.01 g kg⁻¹ cáscara, de 3.58–6.20 g kg⁻¹ de semilla y de 0.22–1.11 g kg⁻¹ de pedúnculo, valores obtenidos con diferentes sistemas de solventes e inferiores a los encontrados en el presente estudio.

Otros estudios muestran rangos de 1.50–85.80 g equivalentes de ácido gálico kg⁻¹ ps para FT (Spigno y De Faveri, 2007; Zhang *et al.*, 2011b), mientras que para FvT se reportan valores de 4.40–7.50 g equivalentes de quercetina kg⁻¹ ps (Zhang *et al.*, 2011b) y de 31.50–83.40 g equivalentes de quercetina kg⁻¹ ps (Tommasi y Miceli, 2003) en diferentes extractos a partir de residuos de vinificación.

Tabla 6. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante de los constituyentes de BI obtenidos por tres sistemas de solventes metanólicos.

Constituyente	FT g CLA kg ⁻¹	FvT g QE kg ⁻¹	DPPH μMol ET g ⁻¹	ABTS μMol ET g ⁻¹
S MeOH:agua (6:4)	3.80±0.09 ^d	2.63±0.04 ^{bc}	77.19±0.37 ^c	75.15±0.57 ^h
S MeOH:agua (7:3)	9.03±0.06 ^h	2.67±0.02 ^c	133.76±1.87 ^h	76.32±0.29 ⁱ
S MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	10.40±0.12 ⁱ	2.72±0.07 ^c	126.72±0.36 ^g	57.58±0.88 ^g
C MeOH:agua (6:4)	2.71±0.09 ^b	2.59±0.01 ^b	81.37±0.06 ^f	40.01±0.49 ^e
C MeOH:agua (7:3)	2.38±0.01 ^a	2.62±0.01 ^b	73.56±1.12 ^d	37.44±0.63 ^d
C MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	6.51±0.01 ^g	2.60±0.02 ^b	66.73±2.23 ^c	42.86±0.37 ^f
P MeOH:agua (6:4)	2.90±0.02 ^c	2.18±0.05 ^a	27.04±1.19 ^b	15.70±0.81 ^c
P MeOH:agua (7:3)	4.13±0.07 ^e	2.15±0.02 ^a	26.57±0.29 ^b	11.11±0.32 ^a
P MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	5.07±0.09 ^f	2.18±0.09 ^a	20.99±1.07 ^a	13.99±0.27 ^b

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p>0.05$). S=semilla, C=cáscara, P= pedúnculo.

La concentración mayor de compuestos fenólicos se obtiene de la semilla del bagazo. Por lo tanto, el principal aporte de compuestos bioactivos está dado por las semillas debido a que durante la maceración generalmente ésta permanece intacta.

Las uvas para vino son una de las principales fuentes de compuestos fenólicos tales como antocianinas, flavanoles, catequina y proantocianidinas (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007; Huntley, 2007; Luque-Rodríguez *et al.*, 2007; Mónica Rubilar *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2009). Durante la fermentación, los compuestos fenólicos contenidos principalmente en cáscara y semilla, sólo son parcialmente transferidos al brandy, vino o semi-vino, por lo que cantidades significativas de compuestos fenólicos permanecen en el bagazo (González-Paramás *et al.*, 2004; Pinelo *et al.*, 2006a; Mónica Rubilar *et al.*, 2007; Spigno y De Faveri, 2007, Guerrero *et al.*, 2008). El contenido restante en el bagazo de uva depende de la variedad de la uva y de las condiciones de fermentación.

5.2 Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos Individuales por HPLC

Los principales compuestos identificados en BI fueron ácido clorogénico, resveratrol y los flavonoides rutina, miricetina, quercetina, catequina y epicatequina (Figura 17 y Figura 18). Los solventes acidificados mostraron ser capaces de extraer compuestos fenólicos tales como catequina, miricetina y ácido clorogénico, en concentraciones mayores de los solventes no acidificados. Los sistemas etanólicos lograron extraer epicatequina y las más altas concentraciones de miricetina, mientras que los sistemas de solventes metanólicos fueron capaces de extraer las más altas concentraciones de ácido clorogénico.

Dennis-Quiñonez *et al.* (2005) reportaron compuestos fenólicos similares en extractos de la misma variedad de uva (Carignan), obtenidos con

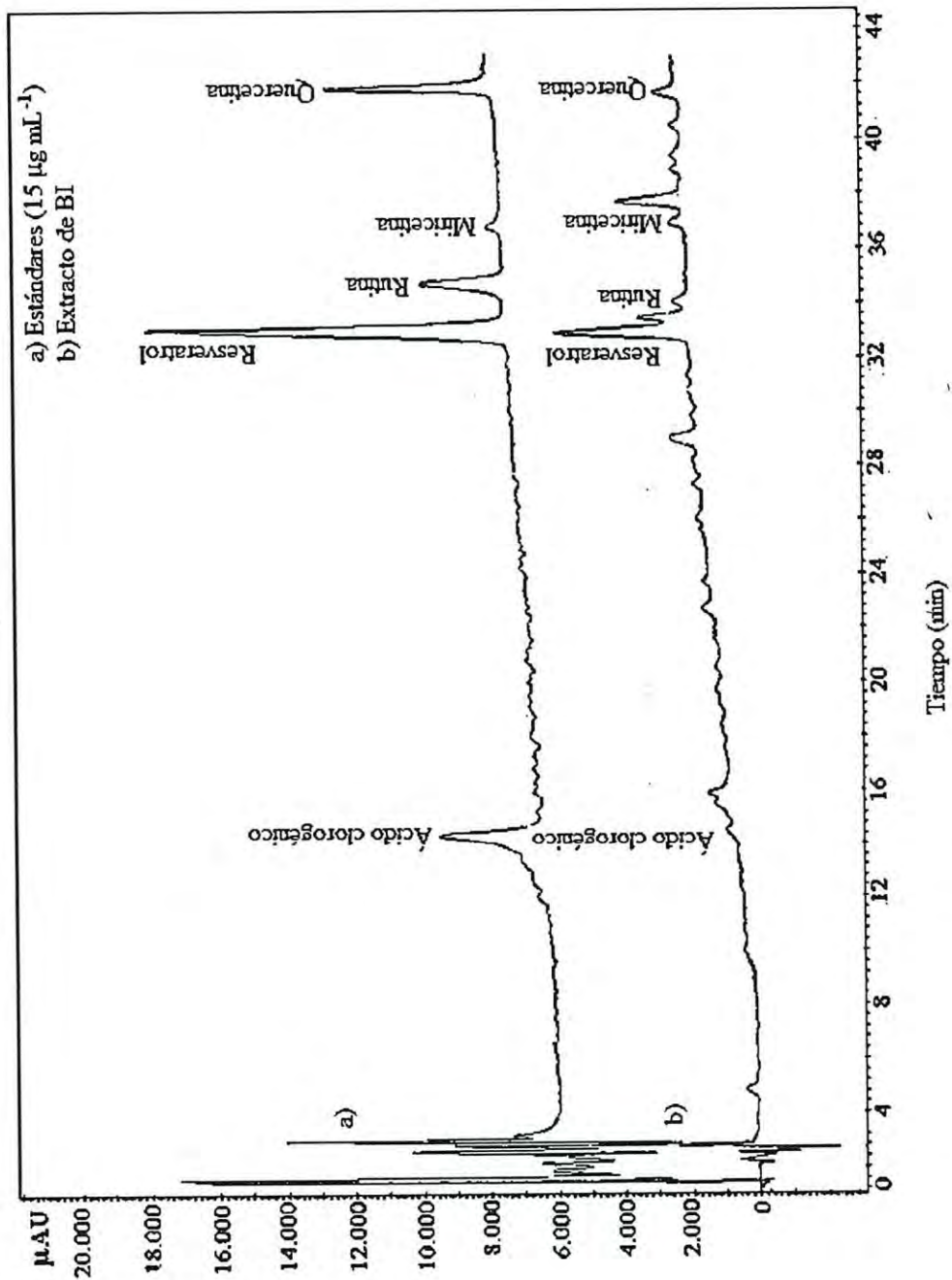


Figura 17. Cromatograma de los compuestos fenólicos presentes en el BI obtenido con detector de arreglo de diodos a 320 nm.

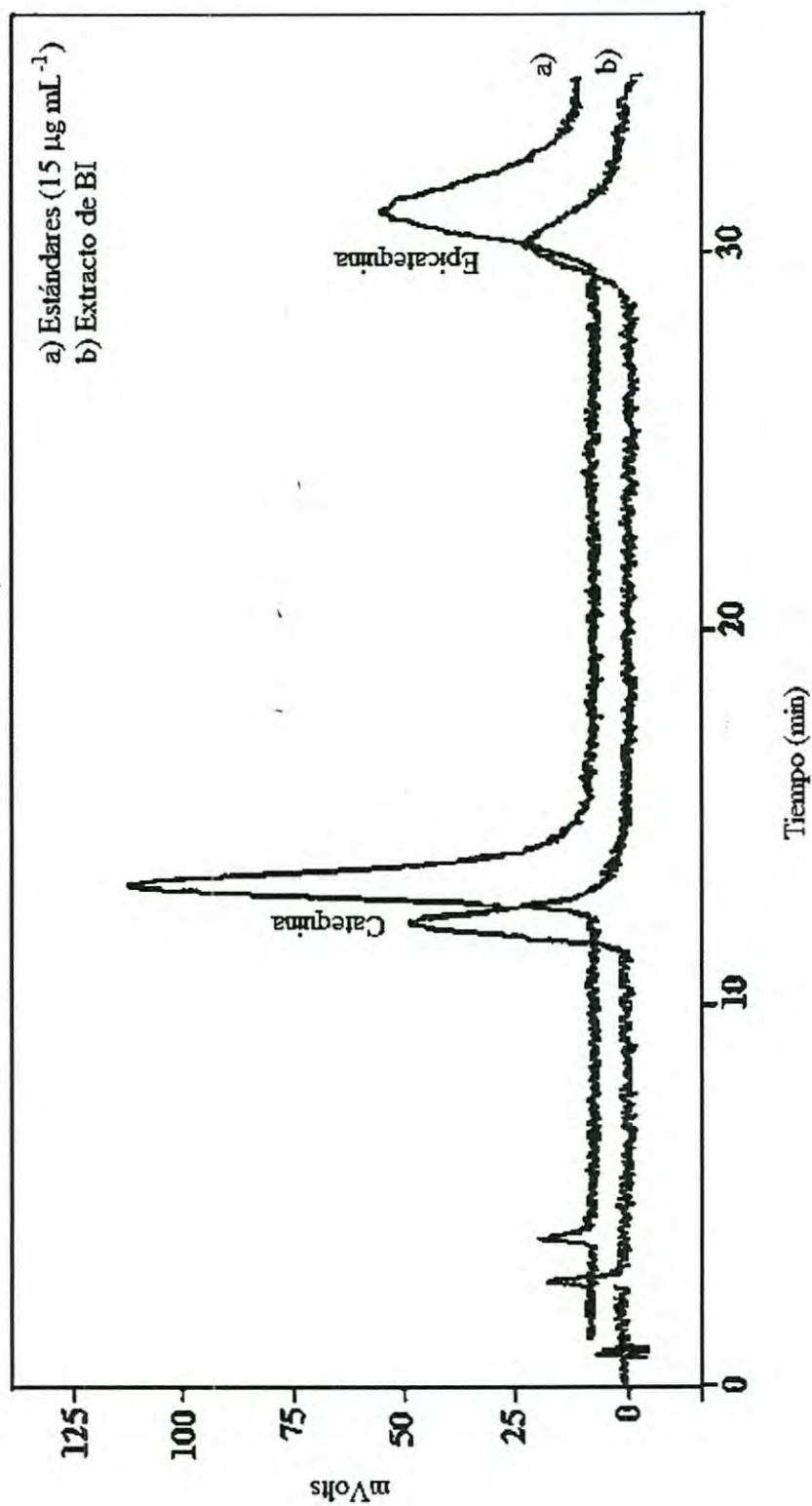


Figura 18. Cromatogramas de catequina y epicatequina presentes en el BI obtenido con un detector de fluorescencia a 280 nm de excitación y 310 nm de emisión.

ACE:agua (7:3). Mientras que Cantos *et al.* (2000) reportaron la presencia de resveratrol, quercetina y catequina en cáscara de uva variedad Napoleón, en extractos obtenidos con MeOH:ácido fórmico (9.07:0.03). En otro estudio por Molina-Quijada *et al.* (2010), reportó la presencia de ácido gálico, resveratrol y rutina en extractos de cáscara de uva Carignan, obtenidos con MeOH:agua (6:4).

La Figura 19 muestra que para todos los sistemas de solventes, miricetina fue el compuesto fenólico presente en mayor concentración, el cual varió de 12 a 51 mg kg⁻¹ pf. La catequina y la epicatequina se encontraron en concentraciones de 20–38 mg kg⁻¹ y 9–27 mg kg⁻¹ pf, respectivamente, utilizando los solventes etanólicos y acidificados. Se encontraron concentraciones bajas de ácido clorogénico, resveratrol, rutina y quercetina en el BI con todos los sistemas de solventes utilizados (<10mg kg⁻¹ pf).

Respecto a la composición fenólica en los constituyentes del BI, se conoce que la semilla y el pedúnculo son ricos en monómeros (compuestos fenólicos), mientras que la cáscara lo es en antocianinas (Pinelo *et al.*, 2006a). La Tabla 7 muestra la concentración de compuestos fenólicos en los constituyentes del BI extraídos con los sistemas metanólicos MeOH:agua (6:4), MeOH:agua (7:3) y MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los extractos de semilla, cáscara y pedúnculo. Con todos los sistemas de solventes, miricetina fue el principal compuesto encontrado en los constituyentes del BI utilizando MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5).

Li *et al.* (2008) reportaron concentraciones de 230 mg de ácido gálico kg⁻¹, 1 150 mg de catequina kg⁻¹ y 1 230 mg epicatequina kg⁻¹ en extractos metanólicos de semilla de uva variedad Cabernet Sauvignon.

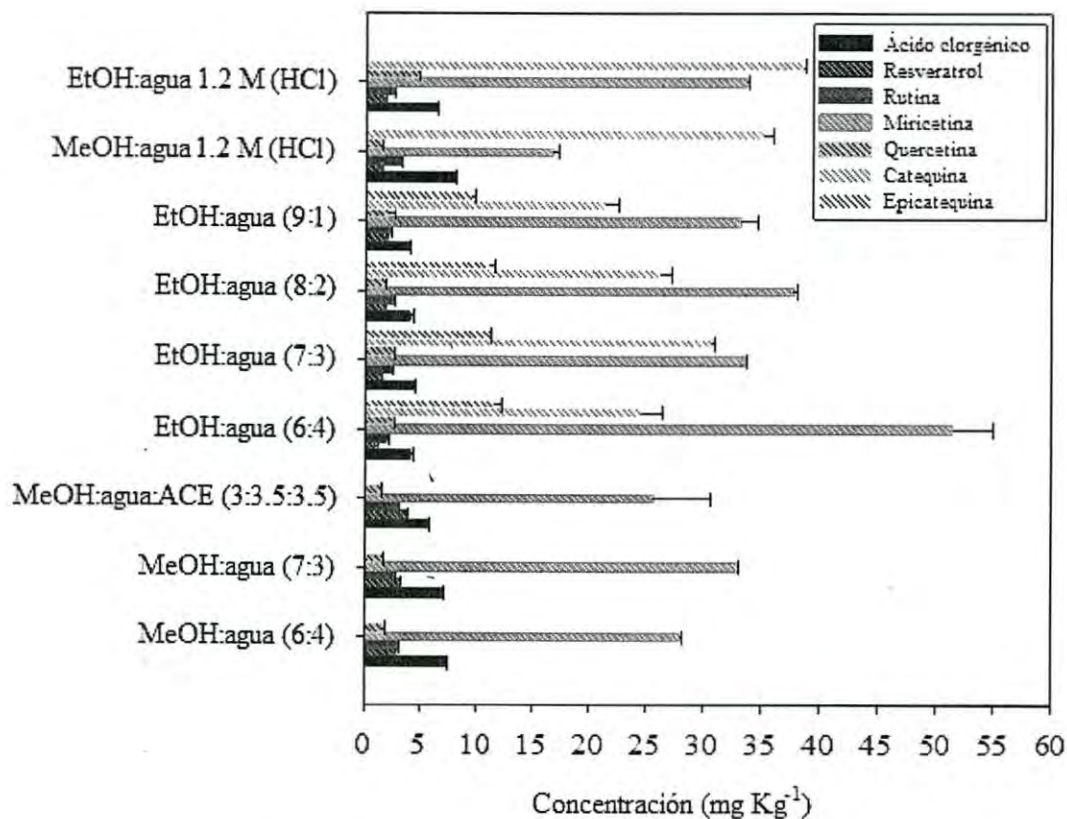


Figura 19. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales presentes en el BI extraídos con diferentes sistemas de solventes.

Tabla 7. Concentración de los principales compuestos fenólicos presentes en los constituyentes de BI, obtenidos con diferentes sistemas de solventes (mg kg⁻¹ pf).

Sistema de solvente	Ácido clorogénico	Resveratrol	Rutina	Miricetina	Quercetina	Catequina	Epicatequina
S MeOH:agua (6:4)	8.30±3.20 ^{abcde}	1.40±0.30 ^a	1.70±0.40 ^a	10.60±1.02 ^a	1.60±0.30 ^a	35.40±0.30 ^b	52.20±0.50 ^a
S MeOH:agua (7:3)	5.80±0.40 ^{ab}	1.40±0.90 ^a	2.20±0.20 ^a	10.40±2.71 ^a	2.80±0.90 ^{abc}	55.50±1.00 ^d	99.70±0.13 ^c
S MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	6.30±0.40 ^{bc}	3.10±0.01 ^c	2.90±0.20 ^b	14.80±0.92 ^c	5.50±1.50 ^d	49.90±0.20 ^c	92.40±0.13 ^b
C MeOH:agua (6:4)	8.80±0.30 ^e	3.60±0.22 ^d	3.90±0.05 ^c	74.10±4.85 ^d	2.40±0.14 ^b	Nd	Nd
C MeOH:agua (7:3)	5.40±0.05 ^a	4.30±0.10 ^e	7.10±1.30 ^e	66.70±2.60 ^d	6.90±0.01 ^d	Nd	Nd
C MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	8.50±0.06 ^c	5.30±0.10 ^f	5.06±0.01 ^d	106.40±2.00 ^e	2.90±0.16 ^c	15.70±0.30 ^a	Nd
P MeOH:agua (6:4)	7.90±0.85 ^{de}	1.80±0.10 ^a	2.80±0.04 ^b	10.70±0.20 ^a	2.70±0.32 ^{bc}	15.70±0.32 ^a	Nd
P MeOH:agua (7:3)	6.30±0.17 ^c	2.50±0.30 ^b	3.50±0.35 ^c	17.10±2.40 ^c	3.00±0.51 ^c	16.60±0.55 ^a	Nd
P MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5)	5.90±1.50 ^{abc}	2.50±0.04 ^b	2.10±0.50 ^a	12.50±0.51 ^b	6.90±0.50 ^d	15.90±0.21 ^a	Nd

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p>0.05$). S=semilla, C=cáscara, P= pedúnculo, Nd= no detectado.

Kammerer *et al.* (2004) reportaron concentraciones de 10 mg de ácido gálico, 220 mg de catequina, 13 400 mg de epicatequina, 350 mg de quercetina-3-glucósido por kg de cáscara; 100 mg de ácido gálico; 790 mg de catequina; 670 mg de epicatequina, 32 mg quercetina-3-glucósido por kg de semilla, en extractos a partir de bagazo de uva Weisser Riesling, valores obtenidos utilizando MeOH:HCl (9.09:0.01).

Dennis-Quiñonez *et al.* (2005), utilizando MeOH:agua (5:5), reportaron mayores concentraciones de ácido clorogénico (370 mg kg⁻¹), resveratrol (520 mg kg⁻¹), rutina (600 mg kg⁻¹), catequina (3 160 mg kg⁻¹) y epicatequina (4 050 mg kg⁻¹) en cáscara y semilla de uva Carignan. Sin embargo, la cáscara y semilla no fueron sometidas a ningún proceso de fermentación.

Molina-Quijada *et al.*, (2010) reportaron 52 mg de resveratrol kg⁻¹ y 1 040 mg rutina kg⁻¹ de uva Carignan extraídos con MeOH:agua (6:4). Otros compuestos fenólicos reportados en extractos de uva hechos con MeOH:agua (5:5) fueron ácido gálico, aldehído protocatéquico, ácido gentísico, catequina, ácido vanilínico, ácido cafeico, vanilina, epicatequina, siringaldehído, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y resveratrol (Liazid *et al.*, 2010). Como se observa, los valores obtenidos en los estudios anteriormente mencionados, fueron más altos que los reportados en el presente estudio. Por lo tanto, una gran proporción de los compuestos fenólicos extraíbles presentes en la uva Carignan migran hacia el vino durante el proceso de fermentación.

Rubilar *et al.* (2007) identificaron galactósido de quercetina, canferol, epicatequina, luteolina y derivados del ácido gálico en bagazo de uva de la variedad Garnatxa, y miricetina, quercetina y diversas formas de derivados del ácido gálico en bagazo de uva Cabernet Sauvignon. Por lo tanto, no sólo la concentración, sino también el tipo de compuesto varían de

acuerdo con la variedad de uva en estudio. Cho *et al.* (2004) reportaron valores de 6.5 mg 3-galactasido/glucósido de miricetina y 9.4 mg quercetina 3-galactósido por kg de uva Cabernet Sauvignon, valores menores a los reportados en este estudio.

Existen algunas publicaciones que reportan los solventes evaluados en este estudio. Sin embargo, son escasos los estudios con sistemas de solventes ecológicos con fines de aplicación en la industria alimentaria. De esta manera, seleccionar un sistema de solvente apropiado debe considerar la extracción eficiente de los compuestos bioactivos así como su capacidad antioxidante.

5.3 Capacidad Antioxidante (CA)

La mayor CA en BI se obtuvo en los extractos obtenidos con EtOH:agua (7:3) 1.2M (HCl), en ambos ensayos DPPH ($153.87 \pm 2.88 \mu\text{Mol ET g}^{-1} \text{ pf}$) y ABTS ($78.51 \pm 1.88 \mu\text{Mol ET g}^{-1} \text{ pf}$). Por otro lado, los valores más bajos de CA se encontraron en los extractos obtenidos con EtOH:agua (9:1) y MeOH:agua (9:1) en ambos ensayos (Tabla 6).

Los solventes acidificados mostraron ser los mejores sistemas de solventes para extraer compuestos fenólicos, los cuales son reconocidos por su capacidad para neutralizar radicales libres. La hidrólisis ácida permite el rompimiento de los enlaces ester liberando compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico e hidroxicinámico. Además, la hidrólisis permite la generación de azúcares de hemicelulosa (compuestos con actividad antioxidante).

Por lo tanto, la CA no puede ser atribuida solamente a la composición fenólica, sino a la suma de los efectos del solvente acidificado (como

donador de protones), los compuestos fenólicos y otros compuestos extractables como los azúcares (Hogan *et al.*, 2010).

Entre los constituyentes del BI, los extractos de semilla exhibieron la mayor CA en el intervalo de 77.19 a 133.76 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ pf con DPPH y de 57.58 a 76.32 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ pf con ABTS (Tabla 7). Los valores menores de CA se obtuvieron en los extractos de pedúnculo.

Los compuestos fenólicos poseen fuertes propiedades antioxidantes que les permiten captar radicales libres, donar hidrógenos, atrapar metales, romper la cadena de reacciones de radicales y reprimir especies de oxígeno reactivas, en reacciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Dai y Mumper, 2010; Gülçin, 2010).

La CA está estrechamente relacionada con la variación de compuestos fenólicos totales en las semilla, posiblemente debido a la concentración alta de compuestos fenólicos que tienden a formar estructuras complejas como las antocianinas en la cáscara y semilla (Xu *et al.*, 2010).

Se sabe que los flavonoides poseen una tendencia alta a sufrir reacciones oxidativas de polimerización, entonces un aumento en el impedimento estérico de las moléculas reduce la disponibilidad de los grupos hidroxilo, los cuales son responsables de la CA y cuyas estructuras más representativas fueron identificadas en los extractos de semilla, además del efecto sinérgico que presentan los compuestos fenólicos (Pinelo *et al.*, 2006a).

Los valores obtenidos en este estudio fueron consistentes con los reportados por Yilmaz y Toledo (2004a) en bagazo de uvas Chardonnay (102.81 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ cáscara ps y 450.51 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ semilla ps) y Merlot (69.81 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ cáscara ps y 272.84 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ semilla ps), valores

obtenidos mediante el ensayo ORAC y en extractos obtenidos con MeOH:agua (7:3).

Xu *et al.* (2010) reportaron una CA en el rango de 76.33 a 649.85 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ mediante ABTS y de 52.42 a 422.18 $\mu\text{Mol TE g}^{-1}$ mediante DPPH en algunas variedades de uva, mientras que para el bagazo de uva Cabernet Sauvignon obtuvieron valores de 488.86 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ mediante ABTS y de 324.62 $\mu\text{Mol ET g}^{-1}$ mediante DPPH, en extracciones realizadas con metanol:agua:ACA (7:2.9:0.1), valores similares a los reportados en este estudio.

La CA puede ser atribuida como resultado de la presencia de flavonoides y antocianinas principalmente (Cho *et al.*, 2004). Los antioxidantes pueden retardar el proceso de oxidación provocado por los radicales libres, con el fin de proteger alimentos y organismos vivos contra el daño oxidativo, por lo que se ha prestado atención a explorar la fuentes naturales de antioxidantes. Estos resultados sugieren que el bagazo de uva Carignan como un residuo industrial, es un recurso natural de antioxidantes.

5.3 Selección de un Sistema de Solventes y Comparación entre el Bagazo Industrial (BI) y el Bagazo de Laboratorio (BL)

Para la comparación del perfil fenólico de BI y BL, los extractos fueron realizados con el sistema EtOH:agua (6:4). Para la selección del sistema de solvente, se consideró el costo y disponibilidad del solvente y la aplicación a utilizar. La Tabla 8 muestra la comparación de FT, FvT y CA entre los extractos de BI y BL. Durante la fermentación, los compuestos fenólicos son transferidos parcialmente al brandy, vino o semi-vino, de esta manera, cantidades importantes de compuestos fenólicos permanecen en el bagazo (Manuel *et al.*, 2006).

Tabla 8. Fenoles totales (FT), flavonoides totales (FvT) y capacidad antioxidante en BI y BL.

Muestra	FT (g CLA kg ⁻¹)	FvT (g QE kg ⁻¹)	DPPH (μMol ET g ⁻¹)	ABTS (μMol ET g ⁻¹)
BL	16.24±0.05 ^b	9.10±0.03 ^b	41.64±0.70 ^b	25.36±0.07 ^a
BI	7.25±0.04 ^a	2.44±0.06 ^a	12.41±0.18 ^a	25.27±0.33 ^a

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. Valores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En este estudio, específicamente, 44.63% de FT y 26.83% de FvT son recuperables en el bagazo de uva Carignan. Por otro lado, la CA para estabilizar el radical ABTS^{•+} permanece, mientras que disminuye para estabilizar el radical DPPH[•], después del proceso de fermentación. Los resultados obtenidos en cuanto a la CA se pueden deber a que los compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes originalmente en la uva, son más hábiles para estabilizar la estructura del radical DPPH[•] que aquellos compuestos fenólicos que permanecen en el bagazo después de la fermentación.

La Figura 20 muestra los compuestos fenólicos individuales presentes en BL. La composición fenólica original en la uva Carignan cambió después del proceso de fermentación (72 h de fermentación y 8.5°Bx), esto debido a que algunos compuestos fenólicos migran con mayor facilidad hacia el líquido alcohólico, los cuales brindan las características de olor, color y sabor a las bebidas fermentadas de uva, en este caso, especialmente la catequina y la epicatequina.

5.4 Determinación de Antocianinas, Carbohidratos, Proteínas y Ácidos Urónicos, Totales

La Tabla 9 muestra la composición del extracto liofilizado del bagazo de uva roja Carignan (EB). Es importante conocer la composición del extracto, ya que todos los elementos presentes en EB tendrán influencia al utilizarlo como un aditivo, especialmente dentro de una matriz polimérica, particularmente, PLA.

El valor de antocianinas monoméricas totales obtenido en este estudio, concuerda con el intervalo de valores presentado por Rein (2005) en diversos frutos rojos: 0.10–4.80 mg g⁻¹; y se encuentra por arriba de la concentración obtenida por Del Carpio Jiménez *et al.* (2009) en frutos de *Berberis boliviana* Lechler (0.07 mg g⁻¹).

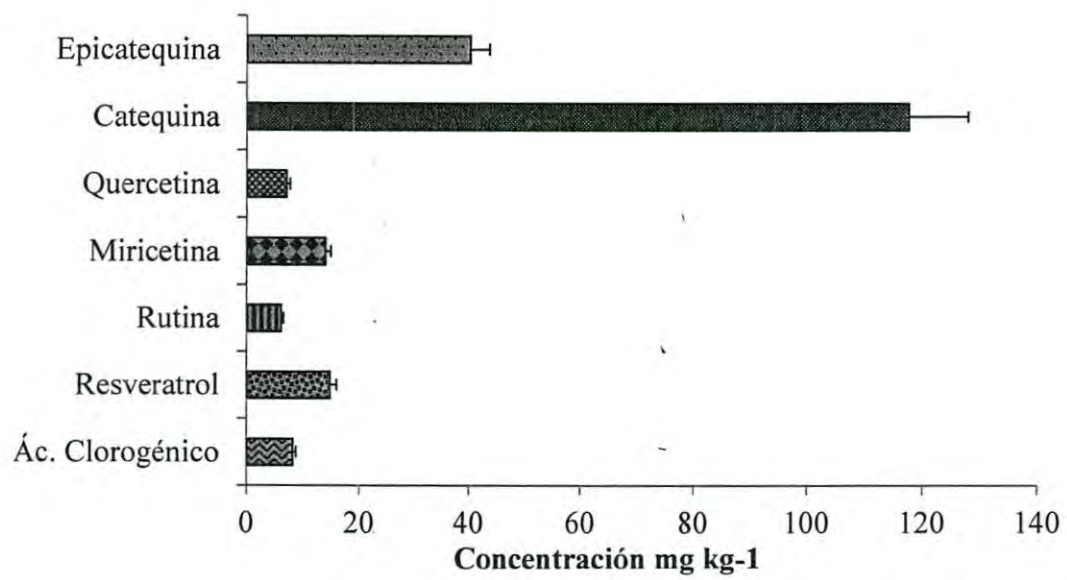


Figura 20. Compuestos fenólicos individuales presentes en los extractos de BL obtenidos con EtOH:agua (6:4).

Tabla 9. Composición del extracto de bagazo de uva roja Carignan (EB).

Componentes	Concentración (mg g ⁻¹)
Antocianinas monoméricas	0.37 ± 0.08
Carbohidratos	0.32±0.01
Proteínas	0.02±0.01
Ácidos urónicos	0.15±0.02

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados.

En cuanto a la cantidad de carbohidratos totales, se encontró una concentración de 0.32 ± 0.01 mg EG g^{-1} EB ps; mientras que para proteínas totales la concentración obtenida fue de 0.02 ± 0.005 mg BSA g^{-1} EB ps.

El contenido de proteína en el BI es congruente con lo reportado para extractos alcohólicos ($4-20$ mg L^{-1} en vinos) (Dambrouck *et al.*, 2005).

En cuanto al contenido de ácidos urónicos en el BI fue de 0.15 ± 0.02 mg EAU g^{-1} BE ps. Pellerin *et al.* (1995) reportaron un porcentaje de 11-22% de ácidos urónicos para vino rojo.

Pinelo *et al.* (2006a) reportaron que la celulosa se compone de cadenas de (1 \rightarrow 4) β -D-glucosa y los enlaces de hidrógeno contienen cerca de 40 de estas cadenas de glicanos. En la pared celular de la cáscara de uva, los polisacáridos consisten principalmente de hemicelulosa de xiloglucanos. Otros azúcares neutros como mananos, xilanos y arabino-galactanos. También se han detectado en pequeñas cantidades en la pared celular de la cáscara de uva.

Algunos polisacáridos de pectinas que se encuentran en la uva son el homogalacturonano, que consiste en un esqueleto de ácido galacturónico unido a unidades de glucosa y xilosa; el ramnogalacturonano I y el ramnogalacturonano II. Todas estas unidades están unidas estructuralmente a diversos compuestos fenólicos, principalmente a aquellas de alto peso molecular, como las antocianinas (Pinelo *et al.*, 2006a). Es por ello oportuno tener conocimiento de las proporciones de éstos elementos presentes en el bagazo ya que pueden interferir con la capacidad funcional (capacidad antioxidante).

5.6 Calorimetría Diferencial de barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TG) y Térmico Diferencial (DTA)

La Figura 21 muestra los termo-gramas DSC de las películas de PLA adicionadas con extractos de BI. La Tabla 10 muestra las propiedades térmicas del PLA_{0%}, PLA_{1%}, y PLA_{3%}. No fue posible obtenerse una película adicionada con 5% de extracto de bagazo, aun variando la temperatura en las diferentes secciones del extrusor. Esto se debió a que el extracto se caramelizaba. Es probable que con otro extrusor de mayor capacidad (tornillo más largo) se logre obtener una película con esta concentración.

No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores de T_g y T_m por la adición de 1% y 3% de extracto. Este mismo comportamiento se observó en la matriz polimérica de PLA aditivado con resveratrol (Tabla 11). El proceso de extrusión con rodillos hace posible una adecuada orientación en el arreglo estructural de las películas, lo que significa un aumento en el grado de cristalinidad. El grado de cristalinidad del PLA aditivado con resveratrol, no pudo ser calculado (Figura 22).

La diferencia en el grado de cristalinidad, se puede deber a que durante el proceso de extrusión y soplado, el plástico fundido es forzado a través de una boquilla con una abertura circular. Una salida de aire se encuentra en el centro de la matriz y el aire comprimido es forzado en el centro del perfil circular de extrusión, creando una burbuja, lo que hace que la sección transversal circular extruida pueda expandirse a diferentes proporciones. Por lo tanto, el PLA no cristalizó considerablemente, obteniéndose solo una ligera orientación del arreglo estructural del polímero. Soto-Valdez *et al.*, (2011) reportaron que al aumentar la concentración de resveratrol se observó un decremento en el grado de cristalinidad.

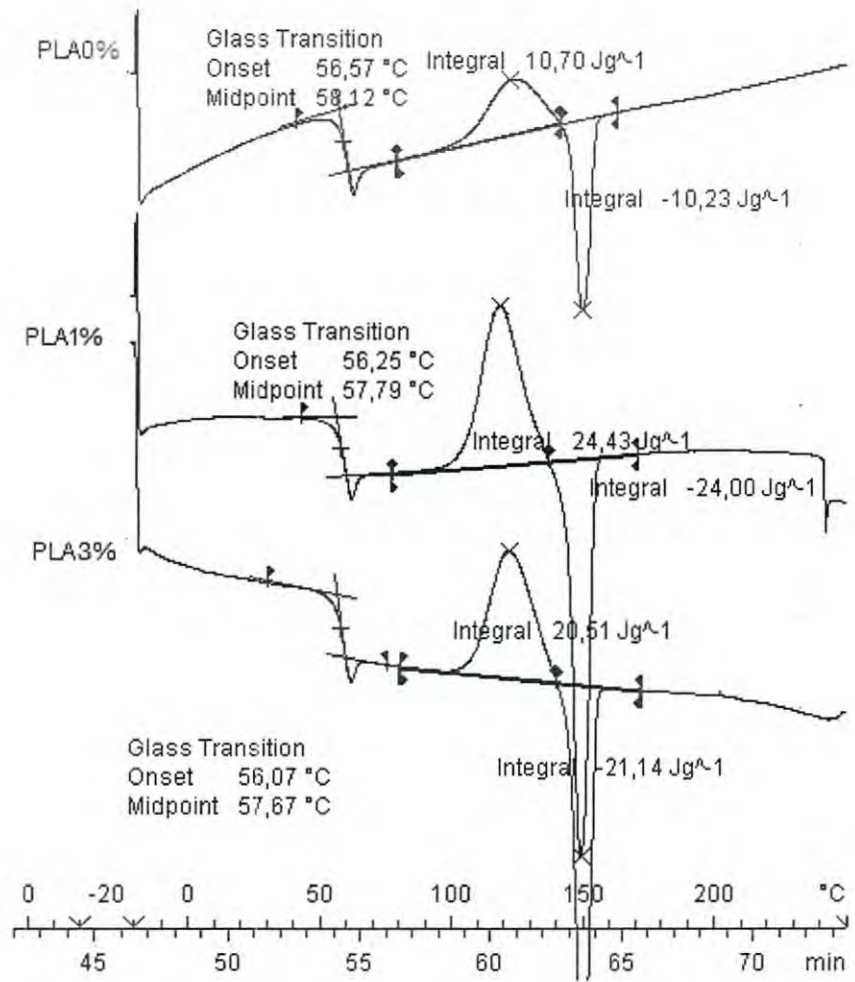


Figura 21. Termo-gramas DSC de las películas de PLA adicionadas con extractos de EB.

Tabla 10. Propiedades térmicas de las películas de PLA adicionadas con EB.

Parámetro	PLA _{0%}	PLA _{1%}	PLA _{3%}
T _g , °C	58.12±0.20 ^a	57.79±0.18 ^a	57.67±0.27 ^a
T _m , °C	150.00±0.90 ^a	149.00±0.20 ^a	149.00±0.37 ^a
ΔH _m , J g ⁻¹	10.70±0.70 ^a	24.43±0.10 ^b	20.51±0.20 ^c
χ _c , %	11.42±0.51 ^a	26.07±0.31 ^c	21.89±0.30 ^b

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. Valores con letras similares en la misma fila no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tabla 11. Propiedades térmicas de las películas de PLA adicionadas con resveratrol.

Parámetro	PLA7	PLA10	PLA11
T _g , °C	57.44±0.51 ^a	58.02±0.42 ^a	57.03±0.45 ^a
T _m , °C	150.00±0.60 ^a	150.00±0.50 ^a	150.00±0.40 ^a
ΔH _m , J g ⁻¹	Nd	Nd	Nd
χ _c , %	Nc	Nc	Nc

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. Nd: no detectado, Nc: no calculado. Valores con letras similares en la misma fila no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

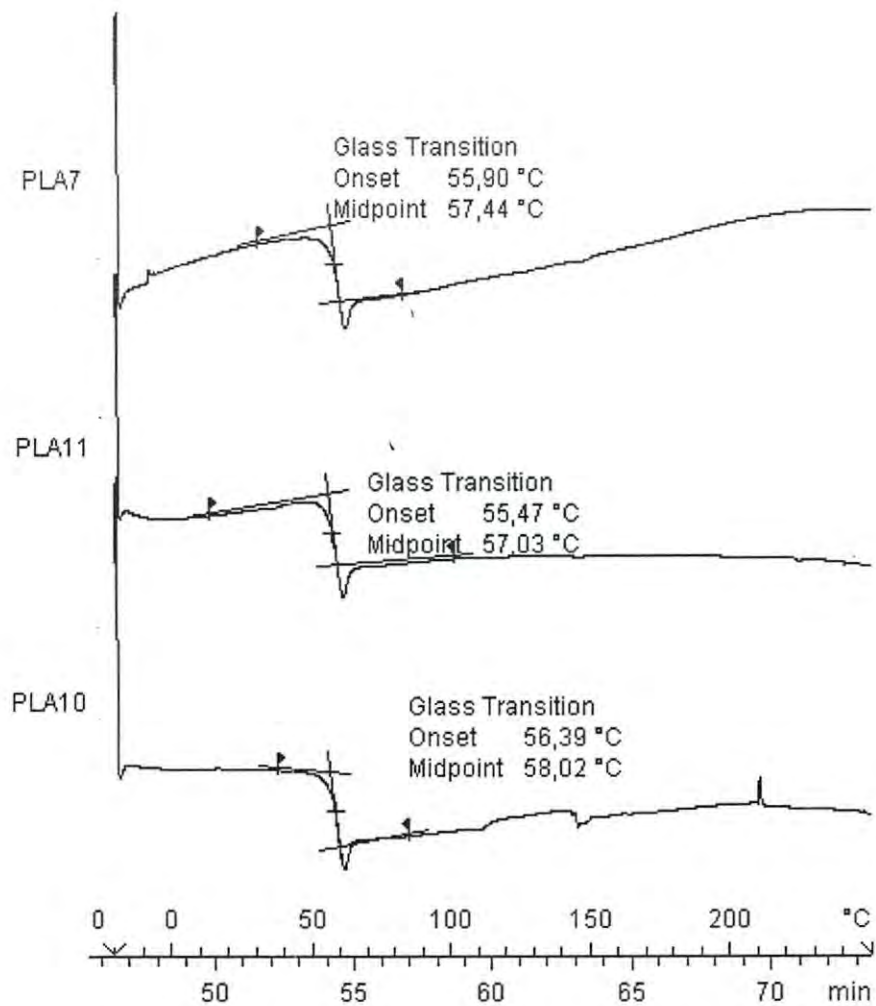


Figura 22. Termo-gramas DSC de las películas de PLA adicionadas con resveratrol.

Los valores del grado de cristalinidad en estas mismas películas adicionadas con resveratrol fueron: 5.7% para PLA₇, 2.8% para PLA₁₀ y 0.9% para PLA₁₁.

Gardette *et al.* (2011) reportaron valores de $T_g=60^\circ\text{C}$, $T_c=115^\circ\text{C}$ y $T_m=149-156^\circ\text{C}$ en PLA sin aditivo sometidas a la foto-oxidación; mientras que para PLA con 40% de sulfato de calcio los valores fueron: $T_g=58^\circ\text{C}$, $T_c=110^\circ\text{C}$ y $T_m=147-155^\circ\text{C}$. Estos valores no variaron después de 400 h de foto-oxidación, y son similares a los obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, la Figura 23 muestra los termogramas de degradación del PLA adicionado con EB y resveratrol, llevados a cabo bajo atmósfera de nitrógeno y aire. Ambos aditivos mostraron ser térmicamente sensibles pero no fácilmente oxidables, como se observa en las curvas bajo atmósfera tanto de aire como de nitrógeno.

El extracto de bagazo (EB) mostró ofrecer una estabilidad menor que el resveratrol. La pérdida de peso (10%) se observó a 100°C . Esto se debe a que los compuestos fenólicos presentes en el bagazo son térmicamente sensibles. Los compuestos de bajo peso molecular como los ácidos fenólicos se degradan a temperaturas superiores a 50°C ; mientras que las antocianinas, en este caso predominantes, inician su degradación a temperaturas mayores de 100°C (Pinelo *et al.*, 2005b; Spigno y De Faveri, 2007).

En la Figura 24 se muestran las curvas TG para PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%}, en las cuales se observa el tipo de transición térmica asociado con las pérdidas de peso del PLA. La degradación del EB acelera la degradación térmica del polímero (por el rompimiento de los enlaces).

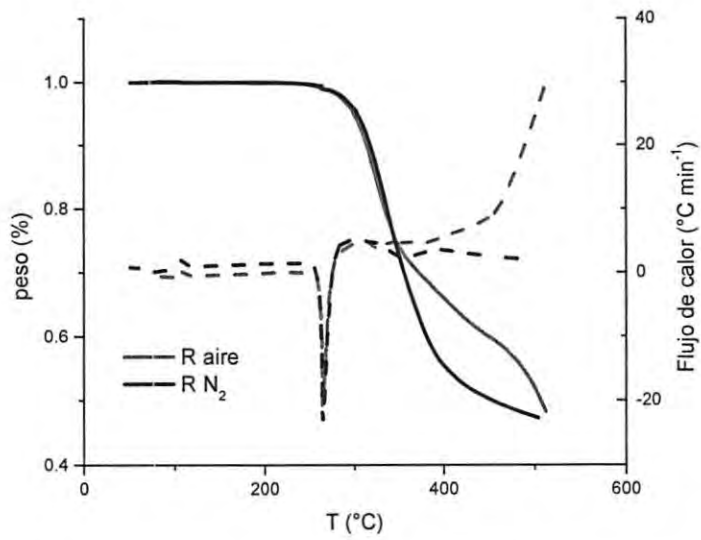
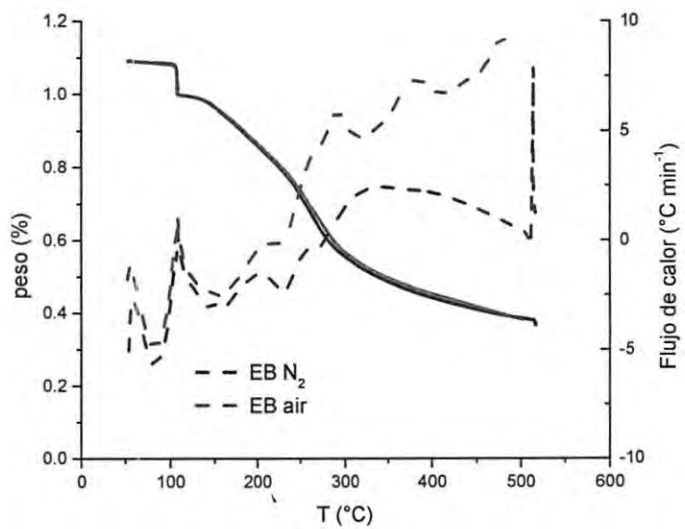


Figura 23. Curvas TG y DTA de EB y resveratrol, bajo atmósferas de nitrógeno y aire.

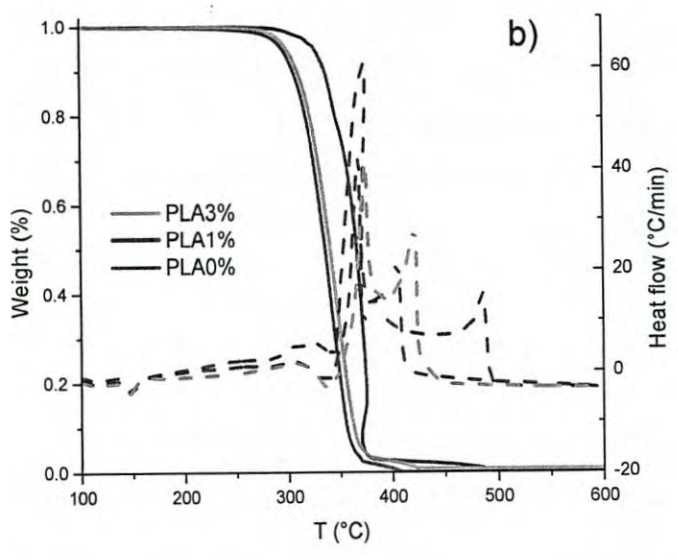
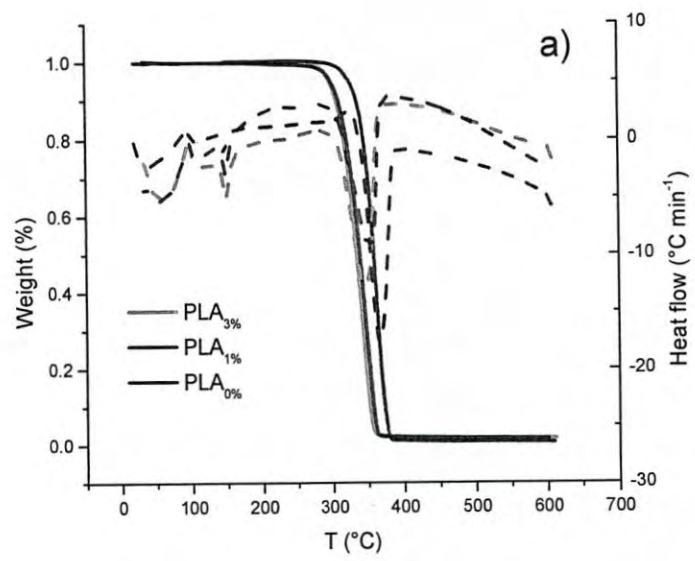


Figura 24. Curvas TG y DTA para PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%}, en atmósferas de a) nitrógeno y b) aire.

Por otro lado, en atmósfera de nitrógeno se observó un comportamiento endotérmico a 350°C, asociado a la mayor disminución de peso del polímero, debido posiblemente a la descomposición de hidróxidos que se forman de la hidrólisis. Mientras que en atmósfera de oxígeno, el comportamiento fue exotérmico con la pérdida de peso. Esto significa que el oxígeno interactúa con el polímero favoreciendo la formación de compuestos de naturaleza exotérmica, posiblemente radicales perhidroxilo (Therías *et al.*, 2012).

Las mediciones termo-gravimétricas muestran que el PLA con aditivo fue más susceptible a la degradación térmica. Las curvas bajo atmósfera de aire y de nitrógeno tuvieron comportamientos similares y los valores de $T_{5\%}$ fueron básicamente similares. Como era de esperarse, no se detectaron cargas residuales.

El efecto de la adición del extracto de bagazo al PLA fue significativo ($p > 0.05$), la estabilidad térmica del polímero decreció ($T_{5\%}$). A los 30°C, aun en presencia de nitrógeno. Como ya se mencionó, esto se debe a que los componentes del bagazo son térmicamente sensibles después de los 50°C (Spigno y De Faveri, 2007).

La temperatura donde la pérdida de peso es el 5% ($T_{5\%}$), la temperatura máxima de la curva DTA (T_{max1} y T_{max2}), y el rendimiento de carga a 600°C ($Char_{600}$) se muestran en la Tabla 12. Valores similares fueron obtenidos por Ortiz-Vazquez *et al.* (2011) reportaron una $T_{5\%}$ alrededor de los 100°C, atribuida a la presencia de los productos de degradación durante el proceso de extrusión del PLA adicionado con BHT.

Sin embargo, los valores de DTA sugieren que el extracto de bagazo tiene el potencial para retardar la oxidación polimérica. Para ambos valores de transición térmica, la muestra con 3% en peso de extracto mostró valores

Tabla 12. Temperatura del 5% de pérdida de peso ($T_{5\%}$), temperatura máxima en DTA ($T_{\max 1}$ y $T_{\max 2}$) y rendimiento de carga a 600°C (Char_{600}) para PLA adicionado con EB.

Película	aire						
	$T_{5\%}(\text{°C})$	$T_{\max 1}(\text{°C})$	$\text{Char}_{600}(\%)$	$T_{5\%}(\text{°C})$	$T_{\max 1}(\text{°C})$	$T_{\max 2}(\text{°C})$	$\text{Char}_{600}(\%)$
PLA 0%	325.00±6.25 ^b	366.00±8.30 ^b	Nd	327.00±6.35 ^b	374.00±8.70 ^a	485.00±5.20 ^c	Nd
PLA 1%	299.00±4.95 ^a	352.00±7.60 ^a	Nd	295.00±4.70 ^a	368.00±8.40 ^a	405.00±4.20 ^a	Nd
PLA 2%	297.00±4.80 ^a	347.00±7.35 ^a	Nd	300.00±5.00 ^a	375.00±8.70 ^a	422.00±5.10 ^b	Nd

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p>0.05$). Nd: no detectado.

de temperatura más altos. Este mismo comportamiento fue observado con las películas adicionadas con resveratrol (Figura 25), aunque el efecto protector fue menor en comparación con el del EB. El valor de $T_{5\%}$ para PLA₇ fue mayor que para PLA₁₀ y PLA₁₁. La $T_{5\%}$ del PLA₁₁ fue menor en comparación con todos los casos. Por otro lado, en las películas adicionadas con EB, no se observan cargas residuales a 600°C (Tabla 13).

La oxidación del PLA, es en realidad un proceso lento, especialmente cuando es promovido por temperaturas (oxidación térmica). De esta manera, no fue posible determinar la temperatura de oxidación mediante ensayos de oxidación inducida (OIT). Por ello, se consideró medir los cambios de la degradación del PLA por foto-oxidación.

5.7 Variaciones en el Peso Molecular (M_w)

Los pesos moleculares (M_w) de las muestras a los diferentes tiempos de foto-oxidación se muestran en la Figura 26. Se observa que a 0 h de irradiación, los M_w del PLA_{1%} y PLA_{3%} fueron menores respecto al del PLA_{0%}. Esto pudo deberse a una degradación térmica llevada a cabo durante el proceso de extrusión (Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011).

Durante las primeras 30 h de irradiación, se presentó una pérdida mayor del M_w en las películas adicionadas con EB, con respecto al del PLA_{0%}, esto puede ser consecuencia de un efecto degradante del extracto. El PLA₁₀ y PLA₁₁ presentaron un comportamiento inverso respecto a PLA₇ a las 30 h de irradiación. El comportamiento diferente entre las películas adicionadas con resveratrol y las adicionadas con EB, puede deberse a la naturaleza de los componentes presentes en EB, ausentes en las películas adicionadas con resveratrol (Pinelo *et al.*, 2005b; Pinelo *et al.*, 2006a; Spigno y De Faveri, 2007).

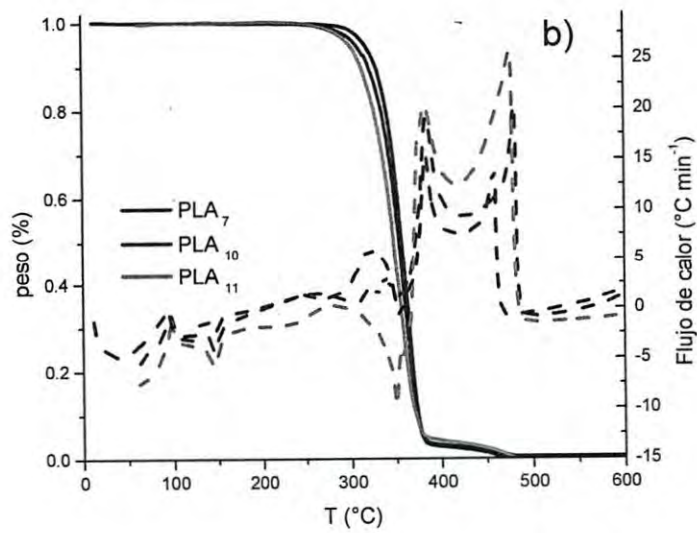
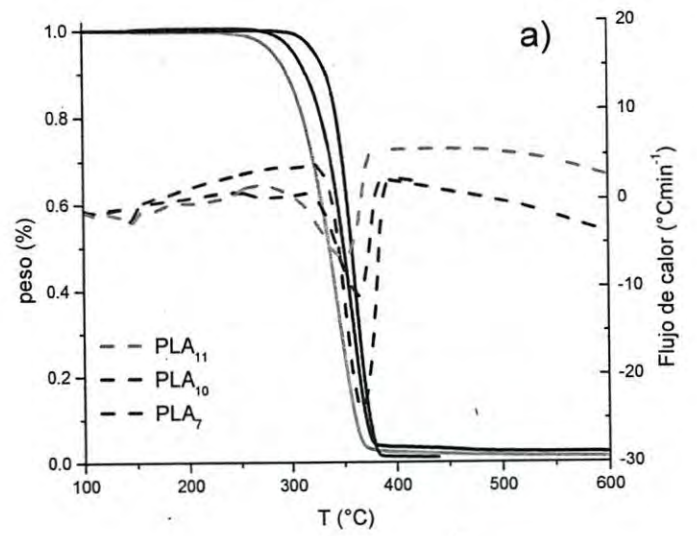


Figura 25. Curvas TG y DTA para PLA₇, PLA₁₀ y PLA₁₁, en atmósferas de a) nitrógeno y b) aire.

160191

Tabla 13. Temperatura del 5% de pérdida de peso ($T_{5\%}$), temperatura máxima en DTA (T_{max1} y T_{max2}) y rendimiento de carga a 600°C ($Char_{600}$) para PLA adicionado con resveratrol.

Película	aire						
	$T_{5\%}$ (°C)	T_{max1} (°C)	$Char_{600}$ (%)	$T_{5\%}$ (°C)	T_{max1} (°C)	T_{max2} (°C)	$Char_{600}$ (%)
PLA 7	324.00±6.20 ^b	366.00±8.30 ^a	Nd	316.00±5.80 ^b	384.00±9.20 ^a	459.00±2.90 ^a	Nd
PLA 10	304.00±5.20 ^a	364.00±8.20 ^a	Nd	306.00±5.30 ^{a,b}	384.00±8.70 ^a	481.00±4.00 ^b	Nd
PLA 11	283.00±9.10 ^a	350.00±7.50 ^a	Nd	300.00±5.00 ^a	383.00±8.00 ^a	477.00±3.80 ^b	Nd

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores en la misma columna con letras similares no son significativamente diferentes ($p>0.05$). Nd: no detectado.

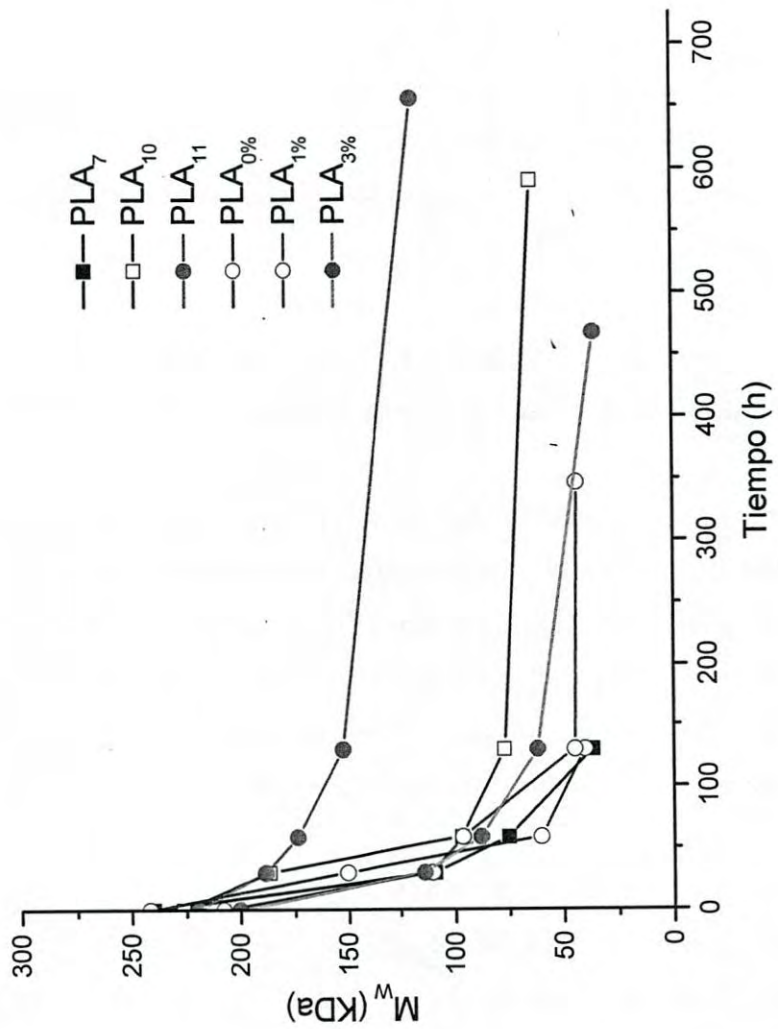


Figura 26. Variaciones del M_w de las películas de PLA a diferentes tiempos de foto-oxidación.

Por otro lado, a partir de las 60 h de irradiación, se observó que existe un comportamiento inverso, ya que el M_w del PLA_{0%} fue menor respecto a los de PLA_{1%} y PLA_{3%}. Este mismo comportamiento se observa para el PLA₁₀ y PLA₁₁, respecto a PLA₇. Se puede decir que después de 30 h de foto-oxidación, existe un efecto antioxidante visible del EB, aún efectiva a tiempos relativamente largos de foto-oxidación. Esto puede ser atribuido a la presencia de antocianinas en el EB. En la naturaleza, las antocianinas son responsables de la gama de colores desde el rojo hasta el azul y poseen diferentes funciones como la protección a la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta (Garzón, 2011). A esta función protectora de las antocianinas, se puede atribuir el efecto mostrado en las películas adicionadas con EB.

Debido a que la degradación térmica del PLA es lenta, es de gran interés investigar su estabilidad bajo condiciones de foto-oxidación.

A tiempo cero de irradiación, se observó una ligera disminución en el peso molecular del PLA, lo que muestra que se presenta una degradación del PLA durante el procesamiento en presencia del EB. La foto-oxidación produce una disminución del peso molecular del PLA_{0%} (~84%) después de 130 h de irradiación. Esto indica que la foto-oxidación provoca escisiones en la cadena del PLA, formando productos de menor peso molecular.

El análisis de la evolución del M_w del PLA_{1%} y PLA_{3%} durante la foto-oxidación también indica una disminución de M_w pero en menor grado. Después de 130 h de irradiación, el M_w del PLA_{1%} y del PLA_{3%} se reducen 69% y 78%, respectivamente. Esto puede ser debido a que las antocianinas presentes en el EB podrían estar absorbiendo los fotones de energía durante la irradiación y de esta manera detienen la formación de radicales libres.

Un comportamiento similar en las variaciones del M_w fueron reportadas para películas de PLA nanocompuestas con ZnO (Therias *et al.*, 2012).

5.8 Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas se midieron en base a los ensayos de tracción. Los parámetros: elongación (\mathcal{E}), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y), son reportados como una función del tiempo de foto-oxidación. Los valores iniciales para todas las películas antes de su acondicionamiento térmico, se muestran en la Tabla 14.

Los valores de las propiedades mecánicas para las películas de PLA adicionadas con EB y térmicamente acondicionadas a tiempo cero de foto-oxidación se muestran en la Tabla 15, en la cual se observa una dramática disminución en los valores de las propiedades mecánicas de las películas después del acondicionamiento térmico. Los valores para las películas adicionadas con resveratrol y térmicamente acondicionadas a tiempo cero de foto-oxidación se muestran en la Tabla 16.

Las películas adicionadas tanto con EB como con resveratrol mostraron un efecto positivo en las propiedades mecánicas del PLA, aunque un efecto mayor en la resistencia a la tracción y el límite elástico se obtuvo en el PLA₁₁ (Figura 27). Esto puede deberse a que las películas con resveratrol tuvieron una impregnación más uniforme en la estructura del polímero respecto a las películas adicionadas con EB. La elongación (\mathcal{E}) disminuyó en todas las películas de PLA, pero después de las 59 horas de irradiación se observó que la razón de variación disminuyó, este comportamiento es semejante al obtenido en la pérdida de M_w como función del tiempo, lo cual es atribuible al efecto que tiene la adición del EB.

Tabla 14. Valores de elongación (\mathcal{E}), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) de las películas de PLA antes del acondicionamiento térmico.

Película	\mathcal{E} (%)	M (MPa)	σ (MPa)	Y (MPa)
0%	57.09±16.69 ^b	2 521.27±300.73 ^a	33.67±1.54 ^a	44.01±3.59 ^a
1%	55.23±26.33 ^a	2 651.76±343.43 ^a	35.25±2.93 ^a	43.37±2.20 ^a
3%	53.14±36.14 ^a	2 595.87±378.90 ^a	35.72±2.75 ^a	42.65±4.05 ^a
7	30.01±5.89 ^a	2 501.75±338.90 ^a	35.72±2.73 ^a	42.65±4.05 ^a
10	34.86±12.42 ^a	2 442.96±280.00 ^a	29.77±5.59 ^a	37.98±7.81 ^a
11	23.68±3.40 ^a	2 439.46±337.91 ^a	42.24±2.89 ^b	46.77±4.00 ^a

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores con letras similares en la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tabla 15. Valores de elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) para PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%} con acondicionamiento térmico, a tiempo cero de foto-oxidación.

Película	ϵ (%)	M (Mpa)	σ (MPa)	YP (Mpa)
PLA _{0%}	6.30±1.50 ^a	3 365.34±504.85 ^a	54.92±4.11 ^a	58.53±3.77 ^a
PLA _{1%}	7.18±1.48 ^a	2 967.41±365.88 ^a	49.22±4.83 ^a	53.49±4.11 ^a
PLA _{3%}	6.47±1.98 ^a	3 298.92±230.65 ^a	51.47±3.02 ^a	56.55±2.66 ^a

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores con letras similares en la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Tabla 16. Valores de elongación (ϵ), resistencia a la tracción (σ), Módulo de tensión (M) y límite elástico (Y) para PLA₇, PLA₁₀ y PLA₁₁ con acondicionamiento térmico, a tiempo cero de foto-oxidación.

Película	ϵ (%)	M (Mpa)	σ (%)	Y (Mpa)
PLA ₇	6.36±3.14 ^a	2 512.68±595.53 ^a	45.54±5.06 ^a	51.18±6.72 ^a
PLA ₁₀	6.83±1.48 ^a	2 349.16±411.00 ^a	46.90±1.57 ^a	50.49±2.28 ^a
PLA ₁₁	6.44±2.31 ^a	2 303.07±208.40 ^a	48.45±3.91 ^a	51.62±4.44 ^a

Los valores representan la media ± la desviación estándar de triplicados. ^aValores con letras similares en la misma columna no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

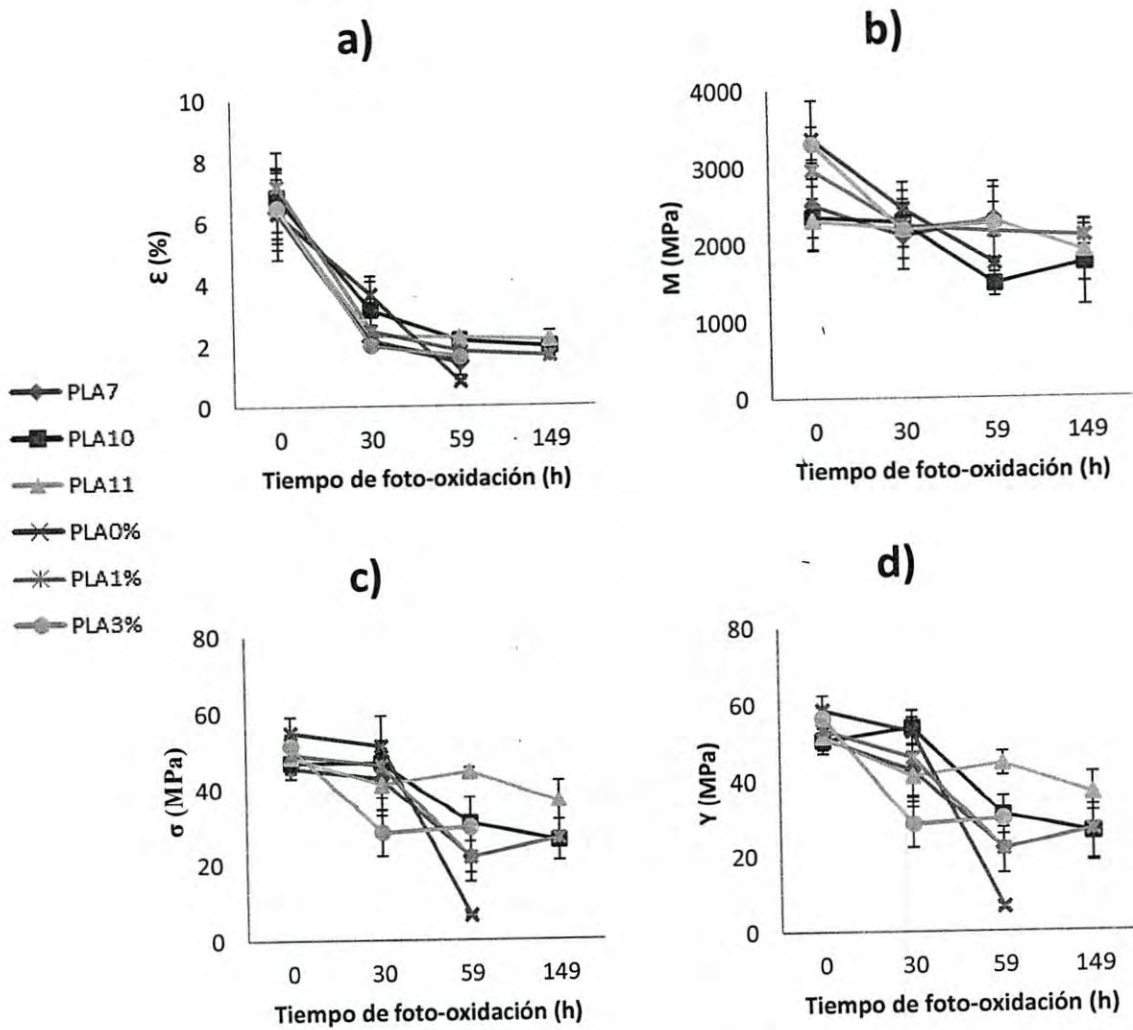


Figura 27. Variaciones de elongación (a), módulo de tensión (b), resistencia a la tracción (c) y límite elástico (d) para las películas de PLA a diferentes tiempos de foto-oxidación.

Durante el proceso de extrusión, las moléculas del EB podrían estar siendo solo adheridas a la estructura del polímero, y en consecuencia, solo actúan hasta que la estructura del polímero es fraccionada. Esto explica porque durante las primeras horas de irradiación, la adición del EB no tiene efecto sobre el M_w y las propiedades mecánicas, sino hasta después del primer fraccionamiento de la estructura del polímero. Después de las 59 h de irradiación, la degradación del PLA_{0%} y PLA₇ fue evidente, lo que hizo que el manejo de los especímenes fuera imposible debido al deterioro.

Se observó un comportamiento similar para la variación de la resistencia a la tracción (σ) y el límite elástico (Y), pero en el caso del módulo de elasticidad (M), el comportamiento resultante no puede ser atribuido directamente a la adición, tanto del EB como del resveratrol.

Clarival y Halleux (2005) reportaron valores de 48–53 MPa (Y) y 3 500 MPa (M), los cuales coinciden con los obtenidos en este estudio. Sin embargo, el valor de la elongación (ϵ) fue mayor. Por otro lado, la hoja técnica de NatureWorks (INGEO, 2012) reporta valores de 7% (ϵ), 59 MPa (σ), 3 500 MPa (M) y 70 MPa (Y). Ortiz-Vazquez *et al.* (2011) reportaron valores de 5.8% (ϵ), 59.3 MPa (σ) y 48.2 MPa (Y) en películas de PLA sin aditivo y 4.1% (ϵ), 54MPa (σ) y 44.7 MPa (Y) en películas de PLA adicionadas con BHT, valores que coinciden con los reportados en este estudio.

5.9 Espectroscopia al Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 28 muestra los espectros de PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%}, antes de la foto-oxidación. La Figura 29 muestra en el dominio 3800–2800cm⁻¹ algunos grupos funcionales. El grupo OH se observa en la banda de absorción a 3501 cm⁻¹; mientras que en las bandas 2996 cm⁻¹ y 2946 cm⁻¹ se observa la presencia del grupo CH₃ y su flexión en la banda 1460 cm⁻¹,

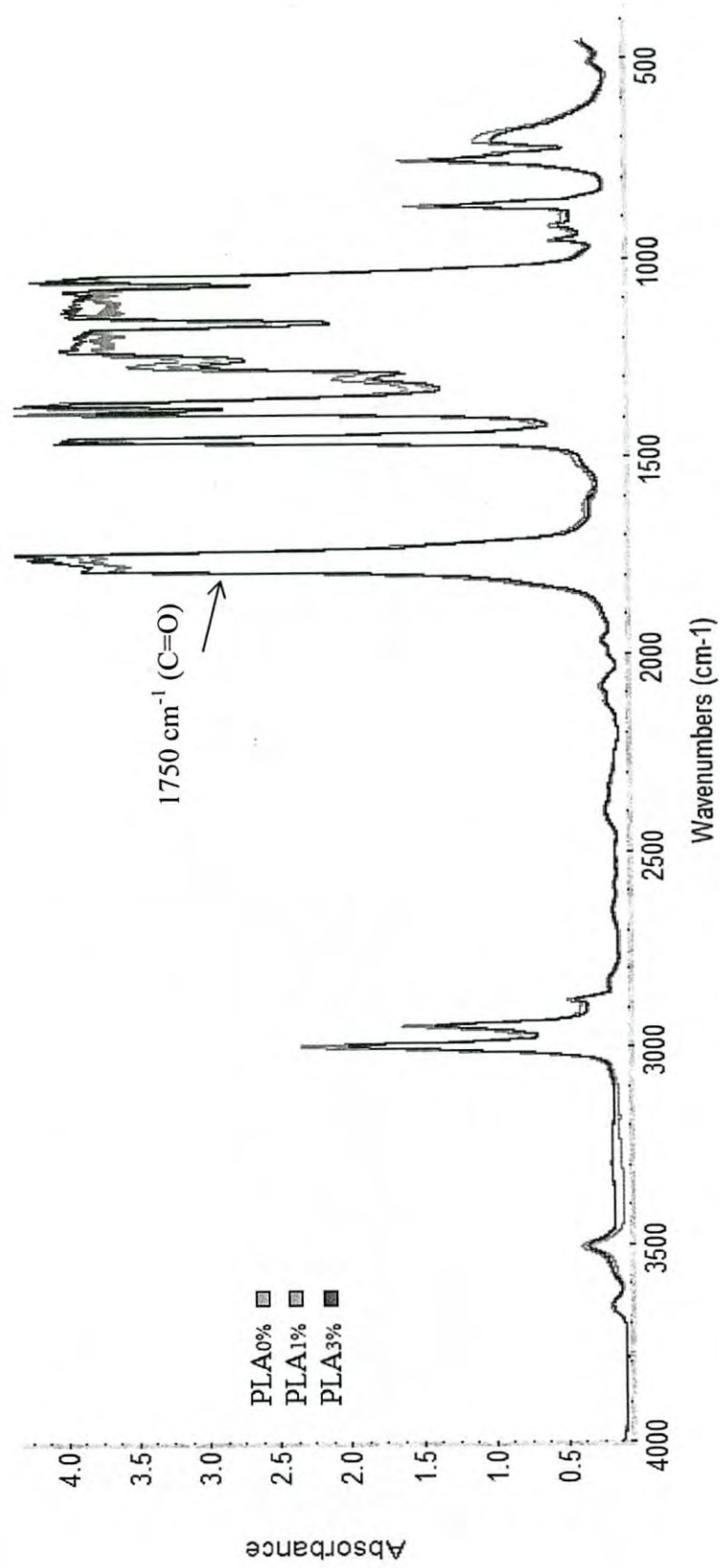


Figura 28. Espectros IR de PLA aditivado con EB a tiempo cero de foto-oxidación.

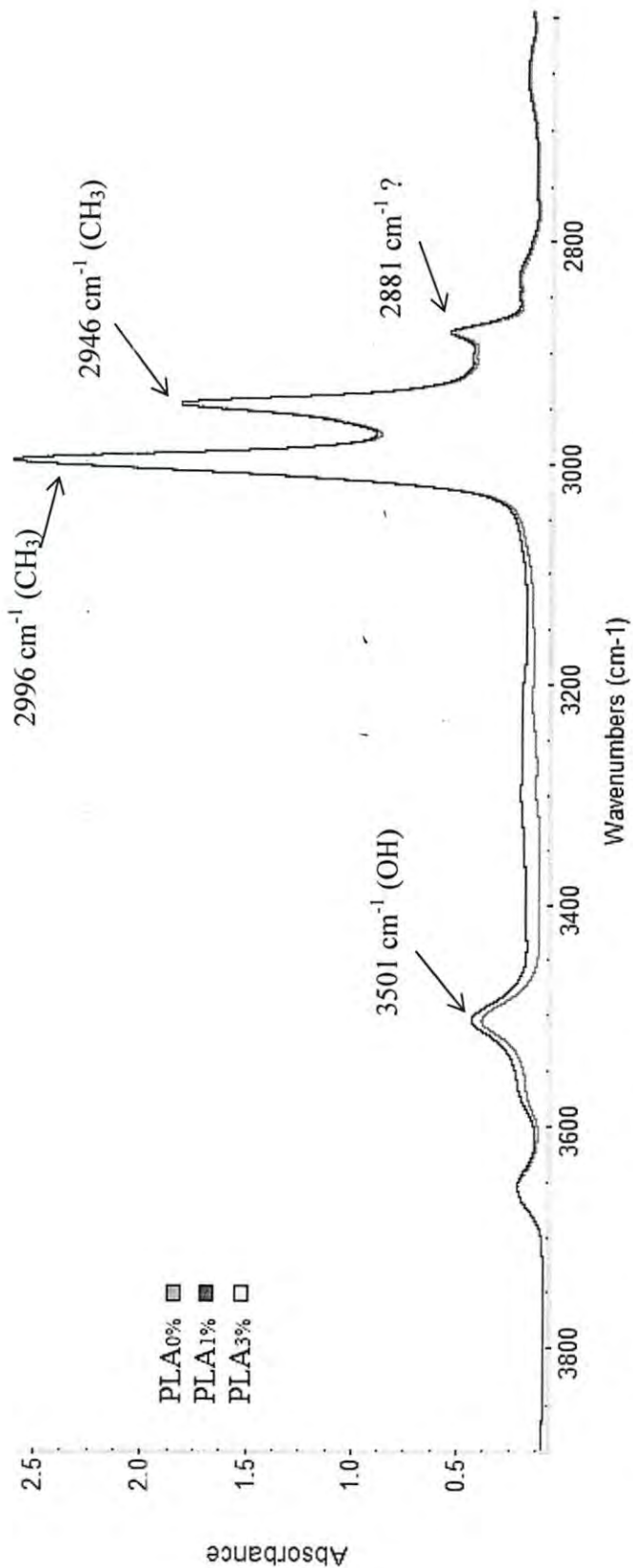


Figura 29. Espectros IR de PLA aditivado con EB, en el dominio 3800–2800 cm⁻¹.

ambos característicos del PLA que aparecen desde el proceso de extrusión y se mantienen sin variación durante las primeras horas de la foto-oxidación. También se muestra el estiramiento del grupo C=O (1750 cm^{-1}) (Gardette *et al.*, 2011).

La intensidad y amplitud de las bandas del grupo OH pueden estar relacionadas con la polaridad de las moléculas presentes en el EB, así como a la formación de puentes de hidrógeno entre el polímero y los compuestos presentes en el EB (Cruz Zuñiga, 2011).

La concentración de estos grupos tiende a aumentar durante la foto-oxidación. A estos grupos se atribuye, en parte, el descenso significativo de los valores de las propiedades mecánicas antes de la foto-oxidación. La formación de estos grupos funcionales está relacionada con la pérdida del M_w durante las primeras 30 h de irradiación (Therias *et al.*, 2012). Este comportamiento fue similar en el PLA₇, PLA₁₀ y PLA₁₁, (Figuras 30 y 31). Sin embargo, en el PLA₁₀ se observa la formación de otros grupos no identificados en el dominio $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.

En la Figura 30 se muestra el estiramiento de los anillos aromáticos, posiblemente correspondiente a la estructura del resveratrol, la cual es aún más visible en la banda de absorción 1608 cm^{-1} ; así como las vibraciones de estiramiento del grupo C-C del esqueleto anular. La Figura 31 se puede observar el estiramiento de los grupos CH del polímero en la región $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.

La Figura 32 muestra la evolución de espectros del PLA_{0%} en función del tiempo de foto-oxidación. En la Figura 33, se observa el aumento de la banda de absorción a 1845 cm^{-1} , que se atribuye a la formación de grupos anhídros en la región hidroxil debida a los grupos alcohol y carboxílico (Bocchini *et al.*, 2010; Gardette *et al.*, 2011; Therias *et al.*, 2012).

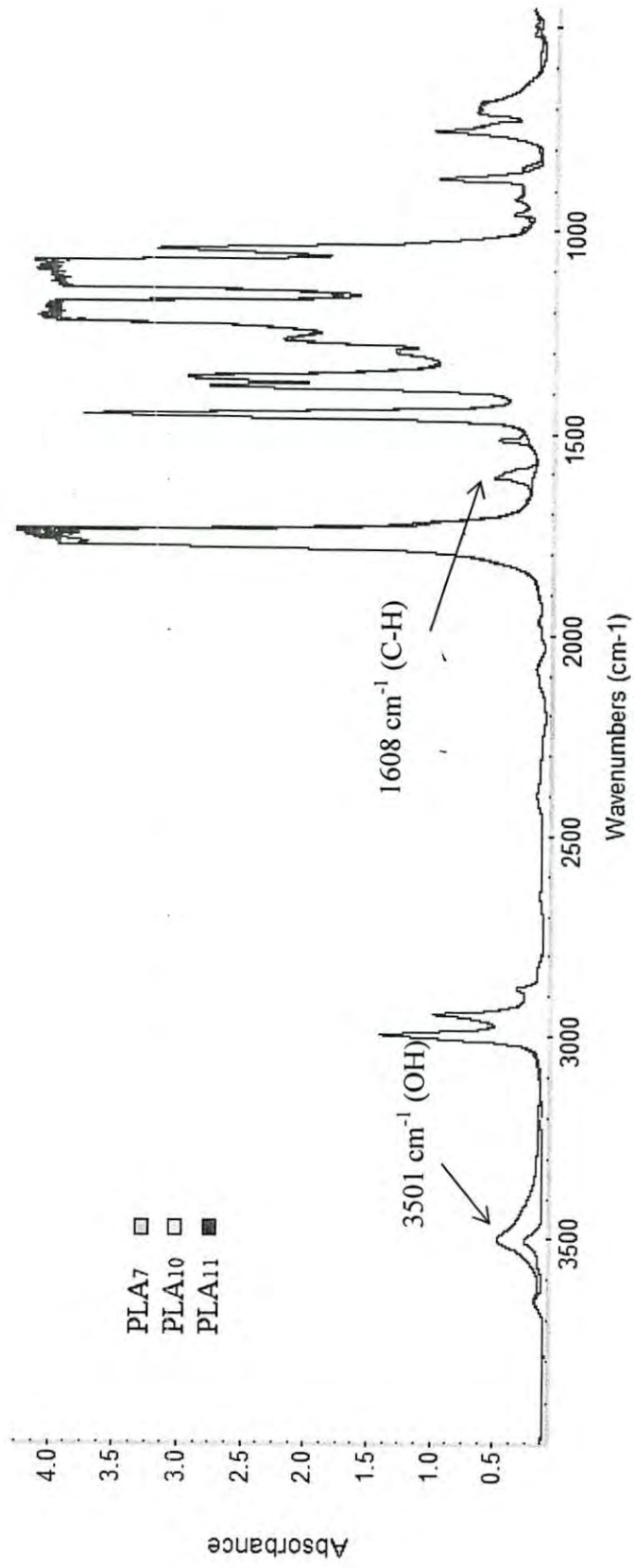


Figura 30. Espectros IR de PLA aditivado con resveratrol, a tiempo cero de foto-oxidación.

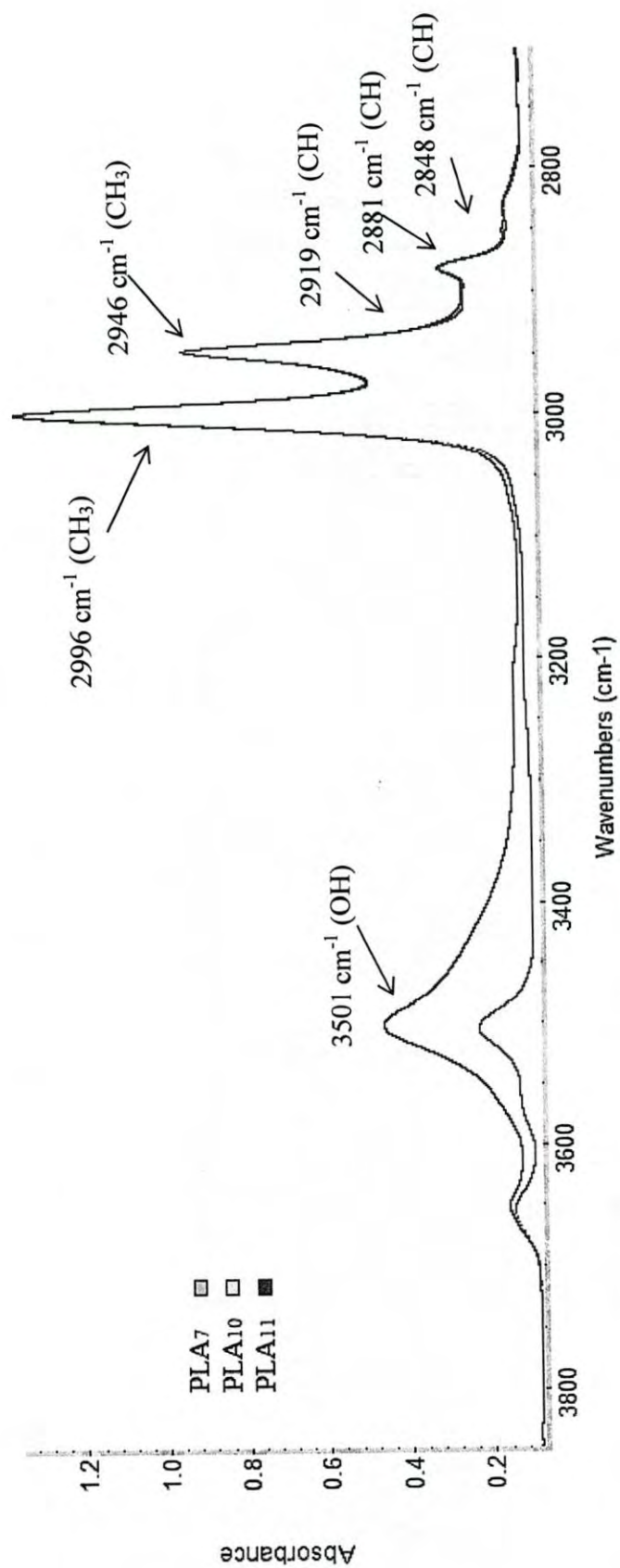


Figura 31. Espectros IR de PLA aditivado con resveratrol en el dominio 3800–2800 cm⁻¹.

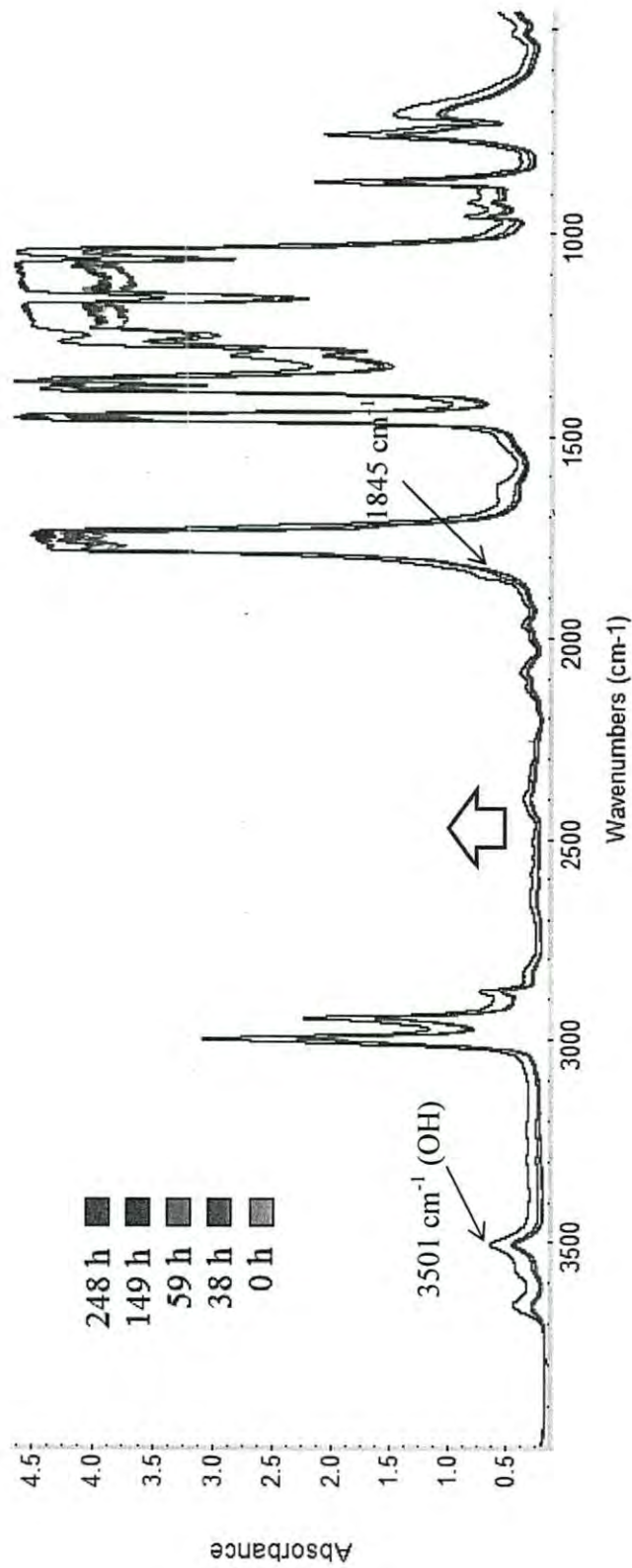


Figura 32. Espectros IR de PLA_{0%} a diferentes tiempos de foto-oxidación.

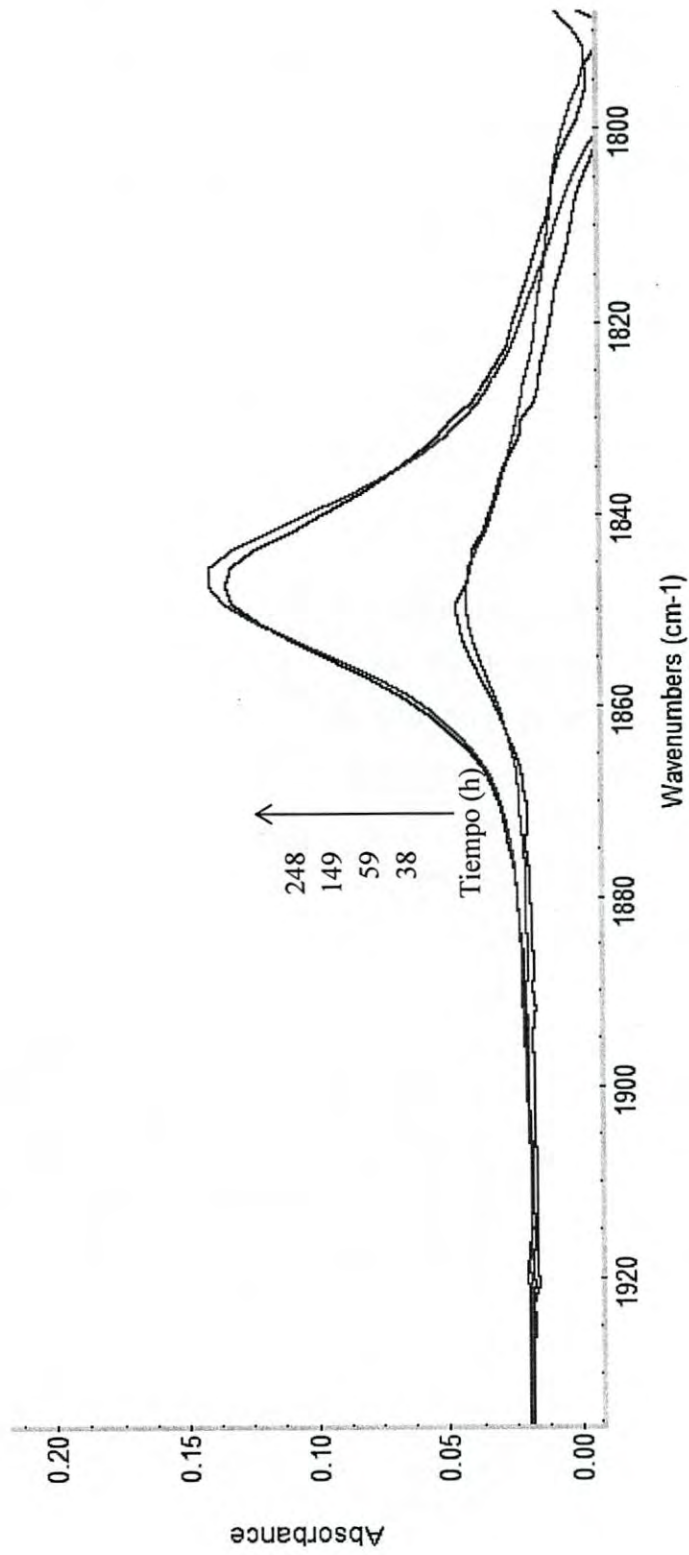


Figura 33. Espectros IR substraídos ($F_x - F_0$) de $PLA_{0\%}$ a diferentes tiempos de foto-oxidación en el dominio 1920–1800 cm^{-1} .

La composición fenólica del EB interacciona con la estructura del PLA produciendo una absorción de energía a frecuencias más altas, y también reduce el crecimiento de la formación de los grupos anhídros en la banda de absorción de 1845 cm^{-1} (Cruz Zuñiga, 2011; Iñiguez Franco, 2011).

En la Figura 34 se presentan los espectros a 305 h de foto-oxidación para el PLA_{0%}, el PLA_{1%} y el PLA_{3%}. La evolución del crecimiento de los grupos en esta banda de absorción se observa en la Figura 35. A 305 h de foto-oxidación se tiene la lectura del último espectro IR para el PLA_{0%}, ya que lecturas posteriores fueron imposibles de realizar debido a que el material estaba totalmente desintegrado. El mismo comportamiento se tuvo para el PLA₇.

Sin embargo, es importante mencionar que para el resto de especímenes, lecturas posteriores si fueron posibles de realizar, como se puede ver en la Figura 33. Para visualizar el aumento del área en la banda de 1845 cm^{-1} se calculó la diferencia del valor del área de la banda del grupo funcional a diferentes tiempos de oxidación con respecto al tiempo cero. Los resultados obtenidos en los espectros, confirman el efecto retardante que brinda el EB al PLA frente a la foto-oxidación.

El efecto protector ante la foto-oxidación fue mayor en las películas aditivadas con resveratrol que las aditivadas con EB. Esto puede ser debido a que los compuestos fenólicos presentes en el extracto del bagazo no se encuentran puros. Por otro lado, la presencia de otros compuestos (carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos) puede influir en el efecto antioxidante.

Sin embargo, las películas aditivadas con 1 y 3% de EB mostraron una estabilidad mejor a la foto-oxidación que las películas de PLA sin aditivo.

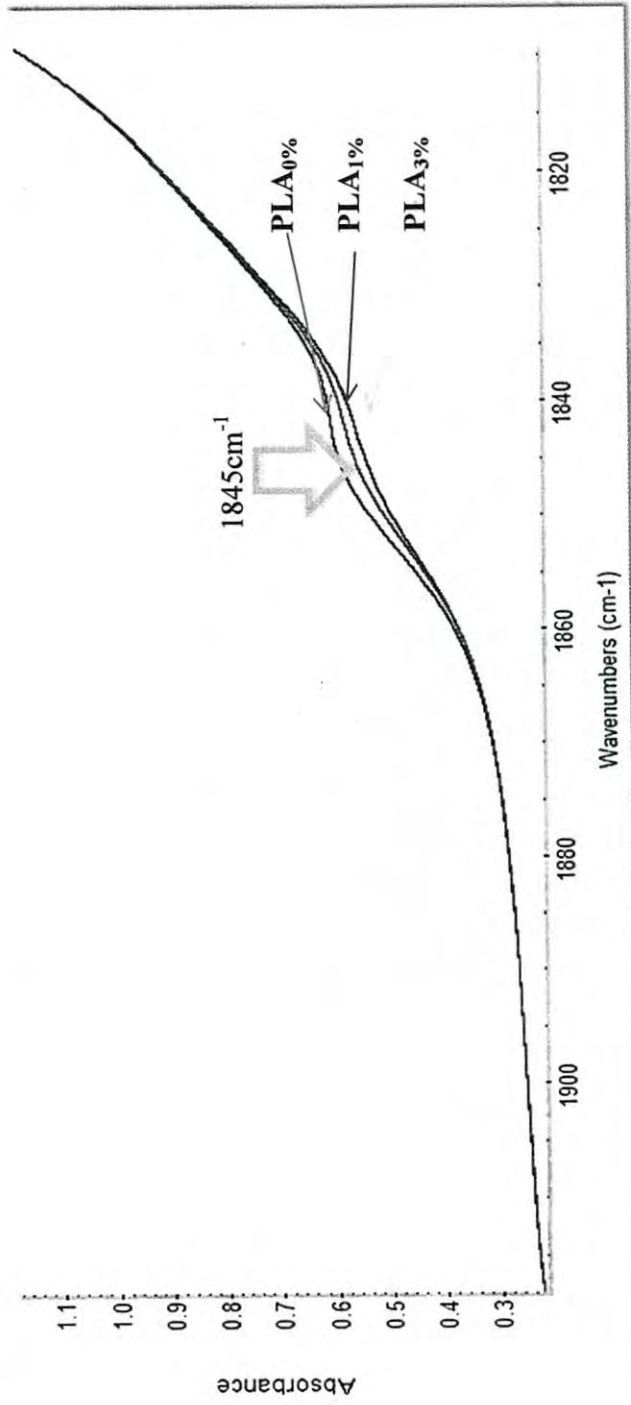


Figura 34. Espectros IR de PLA_{0%}, PLA_{1%} y PLA_{3%} en el dominio 1900–1820 cm⁻¹ a 305 h de foto-oxidación.

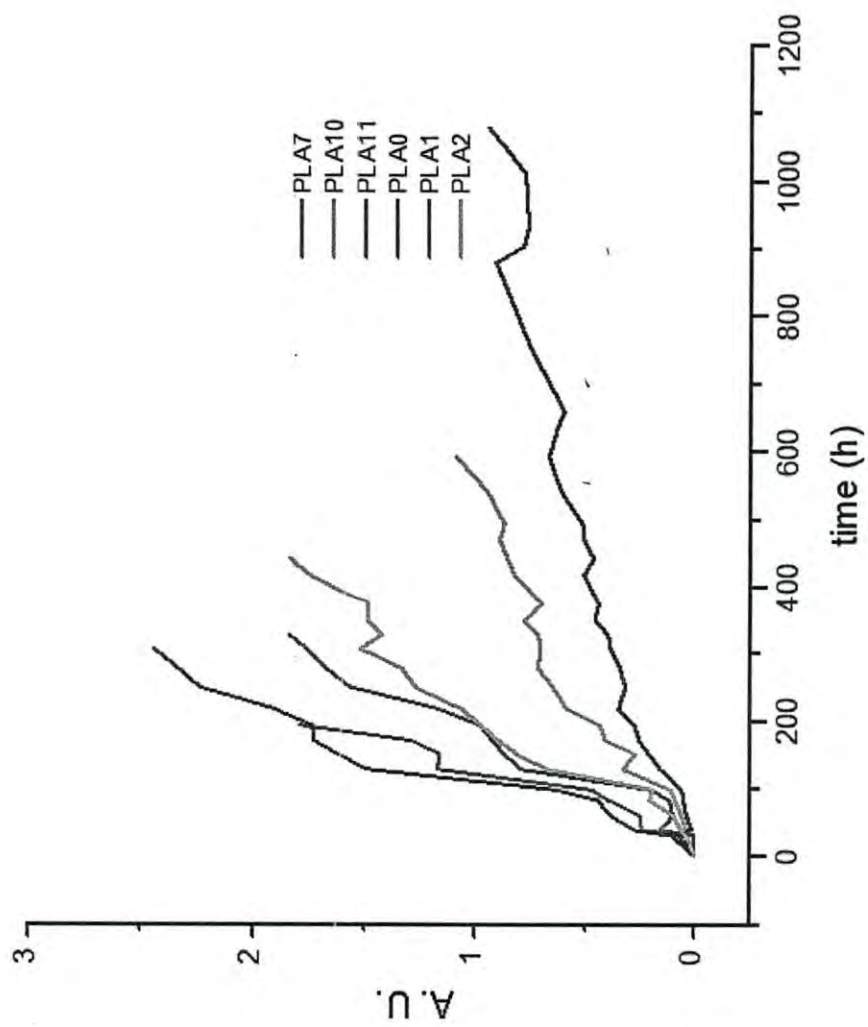


Figura 35. Evolución de la banda de absorción a 1845 cm^{-1} en las películas de PLA ($F_x - F_0$) por efecto de la foto-oxidación.

VI. CONCLUSIONES

Los principales compuestos en el BI fueron miricetina, catequina y epicatequina. El pedúnculo y las semillas fueron ricos en compuestos fenólicos de naturaleza monomérica; mientras que la cáscara lo fue en antocianinas.

Los solventes acidificados mostraron ser capaces de extraer catequina, miricetina y ácido clorogénico. Los sistemas metanólicos fueron capaces de extraer las concentraciones más altas de ácido clorogénico; mientras que los sistemas etanólicos lograron extraer epicatequina y las concentraciones más altas de miricetina.

La eficiencia de extracción y capacidad antioxidante decreció en los sistemas con las proporciones más altas de alcohol. Sin embargo, el mejor sistema de solventes ecológicos para la extracción de compuestos fenólicos fue el EtOH:agua (6:4).

La capacidad antioxidante más alta fue obtenida con los solventes acidificados, seguido por los sistemas MeOH:agua:ACE (3:3.5:3.5) y MeOH:agua (6:4). Entre los constituyentes de BI, los extractos de semilla exhibieron la CA mayor; mientras que los valores menores fueron en los extractos de pedúnculo.

La adición de extractos de bagazo de uva al PLA no mostró tener efectos significativos en los parámetros de Tg, Tc y Tm. Sin embargo, los valores TG muestran que el PLA aditivado con extracto de bagazo de uva es térmicamente estable a temperaturas menores de 100°C.

La adición del extracto de bagazo de uva mostró un efecto retardante en la pérdida del peso molecular del PLA por foto-oxidación. Las propiedades mecánicas del PLA se mantuvieron a tiempos relativamente largos de irradiación.

Los resultados sugieren que el bagazo de uva Carignan (residuo industrial), es un recurso natural con potencial para ser usado como aditivo para retardar la oxidación del PLA.

VII. RECOMENDACIONES

Conducir a nuevas investigaciones sobre la composición y la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en el bagazo de la uva, sobre sistemas más complejos, como lípidos, sistemas biológicos y con aplicaciones ingenieriles y de la industria alimentaria.

Utilizar el bagazo de uva como aditivo en matrices poliméricas para la elaboración de envases que pueden estar expuestos a foto-oxidación.

VIII. REFERENCIAS

- Auras, R., Harte, B. y Selke, S. 2004. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular bioscience* 4(9):835–64.
- Basile, MA., Dipasquale, L., Gambacorta, A., Vella, MF., Calarco, A., Cerruti, P., Malinconico, M. y Gomez d' Ayala, G. 2010. The effect of the surface charge of hydrogel supports on thermophilic biohydrogen production. *Bioresource technology* 101(12):4386–94.
- Bertran, E., Sort, X., Soliva, M. y Trillas, I. 2004. Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource technology* 95(2):203–8.
- Bocchini, S., Fukushima, K., Di Blasio, A., Fina, A., Frache, A. y Geobaldo, F. 2010. Polylactic Acid and Polylactic Acid-Based Nanocomposite Photooxidation. *Biomacromolecules* (Iii):2919–2926.
- Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4):221–247.
- De Campos Luanda, MAS., Leimann, FV., Curi Pedrosa, R. y Ferreira, SRS. 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource technology* 99(17):8413–8420.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, FA. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(10):4606–12.

- Del Carpio Jiménez, C., Serrano, C. y Giusti, M. 2009. CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE *Berberis boliviana* Lechler CHARACTERIZATION OF *Berberis boliviana* Lechler FRUITS. *Rev Soc Quím Perú* 75(1):76–86.
- Carrasco Pancorbo, A., Cruces-Blanco, C., Segura Carretero, A. y Fernández Gutiérrez, A. 2004. Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(22):6687–93.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. y Hermosín-Gutiérrez, I. 2007. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(3):992–1002.
- Cerna, E., Ochoa, Y., Mendoza, R., Badii, MH., Gallegos, G. y Landeros, L. 2010. Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas Assessment of protein quantification methods in *Tetranychus urticae*, as a potential tool for resistance detection to pesticides. *REVISTA INTERNACIONAL DE BOTÁNICA EXPERIMENTAL INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 79(940):147–152.
- Cerruti, P., Santagata, G., Gomez d’Ayala, G., Ambrogio, V., Carfagna, C., Malinconico, M. y Persico, P. 2011. Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer. *Polymer Degradation and Stability* 96(5):839–846.
- Cerruti, P., Ambrogio, V., Postiglione, A., Rychlý, J., Matisová-Rychlá, L. y Carfagna C. 2008. Morphological and thermal properties of cellulose-montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules* 9(11):3004–13.

- Cerruti, P., Malinconico, M., Rychly, J., Matisova-Rychla, L. y Carfagna, C. 2009. Effect of natural antioxidants on the stability of polypropylene films. *Polymer Degradation and Stability* 94(11):2095–2100.
- Cho, MJ., Howard, LR., Prior, RL. y Clark, JR. 2004. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(13):1771–1782.
- Clarinval, AM. y Halleux, J. 2005. Classification of biodegradable polymers. Pp. 3–31 in *Biodegradable polymers for industrial applications*, edited by Ray Smith. Boca Raton, FL, USA.
- Cruz Zuñiga, JM. 2011. Difusión de Rutina y sus subproductos de descomposición en una película de Ácido Poliláctico (PLA) hacia simulantes de alimentos. Maestría En Ciencias. CIAD. 74–82.
- Dai, J. y Mumper, RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)* 15(10):7313–52.
- Dambrouck, T., Marchal, R., Cilindre, C., Parmentier, M. y Jeandet, P. 2005. Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. relationships with wine foamability. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(22):8782–9.
- Dennis-Quiñonez, O., Gámez-Meza, N., Ortega-García, J., Torres-Chávez, PI., Noriega-Rodríguez, JA. y Medina-Juárez, LA. 2005. Identificación de los Compuestos Fenólicos de la Cáscara y Semilla de la Uva Carignane. Pp. 506–524. in. V Congreso del Noroeste. I Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, México.

- Dong, H., Esser-kahn, AP., Thakre, PR. y Patrick, JF. 2012. Chemical treatment of poly(lactic acid) fibers to enhance the rate of thermal depolymerization. *ACS applied materials & interfaces* 4(2):503–9.
- FAOSTAT. “Production Crops.” © *FAO Statistics Division*. Retrieved November 30, 2012 (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>).
- Filisetti-Cozzi, TM. y Carpita, NC. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry* 197(1):157–62.
- Flavel, TC., Murphy, DV., Lalor, BM. y Fillery, IRP. 2005. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37(7):1397–1400.
- Gardette, M., Thérias, S., Gardette, J-L., Murariu, M. y Dubois, P. 2011. Photooxidation of polylactide/calcium sulphate composites. *Polymer Degradation and Stability* 96(4):616–623.
- Garzón, GA. 2011. Las Antocianinas Como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta biol.Colomb. Colloides Naturels de México* 13(3):7–13. (info@mondoalimentario.com).
- Giusti, MM. y Wrolstad, RE. 2001. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. edited by Ronald E. Wrolstad et al. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Retrieved January 9, 2013.
- González-Paramás, AM., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S. y Rivas-Gonzalo, JC. 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(2):234–8.

- Goupy, P., Bautista-Ortin, A-B., Fulcrand, H. y Dangles, O. 2009. Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the dpph radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(13):5762–70.
- Sánchez Guerrero, M., Sineiro Torres, J. y Nuñez, MJ. 2008. Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: optimization and modelling. *Bioresource technology* 99(5):1311–8.
- Göktürk-Baydar, N., Özkan, G. y Çetin, ES. 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites* 58(1):29–33.
- Göktürk-Baydar, N., Özkan, G. y Yaşar, S. 2007. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* 18(9):1131–1136.
- Gülçin, İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(1):210–218.
- Hervás-Serra, A. 2012. El mercado del vino en México. *Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México*. Pp. 1-60.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C. y Zhou, K. 2010. Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & metabolism* 7:71.
- Huntley, AL. 2007. Grape flavonoids and menopausal health. *Menopause international* 13(4):165–9.

- Hwang, SW., Shim, JK., Selke, SE., Soto-Valdez, H., Matuana, L., Rubino, M. y Auras, R. 2012. Poly(L-lactic acid) with added α -tocopherol and resveratrol: optical, physical, thermal and mechanical properties. *Polymer International* 61(3):418–425.
- Inbar, Y., Hadar, Y. y Chen, Y. 1992. Characterization of humic substances formed during the composting of solid wastes from wineries. *Science of The Total Environment* 113(1-2):35–48.
- INFOCIR. 2005. “Elaboración de vinos.” *Boletín Quincenal de Inteligencia Agroindustrial* 1(11):1–5.
- INFOCIR. 2008. “La vid: Características y variedades.” *Boletín Quincenal de Inteligencia Agroindustrial* (10):1–5.
- INGEO. 2012. “Nature Works.” *PLA 4043D*. Retrieved (www.natureworks.com).
- Iotti, M., Fabbri, P., Messori, M., Pilati, F. y Fava, P. 2009. Organic–Inorganic Hybrid Coatings for the Modification of Barrier Properties of Poly(lactic acid) Films for Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment* 17(1):10–19.
- Iñiguez Franco, FM. 2011. Estudios de la Difusión de Catequina y Epicatequina en películas de Ácido Poliláctico y su caracterización fisicoquímica. Maestría en Ciencias. CIAD. Pp. 58–63.
- Jackson, RS. 2008. *Wine Science: Principles and Applications*. Third Edit. edited by Academic Press. London: Elsevier Ltd. Pp. 15–43.
- Jamshidzadeh, A., Baha-al-dini Baigi, BF. y Aram, M. 2010. The effects of grape seed and grape pomace extracts on spatial memory impairment induced by hyoscine in mic_e. *Journal of Medicinal Plants Research Plant. Res.* 4(22):2334–2339.

- Jiang, J., Benter, M., Taboryski, R. y Bechgaard, K. 2010. Oxygen barrier coating deposited by novel plasma-enhanced chemical vapor deposition. *Journal of Applied Polymer Science* 115(5):2767–2772.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R. y Schieber, A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(14):4360–7.
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A. y Carle, R. 2006. A Novel Process for the Recovery of Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) Pomace. *Journal of Food Science* 70(2):C157–C163.
- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y. y Wang, H. 2008. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 16(6):67–73.
- Liazid, A., Barbero, GF., Palma, M., Brigui, J. y Barroso, CG. 2010. Rapid Determination of Simple Polyphenols in Grapes by LC Using a Monolithic Column. *Chromatographia* 72(5-6):417–424.
- Luque-Rodríguez, JM., Luque de Castro, MD. y Pérez-Juan, P. 2007. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Bioresource technology* 98(14):2705–13.
- Mandal, A. 2013. Antioxidants in Technology. *NEWS MEDICAL* 1. Retrieved (<http://www.news-medical.net/health/Antioxidants-in-Technology.aspx>).
- Mantell, C., Rodríguez, M. y Martínez de la Ossa, E. 2003. Kinetics and Mathematical Modeling of Anthocyanin Extraction with Carbon Dioxide and Methanol at High Pressure. *Separation Science and Technology* 38(15):3689–3712.

- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R. y Peralta, E. 2011. Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering* 104(4):508–517.
- Mané, C., Souquet, JM., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V. y Fulcrand, H. 2007. Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(18):7224–33.
- Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L. y Piergiovanni, L. 2010. Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering* 98(3):294–301.
- Molina-Quijada, DMA., Medina-Juárez, LA., González-Aguilar, GA., Robles-Sánchez, RM. y Gámez-Meza, N. 2010. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. *CyTA - Journal of Food* 8(1):57–63.
- Negro, C., Tommasi, L. y Miceli, A. 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource technology* 87(1):41–4.
- Nishiumi, S., Mukai, R., Ichiyanagi, T. y Ashida, H. 2012. Suppression of lipopolysaccharide and galactosamine-induced hepatic inflammation by red grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(36):9315–20.

- OIV. 2012. "OIV Statistical Report on World Vitiviniculture." Retrieved November 30, 2012 (<http://www.oiv.int/oiv/cms/index>).
- OIV Experts. 2012. "Presse Professionnelle. Note de conjoncture mondiale. Mars 2012." Retrieved November 30, 2012 (<http://www.oiv.int/oiv/cms/index>).
- Ortiz-Vazquez, H., Shin, J., Soto-Valdez, H. y Auras, R. 2011. Release of butylated hydroxytoluene (BHT) from Poly(lactic acid) films. *Polymer Testing* 30(5):463–471.
- Pellegrini, N., Del Rio, D., Colombi, B., Bianchi, M. y Brighenti, F. 2003. Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(1):260–4.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P. y Brillouet, JM. 1995. Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate research* 277(1):135–43.
- Peña, E., Badillo, D., Viana, MT. y Correa-Reyes, G. 2007. Utilización de bagazo de uva como un ingrediente en la formulación de alimentos balanceados para juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Pp. 15–17 in *XIII CONGRESO BIENAL AMENA: DR. ALBERTO RIVERA BRECHU*. VERACRUZ 2007.
- Pinelo, M., Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. y Nicoli, M. 2005a. Optimization of continuous phenol extraction from byproducts. *Food Chemistry* 92(1):109–117.

- Pinelo, M., Arnous, A. y Meyer, AS. 2006a. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* 17(11):579–590.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. y Núñez, MJ. 2005b. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(6):2111–7.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. y Nuñez, MJ. 2006b. Effect of bubbling nitrogen and pulsed flow on the antiradical activity of grape residues. *Journal of Food Engineering* 73(3):269–275.
- Prior, RL., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(11):3273–3279.
- Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology*. Helsinki. Pp. 51–53.
- Rivera, OMP., Moldes, AB., Torrado, AM. y Domínguez, JM. 2007. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process Biochemistry* 42(6):1010–1020.

- Rubilar, M., Pinelo, M., Shene, C., Sineiro, J. y Nuñez, MJ. 2007. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(25):10101–9.
- SAGARPA. 2012. “SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN.” Retrieved December 14, 2012.
(<http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/Paginas/default.aspx>).
- Sánchez-Alonso, I., Solas, MT. y Borderías, AJ. 2007. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *Journal of food science* 72(2):E94–101.
- Sánchez, M., Franco, D., Sineiro, J., Magariños, B. y Núñez, MJ. 2009. Antioxidant power, bacteriostatic activity, and characterization of white grape pomace extracts by HPLC–ESI–MS. *European Food Research and Technology* 230(2):291–301.
- SIAP. 2012. “Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.” *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciclo: Perennes 2011*. Retrieved November 30, 2012.
(http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350).
- Skelton, S. 2007. Vitivulture: An introduction to commercial grape growing for wine production. Edition-00 ed. edited by Lulu. London.
- Song, F-L., Gan, R-Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. y Li, H-B. 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *International journal of molecular sciences* 11(6):2362–72.

- Soto-Valdez, H., Auras, R. y Peralta, E. 2011. Fabrication of Poly (lactic acid) Films with Resveratrol and the Diffusion of Resveratrol into Ethanol. *Journal of Applied Polymer Science*. 121(2): 970–978.
- Souquet, JM., Labarbe, B. Le Guernevé, C., Cheynier, V. y Moutounet, M. 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(4):1076–80.
- Spigno, G. y De Faveri, DM. 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78(3):793–801.
- Spigno, G., Tramelli, L. y De Faveri, DM. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200–208.
- Sreeramulu, D., Vijaya Kumar Reddy, C. y Raghunath, M. 2009. Antioxidant activity of commonly consumed cereals, millets, pulses and legumes in India. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 46(1):112–5.
- Therias, S., Larché, J-F., Bussiére, P-O., Gardette, J-L., Murariu, M. y Dubois, P. 2012. Photochemical behavior of polylactide/ZnO nanocomposite films. *Biomacromolecules* 13(10):3283–91.
- Tundis, R., Loizzo, MR., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G., De Luca, D., de Cindio, B. y Menichini, F. 2011. Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annum* L. cultivars (*Acuminatum* small and *Cerasiferum*). *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 66(3):261–9.

- USDA. 2012. Natural Resources Conservation Service: Plants Profile. *United States Department of Agriculture* 14/diciembre/2012. Retrieved December 14, 2012 (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=VITIS>).
- Wang, L-F. y Zhang, H-Y. 2003. A theoretical investigation on DPPH radical-Scavenging mechanism of edaravone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(21):3789–3792.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. y Lu, J. 2010. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry* 119(4):1557–1565.
- Yilmaz, Y. y Toledo, RT. 2004a. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(2):255–60.
- Yilmaz, Y. y Toledo, RT. 2004b. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15(9):422–433.
- Yilmaz, Y. y Toledo, RT. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19(1):41–48.
- Zamani, N., Mianabadi, M. y Abdolzadeh, A. 2011. Changes in anti-oxidant activity of *Thymus transcaspicus* (Klokov) during growth and developmental stages. *Journal of Cell and Molecular Research* 3(1):12–18.
- Zhang, A., Fang, Y., Li, X., Meng, J., Wang, H., Li, H., Zhang, Z. y Guo, Z. 2011. Occurrence and estimation of trans-resveratrol in one-year-old canes from seven major Chinese grape producing regions. *Molecules (Basel, Switzerland)* 16(4):2846–61.

Zhang, A., Fang, Y., Wang, H., Li, H. y Zhang, Z. 2011. Free-radical scavenging properties and reducing power of grape cane extracts from 11 selected grape cultivars widely grown in China. *Molecules (Basel, Switzerland)* 16(12):10104–22.

Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, KS., Erçağ, E., Esin Çelik, S., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, Ş. y Apak, R. 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods* 3(11):2439.