

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis
labrusca L.* (UVA ISABELLA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE.

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico industrial

NATALIA TORO ZAPATA
LISETH SUÁREZ OSORIO

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis
labrusca L.* (UVA ISABELLA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE.

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Químico industrial

LISETH SUÁREZ OSORIO
NATALIA TORO ZAPATA

Director

GLORIA EDITH GUERRERO ÁLVAREZ

Dra. En Ciencias-Química

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012

NOTA DE ACEPTACION DE TRABAJO DE GRADO

Los suscritos directores y jurados del presente trabajo de grado una vez revisada la versión escrita y presenciada la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación de: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

El director: _____

Nombre: GLORIA EDITH GUERRERO.

Jurado: _____

Nombre: NELSON CONTRERAS CORONEL

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminar nuestro camino en la búsqueda de la misión de vida.

A nuestros padres por apoyarnos con su amor incondicional.

A la universidad Tecnológica de Pereira, en especial a la facultad de Química por permitirnos ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para la sociedad.

A Gloria Edith Guerrero, directora del centro de investigación Oleoquímica, por su sincero apoyo, comprensión y confianza en el devenir del trabajo.

Al Doctor Gonzalo Taborda, director de Postgrados en Química universidad de caldas, por su disposición y tiempo a la hora de realizar el análisis de ácidos grasos.

A todos los profesores de la Escuela de Tecnología Química que contribuyeron a nuestra formación académica y personal.

A Janet Cifuentes Marín por su valiosa colaboración en el desarrollo del trabajo

A nuestros compañeros y amigos por su apoyo incondicional y colaboración, y por estar ahí en los buenos y malos momentos.

A todo el equipo que conforma el área de reactivos, almacén y demás dependencias de la escuela.

A Cenipalma, laboratorio de caracterización de aceites por los análisis realizados de vitamina E.

DEDICATORIA

A Dios, y a mis padres que siempre han sido mi apoyo en todos los momentos de mi vida y que gracias a ellos se hizo posible mi crecimiento intelectual, personal y profesional, quienes en mis errores me aconsejan y en mis triunfos me fortalecen, a mis hermanas Manuela y Daniela quienes con su tibieza, cariño e inocencia me inspiran, me ayudan, en mis desaciertos me iluminan, y en mis éxitos me confortan., y en general a todos aquellos que me apoyaron durante el tiempo que dedique a la investigación y desarrollo de este trabajo.

Natalia

A Dios por iluminar mi camino y haberme brindado la oportunidad de vivir ésta experiencia. A mis padres que con su amor, apoyo incondicional y ejemplo de perseverancia hicieron posible mi crecimiento personal y profesional para alcanzar esta meta; a mi hermano Adrián quien me acompaña siempre y es mi fuente de inspiración; a mis familiares cercanos y en general a todos aquellos que me brindaron su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Liseth

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ANEXOS	x
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN.....	xv
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACION.....	17
3. OBJETIVOS	19
4. MARCO DE ANTECEDENTES.....	20
4.1 Composición química del aceite de las semillas de uva.	24
4.2 Estudios en general sobre <i>Vitis labrusca</i> L.	26
5. MARCO TEORICO.....	30
5.1 Generalidades de la <i>vitis labrusca</i> L.	30
5.1.1 Origen de <i>vitis labrusca</i> L. (<i>uva</i> Isabella).....	30
5.1.2 Clasificación Botánica.....	31
5.1.3 MORFOLOGIA.....	32
5.1.3.1 La hoja	33
5.1.3.2 Los troncos.....	33
5.1.3.3 El fruto.....	34
5.1.4 CONDICIONES AGROCLIMATOLOGICAS	35
5.1.4.2 Plagas y enfermedades que atacan los cultivos de uva en Colombia.....	36
5.1.5 PRODUCCION DE UVA EN EL MUNDO	38
5.1.6 USOS DE LA UVA EN EL MUNDO.....	40
5.1.7 PRODUCCION DE UVA EN COLOMBIA.....	40
5.2 LÍPIDOS.....	42
5.2.1 Naturaleza Química de los lípidos	42
5.2.1.1Triglicéridos	42
5.2.2 Ácidos grasos.....	44
5.2.3 Reacciones de los ácidos grasos.....	45
5.2.4 TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES.....	48
5.2.4.1 Estructura Química	49

5.2.4.2 Aspectos funcionales.....	51
5.2.4.3 Tocoferoles en aceites vegetales	51
5.2.5 FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES.....	52
5.2.6 METODOS DE ANALISIS DE GRASAS Y ACEITES.....	54
5.2.6.1 Extracción Método Soxhlet	54
5.2.6.2 Caracterización de las grasas y aceites.	55
5.3 ANTIOXIDANTES.....	59
5.3.1 Especies reactivas de oxígeno.....	60
5.3.2 Método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) para la evaluación de la actividad antioxidante	61
5.4 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA.....	62
5.4.1 Cromatografía en capa delgada. (CCD)	62
5.4.2 Cromatografía de gases. (CG)	63
5.4.3 Espectrómetro de masas.	65
5.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).	69
6. METODOLOGIA.....	74
6.1 MUESTRAS PARA ANALISIS.....	74
6.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS	74
6.3 EXTRACCION DEL ACEITE	74
6.4 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	75
6.5 CARACTERIZACION FISICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella).	75
6.5.1 Densidad.....	75
6.5.2 Índice de refracción	75
6.6 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS de <i>Vitis</i> <i>Labrusca</i> L. (uva Isabella).....	75
6.6.1 Índice de acidez.....	75
6.6.2 Índice de peróxidos	75
6.6.3 Índice de saponificación	76
6.6.4 Índice de yodo.....	76
6.7 SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis</i> <i>Labrusca</i> L. (uva Isabella).....	76

6.8	ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).....	76
6.8.1	Preparación del derivado metilado	76
6.8.2	Análisis composicional de ácidos grasos	76
6.9	ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).....	78
6.9.1.	Obtención de la materia insaponificable	78
6.9.2.	Separación de la fracción de fitoesteroles.....	79
6.9.3.	Preparación del derivado de la fracción de fitoesteroles.	79
6.9.4.	Análisis cromatográfico del derivado obtenido de la fracción de fitoesteroles. .	80
6.10	DETERMINACIÓN DE VITAMINA E POR CLAE.....	82
6.11	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella).....	82
6.11.1	Preparación de la solución de DPPH.....	82
6.11.2	Preparación de la solución de α -tocoferol (control positivo).....	83
6.11.3	Preparación de la muestra.....	83
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
7.1	CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella).....	85
7.2	EXTRACCIÓN DEL ACEITE.....	85
7.3	CARACTERIZACION FISICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella).	88
7.3.1	Densidad.....	89
7.3.2	Índice de refracción.....	89
7.4	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella).	90
7.4.1	Índice de acidez.....	91
7.4.2	Índice de peróxidos.....	92
7.4.3	Índice de saponificación.....	93
7.4.4	Índice de yodo.....	94
7.5	ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella) POR CG-EM.....	94

7.6	ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella) POR CG-EM.	103
7.6.1	Descripción de la materia insaponificable.	103
7.6.2	Cuantificación de la materia insaponificable.	103
7.6.3	Análisis cualitativo de la fracción de fitoesteroles obtenida por separación en fase sólida.....	104
7.6.3.1.	Sistema 1. (Hexano: Acetato de Etilo 9:1)	104
7.6.3.2.	Sistema 2. (Hexano: Diclorometano 6:4)	105
7.6.4	Análisis del derivado obtenido de la fracción de fitoesteroles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).	105
7.7	ANÁLISIS DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES (Vitamina E) DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella) POR CLAE.....	117
7.8	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella)	119
7.8.1	Determinación de la actividad antioxidante del control positivo Vitamina E (α -tocoferol).	119
7.8.2	Determinación de la actividad antioxidante del aceite de <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella).....	121
7.9	SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD	124
7.9.1	SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE	124
7.10	Comparación de las propiedades físicas y químicas del aceite de las semillas de <i>Vitis labrusca</i> L. (uva Isabella) con las propiedades del aceite de semillas de <i>Vitis vinífera</i> L.	132
	CONCLUSIONES.....	137
	RECOMENDACIONES.....	139
	BIBLIOGRAFIA.....	140
	ANEXOS.....	164

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1: Composición en ácidos grasos de aceite vegetales comunes.
- ANEXO 2: Sustituyentes del anillo aromático en la vitamina E. (Tomado de: IUPAC-IUB, 1982)
- ANEXO 3: Preparación del derivado metilado de los ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- ANEXO 4: Certificado de análisis del estándar comercial de Metilesteres.
- ANEXO 5: Espectro de masas de los ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- ANEXO 6: Control por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida, empleando el sistema de elución 1.
- ANEXO 7: Control por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida, empleando el sistema de elución 2.
- ANEXO 8: Espectros de la base de datos del equipo WILEY ACCESS PAC 7ED.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1: Estudios a nivel mundial de la composición química del aceite de las semillas de diferentes variedades de uva.
- Tabla 2: Estudios a nivel mundial de la uva Isabella (*Vitis labrusca L.*)
- Tabla 3: Estudios a nivel nacional de *vitis Labrusca L.* (uva Isabella).
- Tabla 4: Condiciones agro-climatológicas para cultivo de *vitis labrusca L.*
- Tabla 5: Plagas que atacan los cultivos de *vitis labrusca L.*
- Tabla 6: Enfermedades que atacan los cultivos de *vitis labrusca L.*
- Tabla 7: Condiciones de análisis de Metil esteres del aceite de las semilla de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- Tabla 8: Condiciones de análisis de fitoesteroles del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- Tabla 9: Contenido de aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- Tabla 10: Datos experimentales de densidad e índice de refracción para el aceite de las semillas *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).
- Tabla 11: Caracterización química del aceite fresco de de las semillas *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).
- Tabla 12: Composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (Uva Isabella).
- Tabla 13: Porcentaje de abundancia y principales fragmentos de los ácidos grasos encontrados en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- Tabla 14: Cuantificación de la materia insaponificable.
- Tabla 15: Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción de fitoesteroles presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

- Tabla 16: Principales fragmentos de los fitoesteroles presentes en el aceite de semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).
- Tabla 17: Resultados de cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles para el aceite de las semillas *Vitis labrusca* L. (uva Isabella)
- Tabla 18: Actividad antioxidante de la Vitamina E frente al DPPH.
- Tabla 19: Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca* L. (uva Isabella) frente al DPPH.
- Tabla 20: Datos obtenidos del índice de acidez para el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) en el tiempo.
- Tabla 21: Datos obtenidos del índice de peróxidos para el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) en el tiempo.
- Tabla 22: Cuadro comparativo de las propiedades físicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) y las propiedades reportadas por otros autores para el aceite de semillas de *Vitis vinifera* L.
- Tabla 23: Cuadro comparativo de las propiedades Químicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) y las propiedades reportadas por otros autores para el aceite de semillas de *Vitis vinifera* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Racimo de uva Isabella
- Figura 2. Racimo de uva Concord
- Figura 3. (Planta de uva Isabella)
- Figura 4. Hoja de *Vitis L.*
- Figura 5. Frutos de *Vitis Labrusca L. (uva Isabella)*
- Figura 6. Partes del fruto de uva
- Figura 7. Estructura química de los triglicéridos
- Figura 8. Estructura química de los triglicéridos
- Figura 9. Reacción de saponificación
- Figura 10. Hidrólisis acida de una grasa o aceite
- Figura 11. Reacción de hidrogenación
- Figura 12. Esterificación de ácidos grasos con catálisis ácida.
- Figura 13. Trans-Esterificación de lípidos por catálisis ácida.
- Figura 14. Estructura química de los Vitameros del Tocoferol y los Vitameros del Tocotrienol
- Figura 15. Estructura química del tocoferol
- Figura 16. Estructura química del Tocotrienol.
- Figura 17. Estructura química de los principales Fitoestanoles.
- Figura 18. Estructura química de los principales Fitoesteroles.
- Figura 19. Esquema de extracción Soxhlet
- Figura 20. Reacción de saponificación
- Figura 21. Reacción correspondiente a la determinación del índice de yodo de una grasa o aceite por el método de Hanus.
- Figura 22. Reducción del radical estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH.)
- Figura 23. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.
- Figura 24. Representación esquemática de un aparato de cromatografía líquida de alta eficiencia.

- Figura 25. Método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) para la evaluación de la actividad antioxidante (110,128)
- Figura 26. Aceite de semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).
- Figura 28. Perfil Cromatográfico de los metilesteres de Ácidos Grasos presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- Figura 29. Reordenamiento de McLafferty resultando el ion $m/z = 74$.
- Figura 30. Obtención del fragmento $m/z = 87$ por escisión
- Figura 31. Materia Insaponificable
- Figura 32. Cromatograma del análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción de fitoesteroles presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- Figura 33. Espectro de masas del Beta-sitosterol
- Figura 34. Espectro de masas del Estigmasterol
- Figura 35. Espectro de masas del Campesterol
- Figura 36. Espectro de masas del Campestanol
- Figura 37. Actividad antioxidante de la vitamina E frente al DPPH
- Figura 38. Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) frente al DPPH.
- Figura 39. Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* y Vitamina E por el parámetro del $\%IC_{50}$
- Figura 40. Porcentaje de inhibición del DPPH de la muestra de aceite de las semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) a la concentración según IC_{50} de la Vitamina E (932,2 ppm)
- Figura 41. Seguimiento del índice de acidez del aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).
- Figura 42. Seguimiento del índice de peróxidos del aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

RESUMEN

Se llevo a cabo la caracterización física y química del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), obtenidas como desecho del procesamiento de la pulpa para jugo, siguiendo los procedimientos descritos en las normas ICONTEC para grasas y aceites. Las semillas fueron lavadas y secadas (durante 2 días a 40°C), luego fueron molidas en presencia de nitrógeno líquido; la extracción se realizó con n-hexano. Los parámetros físicos evaluados fueron: densidad (0.9246g/cm³) e índice de refracción (1.4753 a 23°C). Los químicos: índice de acidez (2,1870 % de ácido oleico), índice de peróxidos (0 meq de O₂/Kg), índice de saponificación (175.1161) meq KOH/g) e índice de yodo (136.6853 cg de I₂/g). Según el análisis por Cromatografía de gases-espectrometría de masas, los ácidos grasos mayoritarios son el ácido linoleico conjugado (53,843%), el oleico (E) (24,671 %) y el palmítico (13,922 %). De acuerdo con el análisis de vitamina E por CLAE, en el aceite están presentes los siguientes isómeros de tocoferoles y tocotrienoles: δ -Tocotrienol, $\beta+\gamma$ -Tocotrienol, α -Tocotrienol, δ -Tocoferol, $\beta+\gamma$ -Tocoferol, α -Tocoferol. En la materia insaponificable, se identificaron los siguientes fitoesteroles: Campesterol (9,691%), Estigmasterol (10,161%), Campestanol (7,276%), siendo el Beta-sitosterol el mayoritario (72,870%). La actividad antioxidante (capacidad captadora de radicales libres) se determinó empleando el parámetro del IC₅₀ (42,62% de inhibición). Se realizó el seguimiento de estabilidad del aceite de las semillas de uva Isabella mediante el estudio del índice de acidez y peróxidos durante dos meses consecutivos, se observó que se puede obtener un aceite estable hasta la cuarta semana después de su extracción, pasado este tiempo, el aceite sufre un acelerado proceso de degradación oxidativa.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), conocida como de tipo vinífera tinta que pertenece a la familia de las *Vitáceas*, se cultiva en la actualidad en Colombia en las Regiones del Valle del Cauca y Villa del Rosario (Norte de Santander).

La uva Isabella es utilizada principalmente en el eje cafetero para el procesamiento de pulpa para jugo, en cuya actividad se concentra la mayor cantidad de semillas de uva que son eliminadas como residuo sin uso potencial, de acuerdo a esto se plantea la siguiente pregunta objeto de estudio, ¿Es posible aprovechar las semillas del fruto, principal subproducto del procesamiento de la uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), extrayendo el aceite presente y haciendo su respectiva caracterización con el fin de evaluar su uso potencial en la industria cosmética?

2. JUSTIFICACION

La uva Isabella (*Vitis labrusca L.*) es una uva híbrida que se originó en el sur de Estados Unidos (Carolina del Sur). Los principales productores y exportadores de uva Isabella a nivel mundial son Brasil, Colombia, Uruguay, Perú, Argentina y Chile (1).

En cuanto a su uso, la uva (*Vitis vinífera L.*) se emplea fundamentalmente en cocina y en cosmética. Una vía alternativa de aprovechamiento industrial de la uva (*Vitis vinífera L.*) consiste en la extracción del aceite contenido en sus semillas (2,3).

Estudios anteriores han demostrado que el aceite de semilla de *Vitis vinífera L.* se destaca por su bajo contenido en ácidos grasos saturados y un alto contenido en ácido linoleico, además tiene un contenido significativo de proantocianidinas, tocoferoles y tocotrienoles, esteroides y compuestos fenólicos como los taninos (4); además se ha demostrado que dichos compuestos también se encuentran en el aceite de semilla de *Vitis labrusca L.*(5, 6).

Desde el punto de vista nutricional y terapéutico, se reconoce que el consumo de aceite de semillas de *Vitis vinífera L.* aumenta la defensa antioxidante del organismo, evitando el daño oxidativo. También reduce el riesgo de desarrollar problemas cardíacos y circulatorios (7).

Desde el punto de vista cosmético, el aceite de semilla de *Vitis vinífera L.* tiene alta afinidad con la piel, lo que permite la absorción eficiente del aceite al torrente sanguíneo, esta absorción evita la desagradable sensación grasosa que dejan otros aceites corporales, por lo que se emplea en la elaboración de cremas, pomadas, labiales y aceites para masajes (2,3).

En Colombia, la mayor cantidad de viñedos se encuentran principalmente en el Valle del Cauca y Villa del Rosario (Norte de Santander) donde empezaron a

cultivarse alrededor de 1930. Existen unas 1300 hectáreas cultivadas de *Vitis labrusca L.* que producen 2,2 cosechas al año. El desarrollo de la viticultura en el país siempre ha estado ligado a la producción de uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), es así como en el Valle del Cauca se desarrollaron grandes extensiones de tierra cultivadas con vides destinadas a la producción de *Vitis labrusca L.* utilizada para consumo fresco y *Vitis vinifera L.* utilizada para la elaboración de vino (8).

En Colombia, la uva Isabella (*Vitis labrusca L.*) se consume comúnmente como fruta fresca y en la elaboración de jaleas y vinos, de igual manera es utilizada para la obtención de pulpa para jugos, proceso del cual se obtienen las semillas del fruto como residuo (8).

Debido a que en Colombia no se le ha dado un uso potencial a las semillas de *Vitis labrusca L.*, y teniendo en cuenta que el aceite de semilla de *Vitis vinifera L.* es usado como insumo cosmético en otros países, se propone en este proyecto la caracterización físico-química del aceite de semilla de *Vitis labrusca L.*, que contribuya a ampliar la información sobre este fruto con el fin de aprovechar un recurso natural disponible en la región, del cual las semillas son el subproducto de las empresas despulpadoras del eje cafetero y que podría llegar a servir para propósitos industriales o cosméticos generando un nuevo uso de la uva Isabella en el país.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Obtener y caracterizar el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* y evaluar su actividad antioxidante con el fin de ampliar la información sobre este recurso natural y contribuir al aprovechamiento integral del fruto en la región cafetera.

ESPECIFICOS

- Extraer el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.*
- Realizar la caracterización física (densidad e índice de refracción) y la caracterización química (índice de yodo, índice de saponificación, índice de acidez e índice de peróxidos) del aceite de las semillas de la uva Isabella (*Vitis labrusca L.*) según normas ICONTEC.
- Determinar la composición química de los ácidos grasos en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* por CG-EM.
- Determinar el contenido de vitamina E en el aceite obtenido de las semillas de *Vitis labrusca L.* por CLAE.
- Evaluar la actividad antioxidante del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* por DPPH.
- Estudiar los principales componentes de la materia insaponificable por CG-EM.
- Comparar las propiedades físicas y químicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) con las propiedades reportadas por otros autores para el aceite de semillas de *Vitis vinífera L.* con el fin de proponer alternativas para su aprovechamiento.

4. MARCO DE ANTECEDENTES

Los estudios que se han realizado a nivel mundial sobre *Vitis labrusca L.* se han enfocado en la composición química del aceite de las semillas y la capacidad antioxidante; también se han encontrado estudios donde se hace énfasis en distintas variedades existentes de uva, principalmente de la especie *Vitis vinífera L.* En la tabla 1, se mencionan algunos de los estudios realizados al aceite de las semillas de diferentes variedades de uva, tanto *Vitis labrusca L.* como *Vitis vinífera L.*

En la revisión bibliográfica, hasta ahora, no se encontraron reportes a nivel Nacional sobre el estudio del aceite de las semillas de *Vitis Labrusca L.* (Uva Isabella),

Tabla 1. Estudios a nivel mundial de la composición química del aceite de las semillas de diferentes variedades de uva.

Estudios sobre la composición química de los aceites de diferentes variedades de uva.	<p>“Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent”(9).</p> <p>“Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (<i>Vitis vinifera L.</i> and <i>Vitis labrusca L.</i>) widely produced in Brazil” (10).</p> <p>“Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours” (11).</p> <p>“Phenolic compounds and fatty acids in different parts of <i>Vitis labrusca</i> and <i>V. vinifera</i> grapes” (12).</p>
---	--

“Caracterización físico-química del aceite de semillas de uva extraído con solvente en frío” (13).

“Characterization of grape seed and pomace oil extracts” (14).

“Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds” (15).

“Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity” (16).

“Residues of grape (*Vitis vinifera L.*) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants” (17).

“Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinífera L.*) con énfasis en los componentes minoritarios”(18)

“Caracterización del aceite de semilla procedente de distintas variedades de uva II. Composición en ácidos grasos y esteroides” (2).

“Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pepa de uva, *Vitis vinífera L.*, por prensado en frío”(19).

“Caracterización del aceite obtenido de las semillas de uva recogida durante el desarrollo de la baya”(20).

"Caracterización del aceite de semilla de uva de diferentes variedades de uva (*Vitis vinífera* L.)" (21).

"Influencia de la Temperatura y Tamaño de Partícula en el Proceso de Extracción de Aceite de Semilla de uva (*Vitis vinífera*L.)" (22).

"Extracción de aceite de la semilla de uva variedad criolla negra y su caracterización" (3).

"Modelo cinético de la calidad del aceite de pepita de uva" (23).

"Caracterización físico-química del fruto de la uva (*Vitisvinifera*L.) 'PinotNoir' durante su crecimiento y desarrollo en condiciones de trópico alto" (24).

"Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitisvinifera* and *Vitislabrusca*) pomace from Brazilian winemaking" (5).

"Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes" (25).

"Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red Grape products (*Vitislabrusca*) from conventional and organic crops" (7).

"Studies on the lipid constituents of grape seeds recovered from pomace resulting from white grape processing" (26).

"Preliminary study of the influence of CO₂ extraction conditions on the ester, aldehyde, ketone and hydrocarbon content of grape bagasses from jam production" (27).

"Effects of grape (*Vitis labrusca L.*) peel and seed extracts on Phenolics, antioxidants and anthocyanins in grape juice" (6).

"Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitisvinifera L.*) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity" (28).

"Valorization of grape (*Vitisvinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content" (29).

"Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid" (30).

"Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin" (4).

"Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils" (31).

"Separation of grape and wine proanthocyanidins according to Their degree of polymerization" (32).

"Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane" (33).

"Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines" (34).

	"Tocopherol content in fifteen grape varieties obtained using a rapid HPLC method" (35).
--	--

4.1 Composición química del aceite de las semillas de uva.

Los extractos y aceites de uva son ricos en polifenoles, cuya estructura química les otorga propiedades antioxidantes. Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, benceno con uno o más grupos hidroxilos y derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los flavonoides, son los polifenoles más distribuidos en las plantas, son sustancias de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilperanos (36).

Las semillas de uva corresponden a un 6% del peso total de la uva y están compuestas principalmente de agua (25-45%), compuestos glucídicos (34-36%), taninos (4-10%), compuestos nitrogenados (4-6,5%), minerales (2-4%), y lípidos (13-20%) (37)

El 63% de los fenoles totales de las vides de variedades tintas se encuentra en las semillas, el 34% en las pieles y el 3% en el jugo (38).

Dentro de los compuestos activos del aceite de la semilla de uva se pueden encontrar abundantes polímeros derivados de catequina y epicatequina, denominados Procianidinas. Estos compuestos tienen un gran valor farmacéutico, por su actividad antioxidante (39), lo cual le concede una utilización integral a este residuo vitivinícola. Se ha descrito que la pared celular de la semilla de uva contiene aproximadamente 90% en peso de polisacáridos y menos del 10% de

proteínas. Celulosa y ácido poligalacturónico son los mayores constituyentes de la pared, cada uno responsable del 30- 40% del total de los polisacáridos que la componen (40).

Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales, siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas. Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados (41).

Dentro de los polifenoles presentes en la uva, los taninos condensados son antioxidantes, atrapadores de radicales libres e inhibidores de la peroxidación lipídica(39,42).

La procianidina, perteneciente a la clasificación del tanino condensado, también puede ser utilizada como principio activo en productos cosméticos que protegen del daño inducido por radicales libres. Las procianidinas de las semillas de uva no sólo inactivan los radicales libres, sino que estabilizan la vitamina C y aumentan otra capacidad antioxidante, regenerando las vitaminas E y C. Así, aumentan la disponibilidad de vitamina C para otras reacciones, como la síntesis del colágeno.

La procianidina de pepita de uva, es un captador de especies de oxígeno reactivo (EOR) generadas por la radiación ultravioleta (UV), causante del daño celular y responsable del fotoenvejecimiento. Las EOR contribuyen al fotoenvejecimiento (en la dermis) y otocarcinogénesis (generalmente en la epidermis), a través de dos procesos: modificación de la expresión genética y oxidación de los constituyentes genéticos (36).

Las semillas de uva contienen otros antioxidantes además de los polifenoles, como los esteroides y los tocoferoles que potencializan la capacidad antioxidante, y su consumo puede ayudar a contrarrestar la acción de los radicales libres.

En algunos países europeos ya se comercializa este tipo de aceite con propiedades similares a los del aceite de oliva, (25).

El aceite de semilla de uva se destaca por su bajo contenido en ácidos grasos saturados, alto contenido en ácido linoleico (importante en la síntesis de las prostaglandinas, sustancias necesarias para reducir la agregación de las plaquetas y cualquier tipo de inflamación) pero existen problemas de estabilidad ya que el linoato oxidado origina una mezcla compleja de compuestos que contienen oxígeno, estos compuestos oxigenados se descomponen con facilidad y generan aldehídos volátiles y otros compuestos que contribuyen al deterioro del olor y sabor en función del tiempo, (26). También posee alto contenido en vitamina E (previene frente a la arterioesclerosis) y niveles bajísimos de colesterol, por lo que se reconoce que su consumo reduce el riesgo de desarrollar problemas cardíacos y circulatorios (22)

4.2 Estudios en general sobre *Vitis labrusca* L.

Dada su importancia económica y cultural, se han realizado estudios a nivel mundial con uva Isabella (*Vitis labrusca* L.) enfocándose en investigaciones concernientes a la producción del vino, problemas básicos en el manejo de los viñedos y su adaptación a los diferentes climas, algunos de estos estudios también hacen énfasis en distintas variedades de uva principalmente de la variedad *Vitis vinífera* L. En la tabla 2 se mencionan algunos de ellos.

Tabla 2. Estudios a nivel mundial de la uva Isabella (*Vitis labrusca* L.)

<p>Estudios sobre vinificación</p>	<p>“Identificación de levaduras aisladas en las diferentes etapas de fermentación de <i>vitis labrusca</i> variedad Isabella” (43).</p> <p>“Vinificación de <i>Vitis Labrusca</i> variedad Isabella. El vino de la costa de Berisso” (44).</p> <p>“El carbonato de calcio en la des acidificación del vino de uva Isabella” (45).</p> <p>“El manganeso y el cobre del vino de las uvas Isabella y Concord” (46).</p> <p>“Respuesta del vino a las variaciones en la poda de estación seca. Efectos sobre la calidad de la fruta del cultivo de uva Isabella” (47).</p> <p>“El ácido giberélico en el desarrollo de las bayas de uva Isabella” (48).</p>
<p>Estudios sobre el manejo de los viñedos</p>	<p>“Evaluación del crecimiento de raíces y la brotación de yemas en estacas de uva (<i>Vitis vinífera</i> y <i>Vitis labrusca</i>) con el uso de hormonas” (49).</p> <p>“Análisis de <i>Vitis labrusca</i> cv. Isabella empleada en la elaboración del Vino de la Costa mediante marcadores ISSR” (50).</p>

	<p>“El comportamiento de cultivar Isabel (<i>Vitis labrusca</i>) en dos sistemas de formación (espaldera y enrejado)” (51).</p>
--	---

Los estudios de la uva Isabella (*vitis Labrusca L.*) a nivel nacional se han basado en el manejo de plagas respecto al cultivo, poda y fertilización, vinificación, buena producción y comercialización, en la tabla 3 se mencionan algunas de ellos.

Tabla 3. Estudios a nivel nacional de *vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

<p>Estudios basados en el manejo de plagas, cultivo, poda y fertilización.</p>	<p>“Sondeo de agentes causales de enfermedades de etiología viral en uva (<i>Vitis vinífera</i> y <i>Vitis labrusca L.</i>) en el departamento del Valle del Cauca” (52).</p> <p>“Comparación físico-química de la uva Isabella cultivada en villa del rosario (N.S) y en el valle del cauca” (8).</p> <p>“Problemas Principales de la Vid (uva Isabella) en el Valle del Cauca. ICA y CENIUVA, Cali, Colombia” (53).</p> <p>“Manejo Técnico del cultivo de la Vid (uva Isabella) en el Valle del Cauca. CENIUVA, Cali, Colombia” (54).</p> <p>“Manejo integrado del mildiu, <i>plasmopara Vitícola</i>, de la vid cv “Isabella” en Ginebra, Valle. Colombia” (55).</p>
--	---

<p>Estudios vinificación</p>	<p>sobre</p> <p>“Paquete tecnológico para el manejo del cultivo de la uva Isabella. Ceniuva” (56).</p> <p>“Efecto de la aplicación fraccionada de calcio en la maduración, producción, y calidad de la vid <i>vitis labrusca</i> c.v.Isabella, en el municipio de la unión, Valle del cauca” (57).</p> <p>“Comportamiento de algunos componentes no volátiles durante la fermentación alcohólica de la uva Isabella” (58).</p> <p>“Contenido fenólico e identificación de levaduras de importancia vínica de la uva Isabella (<i>vitis labrusca</i>) procedente de villa del rosario (N.S)” (59).</p> <p>“Estudio de factibilidad para el montaje de una planta procesadora de jugo y pulpa a partir de uva Isabella (<i>vitis labrusca</i>) en el municipio de ginebra, Valle del cauca” (60).</p>
<p>Investigaciones sobre la producción y comercialización de la uva</p>	<p>“Exploración de productos a partir de <i>Vitis labrusca</i> en Colombia y en los principales países productores” (61).</p> <p>“Consortio Uva Isabella: Por la reactivación económica y social del Sector Agrícola del Valle del Cauca” (62).</p>

5. MARCO TEORICO

5.1 Generalidades de la *vitis labrusca* L.

El nombre genérico, *vitis*, deriva de la raíz indogermánica *ueut-*, que significa rama flexible, sarmiento, y ésta, a su vez, procede de la raíz *ueit-* que quiere decir retorcer, enroscarse, enredarse.

La vid pertenece a la familia de las Vitáceas, que comprenden entre 15 a 16 géneros, entre los que destaca el género *Vitis*, originario de las zonas templadas del Hemisferio Norte. (63) El género *Vitis*, está dividido en dos secciones o subgéneros: Euvitis y Muscadinia. En el subgénero Euvitis se distinguen tres grupos: las procedentes de América del Norte, que son resistentes a la filoxera y se utilizan fundamentalmente para la producción de las variedades (*Vitis. riparia*, *Vitis. rupestris*, *Vitis. berlandieri*, *Vitis .cordifolia*, *Vitis. labrusca*, *Vitis. candicans* y *Vitis. cinerea*), y las cultivadas en Europa y en Asia occidental, donde una única especie presenta grandes cualidades para la producción de vino es la *V. vinífera* sensible a la filoxera ya las enfermedades criptogámicas. El número de variedades de *Vitis vinífera* registradas en el mundo y surgidas por evolución natural, es al menos de 5.000 (64).

5.1.1 Origen de *vitis labrusca* L. (uva Isabella)

La uva Isabella es una uva híbrida que se originó en el sur de Estados Unidos (Carolina del Sur) antes de 1800, derivada de la cepa nativa *Vitis labrusca* y una variedad vinífera desconocida. Probablemente fue creada por polinización aleatoria como resultado de los intentos realizados en el siglo XVIII para implantar vides Europeas en los EE.UU (8).

En la década de 1850, despertó el interés de los viticultores europeos debido a su resistencia a la enfermedad del oidio (65). El cultivo de la uva Isabella es de fácil expansión, por su buena adaptación a condiciones edafoclimáticas variables, elevada productividad, longevidad y relativa rusticidad (66,67).

Cabe destacar que a partir de finales del siglo XIX, la *Vitis labrusca* fue la solución más usada para la erradicación de la plaga de la filoxera de las plantaciones de vides de vinífera, debido a que sus raíces son tolerantes a este insecto. La solución consistía en hacer porta injertos en base a labrusca e injertar *Vitis vinífera*, y de esta forma conseguir que la planta fuera prácticamente inmune a la plaga. De todos los cultivares de labrusca, la uva Isabella es la más difundida fuera de Estados Unidos. En América Latina, además de Argentina, la uva Isabella es cultivada en Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina), Colombia (Valle del Cauca), Uruguay y Perú (Valle de Cañete). En este último país se le utiliza para elaborar el popular pero mal llamado vino Borgoña (8,68).

5.1.2 Clasificación Botánica

Reino: Plantae
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Rhamnales
Familia: Vitaceas
Género: Vitis L.
Especie: Vitis labrusca

La *Vitis labrusca* pertenece a la familia de las vitáceas, Las plantas de esta familia son lianas y arbustos de tallo herbáceo o sarmientoso; poseen sarcillos opuestos a las hojas. Es la especie americana que más se asemeja a la *Vitis vinífera*, las raíces de esta especie son sensibles a la filoxera radicular y al calcáreo activo, sus sarmientos se enraízan muy bien y se injertan con facilidad,

es muy resistente al oídium y al mildiou. Algunas de las variedades de *Vitis labrusca* son Isabella (figura 1) y Concord (figura 2), así como algunas de sus descendientes son Noah, Clinton y Othello. Estas tiene gran sensibilidad a Black rot y resistencia a Pourriture gris, esto le es ventajoso si se cultiva en climas tropicales (69).



Figura 1. Racimo de uva Isabella



Figura 2. Racimo de uva Concord

5.1.3 MORFOLOGIA

La *vitis labrusca* es una planta leñosa tiene por lo general una vida muy larga, tiene un largo periodo juvenil (3-5 años), durante el cual no es capaz de producir flores; en general, las yemas que se forman durante un año no se abren hasta el año siguiente. Tiene un aparato radicular que se hace imponente con los años, pero se desarrolla y explora el terreno con menos minuciosidad que el de una hierba (Figura 3) (70).



Figura 3. (Planta de uva Isabella)

Una planta puede producir alrededor de 5 kilogramos por cosecha cuando el cultivo no está en plena producción. Después de los 5 años comienza producción en pleno. Del momento de la poda al tiempo de cosecha transcurren cuatro meses, serían seis meses con el descanso que es un tiempo que se le da a la planta para que se fortalezca (70).

5.1.3.1 La hoja: Con sus múltiples funciones es el órgano más importante de la vid. Las hojas (Ver figura 4) son las encargadas de transformar la sabia bruta en elaborada, son las ejecutoras de las funciones vitales de la planta: transpiración, respiración y fotosíntesis. Es en ellas dónde a partir del oxígeno y el agua, se forman las moléculas de los ácidos azúcares. Que se van a acumular en el grano de la uva condicionando su sabor.



Figura 4. Hoja de *Vitis L.*

5.1.3.2 Los troncos: También contribuyen al dulzor de la uva, ya que actúan como acumuladores de azúcares. Por esta razón, las vides viejas son capaces de proporcionar un fruto más regular y una calidad más constante. El raspón, o parte leñosa que forma el armazón del racimo lógicamente no es la parte fundamental del fruto, tiene su importancia por cuanto es capaz de aportar ácidos y sustancias fenólicas (taninos) dependiendo de su participación o no, en los procesos de fermentación.

5.1.3.3 El fruto: Surge muy verde (Ver figura 5), pues está saturado de clorofila, y a partir de aquí toda la planta empieza a ejercer servidumbre a favor del fruto que poco a poco irá creciendo.



Figura 5. Frutos de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella)

El grano de uva Isabella a su vez puede ser dividido en 4 partes cada una de ellas con un aporte específico de características y componentes: la piel, la pulpa, las pepitas y el pincel, ver figura 6.

1. **La piel(Epicarpio u hollejo):** Capa exterior del grano o baya de uva. contiene la mayor parte de los componentes colorantes y aromáticos de los vinos.
2. **La pulpa (Mesocarpio):** Formado por grandes células ricas en mosto. se encuentran los principales componentes del mosto (agua y azúcares) que después, mediante la fermentación se transformarán en vino.
3. **Las pepitas o semillas:** El endocarpio del fruto contiene las semillas, originadas por la fecundación de los óvulos, como máximo hay 4, se encuentran dentro de la pulpa y difieren según las variedades, llegando incluso a encontrarse uvas que nos las contienen. Poseen una capa muy dura y proporciona taninos al vino.

4. **Pincel**, es el canal por el que se nutre la baya, formado por la prolongación de los vasos conductores del pedicelo (71).

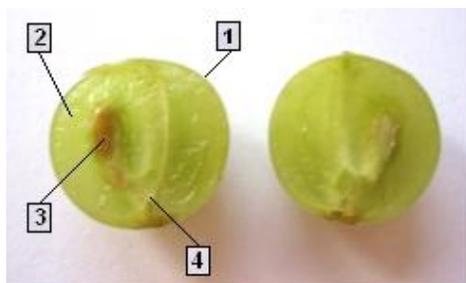


Figura 6. Partes del fruto de uva

5.1.4 CONDICIONES AGROCLIMATOLOGICAS

La uva Isabella progresa en zonas tropicales y templadas, donde reúna las características que se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones agro-climatológicas para cultivo de *vitis labrusca*.

Altitud	El cultivo crece, se desarrolla y produce bien, desde los 900-1600 m.s.n.m, aunque dependiendo de otras condiciones climáticas puede adaptarse también desde el nivel del mar hasta los 2100 m.s.n.m.
Temperatura	Se adapta a regiones de muy variada temperatura, 24°C de temperatura promedio y una amplia variación de temperatura entre el día y la noche.

Precipitación	Se recomienda que este factor sea menos de 800mm por año pero se pueden presentar entre 1000 y 1200 mm año, lo que ocasiona problemas fungosos al cultivo.
Luminosidad	Para la acumulación de azúcares se debe de contar con una buena luminosidad, entre 1833 a 1891 horas luz/año, de brillo solar.
Humedad Relativa	La humedad relativa debe en general ser muy baja; puede oscilar entre el 70%-80%.
Vientos	Los vientos deben presentar promedio de velocidades de 1.5 m por segundo.
Suelo	Los suelos deben poseer: textura media, francos con buena estructura o sueltos, deben ser profundos, el nivel freático debe permanecer como mínimo a 1.5 m de la superficie durante todo el año y el suelo debe poseer una buena permeabilidad.

Fuente: Manejo postcosecha y comercialización de la uva (valle del cauca) (72).

5.1.4.2 Plagas y enfermedades que atacan los cultivos de uva en Colombia

En las tablas 5 y 6, se enuncian algunas plagas y enfermedades que atacan los cultivos de uva. Las enfermedades con más importancia son causadas por hongos y Virus. Las principales enfermedades causadas por hongos son: mildiu, cidium, Botrytis, Roya y phomopsis, las cuales son endémicas, prevalentes y están bien establecidas. Además, las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de epidemias causadas por estas enfermedades. Las enfermedades ocasionadas

por virus, que causan deformaciones y reducen apreciablemente el vigor y la longevidad de los viñedos son el Enrollamiento de la hoja y Flavesencia dorada. Debido a situaciones en el mal manejo del viñedo favorecen el ataque de algunas plagas (Minador, Pulgón, Arañita, Broca de Tallo, Gusano del Fruto y Escama del Tallo (57).

Tabla5. Plagasque atacan los cultivos de *vitis labrusca*.

	Nombre científico	Nombre común
PLAGAS	Minador Pulgón Arañita Broca de Tallo Gusano del Fruto Escama del Tallo	<i>Phyllocnistis sp.</i> <i>Aphis vitis.</i> <i>Panonychusulmi.</i> <i>Amphiceruscornutus.</i> <i>Pyralisvinnata.</i> <i>Aspidotus uvae.</i>

Tabla 6. Enfermedades que atacan los cultivos de *vitis labrusca*.

Enfermedades	Nombre científico
Por Hongos	Mildiou(hongo <i>Plasmoparaviticola</i>) Cidium (hongo <i>Uncinula necátor</i>) Botrytis (hongo <i>Botrytis cinerea</i>) Roya (hongo <i>Phakopsora uva</i>) Phomopsis (hongo <i>Phomopsis viticola</i>)
Por Virus	Enrollamiento de la Hoja Flavesencia Dorada

5.1.5 PRODUCCION DE UVA EN EL MUNDO

Los principales productores de uva a nivel mundial son Italia, Francia, y España por lo se puede decir que estos tres países concentran la tercera parte de la producción mundial, esto a pesar de no contar con un óptimo calendario fenológico, pues sólo producen mayoritariamente uva en la segunda parte del año (junio – noviembre) (1).

Parte de la producción de uva de mesa del hemisferio sur se exporta a países de América Latina y a Nueva Zelanda, la gran mayoría se destina a los con grandes centros consumidores del hemisferio norte. Estados Unidos y la Unión Europea (UE) son los mayores compradores, destacándose los países que tradicionalmente han tenido un gran consumo de uva, como Francia, Austria y Suiza, y los importadores netos del producto, como Alemania, Holanda y el Reino Unido (1).

Principales exportadores:

A excepción de Chile, los principales países exportadores de uva de mesa se encuentran en el **hemisferio norte**.

Italia: Es el mayor exportador de uva de mesa. Los principales destinos de su producción son Alemania y Francia.

Estados Unidos: Es el segundo exportador del hemisferio norte. Canadá, Asia y América Latina son los principales destinos para la uva. El 90% de la producción está concentrada en California. Otra área productora importante se localiza en el estado de Arizona.

Grecia: Es el segundo exportador de Europa y concentra sus ventas en países de ese continente.

España: Es otro gran exportador de Europa. Sus principales mercados son Francia, Alemania, Inglaterra y Portugal.

México: El principal mercado para la uva mexicana es Estados Unidos. A partir de la difusión de tecnología y la asistencia técnica de empresas californianas, en México se registra una notable mejoría en la calidad de la producción (73).

Principales países productores y exportadores del hemisferio sur:

Brasil: Es un gran productor de frutas y hortalizas, en particular, de origen tropical y subtropical. En el país se distinguen tres tipos de producción y destinos para la uva: vinificación, mesa común y mesa fina. La superficie total cultivada con vid es de aproximadamente 60000 ha. La uva que se destina a industria (vinos y jugos) se cultiva principalmente en la región sur, en los estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina y Sur del Paraná. Predomina la plantación de variedades americanas (*V. labrusca* y *V. aestivalis*) que se cosechan entre los meses de febrero y abril (1).

Chile: La fruta de mayor importancia en el mercado exportador es la uva de mesa. La producción de uva de mesa se encuentra más dispersa que la de otros frutales. Las 40000 ha plantadas con esta especie colocan a Chile entre los principales países productores del hemisferio sur. Chile está libre de varias plagas y enfermedades que perjudican el cultivo de uva de mesa, ya que se ve favorecido por barreras naturales y escasas lluvias de verano que lo protegen de enfermedades fúngicas (73).

Sudáfrica: La superficie cultivada de uva de mesa supera actualmente las 21000 ha. El área de HexRiver Valley es la región más importante para la producción de uva de mesa. Es una zona de cultivos intensivos y, como resultado de condiciones climáticas especiales, las uvas son cosechadas dos o tres semanas antes que en otras regiones del país. Predomina el cultivo de uvas negras, las unidades de

producción son pequeñas y, generalmente, cada viticultor empaca sus propias uvas para enviarlas al frigorífico cooperativo regional. El principal mercado de las uvas sudafricanas es la Unión Europea, destacándose Inglaterra (1).

5.1.6 USOS DE LA UVA EN EL MUNDO

A nivel mundial el 80% de uva producida es utilizada en la elaboración de vinos (74). Por su alto contenido nutricional también es orientada para su consumo en fresco y en la producción de zumos, mermeladas, colorantes naturales y pasas (75). Las cáscaras y semillas son un desecho aprovechable de la uva que se obtiene del primer paso del proceso de obtención del vino. Entre sus componentes, existen compuestos antioxidantes que pueden servir, utilizando a estas cáscaras y semillas desecadas y trituradas (cas-sem) como materia prima base para el preparado de alimentos semi-procesados, como mermeladas, harina, fibra dietaria, entre otros. Su semilla tiene un alto contenido en aceite el cual es utilizado en alimentación y en la industria de la cosmética.

Los componentes antioxidantes de la uva y presentes en el vino, así como en otras frutas, verduras y alimentos vegetales, hacen tener a la mano alimentos que favorecen el cuidado y preservación de la salud (76).

5.1.7 PRODUCCION DE UVA EN COLOMBIA

En Colombia, la mayor cantidad de viñedos se encuentran principalmente en el Valle del Cauca, donde empezaron a cultivarse alrededor de 1930. Existen unas 1300 hectáreas cultivadas que producen 2,2 cosechas al año. El cultivo de la vid es laborioso y artesanal. La uva se produce durante todo el año; la temporada alta de comercialización de uvas colombianas, se da entre los meses de noviembre, diciembre y enero, debido a que durante esta época los mercados requieren algunas variedades de uva: red-globe, roja, Italia, blanca o verde, river, negra o gruesa (8).

La uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), originalmente proviene del sur de los Estados Unidos, se cultiva en la actualidad en Colombia en las Regiones del Valle del Cauca y Villa del Rosario (Norte de Santander). La primera región tiene mayor tiempo y área destinada al cultivo de esta uva. Mientras que la región de Villa del Rosario tiene un 10 % del área sembrada (8).

El desarrollo de la viticultura en el país siempre ha estado ligado a la producción de uva para consumo fresco, es así como en el Valle del Cauca se desarrollaron grandes extensiones de tierra cultivadas con vides destinadas a la producción de uvas de mesa y por lo tanto de variedades con características ideales para este propósito. Sin embargo la producción de uva destinada para la elaboración de vino tiene una connotación muy distinta (8).

En general cuando se produce uva de mesa se quiere tener altas producciones por unidad de área sembrada, mientras que cuando se está pensando en hacer vino lo que se quiere es tener una uva de excelente calidad en cuanto al contenido de compuestos necesarios para la obtención del vino y esto se logra obteniendo producciones controladas (máximo 9 toneladas por hectárea por ciclo), es así que, contrario a lo que ocurre para la producción de uva de mesa, para la producción de uva para vino se prefieren suelos más bien pobres y escasos en materia orgánica (8).

En Colombia, el auge en el consumo de vino hace que la producción de uva para vino sea vista como una alternativa viable que puede generar buenos resultados. Se puede decir que existen algunas zonas del país que son adecuadas para la producción de vinos de calidad, que por sus características edáficas (suelos) y sus características climáticas conceden a la uva todos los componentes necesarios para engendrar un producto de calidad superior.

Estas características ideales las podemos encontrar en algunas zonas de Boyacá, en el departamento del Tolima, en el Huila y en general donde se tengan climas secos con periodos de alta luminosidad y una diferencia de temperatura

considerable entre el día y la noche. La diferencia de altitud en las zonas de producción también genera diversas tipologías de vino creando una amplia gama de productos nacionales (8).

5.2 LÍPIDOS

Los lípidos son ésteres de ácidos monocarboxílicos, que llevan generalmente una cadena hidrocarbonada larga, son muy poco solubles en agua u otros disolventes polares y solubles en disolventes orgánicos como éter, cloroformo o acetona (77). Son compuestos comunes en la naturaleza. Se encuentran en sitios tan diversos como la yema de huevo son un componente importante de las membranas vegetales y animales (78).

Si los clasificamos según su naturaleza química, los lípidos pertenecen a dos clases principales. Una, que consta de compuestos de cadena abierta con cabezas polares y largas colas no polares, incluye los triglicéridos, ácidos grasos, esfingolípidos, fosfoacilgliceroles y glucolípidos. La segunda clase importante, de los compuestos poliprenílicos incluye los terpenos y esteroides (78).

5.2.1 Naturaleza Química de los lípidos

5.2.1.1 Triglicéridos

Los triglicéridos son triésteres del glicerol y de tres ácidos grasos, en la Figura 7 se observa la estructura de los triglicéridos. Pueden considerarse formados por la condensación de una molécula de glicerol con tres de ácidos grasos, para dar tres moléculas de agua y una de un triglicérido (77).

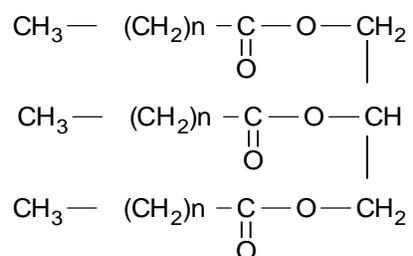


Figura 7. Estructura química de los triglicéridos

Los triglicéridos que están constituidos por ácidos grasos saturados, presentan temperaturas de fusión altas y son sólidos a temperatura ambiente. Son lo que se denomina **grasas**. Los triglicéridos con una alta proporción de ácidos grasos insaturados y poli insaturados poseen temperaturas de fusión menores; son los **aceites** (78).

Los triglicéridos se subdividen en simples y mixtos.

Triglicéridos simples Cuando todos los ácidos grasos en un triglicérido son idénticos se le denomina simple (77).

Triglicéridos mixtos: los compuestos en los que dos o tres residuos diferentes de ácidos grasos están presentes en la molécula (77).

La mayoría de los lípidos en la naturaleza son mezclas complejas de triglicéridos simples y mixtos; por lo tanto, muchos ácidos grasos son componentes de las grasas y aceites comunes (78).

La función principal de los triglicéridos es almacenar energía química. Si la demanda energética de los seres vivos es tal que se consumen más nutrientes ricos en energía que los necesarios para el proceso metabólico, gran parte de este exceso de energía se almacena en los enlaces de las moléculas de triacilglicéridos localizadas dentro de células especializadas en el almacenamiento de grasa, que se denominan células adiposas. Si no hay cantidad suficiente de carbohidratos para el metabolismo, se degradan los triacilglicéridos para utilizarse como fuente de energía (78).

5.2.2 Ácidos grasos

Un ácido graso tiene un grupo carboxilo en el extremo polar y una cadena hidrocarbonada en el no polar. Los ácidos grasos son compuestos anfipáticos porque el grupo carboxilo es hidrofílico y la cola hidrocarbonada es hidrofóbica. El grupo carboxilo puede ionizarse en las condiciones apropiadas. En la figura 8 se observa la estructura de un ácido graso (78).

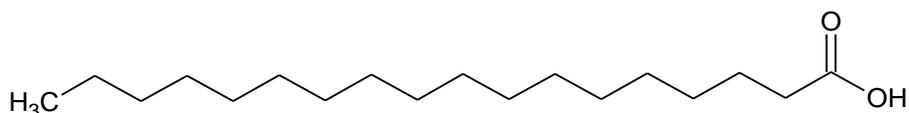


Figura 8. Estructura química de los triglicéridos

La mayoría de los ácidos grasos naturales poseen cadenas no ramificadas y, debido a que se sintetizan a partir de unidades con dos carbonos, poseen un número par de átomos de carbono. Si hay dobles enlaces carbono-carbono en la cadena, decimos que el ácido graso es insaturado; si sólo hay enlaces sencillos, el ácido graso es saturado (78).

En los ácidos grasos insaturados, la estereoquímica en el doble enlace suele ser *cis*, no *trans*. La diferencia entre los ácidos grasos *cis* y *trans* es muy importante en la determinación de su forma general. Un doble en la *cis*, introduce una flexión en la terminación hidrocarbonada, mientras que la forma de un ácido graso *trans* es parecida a la de un ácido graso saturado en su conformación extendida a plenitud. Es común que el primer enlace doble de un ácido graso insaturado se encuentre entre C-9 y C-10, el resto de los enlaces dobles tienden a comenzar en C-12 y C-15, por lo tanto, los ácidos grasos normalmente no tienen sistemas de dobles enlaces conjugados (78).

Los ácidos grasos insaturados de origen vegetal poseen mayoritariamente una configuración *cis*. Los provenientes de animales poligástricos contienen una pequeña proporción de isómeros *trans*, producidos por acción microbiana en el rumen. Esta cantidad usualmente no sobrepasa el 3% o 4% del total. La mayor fuente de los isómeros *trans* en la dieta humana deriva de la hidrogenación industrial de aceites vegetales (79), (anexo 1) se proporciona la composición en ácidos grasos de algunos aceites vegetales comunes.

La conversión de aceites en grasas es un proceso de importancia comercial, la industria alimentaria usa este proceso para solidificar grasas que a temperatura ambiente son líquidas; esto es necesario para poder utilizar esas grasas en los procesos de manufactura, y para aumentar la estabilidad del producto frente a la oxidación. La hidrogenación genera gran cantidad de ácidos grasos *trans*, que puede alcanzar hasta un 40% de las grasas totales (79).

En la última década, numerosos estudios clínicos y epidemiológicos coinciden en demostrar que los ácidos grasos *trans* poseen efectos adversos sobre las lipoproteínas plasmáticas, lo que produce un incremento del colesterol LDL (LowDensityLipoprotein o colesterol de baja densidad) y descenso del colesterol HDL (high-densitylipoprotein o colesterol de alta densidad). Los ácidos grasos esenciales (llamados de así porque el cuerpo no los sintetiza y son necesarios consumirlos en la dieta) conocidos con el nombre de omega-3 (ácido α -linolénico) y omega-6 (ácido linolénico), producen el efecto contrario, ya que estos ácidos reducen el nivel de colesterol en la sangre y la lipogénesis hepática, además, están involucrados en la disminución de la presión sanguínea (79, 80).

5.2.3 Reacciones de los ácidos grasos

Saponificación: Es una reacción típica de los ácidos grasos, en la cual reaccionan con bases (NaOH o KOH) y dan lugar a una sal de ácido graso, que se

denomina jabón (78,79). En la figura 9 se muestra la reacción general de saponificación de un ácido graso.

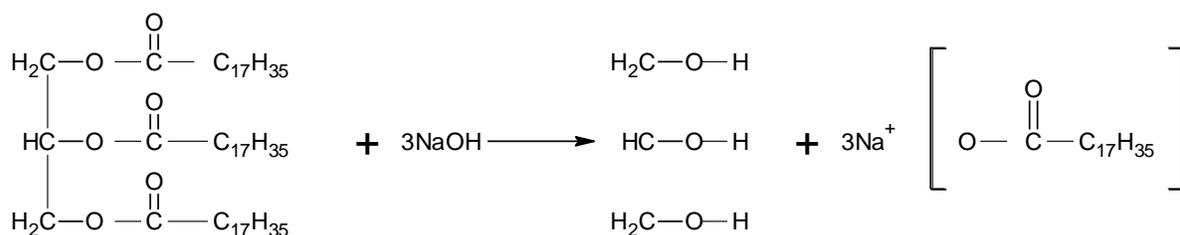


Figura 9. Reacción de saponificación

Hidrólisis ácida: Es una reacción reversible; la reacción con agua en medio ácido genera el glicerol y los ácidos grasos correspondientes (78,79). En la figura 10 se observa la hidrólisis ácida de una grasa o aceite.

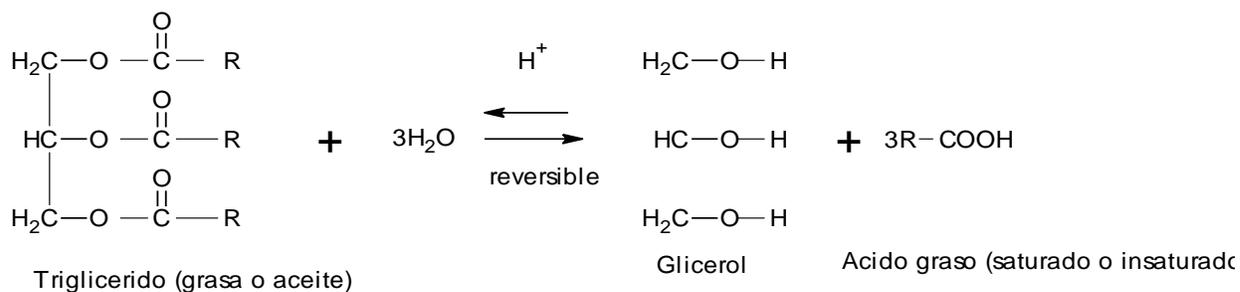


Figura 10. Hidrólisis ácida de una grasa o aceite

Hidrogenación: Las grasas y aceites insaturados pueden ser hidrogenados, convirtiéndose en el proceso los ácidos grasos insaturados, total o parcialmente, en saturados. Esta es la forma industrial en que se producen las margarinas (78,79). En la figura 11 se muestra la reacción de hidrogenación.

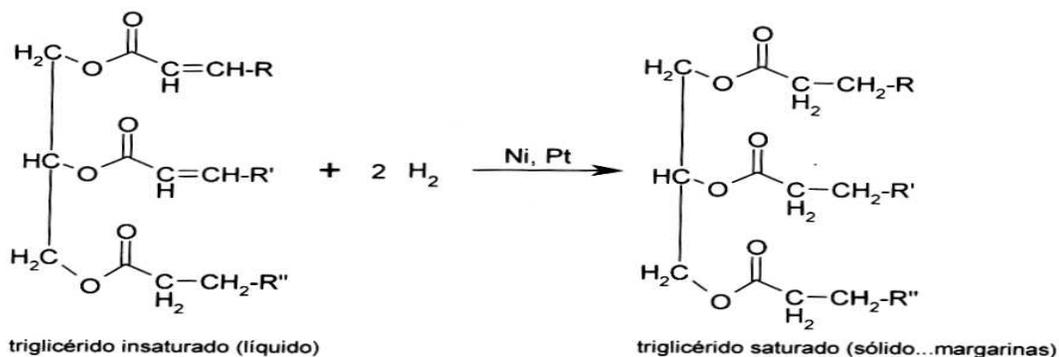


Figura 11. Reacción de hidrogenación

Esterificación y transesterificación: En la esterificación, un ácido graso se une a un alcohol mediante un enlace covalente, formando un éster y liberándose una molécula de agua. Los ácidos pueden ser esterificados por alcoholes en presencia de un apropiado catalizador ácido (figura 12). El paso inicial es la protonación del ácido para dar el ión (77), el cual puede sufrir una reacción con el alcohol para dar el intermediario (78), y este a su vez puede perder un protón para convertirse en el éster (79). Cada paso en este proceso es reversible pero en presencia de un gran exceso del alcohol, el punto de equilibrio de la reacción es desplazado para que la esterificación se realice (79).

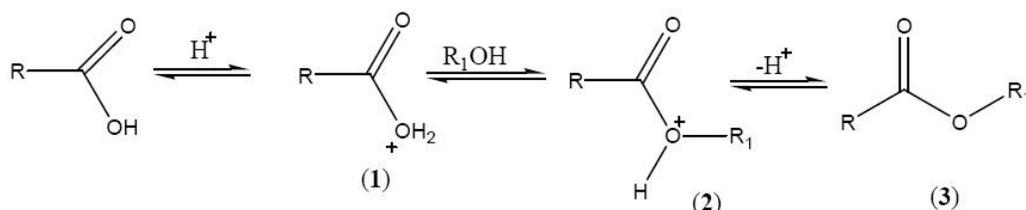


Figura 12. Esterificación de ácidos grasos con catálisis ácida.

La trans-esterificación ocurre bajo condiciones similares (figura 13). La protonación de éster es seguida por la adición del alcohol para dar el intermediario (4) el cual se disocia para posteriormente dar el éster (6). El agua debe ser una vez más excluida. Las condiciones preferidas para esterificación o trans-

esterificación de ácidos carboxílicos son por consiguiente un exceso del alcohol con el que se quiere esterificar y ausencia de agua (79).

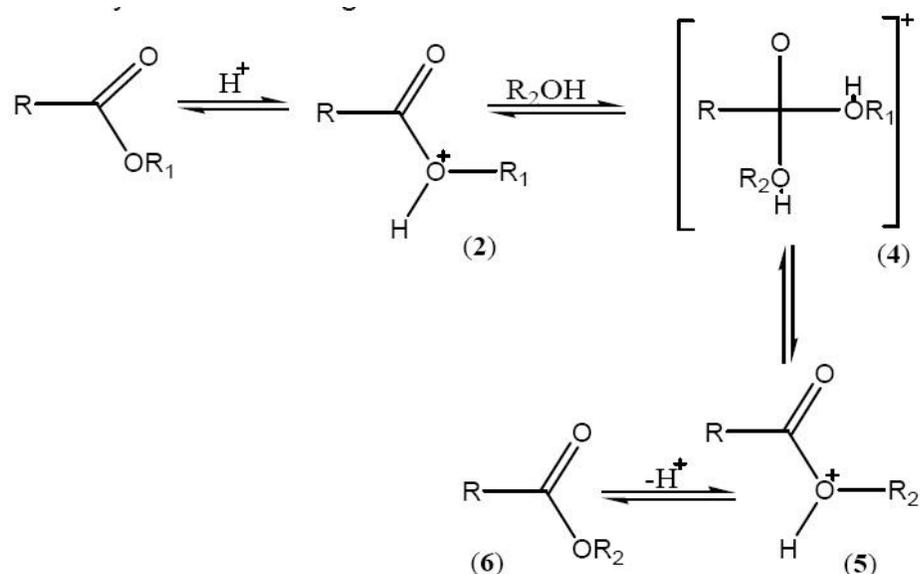


Figura 13. Trans-Esterificación de lípidos por catálisis ácida.

5.2.4 TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES

El término general vitamina E se utiliza para designar a un grupo de 8 vitámeros los cuales se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles (α , β , γ , δ), solubles en lípidos y disolventes orgánicos. Su estructura consta de 2 partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. La vitamina E se encuentra principalmente en los aceites vegetales (soya, maíz, algodón, girasol y uva); el trigo, la avena y el arroz integral; la mantequilla y el huevo (82).

Las estructuras químicas de los vitámeros de tocoferol se presentan en la Figura 14a, son 4 isómeros que tienen una cadena saturada. Las estructuras de los tocotrienoles se muestran en la Figura 14b, estos isómeros tienen una cadena insaturada con 3 dobles enlaces en los carbonos 3,7 y 11. Dentro de cada grupo,

los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como α , β , γ , δ (82).

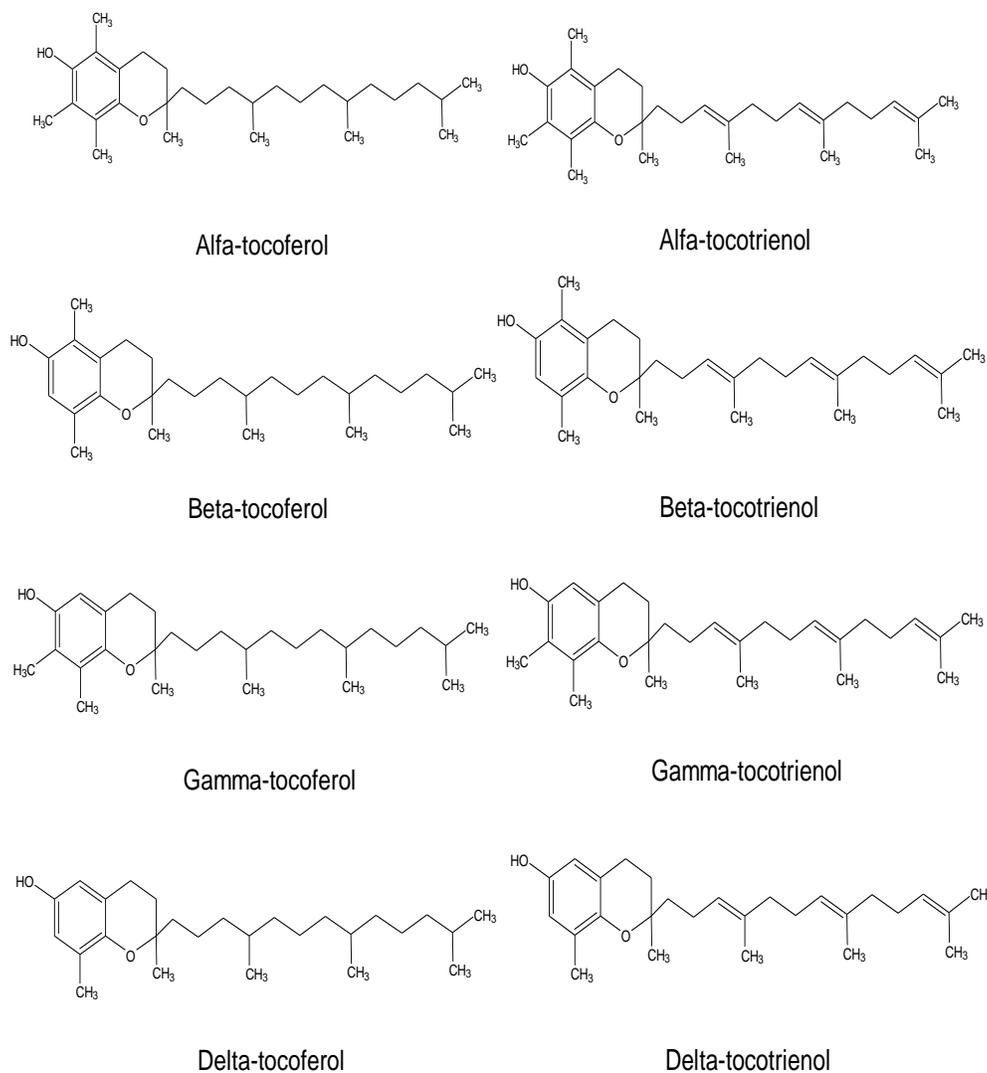


Figura 14a Estructura química de los Vitámeros del Tocoferol

Figura 14b Estructura química de los Vitámeros del Tocotrienol

5.2.4.1 Estructura Química

A diferencia de otras vitaminas que presentan una sola estructura química, bajo el nombre de vitamina E se agrupan dos conjuntos de compuestos químicamente muy similares, que presentan en su estructura básica: 2-metil-2-(4',8',12'-

trimetiltridecil)-6-cromanol. Estos son los tocoferoles y los tocotrienoles. Los tocoferoles poseen una cadena poliprenilo saturada de 16 carbonos y tres centros quirales con configuración R en las posiciones 2, 4' y 8' (figura 15) (81).

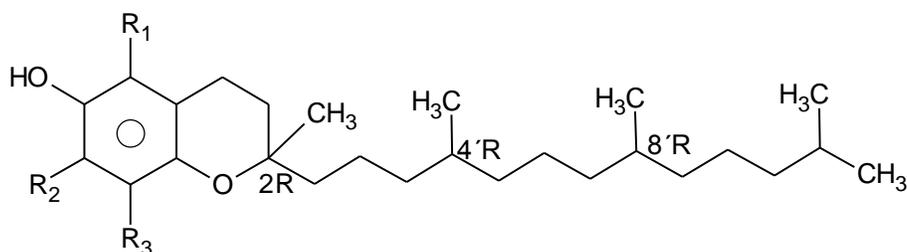


Figura 15. Estructura química del tocoferol

Los tocotrienoles, poseen una cadena isoprenoide con tres insaturaciones en las posiciones 3', 7' y 11' (figura 16). Los miembros dentro de cada conjunto son denominados α , β , γ , δ dependiendo del número y de la posición de los grupos metilo sustituyentes del anillo aromático (anexo 2) (81)

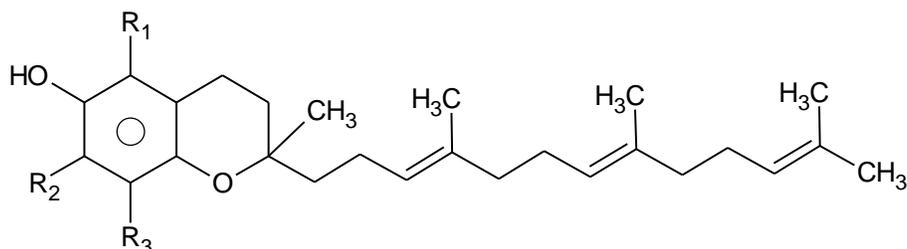


Figura 16. Estructura química del tocotrienol

Debido a que los tocoferoles poseen tres centros quirales, ellos pueden existir como ocho diastereoisómeros agrupados en cuatro pares de enantiómeros. En cuanto a los isómeros de los tocotrienoles, es importante aclarar que debido a la presencia de los dobles enlaces en las posiciones 3' y 7', estos compuestos sólo presentan isómeros de posición y, debido a que poseen un centro quiral en la posición 2, presentan dos estereoisómeros (81).

5.2.4.2 Aspectos funcionales

A la vitamina E se le conoce como uno de los principales factores alimentarios necesarios para el buen funcionamiento del organismo, y en la prevención de numerosas patologías. Sin embargo, la principal acción que se le ha atribuido es la de funcionar como un escudo protector de las membranas celulares para evitar el deterioro por los radicales libres que contienen oxígeno y que pueden resultar tóxicos y cancerígenos (82).

La presencia de α -tocoferol en un aceite o grasa es deseable, debido a que es considerado el vitámero más importante de los tocoferoles, ya que ejerce mayor actividad biológica y tiene mayor capacidad antioxidante y está involucrado en la prevención de enfermedades degenerativas (83, 84).

A diferencia de los tocoferoles, los tocotrienoles presentan baja actividad biológica. Estudios han demostrado que los tocotrienoles son eficientes en la prevención y reducción de la peroxidación lipídica, además tiene propiedades terapéuticas e inhibe la proliferación de células del cáncer de mama y ayudan a disminuir el colesterol (85).

5.2.4.3 Tocoferoles en aceites vegetales

La distribución de los tocoferoles en aceites vegetales es diferente a la de los tocotrienoles. Los tocoferoles están presentes en todos los organismos fotosintéticos, pero los tocotrienoles se encuentran sólo en ciertas familias de plantas (82).

En relación con las propiedades antioxidantes, se ha estudiado la rancidez y la estabilidad oxidativa de distintos aceites vegetales evaluándose el efecto de la concentración de tocoferoles, junto con otros factores, sobre la estabilidad de los aceites (86), se ha demostrado que los isómeros γ -tocoferol y δ -tocoferol son más estables frente al proceso oxidativo, y que los tocoferoles tienen potencial antioxidante mayor a los tocotrienoles (87).

La actividad antioxidante de los tocoferoles y otros compuestos de los aceites vegetales, presenta un creciente interés desde que fueron relacionados con su carácter protector frente a enfermedades degenerativas crónicas como las enfermedades coronarias, la degeneración neuronal y la aparición de tumores en diferentes localizaciones (88). Estas propiedades antioxidantes han sido también utilizadas en campos como la cosmética (89, 90).

5.2.5 FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES

Los fitoesteroles son triterpenos insaturados con uno o dos dobles enlaces entre carbono y carbono. Pueden formar ésteres con ácidos grasos, ácidos fenólicos o hexosas (usualmente glucosa). A diferencia de los fitoesteroles, los fitoestanoles como el campestanol y sitostanol, son triterpenos saturados, ya que no contienen dobles enlaces carbono-carbono, además son menos abundantes en la naturaleza (92). Los fitoestanoles están en menor proporción en el reino vegetal, pero se preparan por reducción química de los fitoesteroles, obteniendo sitostanol, campestanol y estigmastanol (Ver figura 17) (91).

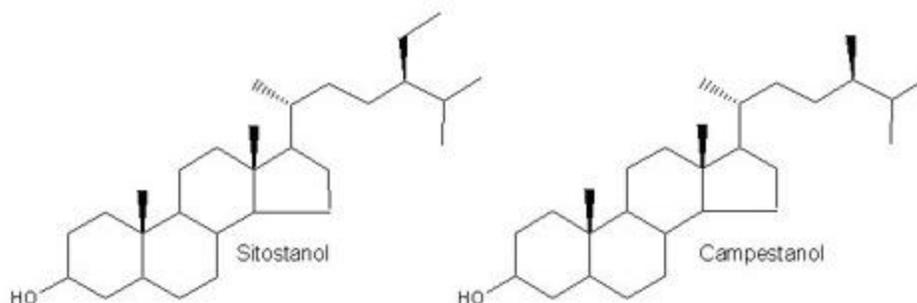


Figura 17. Estructura química de los principales Fitoestanoles.

En la naturaleza, se han descrito más de 200 tipos diferentes de esteroides vegetales en diferentes especies de plantas, siendo los más abundantes: el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, constituyendo el 95-98% de los fitoesteroides identificados (Ver Figura 18) (91).

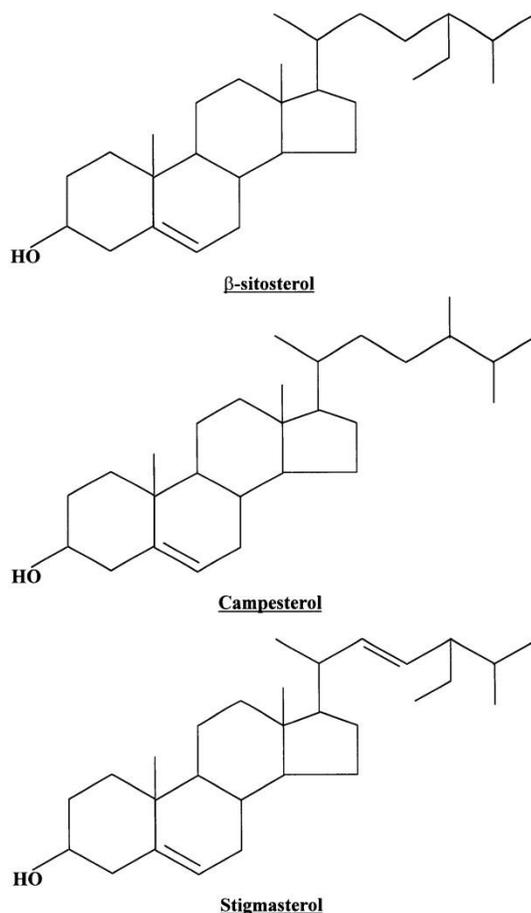


Figura 18. Estructura química de los principales Fitoesteroles.

Los fitoesteroles se encuentran en casi todos los tallos, frutos y hojas vegetales. Las principales fuentes son los aceites vegetales, semillas oleaginosas, en cereales, legumbres, frutos secos (91).

Los fitoesteroles y fitoestanoles inhiben la absorción intestinal de colesterol, por ello, su consumo se ha asociado con la disminución del riesgo de enfermedades del corazón. Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas. También se ha reconocido que los fitoesteroles y fitoestanoles poseen propiedades inmunomoduladoras que podrían ser benéficas para la prevención del cáncer de colon, cáncer de mama y daño tisular asociado a inflamación (92,93).

5.2.6 METODOS DE ANALISIS DE GRASAS Y ACEITES

5.2.6.1 Extracción Método Soxhlet

La extracción sólido-líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente o componentes que se transfieren de la fase sólida a la fase líquida recibe el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte (95, 96).

El método soxhlet consiste en una extracción sólido-líquido, que se utiliza generalmente para aislar los componentes lipídicos de una muestra, por medio de un solvente apolar como el Éter dietílico, el Éter de petróleo o el Hexano. Este método de extracción es directo, aplicable a alimentos en general, para la obtención de la fracción de grasa libre de la muestra para su posterior utilización (94).

El procedimiento básico consiste en llenar un dedal poroso de celulosa con una muestra sólida del material, al cual el solvente condensado extraerá continuamente componentes afines o solubles a éste. Para tener un mayor rendimiento es conveniente un tiempo de extracción de 2 horas. Mientras más tiempo lleve el proceso de extracción, mayor será la cantidad de material extraído (94). En la figura 19 se muestra un esquema del método de extracción soxhlet.

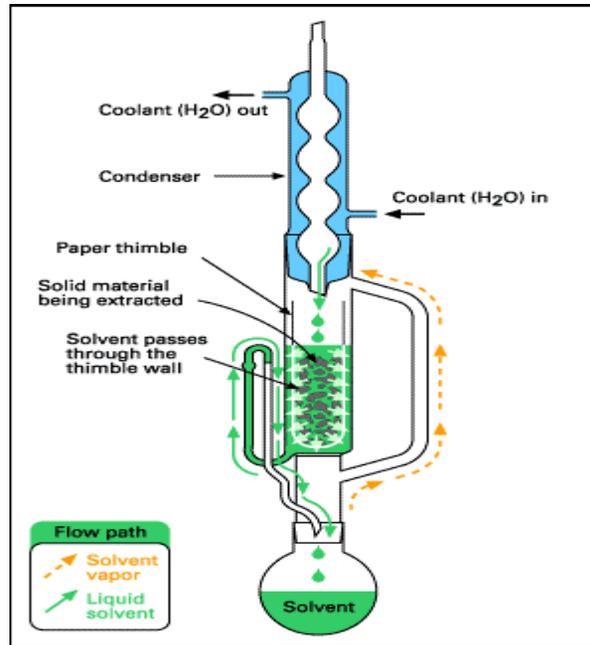


Figura 19. Esquema de extracción Soxhlet

5.2.6.2 Caracterización de las grasas y aceites.

Caracterización física

Densidad: La densidad relativa se determina picnométricamente, en un aceite es la relación entre su peso y su volumen, esta constante no varía cuando esta puro o fresco, pero es afectado por la edad, la rancidez y cualquier tratamiento que se le haga al aceite. La densidad depende de la temperatura y de la presión. Se determina según la norma ICONTEC 336 (97) (98).

Índice de refracción: Es la razón de la velocidad de un rayo de luz en el vacío a la velocidad de luz a través de la sustancia. Es igualmente la relación del seno del ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción y varía con la longitud de onda del rayo de luz refractado y con la temperatura. El índice de refracción se indica con la notación n_D para una temperatura en °C y longitud de onda de la línea D del sodio (99). El índice de refracción se determina de acuerdo a la norma colombiana ICONTEC 286 (100).

Caracterización química

Índice de acidez

El índice de acidez (IA) es una medida del contenido en ácidos libres presentes en grasas y ácidos grasos; además de los ácidos grasos libres, se determinan los ácidos minerales que pudiera haber. El conocimiento del contenido en ácidos grasos libres sirve como prueba de pureza y en ocasiones permite extraer conclusiones acerca del tratamiento o reacciones de degradación que se hayan producido. Las grasas brutas, sin refinar presentan por lo general un IA de hasta 10, mientras que para los aceites refinados suele ser 0.2. El IA se expresa como miligramos de hidróxido de potasio requerido para neutralizar los ácidos grasos libres contenidos en 1g de grasa o aceite. La muestra se disuelve en un disolvente orgánico y los ácidos presentes se titulan con una disolución de hidróxido de potasio frente a fenolftaleína (91). Se realiza según la norma colombiana ICONTEC 218 (101).

Índice de peróxidos: El índice de peróxidos es una medida del oxígeno unido a las grasas en forma de peróxido. Como productos de oxidación primarios se forman especialmente hidroperóxidos, además de cantidades reducidas de otros peróxidos como consecuencia de procesos oxidativos, Este parámetro permite cuantificar la alteración del aceite causada por la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con formación de peróxidos que posteriormente se polimerizan y descomponen dando origen a aldehídos, cetonas y ácidos de menor peso molecular, la conservación del aceite es esencial ya que este proceso es acelerado en presencia de luz, calor y humedad. El enranciamiento oxidativo destruye las vitaminas liposolubles, particularmente las vitaminas A y E; se disuelve la muestra en una mezcla de cloroformo y ácido acético glacial y se mezcla con una disolución de yoduro potásico. La cantidad de yodo liberada por reacción con los grupos peróxidos se determina finalmente por valoración con una disolución de tiosulfato sódico (91). Se determina según la norma ICONTEC 236 (102).

Índice de saponificación: El índice de saponificación (IS) es una medida de los ácidos grasos libres y combinados que existen en la grasa y es directamente proporcional a su masa molecular media: Cuanto menor sea la masa molar media de los ácidos grasos presentes (es decir, cuanto mayor sea la proporción de ácidos grasos de cadena corta), tanto mayor será el índice de saponificación. El IS se utiliza para comprobar la pureza de las grasas. El IS representa la cantidad de hidróxido de sodio o potásico necesaria para la saponificación de 1g de grasa, la muestra problema se saponifica con un exceso de disolución de hidróxido de potasio en etanol (figura 20). La cantidad de hidróxido potásico que no ha reaccionado se determina por valoración con ácido clorhídrico (91). El IS se determina de acuerdo con la norma colombiana ICONTEC 235 (103).

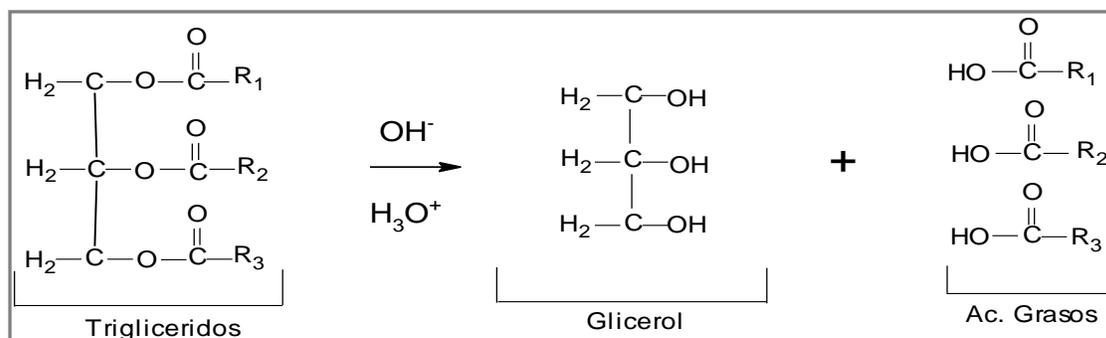


Figura 20. Reacción de saponificación

Índice de yodo: método de Hanus.

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa, será mayor cuanto más sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, utilizándose por ello para comprobar la pureza y la identidad de las grasas (77). Se determina según la norma ICONTEC 283 (104).

La muestra problema exactamente pesada se somete a la acción del reactivo de Hanus (solución de mono bromuro de yodo en ácido acético) y luego de un tiempo

determinado, se valora el yodo en exceso, mediante el empleo de solución de tiosulfato de sodio (Figura 21) (105).

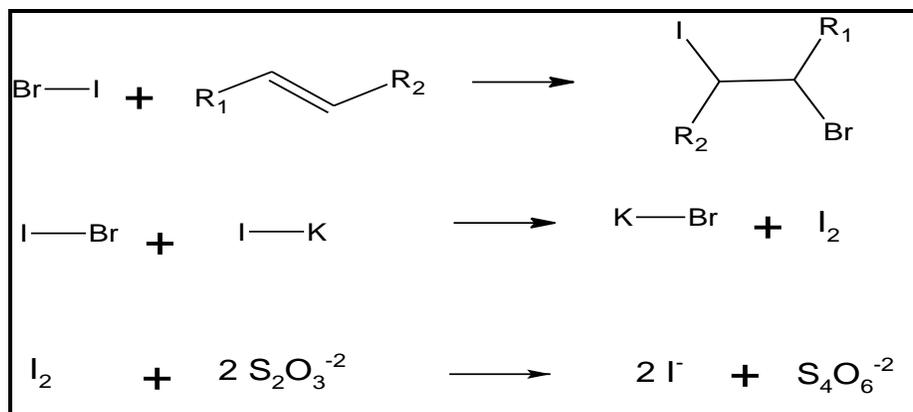


Figura 21. Reacción correspondiente a la determinación del índice de yodo de una grasa o aceite por el método de Hanus.

Según el índice de yodo los aceites se pueden clasificar como:

- Aceites secantes. Son aquellos que tiene índices de yodo muy elevados que pasan de 120 (como el de linaza y los de pescado). Son los que al exponerse a la acción del aire absorben el oxígeno de este y forman películas transparentes a la goma elástica.
- Aceites no secantes. Son aquellos aceites que poseen índices de yodo inferiores a 100 (oliva, maní, almendras). Son los que al exponerse a la acción del aire se mantiene líquidos y se espesan un poco.
- Aceites semisecantes. Son aceites que tiene índices de yodo intermedios. (algodón, ajonjolí, maíz). Estos aceites desecan menos que los secantes y su índice de yodo está comprendido entre 100 y 120 (105).

5.3 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los cuales son captados por los radicales libres, cumpliendo una función preventiva en el desarrollo del envejecimiento y de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

El antioxidante, al interactuar con el radical libre le cede un electrón, debilitando su acción y en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (106).

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos, puesto que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en un nuevo radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que puede eventualmente destruir las células (107).

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando gran daño a biomoléculas, membranas celulares y tejido (107).

Los radicales libres en cantidades moderadas tienen importantes efectos fisiológicos como la regulación de la respuesta inmunológica de defensa (inactivación de virus, eliminación de bacterias u hongos), están involucrados en muchos procesos químicos importantes, como el deterioro de los alimentos; por lo que deben ser considerados como benéficos o tóxicos dependiendo de su concentración y de los mecanismos antioxidantes que los producen (108).

Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxidoreducción con oxígeno (REDOX), que tienen lugar

en el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria controlada y también en ocasiones, como respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de cigarrillo, exceso de ejercicio e isquemia (109).

Debido a este aumento incontrolado de radicales libres, el cuerpo hace uso de los antioxidantes como sistema de protección. Estos sistemas incluyen antioxidantes producidos en el cuerpo (endógenas) y otros obtenidos de la dieta (exógenos); los primeros incluyen las defensas enzimáticas: superóxido dismutasa (transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno), glutatión peroxidasa (convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres). Los obtenidos en la dieta tales como: la vitamina E, la vitamina C, el β caroteno, flavonoides y licopenos entre otros, se encuentran en los vegetales de la dieta (109).

5.3.1 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo, es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) término aplicado colectivamente a las especies radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos en radicales (107).

Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son radicales libres (el anión superóxido O_2^- y el hidroxilo OH^-) (107).

5.3.2 Método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) para la evaluación de la actividad antioxidante

El procedimiento seguido para determinar la actividad antioxidante se basa en el método descrito por Brand-Williams et al., (1995) (110), el cual consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH.). La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante. Por lo tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una solución metanólica de DPPH, ver figura 22.

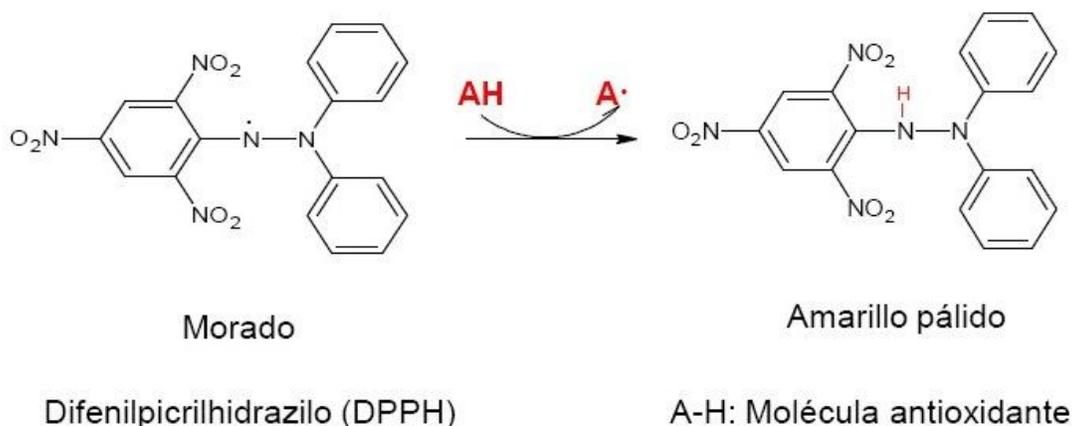


Figura 22. Reducción del radical estable 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH.)

5.4 GENERALIDADES DE LA CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria, (111). En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y / o cuantitativamente (112).

5.4.1 Cromatografía en capa delgada. (CCD)

La cromatografía en capa delgada es un método fisicoquímico fundado en la separación de las sustancias de una mezcla por migración diferencial sobre una capa delgada de un adsorbente o gel, con o sin aglutinante, extendido homogéneamente en un soporte rígido o flexible (113).

La separación se lleva a cabo sobre una fina capa que constituye la fase estacionaria, por lo general de sílica gel, que se deposita sobre una placa de vidrio, plástico o aluminio. La fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad, moviendo los componentes de la muestra a diferentes velocidades de acuerdo al grado de interacción con la matriz y la solubilidad en el disolvente (114).

Una vez localizados los analitos, se determina para cada componente el valor del R_f como el cociente entre el recorrido de la sustancia y el recorrido del disolvente, éste valor puede ser utilizado para la identificación de cada una de las manchas, pero no como criterio único ya que varios compuestos pueden tener el mismo R_f con determinada mezcla (114).

5.4.2 Cromatografía de gases. (CG)

La cromatografía de gases es una técnica analítica utilizada en la separación, identificación y medida de los componentes de una mezcla. Se basa en la diferencia de velocidades de migración de los componentes de una mezcla, al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo relleno de un material adecuado. En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna (115). Existen dos tipos de cromatografía de gases: cromatografía gas-sólido (CGS) que está limitada a moléculas polares donde se produce la retención de los analitos en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física; cromatografía gas-líquido (CGL) que se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. En cromatografía de gases (CG), se emplean dos tipos de columnas: columnas rellenas y columnas capilares. Las columnas capilares pueden ser: columnas abiertas de sílice fundida (FSOT), columnas abiertas de pared recubierta (WCOT) y columnas abiertas recubiertas con soporte (SCOT) (117).

El principio de la cromatografía de gases esta basado en la volatilización de la muestra en el puerto del inyector, la separación de los componentes en una columna, que soporta la fase estacionaria, mientras que los componentes de una mezcla son arrastrados por la fase móvil, y la salida de cada componente de la columna se registra por un detector. Figura 23 (116)

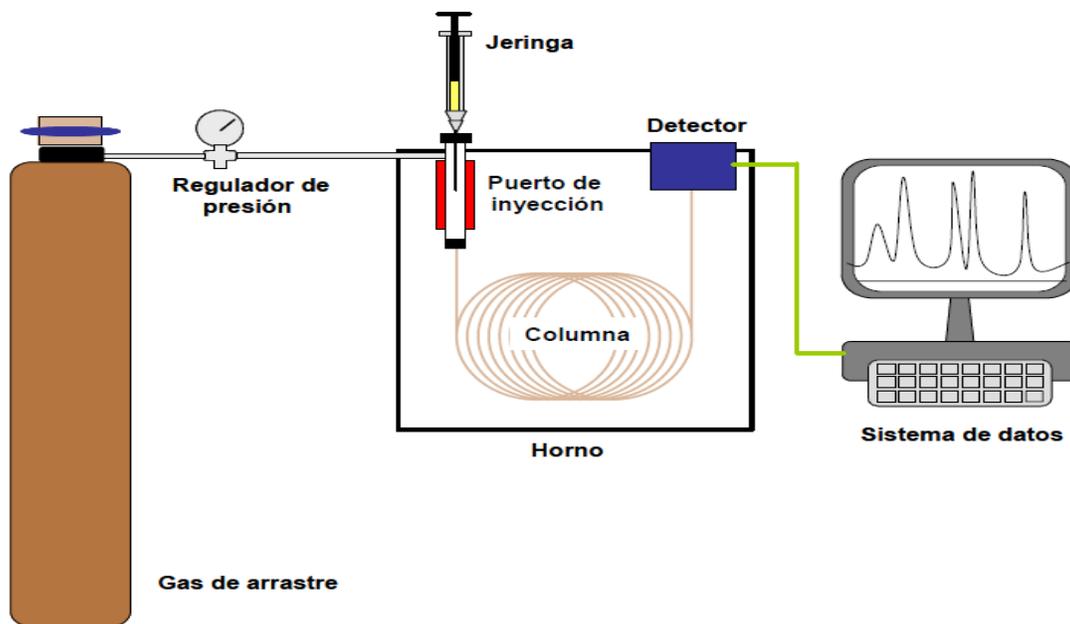


Figura 23. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.

Columnas cromatográficas

Las columnas están hechas de cobre, acero inoxidable o tubos de vidrio, dobladas o enrolladas. Las columnas analíticas tienen una longitud de 1-6 m. de longitud y 2-4 mm de diámetro. Según se encuentre en ella distribuida la fase estacionaria y el valor que alcance la relación de fases se originan los diferentes tipos de columnas:

1. Clásicas de relleno: Constituidas por un tubo de metal o vidrio con relleno de soporte granular, con la superficie recubierta por una película de la fase estacionaria. Este tipo de columna se usa a escala preparativa.
2. Capilares rellenas: Se distinguen de las columnas clásicas de relleno por el diámetro interno del tubo, no excede un milímetro. Además, la relación entre los diámetros del tubo y de la partícula de relleno es del orden de tres a cinco veces. Esto hace que sea un relleno más irregular. Este tipo de

columnas no está comercializado, debido a lo difícil de introducir un soporte en un tubo capilar metálico de esa longitud.

3. Capilares de capa porosa: En este caso el soporte es depositado en la pared interior del tubo, después es recubierto por la fase estacionaria y la parte central del capilar permanece vacía.
4. Capilares abierta: También conocidas como columnas Golay. La fase estacionaria va depositada en la pared interior del tubo que actúa como soporte (117, 118).

Detectores

Los detectores son dispositivos que indican y miden los solutos en la corriente del gas portador, convirtiendo una señal no medible directamente en una señal elaborable de una propiedad física. Esta señal es elaborada por una comparación entre el gas portador y el mismo gas llevando cada uno de los componentes previamente separados en la columna, esto es traducido en una señal eléctrica que es amplificada y registrada al momento de salir de la columna. Un buen detector es altamente sensible, tiene una respuesta lineal sobre un amplio rango de concentración y es relativamente insensible a variaciones de flujo y temperatura (119).

5.4.3 Espectrómetro de masas.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación masa/carga, m/z . La mayoría de los iones que se estudian presentan una sola carga, de modo que la relación es sencillamente la masa del ion. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) combina las ventajas de ambas técnicas: el alto poder de resolución y la velocidad de análisis de la cromatografía de gases

(CG), mientras la espectrometría de masas(EM) provee tanto la identificación como la cuantificación por debajo del nivel de las ppb (119).

Las moléculas del analito deben ser primero ionizadas para ser atraídas (o repelidas) por un apropiado campo magnético o eléctrico. Existen numerosas técnicas de ionización, pero impacto electrónico (IE) es el más antiguo, común y simple. La fuente de ionización es calentada y bajo vacío la mayoría de las muestras son fácilmente vaporizadas e ionizadas. Los electrones de alta energía golpean las moléculas neutras del analito, causando la ionización (usualmente pierde un electrón) y fragmentación. Esta técnica de ionización produce en su mayoría exclusivamente iones positivos (119).

Otros medios para lograr la ionización son la ionización química (IQ y, la ionización química negativa (IQN). En IQ, un gas reactivo como el metano es admitido a la cámara de iones donde es ionizado, produciendo un catión el cual experimenta más reacciones para producir iones secundarios. Comúnmente esta técnica produce menos fragmentaciones y espectros más simples. El pico mayor que resulta es (M +1), siendo M el peso molecular (119).

Para llevar a cabo la ionización química, la cantidad de iones es habitualmente diferente de la usada para impacto electrónico, la presión de operación es mayor y la temperatura es más baja. Después de la ionización, las partículas cargadas son repelidas y atraídas por lentes cargados en el analizador de masa. Aquí las especies iónicas son separadas por su razón masa-carga (m/z) por cualquiera de los dos campos magnético o eléctrico (117).

Los analizadores de masa típicos para CG/EM son cuadrupolos o trampa de iones. El detector de masas más simple para cromatografía de gases es el detector de trampa de iones (DTI). En este instrumento, los iones se generan por impacto de electrones o por ionización química, a partir de la muestra eluida, y luego se mantienen en un campo de radiofrecuencia. A continuación, los iones

atrapados se expulsan del área de almacenamiento hacia un detector multiplicador de electrones. La expulsión se controla de tal forma que es posible un barrido en función de la relación masa/carga (118).

El espectro de masa es simplemente un plano de la abundancia de los iones en función del (m/z). Bajo condiciones controladas, las razones de abundancia y (m/z) específico que presentan las especies son únicos para cada compuesto. Estos pueden ser utilizados para determinar el peso molecular y la estructura química de cada compuesto (119).

La presentación de datos puede ser de dos maneras; o como un total análisis (scan, TIC-Total Ion Chromatogram) o como un número pequeño individual de iones (SIM-Selected Ion Monitoring) característicos de un compuesto. Total ion Chromatography (TIC) es usado para identificar compuestos desconocidos. Un rango específico de masas es escaneado. Todos los picos son reportados así que los espectros de masa pueden ser recuperados del computador y ser usados para identificar cada pico. La computadora compara rápidamente cada espectro de masa desconocido con cerca de 150.000 espectros de referencia. La adquisición de datos necesario para examinar todos los iones en el rango seleccionado es lento, la sensibilidad es limitada, y usualmente no es óptima (119).

Otros detectores empleados en GC: detector de Conductividad térmica (DCT), de ionización de flama (FID), de Quimioluminiscencia del azufre (SCD), de Emisión atómica (AED), de captura de electrones (ECD), Termoiónicos (TID), Fotométrico de llama (FPD), de Fotoionización, de Nitrógeno-Fósforo, de Conductividad electrolítica (ELCD) y el Espectrómetro Infrarrojo de transformada de Fourier (120, 117).

-Detector termoiónico (TID): Se usa para compuestos fosforados y nitrogenados, su funcionamiento es parecido al detector de ionización de llama, el eluyente se mezcla con hidrogeno y se quema. El gas se pasa alrededor de una esfera de

rubidio calentado a 600° C y sometida a 180 V, creando un plasma en el cual se forman gran cantidad de iones que producen una corriente medible, la intensidad es proporcional al número de iones formados y así determinar la cantidad del analito.

- Detector de conductividad térmica (DCT): Consiste de dos celdas metálicas idénticas, cada una conteniendo un filamento de alambre de tungsteno o de tungsteno con lámina de oro. Este es un método no destructivo dependiente de la concentración, con selectividad universal. Su modo de detección es debido al cambio de resistencia del cable basado en la termo conductividad del gas cuando fluye a través de la columna (118).

- Detector de ionización de flama (FID): Consiste de una flama de hidrógeno/aire y una placa colectora. Las muestras que salen de la columna pasan a través de la flama, la cual rompe las moléculas orgánicas y produce iones. Los iones son colectados en un electrodo parcial produciéndose una señal eléctrica. Este es un método destructivo dependiente del flujo de masa, con selectividad para compuestos orgánicos, es extremadamente sensible en un amplio rango dinámico. Su modo de detección es debido a la producción de iones en una flama resultando en una corriente que puede ser medida (118).

- Detector de captura de electrones (DCE): Es altamente sensible a los compuestos halogenados y por lo tanto muy útil en la detección de pesticidas. Para este tipo de cromatografía la muestra debe contener una fase gaseosa electrófora. Este es un sistema donde se detectan partículas β por absorción de especies que contienen halógenos, nitrilos, nitratos, organometales y dobles enlaces conjugados. Las partículas β son emitidas por una fuente de ^{63}Ni , los electróforos las absorben reduciendo la corriente, siendo esta la base de la respuesta (118).

5.4.4 Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada por su alta sensibilidad, es idónea para separar sustancias o grupos de sustancias poco volátiles o térmicamente inestables o que solo se transforman con dificultad en sus derivados volátiles (112).

En la figura 24 se muestra el esquema de un aparato de cromatografía líquida de alta eficiencia, los componentes de una mezcla son llevados través de una fase estacionaria fijada dentro de una columna mediante el flujo de una fase móvil líquida; la elusión de la muestra puede ser obtenida con disolventes de composición constante (modo isocrático) o con disolventes de composición variable (modo gradiente). Dichas separaciones están basadas en las diferencias de la velocidad de migración entre los componentes de la muestra que vienen condicionadas por la naturaleza de los analitos y su interacción con las fases; así el componente más afín a la fase estacionaria se retienen más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil seretiene menos y eluye antes (121,122).

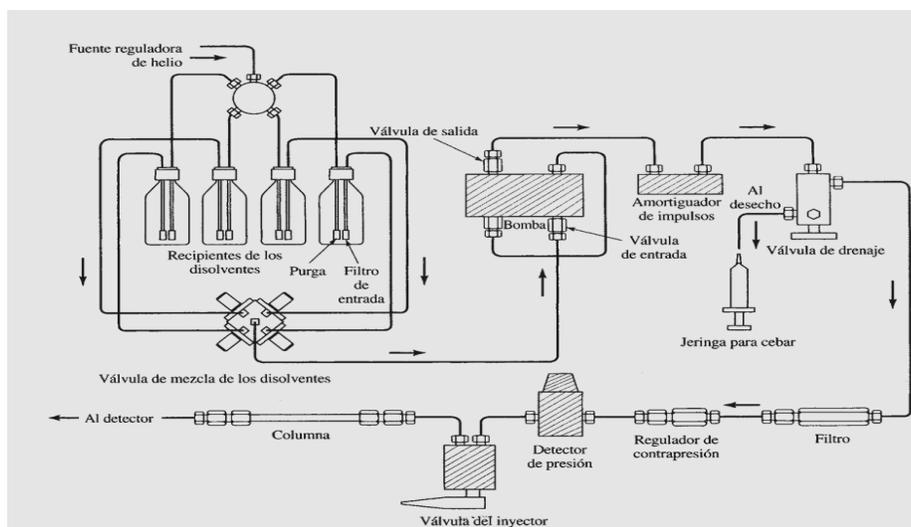


Figura 24. Representación esquemática de un aparato de cromatografía líquida de alta eficiencia.

Columnas.

El diámetro interno de una columna de CLAE es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm. Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta eficacia, más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones, estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y una longitud de 3 a 7.5 cm (112).

Tipos de columnas:

Algunas de las columnas empleadas en Cromatografía de alta eficiencia son: de exclusión molecular (SEC), de afinidad, Intercambio iónico (IEC), (121) y otras como:

Fase normal (FN),

la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamados ODS o C18), octilsilano (C8), fenilo, ciano (CN), amino, diol etc. (anexo 2); el material de relleno puede emplear básicamente dos formas, irregular o esférica, actualmente se tienden a emplear columnas de 25 cm, o de 10-15 cm. de longitud con partículas de 5 μm , según la resolución requerida. La cromatografía de fase normal es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para separar isómeros posicionales con sustituyentes polares. El mayor inconveniente de la FN se debe a la alta actividad del material de relleno, que tiende a absorber agua y solventes polares en superficie (121).

Fase reversa (FR), La fase estacionaria consiste en una matriz de sílica empacada que lleva unida covalentemente una cadena alquílica de *n*-carbonos

(por ejemplo, C-8 significa que se incorpora una cadena octil y C-18 una octadecil). La más hidrofóbica es, en este caso, la fase estacionaria, eluyendo los compuestos hidrofílicos más rápidamente que los hidrofóbicos, que interaccionan con la fase estacionaria. También hay empaquetamientos poliméricos alternativos a la sílice que ofrecen similares características con mayor resistencia dinámica y más amplio rango de estabilidad de pH. Existen dos variantes de la cromatografía en fase reversa:

- **Supresión iónica**, se utiliza modificando el pH de la fase móvil para ácidos y bases débiles, de forma que el analito pasa a ser más lipófilo y se mejora la separación porque se establece más interacción con la columna.
- **Formación de pares iónicos**, se utiliza para compuestos que tienen grupos funcionales biológicos que serán unidos a un contraión. El contraión se asocia al analito y lo desplaza del par iónico normal (corrientemente Na^+ o Cl^-) mejorando su hidrofobicidad. Para analitos catiónicos se utilizan grupos alquil o aril sulfonatos y para analitos aniónicos aminas cuaternarias (123).

Detectores.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. El más utilizado es el detector de índice de refracción. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico (121).

- **Detector de índice de refracción:** Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un

detector universal y no destructivo. Tiene la desventaja de ser muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es afectado por cambios de temperatura. Existen tres tipos diferentes de detectores de índice de refracción: Fresnel, Deflexión, Interferométrico (121).

-Detector UV: Es el detector más empleado en CLAE. Posee una buena sensibilidad y rango lineal. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de solventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Pueden ser de (a) longitud de onda fija, sólo se detectan analitos que absorban a unas determinadas longitudes de onda, en el caso de que no absorban deben derivatizarse para cambiar su espectro de absorción molecular a esas longitudes; (b) de longitud de onda variable, se puede seleccionar cualquier longitud de onda; y (c) de dispositivo de diodos (*diode array*), proporcionan un espectro completo por unidad de tiempo. La luz policromática pasa a través de la celda de flujo y la luz transmitida es dispersada por una red y dirigida al dispositivo de fotodiodos. Permite la cuantificación por supresión espectral, aunque el pico de interés no esté bien resuelto, y la identificación de sustancias por su espectro característico (123).

- Detector de Fluorescencia: Es el detector más empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas (121).

-Detector de Conductividad (electroquímicos). La muestra es oxidada o reducida en la superficie de un electrodo a potencial constante, y pueden ser potenciados por coulombimetría.

-Luz dispersada tras evaporación. Funciona midiendo la luz dispersada por partículas sólidas del soluto después de la nebulización y evaporación de la fase móvil (123)

-Espectrometría de masas. Se utiliza la relación masa/carga de las sustancias eluidas y es aplicable a cualquier analito. Es el detector más sensible, selectivo y universal, pero de costo todavía elevado. Para cromatografía líquida se utilizan detectores cuadrupolares o detectores híbridos con acoplamiento a presión atmosférica como son fuentes APCI (ionización química a presión atmosférica) o fuentes ESI (electrospray) (123)

6. METODOLOGIA

6.1 MUESTRAS PARA ANALISIS

Se utilizaron semillas frescas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) suministrados por despulpadoras del eje cafetero, obtenidas como desecho después de procesar la pulpa para jugos. Estas se llevaron al laboratorio de Oleoquímica, (Escuela de química de la Universidad Tecnológica de Pereira) para su respectivo análisis.

6.2 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Se realizó un tratamiento preliminar a la muestra el cual consistió en:

- Un proceso de limpieza y lavado a las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) con detergente Tego 51 al 1%, se secaron en un horno a una temperatura de 40 °C durante 48 horas, en el laboratorio de Oleoquímica.
- Molienda en molino de aspas de las semillas en presencia de nitrógeno líquido.
- Se conservaron en frío para la posterior extracción del aceite.

6.3 EXTRACCION DEL ACEITE

Se llevó a cabo la extracción utilizando la técnica soxhlet empleando como solvente n-hexano, una relación muestra: solvente 1:10 y un tiempo de extracción de tres horas con base en otros estudios (124). El extracto se concentró en rotaevaporador para su posterior análisis.

6.4 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El aceite obtenido de la extracción fue envasado en frascos ámbar y se conservó a temperatura ambiente.

6.5 CARACTERIZACION FISICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

Al aceite fresco de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), se le realizaron las siguientes determinaciones físicas por triplicado.

6.5.1 Densidad. Se realizó según la norma ICONTEC 336, reportando los resultados en gramos/mililitro (97).

6.5.2 Índice de refracción. Se hizo de acuerdo a la norma ICONTEC 286, (100). Las mediciones se realizaron en un refractómetro marca Fisher Scientific, modelo 334620 a 23 °C.

6.6 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

Al aceite fresco de semilla de uva Isabella *Vitis Labrusca L.*, se le realizaron las siguientes determinaciones químicas por triplicado.

6.6.1 Índice de acidez. Se determinó de acuerdo a la norma ICONTEC 218, reportando los resultados en porcentaje de ácido oleico (101).

6.6.2 Índice de peróxidos. Se analizó según la norma ICONTEC 236, reportando los resultados en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de grasa (102).

6.6.3 Índice de saponificación. Se determinó de acuerdo a la norma ICONTEC 235, reportando los resultados como mg de hidróxido de potasio requeridos para saponificar un gramo de aceite (103).

6.6.4 Índice de yodo. Se analizó según la norma ICONTEC 283, reportando los resultados en gramos de yodo por 100g de muestra (104).

6.7 SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella)

Se hizo mediante el análisis periódico del índice de acidez y peróxidos del aceite obtenido. El seguimiento se realizó por dos meses evaluando los parámetros cada ocho días.

6.8 ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).

6.8.1 Preparación del derivado metilado

Se tomaron 50 µl del derivatizante hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) y 50 µl de muestra, se llevaron a un baño a 100°C por 10 minutos, procedimiento completo ver anexo 3.

6.8.2 Análisis composicional de ácidos grasos

El análisis del derivado metilado del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) marca Shimadzu QP2010, empleando un estándar de mezclas de metilesteres de ácidos grasos marca RESTEK, con código de catálogo 35078 de

concentración de 30 mg/mL y las condiciones de análisis descritas en la tabla 7, con base en estudios anteriores (125).

Tabla 7. Condiciones de análisis de Metil esteres del aceite de las semilla de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

CONDICIONES	METIL ESTERES
CROMATOGRAFO	Shimadzu QP2010
COLUMNA	Fame Wax 30m \varnothing = 0.32 mm espesor de partícula= 0.25 μ m
DETECTOR	MASAS
TEMPERATURA DE INYECTOR	250°C
PROGRAMA T(1) RATA (1) T(2)	100°C/2min 7°C/min 300°C/7min
GAS DE ARRASTRE	Helio

FLUJO	1,20 mL/min
MODO DE INYECCION	Split
MODO DE ADQUISICIÓN DE DATOS	SIM
VOLUMEN DE INYECCION	1.0 µL
POTENCIAL DE IONIZACION (PI)	70eV

6.9 ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE FITOESTEROLES POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM).

6.9.1. Obtención de la materia insaponificable.

Se realizó la extracción y cuantificación de la materia insaponificable del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) de acuerdo a la norma ICONTEC 235-2 (126).

6.9.2. Separación de la fracción de fitoesteroles.

La separación de la fracción de fitoesteroles de la materia insaponificable se hizo por separación en fase sólida, empleando la columna Restek, Silica, SPE fase normal, volumen 3ml, de 500mg. Se acondicionó la columna con 3 mL de Hexano, luego se llevo a sequedad con aire y posteriormente se aplicó la muestra. Para lograr las mejores condiciones de separación de la fracción de fitoesteroles se ensayaron dos sistemas de elución, en los cuales la muestra era soluble.

Sistema 1.(Hexano: Acetato de Etilo 9:1)

Se eluyeron, la fracción 1 (F1) con 1.5 ml de Hexano: Acetato de Etilo 9:1 y la fracción 2 (F2) con 2ml de Acetato de Etilo; para un volumen total de elución de 3.5ml.

Sistema 2.(Hexano: Diclorometano 6:4)

Se eluyeron, la fracción 1 (F1) con 5ml de Hexano: Diclorometano 6:4 y la fracción 2 (F2) con 2ml de Diclorometano; para un volumen total de elución de 7ml.

Se usó como control la cromatografía en capa delgada (CCD), las fracciones obtenidas de la separación en fase sólida se sembraron en placas de vidrio con Sílica gel 60de 7.0 x 2.5 cm, se empleó como fase móvil Hexano: Éter etílico: Ácido Acético (8: 2: 0.1) utilizado previamente por otros autores para el estudio de esteroides, y se empleó como patrón, colesterol (P). (122). Se utilizaron como reveladores Vapores de Yodo y Acido fosfomolibdico al 10% en etanol absoluto (127).

6.9.3. Preparación del derivado de la fracción de fitoesteroles.

La fracción de fitoesteroles separada se derivatizó adicionando 125 µL del reactivo (N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida-trimetilclorosilano), disponible bajo la denominación (Silyl-991(BSTFA-TMCS)) 99:1 y 125 µL de piridina. La

mezcla se agitó en vortex por 10 segundos y fue incubada en baño a 70 °C por 20 minutos, se dejó enfriar para su posterior análisis cromatográfico.

6.9.4. Análisis cromatográfico del derivado obtenido de la fracción de fitoesteroles.

El análisis del derivado obtenido de la fracción de fitoesteroles, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) marca Shimadzu QP2010, las condiciones de análisis se basan en estudios anteriores y están descritas en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de análisis de fitoesteroles del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

CONDICIONES	FITOESTEROLES
CROMATOGRAFO	Shimadzu QP2010
COLUMNA	Rtx-5sil MS Crossbond 30m \varnothing = 0.25 mm espesor de partícula= 0.25 μ m
DETECTOR	MASAS
TEMPERATURA DE INYECTOR	310°C

PROGRAMA	
T(1)	150°C/2min
RATA (1)	8°C/min
T(2)	320°C/6min
GAS DE ARRASTRE	Helio
FLUJO	0,7 mL/min
MODO DE INYECCION	Splitless
MODO DE ADQUISICION DE DATOS	ESCAN
VOLUMEN DE INYECCION	1.0 µL
POTENCIAL DE IONIZACION (PI)	70eV

6.9 DETERMINACIÓN DE VITAMINA E POR CLAE

El estudio de vitamina E del aceite fresco de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) (tocotrienoles como δ , β/γ , α -tocotrienol y tocoferoles como δ , β/γ , α -tocoferol), se llevó a cabo en el centro de investigación de CENIPALMA; el análisis se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), empleando un detector de fluorescencia (FL) y una columna Merck, Chromolith RP-18e (4mm IDx100mm largo); se utilizó una fase móvil metanol-agua (80:20) y un flujo de 2.5 mL/min. La determinación se basó en la metodología descrita por Pascal et al, 2004 con modificaciones hechas en el Laboratorio de Caracterización de Aceites. Para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles se empleó el método de estándar externo, utilizando patrones certificados de CALBIOCHEM (Tocotrienol Set Cat. No. 613432), CALBIOCHEM (Tocopherol Set Cat. No. 613424).

6.10 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella)

Al aceite obtenido de las semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) se le determinó su potencial antioxidante empleando el método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (110,128).

6.11.1 Preparación de la solución de DPPH

La solución de DPPH se preparó el día del ensayo, La solución se preparó a 2000 ppm en un matraz aforado, empleando metanol como solvente. Posteriormente la solución se transfirió a un frasco ámbar protegido de la luz.

6.11.2 Preparación de la solución de α -tocoferol (control positivo)

Para realizar el ensayo de actividad antioxidante se utilizó como control positivo α -tocoferol (Vitamina E). Se preparó una solución a una concentración de 2000 ppm, utilizando como solvente: etanol grado analítico. A partir de esta solución se prepararon patrones a diferentes concentraciones: 1500, 1000, 750, 500, 250 y 100 ppm y se determinó su actividad antioxidante según el método descrito en la figura 18.

6.11.3 Preparación de la muestra

Se pesaron 2 mg de aceite obtenido de las semillas de *Vitis Labrusca L.* y se disolvieron en 1 mL del solvente obteniéndose una solución de concentración 2000 ppm; se prepararon patrones a diferentes concentraciones: 1500, 1000, 750, 500, 250 y 100 ppm y se determinó su actividad antioxidante. En la figura 18, se muestra el procedimiento seguido para determinar la actividad antioxidante.

Para medir la absorbancia de referencia, se tomó 1 ml de la solución de DPPH, antes de añadir la muestra y estándar, y se midió su absorbancia a 517 nm.

El procedimiento que se describe a continuación en la figura 25, se le realizó tanto a la muestra (aceite obtenido) como al control positivo (α -tocoferol).

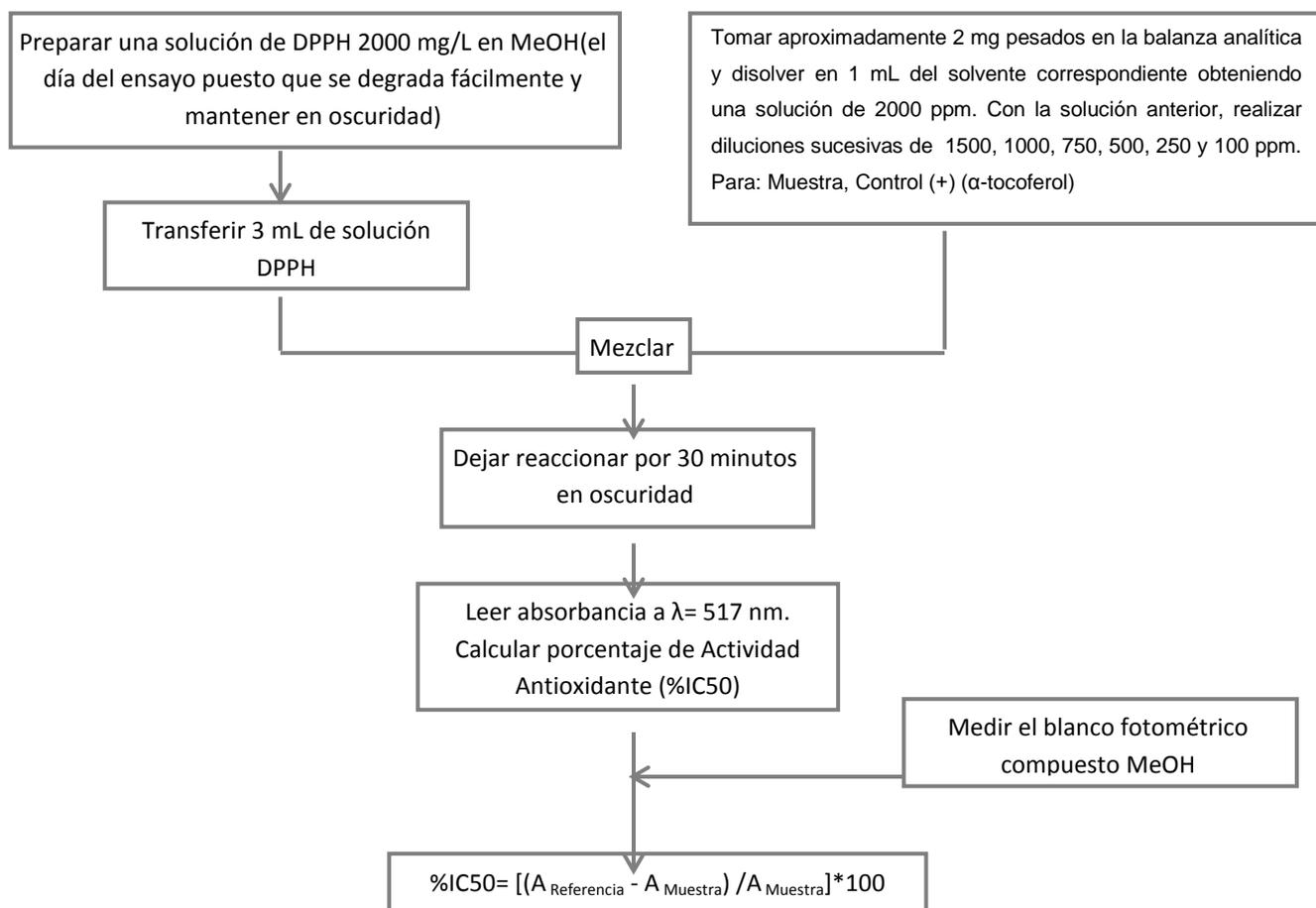


Figura 25. Método espectrofotométrico del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) para la evaluación de la actividad antioxidante (110,128)

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La capacidad captadora de radicales libres (capacidad de decoloración) se determinó empleando el parámetro del IC_{50} (129,130), cuya fórmula es:

$$\%IC_{50} = \frac{(A_{ref} - A_M)}{A_{ref}} \times 100$$

Donde, A_{ref} , es la absorbancia de referencia (solución de DPPH) y A_M es la absorbancia de la muestra.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS SEMILLAS DE *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

El secado de las semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) se realizó en un horno a una temperatura de 40°C durante 48 horas. Las semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) presentaron un contenido de humedad del 13,71%, determinado según la norma NTC 287 (131). Otros estudios han reportado un contenido de humedad del 7% en las semillas (20). Cabe resaltar que, las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) fueron obtenidas como desecho del despulpado de la uva, por lo tanto, tenían gran cantidad de residuos como cáscaras y pulpa del fruto, y es probable que estas impurezas incidieran en el aumento del contenido de humedad.

La humedad óptima de las semillas varía ampliamente según las distintas clases de éstas y el método de extracción que se emplee. Los procesos de degradación de las semillas suministran productos nutritivos para el crecimiento de la microflora, a la vez que estimulan la actividad enzimática; por ello la alteración es un proceso autocatalítico que se ve favorecido por la humedad (132).

7.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE.

Para la extracción del aceite se emplearon las semillas molidas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella). El aceite presentó un color amarillo intenso (figura 26) y olor dulce. El porcentaje de rendimiento aproximado de aceite extraído de las semillas por extracción Soxhlet empleando hexano, fue de 9.62%. Los resultados presentaron una desviación estándar inferior a 1, indicando que los resultados son reproducibles y confiables. En la Tabla 9 se presentan los rendimientos de extracción del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) cuyo

porcentaje de rendimiento obtenido se encuentra por debajo del reportado para el aceite de pepita de uva (*Vitis vinifera*) el cual tiene un porcentaje de rendimiento que oscila entre 12.35% y 16.00% (14).

Tabla 9. Contenido de aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).

Ensayo	Porcentaje de rendimiento
1	9,5201
2	9,7823
3	9,5545
Rango superior	9,7823
Rango inferior	9,5201
promedio	9,6190
Desviación estándar	0,1163

Figura 26. Aceite de semillas de *Vitis Labrusca* L. (uva Isabella).



El rendimiento de la extracción varía por la influencia de algunos factores, entre ellos, el contenido de aceite en las semillas y el método de extracción empleado. El contenido de aceite en la semilla depende de la variedad, y las condiciones agroclimatológicas del lugar donde se cultiva (14).

La humedad de las semillas es un factor que afecta, desde luego, la afinidad entre el aceite y la semilla. Si las semillas están muy secas, el aceite no se puede extraer eficazmente (132).

La dificultad que puede presentarse en la extracción, es que el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) se encuentra fuertemente aprisionado en las células que lo contienen, además de que las semillas poseen una constitución leñosa. Por esta razón, el material debe ser previamente molido o macerado para permitir una mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. Las semillas trituradas o sus partículas convertidas en trozos muy finos, facilitan la extracción con disolvente, tanto por el efecto de rompimiento ejercido por la trituración, como por la disminución de las distancias que deben recorrer el aceite y el disolvente, dentro y fuera de la semilla (132).

Se distinguen varios sistemas de extracción del aceite de semillas oleaginosas, entre ellos se pueden mencionar:

- Extracción mecánica

Para obtener un buen rendimiento en esta extracción es necesario aplicar grandes presiones, para ello se usan las prensas de tornillos llamados expellers. La desventaja es que con estas presiones se desarrolla mucho color y aumento de temperatura, lo que da lugar a la desnaturalización de proteínas, alteración de algunos componentes y oscurecimiento del aceite (133).

- Extracción con fluidos supercríticos.

El disolvente en estado supercrítico más empleado es el CO₂, que en estas condiciones presenta baja viscosidad , baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión , que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. Este proceso extractivo conjuga las

ventajas de la destilación y de la extracción con líquidos, superando a cada una de ellas, ya que permite lograr una determinada selectividad controlada en el proceso extractivo; el extracto queda virtualmente libre de solvente residual y se pueden usar disolventes en estado supercrítico no tóxicos ni peligrosos en industrias farmacéuticas y alimentarias sin contaminar el producto (133).

- Extracción con disolventes (Método Soxhlet)

El método soxhlet consiste en una extracción sólido-líquido. Su ventaja es que la muestra se pone en contacto repetidamente con las fracciones de disolvente lo que ayuda a desplazar el equilibrio de la transferencia, además es un método sencillo que permite extraer mayor cantidad de muestra que la mayoría de métodos modernos.

Algunos inconvenientes de la extracción Soxhlet en comparación con otras técnicas se encuentran en el tiempo requerido para la extracción y el uso de gran cantidad de solvente, las muestras se extraen en el punto de ebullición del solvente durante un largo período de tiempo aumentando la posibilidad de descomposición térmica de los analitos termolábiles. El dispositivo Soxhlet es incapaz de proporcionar la agitación, lo que aceleraría el proceso. Debido a la gran cantidad de disolvente utilizado, es necesaria la evaporación o concentración después de la extracción (133,134).

7.3 CARACTERIZACION FISICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).

Los parámetros físicos evaluados fueron comparados con normativas internacionales para aceite de semilla de diferentes variedades, especialmente *Vitis vinifera* L. y con los rangos establecidos por la norma ICONTEC para aceite de pepita de uva.

7.3.1 Densidad.

Como se presenta en la tabla 10 el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* presento una densidad de 0,9246g/mL, con una desviación estándar de 0,00004 que indica que el método es reproducible y confiable. No hay reporte sobre este parámetro para la variedad *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), pero el valor hallado es similar al establecido por la norma ICONTEC 265 para aceite de pepita de uva (0,923-0,926 g/cm³) (135), y se asemeja con la densidad reportada por normas internacionales de México (0,920-0,926 g/cm³)(136), y argentina (0,906-0,20 g/cm³)(137), y se encuentra dentro del rango reportado por estudios realizados al aceite de las semillas de diferentes variedades de *Vitis vinifera L.* (0,910-0,930 g/cm³)(13)(9).

7.3.2 Índice de refracción.

En la tabla 10 se presenta el índice de refracción determinado a 23°C para el aceite de las semillas de uva *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), en la que el valor promedio obtenido fue de 1,4753 con una desviación estándar de 0,0003, lo que indica que los resultados son confiables y reproducibles. El valor hallado se encuentra dentro del rango establecido por la norma ICONTEC 265 para aceite de pepita de uva (1,473-1,477), (135), y se encontró similar al rango reportado por varios estudios realizados al aceite de las semillas de *Vitis vinifera L.* (1,4690-1,466-1,466) (26,14), y dentro del rango de normas internacionales como la salvadoreña, (1,473-1474) (138).

Tabla 10. Datos experimentales de densidad e índice de refracción para el aceite de las semillas *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

Parámetro Físico	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Rango Superior	Rango Inferior	Promedio	Desviación Estándar
Densidad (g/cm ³)	0.9246	0.9245	0.9246	0.9246	0.9245	0.9246	0.00004
Índice de Refracción a 23°C	1.4749	1.4753	1.4756	1.4756	1.4749	1.4753	0.0003

7.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

En la tabla 11 se presenta los resultados obtenidos de los diferentes análisis químicos realizados al aceite de semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

Tabla 11. Caracterización química del aceite fresco de de las semillas *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella).

Ensayo	Índice de acidez (% ácido oléico)	Índice de peróxidos (meq de O ₂ /kg)	Índice de saponificación (mg KOH/g)	Índice de yodo
1	2.1768	0	174.9592	136.1170
2	2.2061	0	175.1609	136.6865
3	2.1781	0	175.2282	137.2524
Rango superior	2.2061	0	175.2282	137.2524
Rango Inferior	2.1768	0	174.9592	136.1170
Promedio	2.1870	0	175.1161	136.6853
Desviación Estándar	0.0135	0	0.1143	0.4635

7.4.1 Índice de acidez.

Como se observa en la tabla 11, el índice de acidez obtenido para el aceite fresco de semillas de uva Isabella fue 2.1870 expresado en % de ácido oleico, que corresponde a 4.3508 expresado como mg KOH/g de muestra; con una desviación estándar de 0.0135 lo que indica que el método es confiable y los datos reproducibles. No hay reporte sobre este parámetro para la variedad *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), pero el valor hallado está muy por encima del nivel exigido por la norma ICONTEC 265 para aceite de semilla de *Vitis vinifera*, y por parámetros internacionales cuyos valores son respectivamente son 0,1 % de ácido oleico (135) y 4.0 mg KOH/g de muestra. El valor del índice de acidez obtenido para el aceite de las semillas de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella), es alto, lo que indica que

el aceite es fácilmente oxidable, rico en polifenoles y antocianinas. El proceso de extracción por solvente favorece la descomposición de las cadenas de triglicéridos debido al calor, lo cual da origen a una mayor cantidad de ácidos grasos libres los cuales son los responsables de la oxidación de lípidos en el aceite y por lo tanto contribuyen a la rancidez del mismo (3) (4).

En cuanto al estado de maduración de la uva, el daño de las semillas, que conduce a la disminución de las buenas propiedades de almacenamiento, ocurre cuando las semillas, ya maduras, permanecen sin recolectarse, en la planta, durante un tiempo prolongado, sobre todo en el periodo de las lluvias. Debido a esto es notable la disminución de la calidad de las semillas y la producción de semillas con aceite de acidez relativamente alta (132).

La humedad atmosférica durante el periodo de maduración y secado de las semillas es el factor más importante para determinar las subsiguientes propiedades del aceite. Las semillas que maduran bajo poca humedad ambiente tienden a ser más estables, aunque se expongan más tarde a la lluvia; mientras que las semillas maduras con mucha humedad tienden a alterarse, aun cuando se sequen posteriormente, hasta un grado de humedad inferior. La inestabilidad de las semillas maduras en atmósfera muy húmeda se atribuye a la retención de la actividad enzimática, durante un período en que las enzimas, normalmente, se encuentran en un estado latente, esto puede dejar las enzimas en condiciones favorables, para reasumir su actividad más tarde (132).

7.4.2 Índice de peróxidos.

El valor del índice de peróxidos para el aceite de semillas de uva Isabella fue 0 meq de O₂/kg (Tabla 11). No hay reporte sobre este parámetro para la variedad *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), pero los resultados mostraron valores inferiores al rango permitido por la norma ICONTEC 265 para aceite de semilla de *Vitisvinífera*, cuya norma establece un índice de peróxidos de 1 meq de O₂/kg para aceite refinado y 5 meq de O₂/kg para aceite virgen (135). El valor obtenido muestra que

en el aceite fresco de semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) no se encontraban peróxidos, lo que indica que durante la extracción el aceite no sufrió degradación oxidativa. El bajo índice de peróxidos obtenido muestra una alta resistencia de este aceite a la oxidación, la reactividad está referida a la presencia de ácidos grasos insaturados así como también de sustancias antioxidantes como la vitamina E que ayudan a retardar la degradación del aceite. Debido a que este aceite presenta un alto grado de insaturaciones dispone de muchos sitios activos para la oxidación, razón por la cual es importante realizar otro tipo de análisis químico como, la prueba de anisidina que permite establecer estados avanzados de oxidación; y que permite determinar con exactitud la estabilidad oxidativa del aceite (139).

7.4.3 Índice de saponificación.

En La tabla 11, se presenta el valor calculado del índice de saponificación para el aceite de semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) (175.1161 mg KOH/g). La desviación estándar calculada fue inferior a uno, indicando que los datos y el método son confiables y repetibles. Este parámetro representa la medida de los ácidos grasos libres y combinados que existen en la grasa y es directamente proporcional a su masa molecular media (140). De acuerdo a esto, el valor obtenido del índice de saponificación para el aceite de uva Isabella, indica que el aceite presenta ácidos grasos de bajo peso molecular o contiene una proporción muy pequeña de ácidos grasos de cadena corta, lo que se confirma más adelante con el análisis composicional de ácidos grasos por CG-EM (56). El índice de saponificación obtenido para el aceite de semillas de uva Isabella está por debajo de los rangos reportados por los índices de saponificación de los aceites de semilla de *Vitis vinífera*, 212 mg KOH/g (26) y los reportados por el ICONTEC para aceite de pepita de uva, 186-194 mg KOH/g (135).

7.4.4 Índice de yodo.

El índice de yodo obtenido para el aceite de semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) fue 136.6853, según el análisis estadístico de los datos, el resultado es confiable y reproducible (tabla 11), Según la clasificación de los aceites con base en el índice de yodo del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), se clasifica como secante (índice de yodo mayor a 120), clasificación en la que también se encuentra, el aceite de semillas de *Vitis vinífera* 124-143 (14).

De este valor se puede analizar que es un aceite con un alto grado de insaturaciones, El índice de yodo determina de forma indirecta el grado de insaturaciones indicando que el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) presentan alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Esto se corroboró con los resultados del análisis de ácidos grasos por CG-EM que se muestran más adelante. El índice de yodo del aceite de semilla de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) se encuentra dentro del rango establecido por normas internacionales, cuyos valores reportados para el aceite de semillas de *Vitis vinifera L.* son 136-143; 129-136; 124-138, reportados por otros estudios en Francia, Italia y España respectivamente (14).

7.5 ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LAS SEMILLA DE *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) POR CG-EM.

Para la separación y cuantificación de los ácidos grasos que componen el aceite de la semilla de uva Isabella, se empleó un estándar de 28 metil esterres (marca RESTEK, con código de catálogo 35078 de concentración de 30 mg/mL) (anexo 4). El modo de adquisición de datos fue SIM (monitoreo selectivo de iones), empleando las condiciones de análisis descritas por otros autores (125). El cromatograma obtenido se presenta en la figura 28, se observan varios picos que según sus espectros de masas (anexo 5), se hizo la identificación de los ácidos grasos descritos en la tabla 12, mediante la comparación de los tiempos de

retención del estándar empleado, y se llevo a cabo el análisis de los fragmentos de los ácidos grasos mayoritarios (tabla 13).

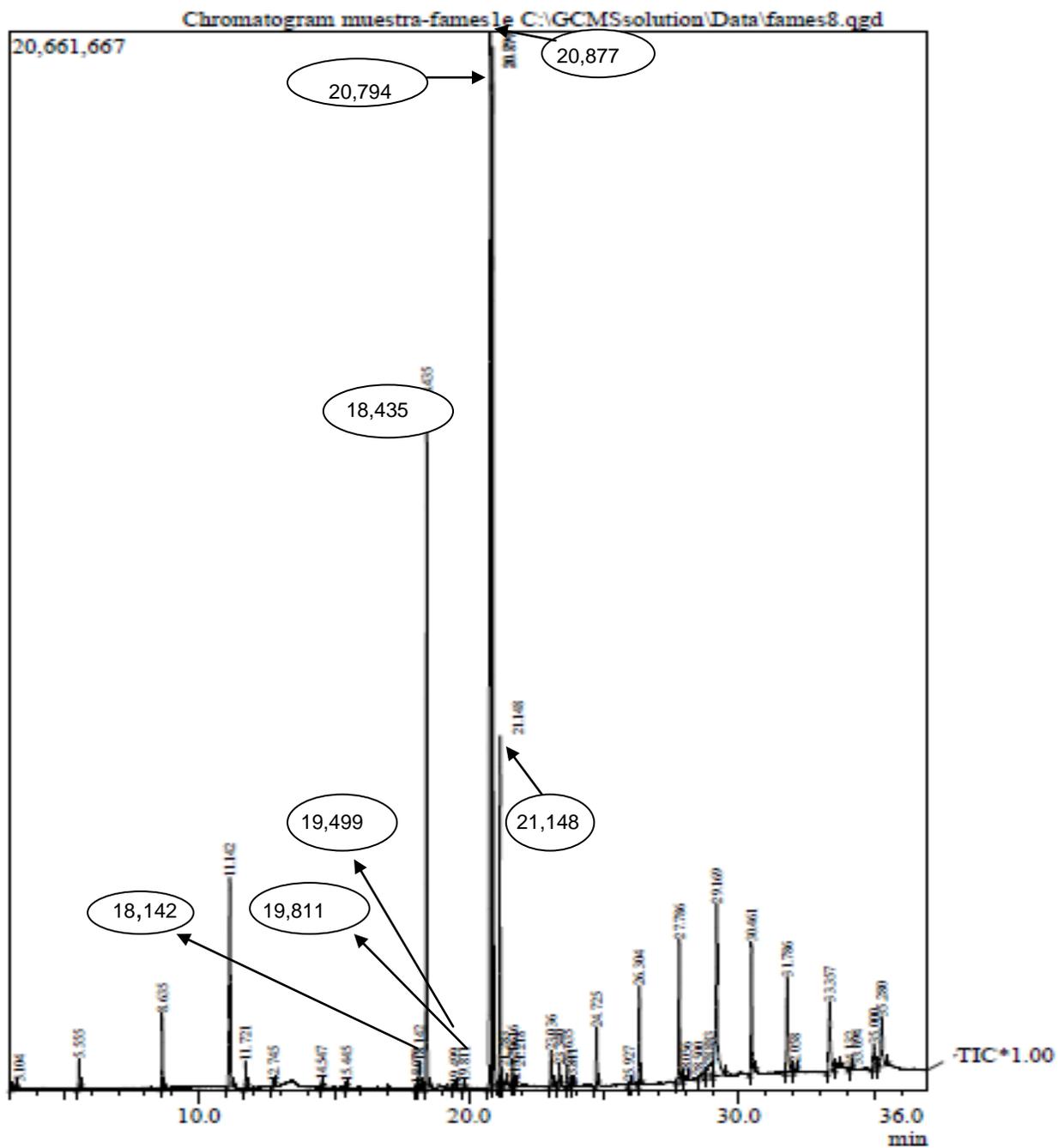
Con las condiciones cromatográficas empleadas, se logró la separación de 21 de los 28 componentes del estándar, y de estos compuestos se identificaron 7 en el aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), los ácidos grasos mayoritarios que componen el aceite de uva Isabella son el ácido linoleico conjugado (53,843%), el oleico (E) (24,671 %), y palmítico (13,922%), seguido de los ácidos esteárico (6,790%), palmitoleico (0,550%), margárico (0,123%) y linoléico (0,100%). La composición del aceite de las semillas *vitis labrusca L.* (uva Isabella) indica que más del 70% está constituido por ácidos grasos insaturados siendo el mayoritario el linoleico conjugado.

En todos los espectros de masas identificados, se puede apreciar que, para: el éster metílico del ácido linoleico conjugado identificado presenta un ion molecular m/z de 294 (ver anexo) y sus iones principales son m/z 81, 95 y 67 los cuales son fragmentos característicos de este compuesto; el m/z 81 indica la presencia de los dobles enlaces del compuesto. Los ésteres metílicos para el ácido palmítico ion molecular (m/z 270) y esteárico ion molecular (m/z 298); presentan pérdidas iguales de los fragmentos que se encuentran en mayor abundancia (m/z 74 y 87), diferenciándose en el ion molecular que representa la masa de cada uno de los compuestos.

Tabla 12. Composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (Uva Isabella)

Pico	Acido graso	N°de carbonos	Tiempo de retención	% de área
1	Acido linoleico conjugado	18:2	20,794	53,843
2	Acido linoleico	18:2	19,499	0,1004
3	Acido oleico E	18:1	20,877	24,671
4	Acido palmítico	16:0	18,435	13,922
5	Acido esteárico	18:0	21,148	6,790
6	Acido palmitoleico	16:1	18,142	0,550
7	Acido Margárico	17:0	19,811	0,123

Figura 28. Perfil Cromatográfico de los metilesteres de Ácidos Grasos presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).



El pico base de $m/z = 74$ en los ácidos saturados y presente en los insaturados según los principales fragmentos de la tabla 13, es el obtenido por el "reordenamiento de McLafferty", figura 29, que resulta de un estado de transición de 6 miembros por la transferencia de un hidrogeno y al grupo carboxilo. Y el segundo pico en importancia de $m/z = 87$ por una escisión o ruptura en la posición β de la cadena acílica, figura 30, (141, 142).

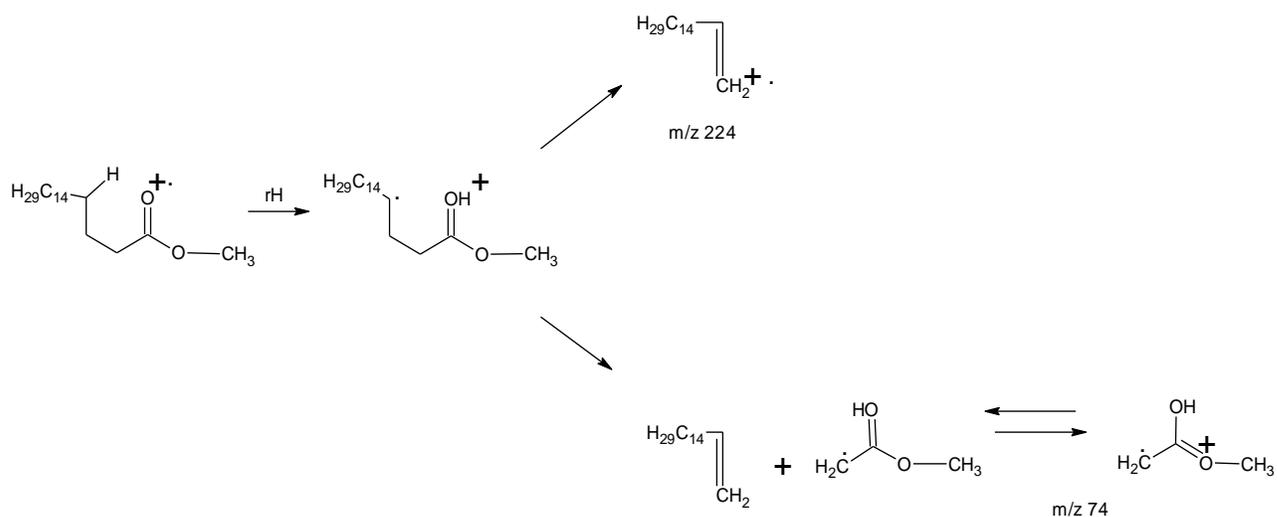


Figura 29. Reordenamiento de McLafferty resultando el ion $m/z = 74$.

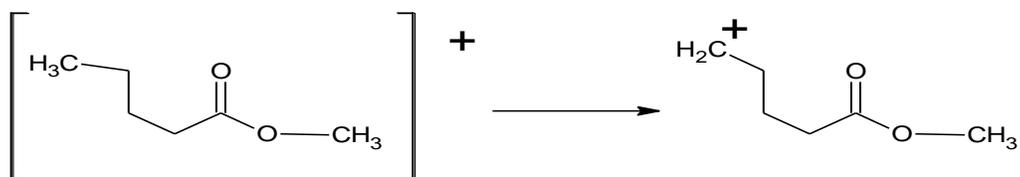


Figura 30. Obtención del fragmento $m/z = 87$ por escisión

Tabla 13. Porcentaje de abundancia y principales fragmentos de los ácidos grasos encontrados en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).

Fragmento	m/z	Porcentaje de Abundancia	Nombre
$\left[\text{HC}=\text{C}=\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \right]^+$	81	100%	Ácido linoleico conjugado
$\left[\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{CH}_2 \right]^+$	67	96%	
$\left[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \right]^+$	95	70%	
$\left[\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{CH} \right]^+$	67	100%	Ácido linoleico
$\left[\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{CH}_2 \right]^+$	55	99%	
$\left[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \right]^+$	81	96%	
$\left[\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \right]^+$	95	57%	
$\left[\text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{CH} \right]^+$	55	100%	

$\left[\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$ $\left[\text{H}_3\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]^+$	74	90%	Ácido oleico (E)
$\left[\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$ $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}=\text{CH} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$	74	100%	Ácido Palmítico
$\left[\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$ $\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}=\text{CH} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$	74	100%	Ácido Esteárico
$\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}=\text{CH} \\ \\ \text{OCH}_3 \end{array} \right]^+$	87	66%	

 	55	100%	Ácido Palmitoleico
	69	77%	
	74	64%	
 	74	100%	Ácido margárico
	87	66%	

Los espectros de masas de ácidos grasos insaturados son muy diferentes de sus análogos saturados, y también varían un poco según el grado de insaturación, esto se cree que es debido a la migración del doble enlace cuando se produce el ion molecular. La única excepción es para el isómero trans, que tiene un pico correspondiente a un $m/z = 111$, diferencia entre el ácido oléico y el eláidico que presentan el mismo patrón de fragmentación. Así mismo se ha afirmado que

existen iones específicos en el espectro de polienos, que son de gran ayuda para la identificación de ácidos poli insaturados, como para (n-3) un fragmento característico de $m/z=108$ con un 27-66% de abundancia en el ácido linoléico, y para (n-6) un ion importante es $m/z=150$ 9-30% de abundancia para el linoléico, (142, 143).

En comparación con datos reportados del contenido de ácidos grasos para algunos aceites de uso cosmético se encontró que el aceite de semilla de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) presenta similitud con estudios realizados internacionales para el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) C14:0 0,21%, C16:0 9,42%, C16:1n-9 0,32%, C17:0 0,0836%, C18:0 3,24%, C18:1n-9 16,91%, C18:1n-7 1,20%, C18:2n-6 58,91%. (12). Y también similares a los reportados por los ácidos grasos reportados por estudios realizados al aceite de diferentes variedades de *Vitis vinifera* L. Otros estudios han informado de valores tanto altos como bajos que se reportan en diferentes países: Tres variedades de aceites egipcios tenían valores altos de C16:0 (9.6 a 11.9%) y C18:1 (19,4 a 24,6%) y bajos de C18:2 (61,3-61,6%), Catorce variedades procedentes de Rumanía tenía valores generalmente bajos de C16:0 (5,9 a 0,3%) C18:0 (2.7-4.1%), C18:1 (10,7 a 16,0%) y valores altos de C18: 2 (71,1 a 76,1%) (4). Algunos autores han demostrado que los valores varían dependiendo del origen de la semilla y el método de extracción del aceite (26,18).

7.6 ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA MATERIA INSAPONIFICABLE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) POR CG-EM.

7.6.1 Descripción de la materia insaponificable.

La materia insaponificable presentó una coloración amarilla y aspecto sólido a temperatura ambiente (figura 31), además su olor se puede relacionar al del aceite obtenido de las semillas de la *vitis labrusca* L. (uva Isabella).



Figura 31. Materia Insaponificable

7.6.2 Cuantificación de la materia insaponificable.

En la tabla 14 se observan los resultados obtenidos para la cuantificación de la materia insaponificable, se aprecia que su contenido en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) es de 1,82%; de acuerdo a la desviación estándar obtenida se puede decir que los resultados son confiables y reproducibles. El porcentaje de materia insaponificable obtenido es inferior al reportado por otros autores para aceite de semilla de *Vitis vinífera* L., el cual es de 3,1% (26). El contenido de materia insaponificable la medida de la proporción de material orgánico disuelto por los glicéridos y ácidos grasos que en general conforman el 95% de casi todos los aceites. Los materiales orgánicos pueden ser impurezas como aceite mineral, o de origen natural como esteroides, tocoferoles, carotenoides o pigmentos (26).

Tabla 14. Cuantificación de la materia insaponificable.

Ensayo	Masa de aceite (g)	Masa materia insaponificable (g)	% materia insaponificable
1	5.0198	0.0949	1.8305
2	5.0245	0.0921	1.8330
3	5.0179	0.0907	1.8075
Rango superior		0.0949	1.8330
Rango inferior		0.0907	1.8075
Promedio		0.0926	1,8237
Desviación estándar		0.0021	0,0115

7.6.3 Análisis cualitativo de la fracción de fitoesteroles obtenida por separación en fase sólida.

Para establecer las mejores condiciones de separación de la fracción de fitoesteroles en fase sólida, se evaluaron dos sistemas de elución, posteriormente se usó como control cromatografía en capa delgada (CCD) con el fin de saber si la separación de los fitoesteroles se lograba o no.

7.6.3.1. Sistema 1. (Hexano: Acetato de Etilo 9:1)

Se eluyeron, la fracción 1 (F1) con 1.5mL de Hexano: Acetato de Etilo 9:1 y la fracción 2 (F2) con 2mL de Acetato de Etilo; para un volumen total de elución de 3.5mL.

Las fracciones 1 (F1) y 2 (F2) obtenidas de la separación en fase sólida se corrieron en una cromatoplaaca donde se observaron tres manchas definidas (anexo 6). Se observó una mancha de Rf 0.145, correspondiente al patrón de colesterol (fracción P), y en la fracción 2 (F2) se aprecian dos manchas, una de Rf 0.163 y la otra de Rf 0.272, lo que indica que en esta fracción se eluyeron los

esteroles; en la fracción 1(F1) se dio una limpieza de la muestra, por lo tanto en esta fracción no se observó la presencia de esteroles.

7.6.3.2. Sistema 2. (Hexano: Diclorometano 6:4)

Se eluyeron, la fracción 1 (F1) con 5mL de Hexano: Diclorometano 6:4 y la fracción 2 (F2) con 2mL de Diclorometano; para un volumen total de elución de 7mL. Este sistema se empleó con el fin de mejorar la separación obtenida con el sistema 1. Las fracciones 1 (F1) y 2 (F2) obtenidas de la separación en fase sólida se corrieron en una cromatoplaaca donde se observaron tres manchas definidas (Anexo 7). Se observó una mancha de Rf 0.145, correspondiente al patrón de colesterol (fracción P); en la fracción 1(F1) se dio una limpieza de la muestra, por lo tanto en esta fracción no se observó la presencia de esteroles; en la fracción 2 (F2) se aprecian dos manchas, una de Rf 0.164 y la otra de Rf 0.270, lo que indica que en esta fracción se eluyeron los esteroles.

Teniendo en cuenta el control realizado por cromatografía en capa delgada (CCD) para la separación en fase sólida, se observó que en la fracción 2 (F2) se eluyeron los esteroles. El sistema 2 no mejoró la separación del sistema 1, en ambos sistemas los resultados fueron similares, sin embargo la mejor separación se dio con el sistema 1 (Hexano: Acetato de Etilo 9:1). La fracción de fitoesteroles obtenida (F2) se derivatizó para su posterior análisis cromatográfico.

7.6.4 Análisis del derivado obtenido de la fracción de fitoesteroles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

De acuerdo con el análisis cromatográfico se observaron 14 compuestos de los cuales 4 se estimaron como fitoesteroles (tabla 15). Sin embargo, el cromatograma (Figura 32) no presentó una separación adecuada de todos los

componentes y se encontró, que muchos de ellos presentaron áreas por debajo de 1.5%, lo que no permitió su plena identificación. En el caso de los compuestos mayoritarios, la identificación preliminar de las estructuras se realizó inicialmente por comparación de sus espectros de masa con los reportados por la biblioteca del equipo, WILEY ACCESS PAC 7 ED y estas se confirmaron con el análisis de los principales fragmentos de sus espectros.

Sin embargo es de anotar que no fue posible obtener espectros con porcentajes mayores al 90% de similitud.

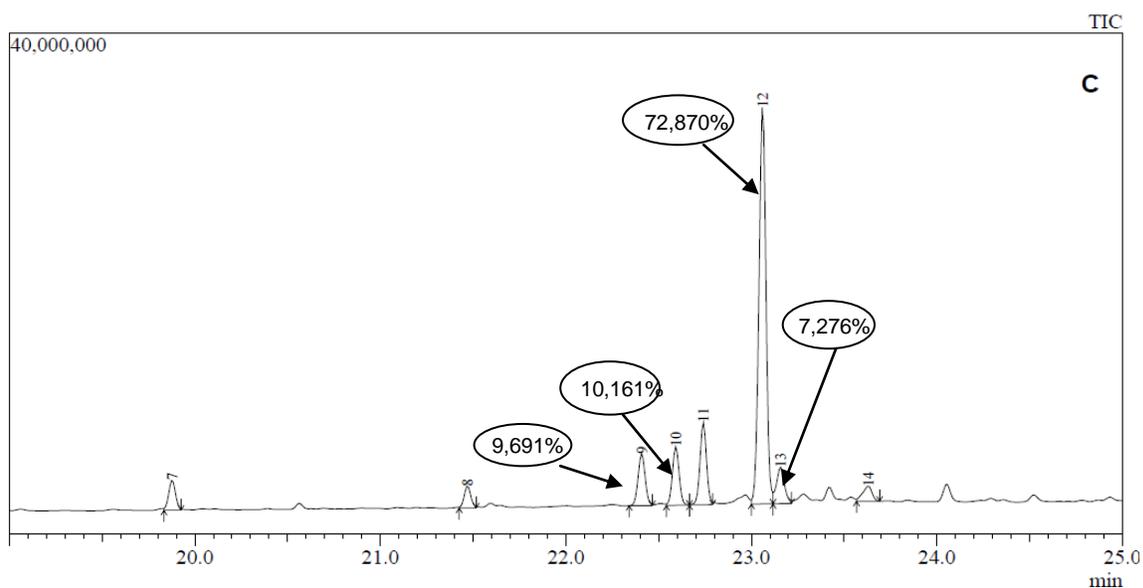


Figura 32. Cromatograma del análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción de fitoesteroides presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

Tabla 15. Análisis composicional por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de la fracción de fitoesteroles presentes en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

PICO	NOMBRE COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	AREA	% AREA
1	Beta-sitosterol	23.060	84259545	72,870%
2	Estigmasterol	22.592	11749445	10,161%
3	Campesterol	22.408	11206654	9,691%
4	Campestanol	23.157	8413415	7,276%

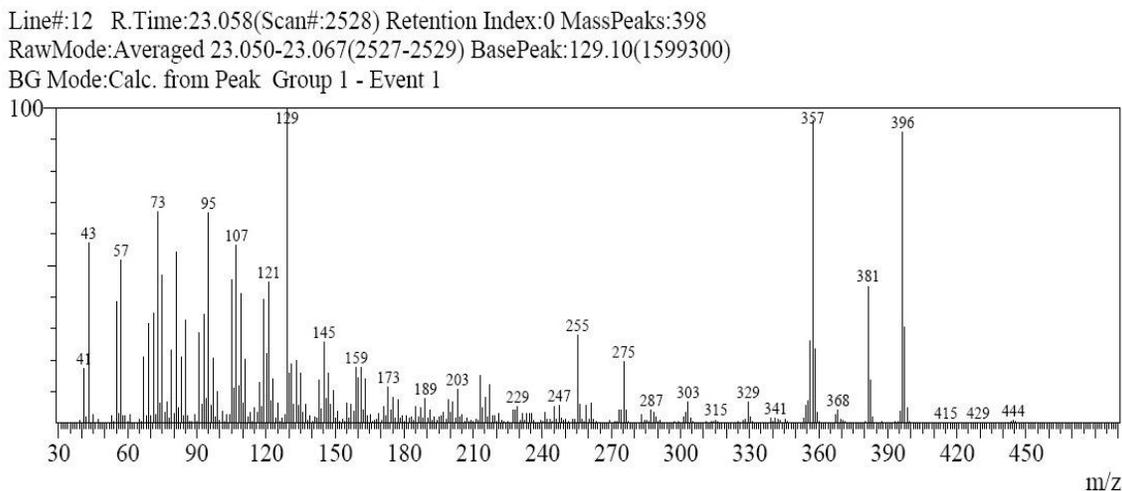
La identificación preliminar se hizo por comparación con los compuestos propuestos por la base de datos del equipo, WILEY ACCESS PAC 7 ED, teniendo en cuenta su porcentaje de similitud el cual fue del 79%. De los fitoesteroles identificados en la materia insaponificable, se encontró que el mayoritario es el Beta-sitosterol(tr23.060) con un área total del 72,87%.

Según su espectro de masas (figura 33) y (anexo 8), el ión molecular corresponde a $M+ 486$ consistente con la fórmula molecular $C_{32}H_{58}OSi$; el pico base fue el m/z 129 (100%).

Se presentó el fragmento característico de esteroides m/z 255(30%) atribuido a la pérdida de $C_{10}H_{21}$, m/z 145 (25%) por la pérdida de 341uma. Adicionalmente, se presentaron otros fragmentos importantes m/z 396 (95%) por pérdida desilanol $M-[Si(CH_3)_3-OH]$, m/z 95 (68%), m/z 57 (53%) y m/z 43 (58%) (131, 20, 132), las estructuras de estos fragmentos se muestran en la tabla 17 y se explican en la figura 33.

Otros autores han reportado una composición porcentual del 66.58% para β -sitosterol, por lo cual es el fitoesterol predominante en el aceite de las semillas de *Vitis vinífera L.* (21, 134).

Figura 33. Espectro de masas del Beta-sitosterol

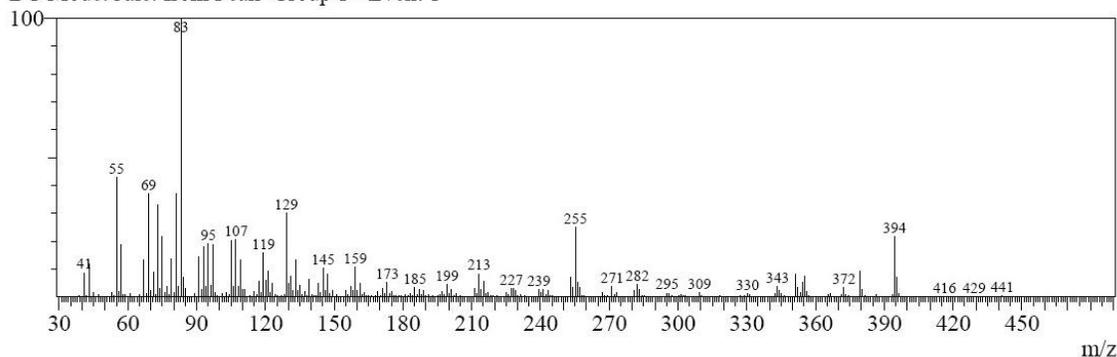


La identificación preliminar se hizo por comparación con la base de datos del equipo, WILEY ACCESS PAC 7 ED, teniendo en cuenta su porcentaje de similitud el cual fue del 88%. El compuesto con tiempo de retención 22.592 min y un área total del 10,16% corresponde al estigmasterol. En su espectro de masas (figura 34) y (anexo 8), se observó como ión molecular el correspondiente a $M+ 484$ consistente con la fórmula molecular $C_{32}H_{56}OSi$; el pico base fue el m/z 83 (100%). Como se aprecia en la tabla 16, se presentó el fragmento característico de esteroides m/z 255 (29%) atribuido a la pérdida de $C_{10}H_{19}$, m/z 394 (28%) por pérdida de silanol $M-[Si(CH_3)_3-OH]$, m/z 55 (43%), m/z 69 (37%) (144, 145, 147).

Estudios anteriores reportan una composición porcentual del 10,6% para el estigmasterol, razón por la cual es reportado como segundo fitoesterol en orden de importancia presente en el aceite de las semillas de *Vitis vinífera L.* (18, 148).

Figura 34. Espectro de masas del Estigmasterol

Line#:10 R. Time:22.592(Scan#:2472) Retention Index:0 MassPeaks:383
RawMode:Averaged 22.583-22.600(2471-2473) BasePeak:83.10(535475)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



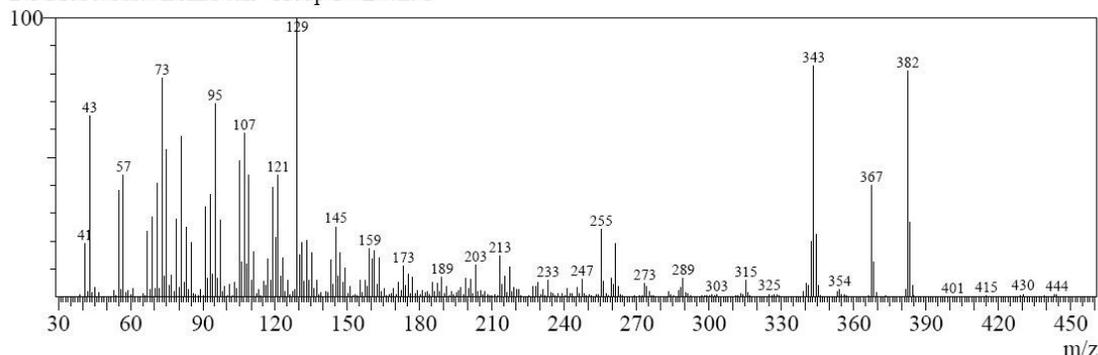
El compuesto con tiempo de retención 22.408 min, según la comparación con la base de datos del equipo, WILEY ACCESS PAC 7 ED teniendo en cuenta su porcentaje de similitud el cual fue de 77%, corresponde al Campesterol, con un área total de 9,69%. Como se muestra en (figura 35) y (anexo 8), el ión molecular corresponde a $M^+ 472$ consistente con la fórmula molecular $C_{31}H_{56}OSi$; el pico base fue el m/z 129 (100%).

El espectro presentó el fragmento característico de esteroides m/z 255(25%) atribuido a la pérdida de C_9H_{19} , m/z 382 (80%) por pérdida de silanolM-[$Si(CH_3)_3-OH$], m/z 95 (70%), m/z 57 (45%), m/z 43 (67%), m/z 107 (60%) y (144, 145, 146) las estructuras de estos fragmentos se muestran en la tabla 16.

Otros autores han reportado una composición porcentual del 9,3% para el campesterol, indicando que se encuentra en menor proporción en el aceite de las semillas de *Vitis vinifera L* (18, 148).

Figura 35. Espectro de masas del Campesterol

Line#:9 R.Time:22.408(Scan#:2450) Retention Index:0 MassPeaks:376
RawMode:Averaged 22.400-22.417(2449-2451) BasePeak:129.05(213711)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

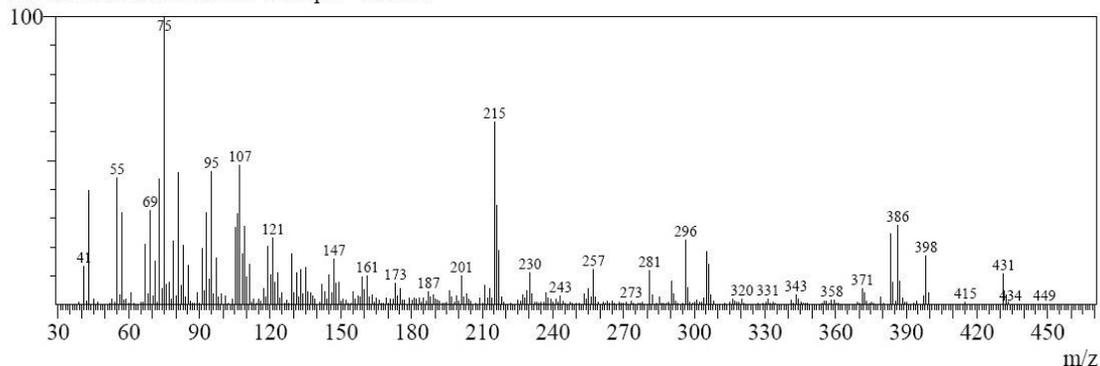


En menor proporción, se encontró el compuesto con tiempo de retención 23.157 min, con un área total del 7,28%, según la comparación con la base de datos del equipo, WILEY ACCESS PAC 7 ED teniendo en cuenta su porcentaje de similitud el cual fue de 77%, corresponde al Campestanol. Según su espectro de masas (figura 36) y (anexo 8), este compuesto presentó un ion molecular M^+ 474 consistente con la fórmula molecular $C_{31}H_{58}OSi$ y como pico base m/z 75 (100%). Se presentó el fragmento característico de los estanoles m/z 215 (65%) atribuido a la pérdida de $C_9H_{19}M$ -[ROH-Sc-42], m/z 384 (45%) por pérdida de silanol M -[$Si(CH_3)_3$ -OH], m/z 55 (43%), m/z 95 (45%) y m/z 107 (50%) (145, 146, 149) las estructuras de estos fragmentos se observan en la tabla 16.

Estudios anteriores han reportado una composición porcentual del 0.45% para el campestanol, indicando que se encuentra en menor proporción en el aceite de las semillas de *Vitis vinifera* L (18, 148).

Figura 36. Espectro de masas del Campestanol

Line#:13 R.Time:23.158(Scan#:2540) Retention Index:0 MassPeaks:371
RawMode:Averaged 23.150-23.167(2539-2541) BasePeak:75.00(162933)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



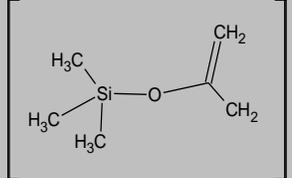
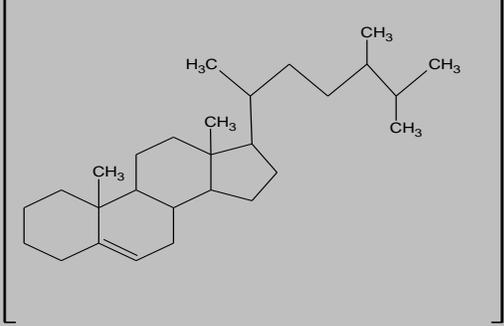
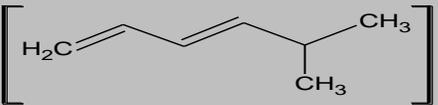
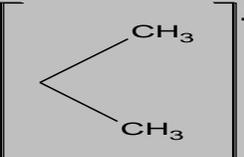
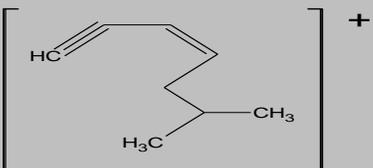
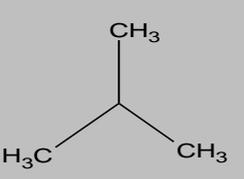
La extracción con solventes es muy efectiva ya que permite recuperar hasta un 90% del total de los fitoesteroles. Los solventes no polares tales como el hexano extraen cuantitativamente fitoesteroles libres. En general, las mezclas de fitoesteroles contienen un 40-58% de sitosterol, 20-30% de campesterol y 14-22% de estigmasterol (150).

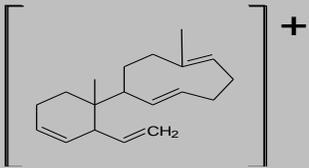
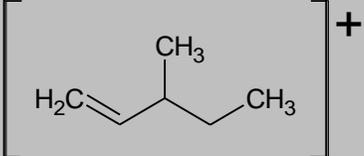
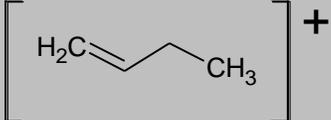
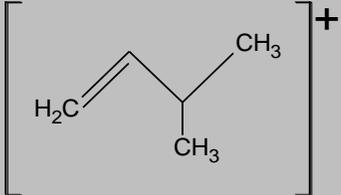
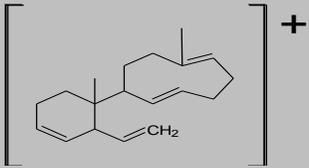
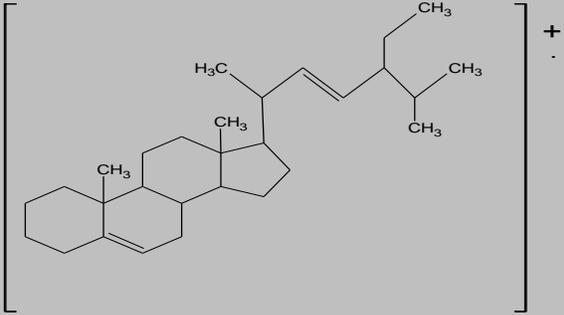
Los esteroides encontrados dentro de la materia insaponificable como el sitosterol y campesterol tienen importancia a nivel medicinal, puesto que estudios clínicos han mostrado que estos esteroides ofrecen protección contra las enfermedades cardiovasculares y reducen significativamente la concentración del colesterol de baja densidad (LDL), el cual es responsable particularmente de las enfermedades coronarias (150).

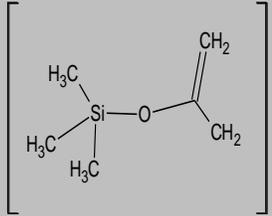
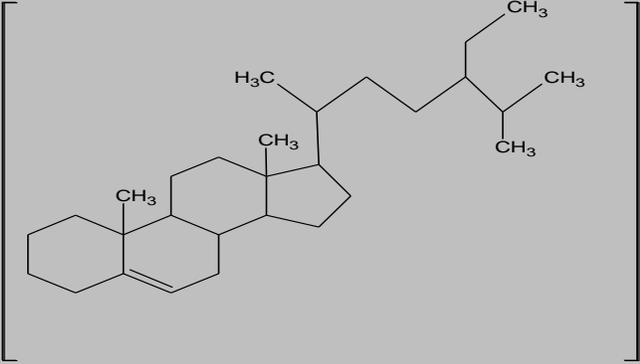
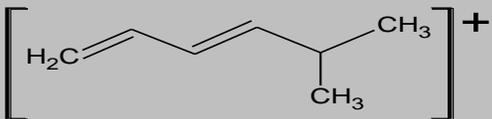
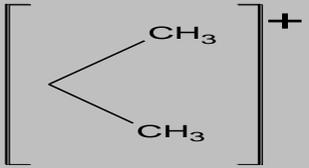
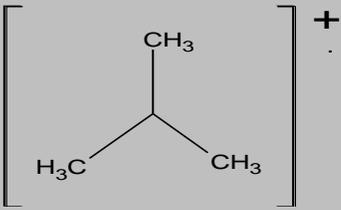
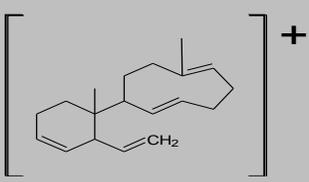
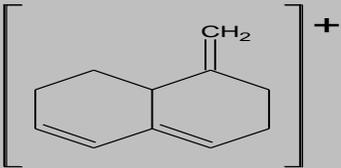
El estigmasterol se utiliza como un precursor en la fabricación sintética de la progesterona, una valiosa hormona humana que desempeña una importante función fisiológica en el tejido y la reconstrucción de los mecanismos relacionados con los estrógenos, actuando así como un intermediario en la biosíntesis de andrógenos, estrógenos, y corticoides (151).

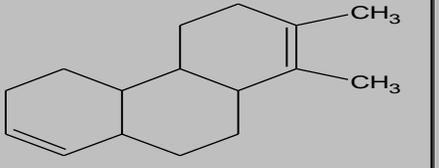
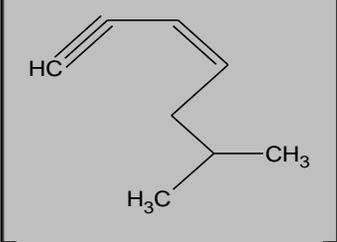
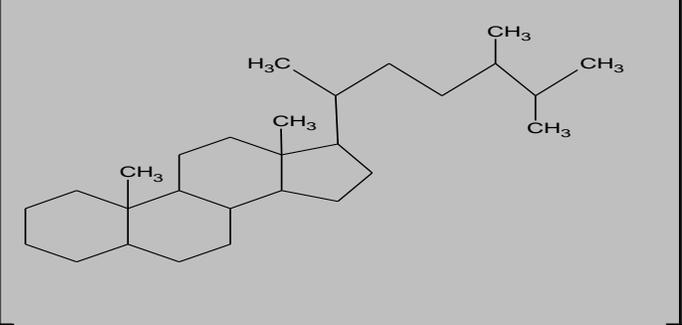
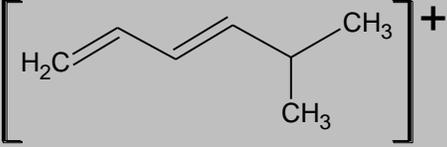
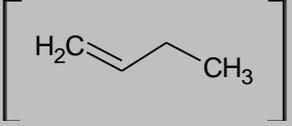
Por su parte los estanoles, se encuentran con menor frecuencia, siendo el producto de la hidrogenación de los respectivos esteroides: sitosterol (sitostanol), campesterol (campestanol) y estigmasterol (estigmastanol). La conversión de los esteroides a estanoles puede depender de los procedimientos de hidrogenación y el tipo de catalizador utilizado. Estudios han demostrado que los estanoles tienden a ser más eficaces en la reducción de los niveles de colesterol que los esteroides (152).

Tabla 16. Principales fragmentos de los fitoesteroles presentes en el aceite de semillas de *vitis labrusca* L. (uva Isabella).

Fragmentos	m/z	Porcentaje de Abundancia	Nombre
	129	100%	
	382	80%	
	95	70%	Campesterol
	43	67%	
	107	60%	
	57	45%	

	255	25%	
    	83	100%	Stigmasterol
	55	43%	
	69	37%	
	255	29%	
	394	28%	

	129	100%	
	396	95%	
	95	68%	
	43	58%	B-sistosterol
	57	53%	
	255	30%	
	145	25%	

$\left[\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{Si}=\text{OH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \right] +$	75	100%	
$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] +$ 	215	65%	
$\left[\begin{array}{c} \text{HC} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \right] +$ 	107	50%	
$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] +$ 	384	45%	
$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] +$ 	95	45%	
$\left[\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array} \right] +$ 	55	43%	Campestanol

7.7 ANÁLISIS DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES (Vitamina E) DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) POR CLAE.

En la tabla 17, se aprecian los resultados correspondientes al análisis de tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E) por CLAE para el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella), donde se reportan tres isómeros del tocoferol, siendo el mayoritario el $\beta+\gamma$ -tocóferol con una concentración de 78 ppm, y tres isómeros del tocotrienol, siendo el más importante el $\beta+\gamma$ -tocotrienol con una concentración de 283 ppm. En uno de los estudios realizados a la determinación de tocoferoles para el aceite de las semillas de uva se encontró la mezcla de isómeros $\beta+\gamma$ -tocóferol con una concentración de 17,14 mg/kg (167), pero no se encontró el $\beta+\gamma$ -tocotrienol, siendo la primera vez que se reporta para el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella), según la bibliografía consultada (14,26,37,153). Los isómeros γ y δ -tocóferol son más estables frente al proceso oxidativo, y los tocoferoles tienen potencial antioxidante mayor a los tocotrienoles (87).

Tabla 17. Resultados de cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles para el aceite de las semillas *Vitis labrusca* L. (uva Isabella)

Nombre:	Aceite de <i>Vitis Labrusca</i> L. (uva Isabella)	
Vitamina E, mg/kg (ppm)		
No.	Nombre	Promedio
1	δ -Tocotrienol	4
2	$\beta+\gamma$ -Tocotrienol	283
3	α -Tocotrienol	80
4	δ -Tocoferol	12
5	$\beta+\gamma$ -Tocoferol	78
6	α -Tocoferol	44
	Total vitamina E	500

El contenido total de vitamina E encontrado en el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) (500ppm) comparado con otros estudios realizados a aceites de semillas

de *Vitis vinifera* L. se encontró por debajo de los reportados por este 827,7; 853,8;997,7 ppm (13) y muy por encima a estudios realizados a las semillas de uva Isabella 10,74 ppm (37). Otros estudios realizados a diferentes variedades de uva, muestran que el contenido total de tocoferoles totales son: en Francia 127-706 ppm, en Italia 63-1208 ppm y España 240-542 ppm (151), encontrándose el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) dentro del rango reportado por España.

Estudios realizados sobre la estabilidad oxidativa de aceites de uva han demostrado que el aumento de la temperatura se encuentra directamente relacionado con el contenido inicial del tocoferol, es decir a medida que aumenta la temperatura disminuye el contenido en tocoferoles siendo el α -tocoferol el menos estable (154).

El mecanismo de acción antioxidante de la vitamina E consiste en la interrupción de las etapas de propagación y descomposición del proceso de autoxidación y en la reacción con el oxígeno singlete en el proceso de fotoxidación. En la autoxidación los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo originando un radical ariloxilo y un hidroperóxido. Los radicales ariloxilo resultantes se estabilizan por deslocalización electrónica de la estructura fenólica, reaccionando fácilmente con otros radicales peroxilo para formar productos estables, resultando poco probable que abstraigan átomos de hidrógeno de moléculas lipídicas intactas. (155)

La estabilidad oxidativa del aceite de las semillas de *Vitislabrusca* L. (uva Isabella) no depende solamente de la vitamina E que este pueda contener, dado que intervienen otros metabolitos secundarios que tienen propiedades antioxidantes en los que se encuentra enriquecido el aceite de uva como fitoesteroles y algunos fenoles.

El alto contenido de vitamina E hace que el aceite sea de gran interés para un potencial uso cosmético, donde se podría emplear para la elaboración de diversos

productos como cremas nutritivas, productos exfoliantes, tratamientos para el cabello, cremas hidratantes faciales y corporales con filtro protector contra los rayos UV, además de ser un posible aditivo para la complementación de otros aceites y productos (156, 157, 5).

La oxidación de los lípidos en la industria de alimentos sigue siendo un problema importante. Los aceites con un alto contenido de tocoferoles se pueden utilizar en aplicaciones donde se necesitan un alto nivel de protección antioxidante (15).

7.8 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE *Vitis labrusca* L. (uva Isabella)

7.8.1 Determinación de la actividad antioxidante del control positivo Vitamina E (α -tocoferol).

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante del α -tocoferol por el método del DPPH, se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Actividad antioxidante de la Vitamina E frente al DPPH.

Concentración Vitamina E (ppm)	Absorbancia			% Inhibición			Prom %I	Desviación estándar
	A 1	A 2	A 3	%I 1	%I 2	%I 3		
100	0.774	0.772	0.773	5.01	5.3	5.1	5.1	0.1484
250	0.694	0.695	0.693	14.88	14.86	14.85	14.86	0.0153
500	0.582	0.583	0.584	28.53	28.56	28.54	28.54	0.0153
750	0.463	0.462	0.463	43.18	43.23	43.22	43.21	0.0265
1000	0.359	0.359	0.360	55.90	55.91	55.86	55.89	0.0265

1500	0.145	0.144	0.146	82.21	82.25	82.23	82.24	0.0200
2000	0.011	0.012	0.013	98.61	98.55	98.57	98.58	0.0306

La capacidad captadora de radicales libres (capacidad de decoloración) se determinó empleando el parámetro del IC₅₀, cuyos resultados corresponden al % de inhibición que se muestra en la tabla 19. Cada muestra se hizo por triplicado con el fin de obtener una mayor correlación de los datos.

Los valores encontrados, expresados en %IC₅₀, variaron entre máximos y mínimos de 98,58% y 5,10% para los ensayos con Vitamina E (α-tocoferol).

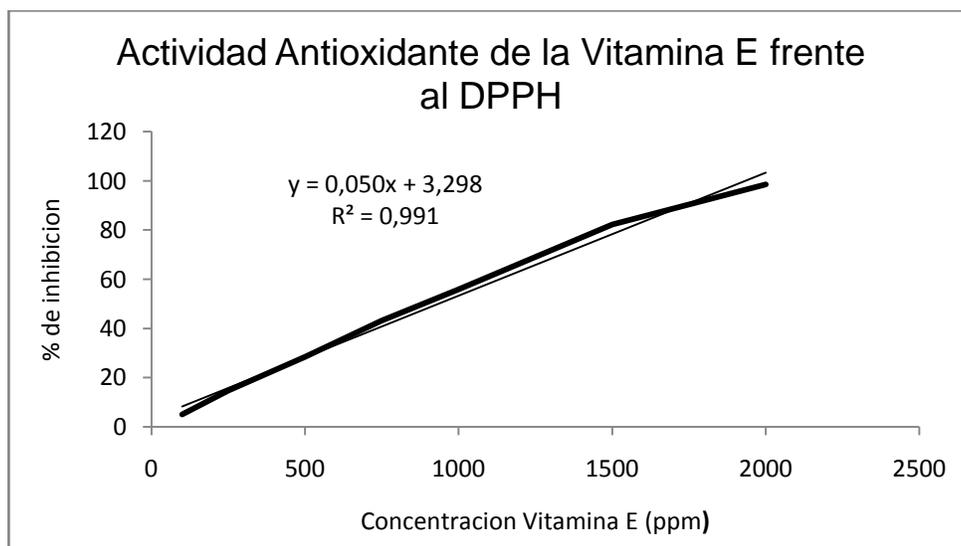


Figura 37. Actividad antioxidante de la vitamina E frente al DPPH

Como se observa en la grafica de actividad antioxidante de la vitamina E frente al DPPH (Figura 37), el rango de linealidad se encuentra entre 100 y 1500 ppm de vitamina E, con un coeficiente de correlación de 0.9914, indicando que la vitamina E es un buen control en ese rango. La concentración de DPPH que reaccionó al inhibir el radical en un 50% corresponde a 932,2 ppm.

7.8.2 Determinación de la actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella)

En la tabla 19 se presentan los resultados de la actividad antioxidante del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* Los valores encontrados, expresados en %IC₅₀, varían entre máximos y mínimos de 92,88% y 2,63%, estos datos se encuentran en similitud con los resultados del control positivo vitamina E, dando a conocer que el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) es un buen control como antioxidante.

Tabla 19. Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) frente al DPPH.

Concentración Muestra de aceite de (uva Isabella) (ppm)	Absorbancia			% Inhibición			Prom %I	Desviación estándar
	A 1	A 2	A 3	%I 1	%I 2	%I 3		
100	0.794	0.793	0.795	2.62	2.66	2.60	2.63	0.0306
250	0.735	0.734	0.736	9.84	9.90	9.86	9.87	0.0306
500	0.641	0.642	0.641	21.38	21.36	21.32	21.35	0.0306
750	0.544	0.543	0.544	33.28	33.30	33.25	33.27	0.0252
1000	0.420	0.421	0.423	48.43	48.38	48.41	48.40	0.0252
1500	0.214	0.213	0.215	73.70	73.72	73.67	73.69	0.0252
2000	0.058	0.058	0.057	92.87	92.85	92.91	92.88	0.0306

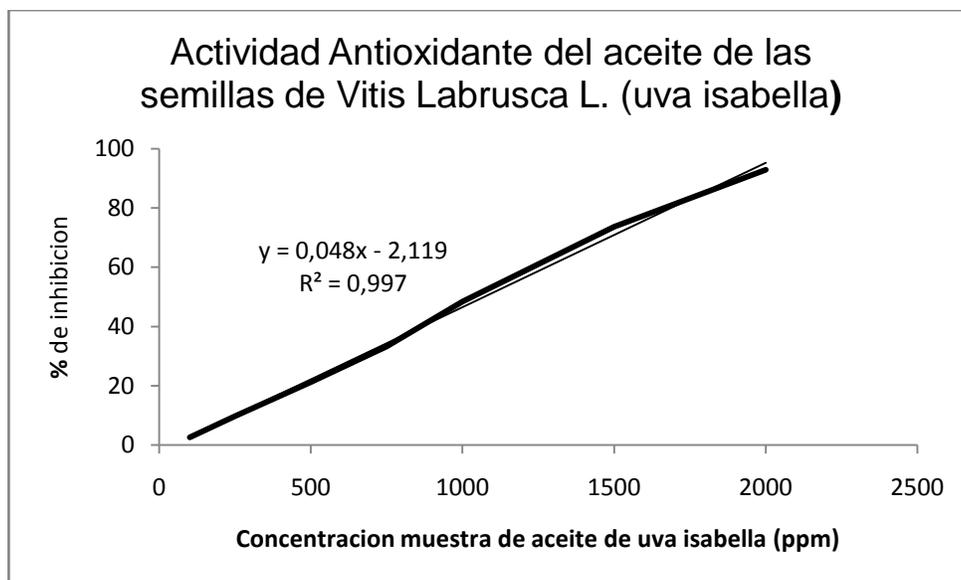


Figura 38. Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* (uva Isabella) frente al DPPH.

Como se aprecia en la grafica de actividad antioxidante del aceite de *Vitis labrusca L.* frente al DPPH (figura 38), el rango de linealidad se encuentra aproximadamente entre 100 y 2000 ppm, con un coeficiente de correlación de 0.9972, indicando que el aceite de *Vitis labrusca L.* puede comportarse como un buen antioxidante, de manera similar al α -tocoferol (vitamina E). La concentración de DPPH por el parámetro del %IC50 es igual a 1070,2 ppm, comparado con estudios realizados al aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) con concentraciones de 2694 ppm se encuentra por debajo de este, y con otro estudio realizado al aceite de las semillas de uva Isabela se encuentra muy por debajo 234,53 ppm. La composición de la muestra afecta la ubicación del antioxidante en el medio de reacción y por lo tanto su eficiencia en el método dado.

En la figura 39, se observa que el aceite de *Vitis labrusca L.* se encontró por encima del 50% de inhibición, lo que indica que el aceite presentó buena actividad antioxidante comparada con la actividad de la Vitamina E.

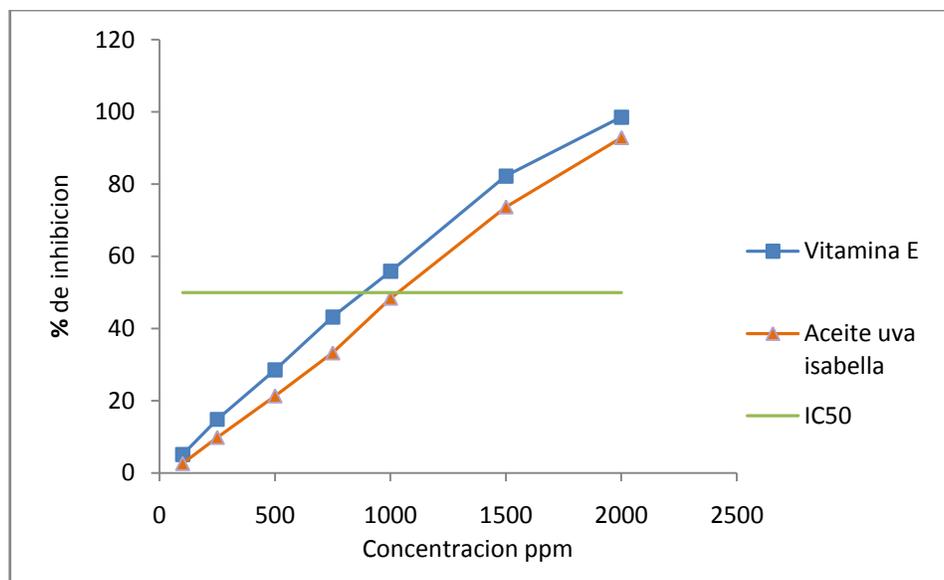


Figura 39. Actividad antioxidante del aceite de *Vitis Labrusca L.* y Vitamina E por el parámetro del %IC₅₀

La actividad antioxidante es dependiente de la concentración de la muestra, concentra en cantidad considerable principalmente taninos condensados, por lo que los valores de capacidad antioxidante serían fuertemente influenciados por la presencia de estos compuestos (159, 160), además contienen, varios antioxidantes aparte de los polifenoles, como los esteroides y los tocoferoles, los cuales pueden influir también en el nivel de actividad antioxidante (161). Debido a esto, por debajo de 100 ppm la actividad de los compuestos antioxidantes es muy baja, por lo que no alcanza a reaccionar con el radical del DPPH. Por otro lado, se puede llegar a una concentración elevada de este agente hasta un punto en el que la reacción aparentemente se detiene, mostrando una actividad prácticamente constante.

Para mostrar la inhibición de la muestra, se utilizó la concentración del IC₅₀ del control positivo, en este caso, la vitamina E (932,2 ppm). Sustituyendo esta concentración en la ecuación que denota la relación lineal entre el porcentaje de inhibición contra la concentración de la muestra, se halló el porcentaje de inhibición para la muestra (Figura 40).

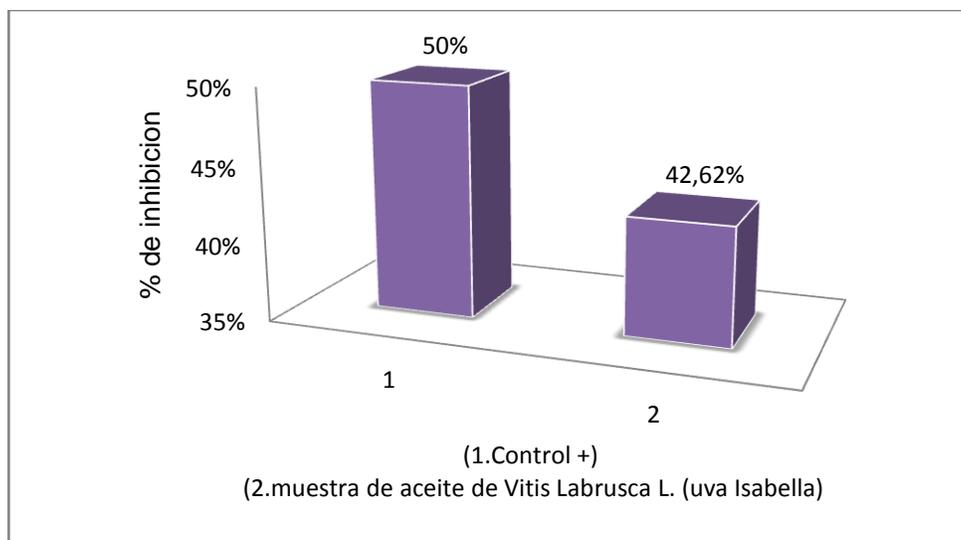


Figura 40. Porcentaje de inhibición del DPPH de la muestra de aceite de las semillas de Vitis Labrusca L. (uva Isabella) a la concentración según IC50 de la Vitamina E (932,2 ppm)

La figura 40, indica que la muestra de aceite tiene un porcentaje de inhibición (42,62%). Este porcentaje se encuentra cercano al 50 % de inhibición, por lo que se pudo deducir que la muestra de aceite de semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) presenta buena actividad antioxidante, referente al control positivo y a otros estudios realizados a la *Vitis labrusca L.* como a diferentes variedades de uva (5,16, 30, 11, 162, 163).

7.9 SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD

7.9.1 SEGUIMIENTO DE ESTABILIDAD DEL ACEITE

Mediante el análisis periódico del índice de acidez y peróxidos, se hizo el seguimiento de estabilidad del aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella).

En la tabla 20, se presenta el porcentaje de ácidos grasos libres calculado para el aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) durante 2 meses de evaluación, partiendo de un índice de acidez de 2.1870% hasta 4.0879% expresado en porcentaje de

ácido oleico. El análisis de la curva (Ver figura 41), muestra que el aceite recién obtenido ya no cumplía con el valor de acidez reportado por la norma ICONTEC, cuyo valor es de 0,1 % de ácido oleico (135). El valor del índice de acidez para el aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) fue de 2,1870% de ácido oleico, el cual se encuentra superior al nivel exigido por la norma ICONTEC para aceite de semillas de *Vitis vinífera L.*

Innumerables factores determinan la estabilidad de un aceite, destacando la composición química y las condiciones de manejo, almacenamiento y procesamiento de las materias primas (164).

El aceite de la semilla de uva se oxida fácilmente debido al contenido de ácidos grasos insaturados y poli insaturados (3). La temperatura y presencia de luz fueron controladas durante el proceso de extracción y almacenamiento del aceite; es probable que la humedad presente en la materia prima, la cual era un residuo constituido por semillas y restos de pulpa, incidiera en el aumento de la acidez debido a que la humedad se relaciona con la producción de enzimas lipolíticas que afecta a los ésteres de glicerol y lleva a la formación de ácidos grasos libres (165). Esta rancidez puede ser de tipo hidrolítica, y es la que resulta de la hidrólisis de los triacilgliceroles en presencia de lipasas y humedad (164). El efecto más notable de la alteración de las semillas se observa en la hidrólisis del aceite, para dar contenidos elevados de ácidos grasos libres, aunque este efecto no es el único que produce resultados perjudiciales. La degradación de los constituyentes no glicéridos de las semillas produce invariablemente materias coloreadas liposolubles que oscurecen el aceite, disminuyendo la estabilidad del color. Cuando la estabilidad del aceite es alterada se dificulta la manipulación de las semillas, conduciendo a rendimientos muy bajos e incluso una destrucción total del aceite (132). Tanto los tocoferoles como los tocotrienoles funcionan como antioxidantes evitando la oxidación de lípidos presentes (5). El mecanismo de acción antioxidante consiste en la interrupción de las etapas de propagación y descomposición del proceso de autoxidación. En la autoxidación los tocoferoles

interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo originando un radical ariloxilo y un hidroperóxido (5,155).

Cabe resaltar que el aceite de *Vitis labrusca L.* empleado para el seguimiento, era un aceite no refinado y que es este proceso el que permite eliminar los ácidos grasos libres presentes en el aceite con el fin de evitar la rancidez del mismo (3).

Tabla 20. Datos obtenidos del índice de acidez para el aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) en el tiempo.

Semana	Índice de acidez (% ácido oleico)	Rango superior	Rango inferior	Promedio	Desviación estándar
0	2.1768	2.2061	2.1768	2.1870	0.0135
	2.2061				
	2.1781				
1	2.0936	2.2619	2.0936	2.1630	0.0718
	2.2619				
	2.1336				
2	2.3213	2.3213	2.2070	2.2803	0.0519
	2.3125				
	2.2070				
3	2.5540	2.6546	2.5540	2.5883	0.04687
	2.5564				
	2.6546				
4	2.6639	2.6639	2.6573	2.6653	0.0071
	2.6573				
	2.6746				

5	2.7168	2.7711	2.7168	2.7413	0.0225
	2.7360				
	2.7711				
6	2.8363	2.9190	2.8363	2.8786	0.0338
	2.8804				
	2.9190				
7	2.9054	2.9751	2.9041	2.9282	0.0332
	2.9041				
	2.9751				
8	3.3733	3.3733	3.3039	3.3719	0.0550
	3.4385				
	3.3039				
9	4.0927	4.0927	4.0816	4.0879	0.0047
	4.0895				
	4.0816				

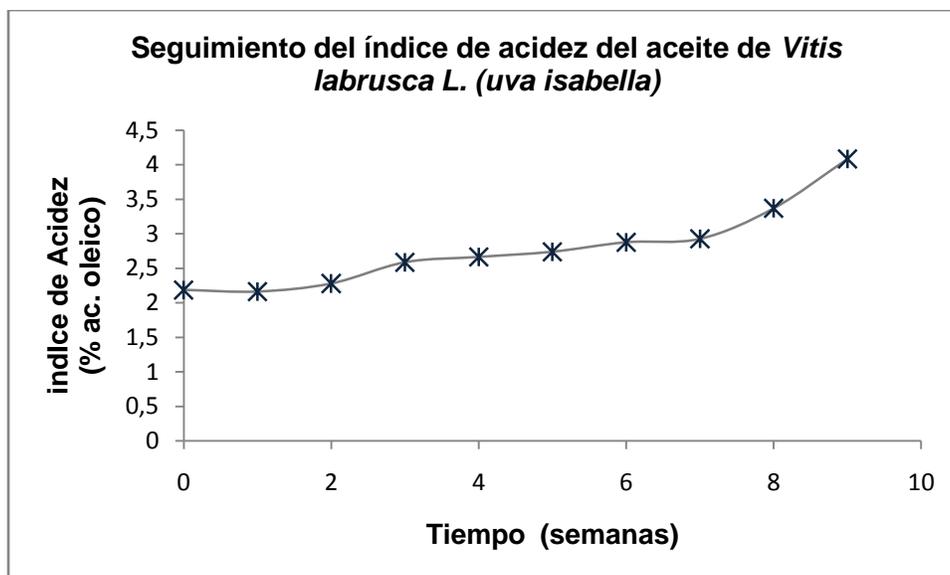


Figura 41. Seguimiento del índice de acidez del aceite de *Vitis labrusca* L. (uva isabella)

En la tabla 21, se presenta el índice de peróxidos obtenido para el aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) durante 2 meses de evaluación, partiendo de un índice de peróxidos de 0 hasta 19.5643 expresado como meq de O₂/kg; De acuerdo al rango reportado por la norma ICONTEC para aceite de semilla de *vitis vinífera*, cuyo rango de índice de peróxidos es de 1 meq de O₂/kg para aceite refinado y 5 meq de O₂/kg para aceite virgen (135), los resultados obtenidos muestran valores inferiores al rango permitido en el aceite fresco hasta la cuarta semana después de su extracción, mientras que en la quinta semana se observa un incremento considerable y una variación en el índice de peróxidos, mostrando valores superiores a los reportados. El análisis de la curva (Ver figura 42) muestra inicialmente la ausencia de peróxidos en el aceite fresco continuando así hasta la cuarta semana, a lo largo del seguimiento se observó que la curva tiene una tendencia de crecimiento a partir de la quinta semana y en la sexta semana el índice de peróxidos alcanza un valor máximo de 35.3842 meq de O₂/kg; sin embargo en la séptima semana se produjo un descenso en 21.7366 meq de O₂/kg, pero luego hay un comportamiento fluctuante que alcanza un valor máximo

de 34.8416 meq de O₂/kg en la octava semana y nuevamente un descenso de 19.5643 meq de O₂/kg en la novena semana en la cual finaliza el seguimiento.

El comportamiento observado demuestra que una vez agotados los antioxidantes presentes en el aceite, se produce un aumento de los peróxidos debido a que el aceite sufre un acelerado proceso de degradación oxidativo. La rancidez oxidativa es sin duda la principal causa del deterioro de aceites y grasas y define la vida de almacenamiento de este tipo de productos. Por lo tanto, la estabilidad viene a ser uno de los principales criterios de calidad en aceites y grasas (164). La rancidez oxidativa puede ser producto de la autooxidación por radicales libres, fotooxidación y oxidación enzimática catalizada por lipoxigenasa, destruyendo los ácidos grasos esenciales y produciendo compuestos tóxicos (164). La rancidez oxidativa ocurre por la reacción del oxígeno atmosférico con los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados. Esta reacción genera los productos primarios de la oxidación (peróxidos e hidroperóxidos), los cuales por una serie de reacciones paralelas producen los compuestos secundarios de la reacción, sean estos volátiles, como aldehídos, cetonas y ácidos, o no volátiles como dímeros, trímeros y polímeros, característicos de productos rancificados (164). La reacción es iniciada por iones metálicos o por energía térmica o luminosa, produciendo los primeros radicales libres; la producción y almacenamiento a bajas temperaturas y la protección contra la luz, retardarían la formación de los radicales libres y el apareamiento de la rancidez, aumentando la estabilidad o vida útil de los aceites (164).

El aceite de uva, debido al alto porcentaje de ácidos grasos insaturados presenta una gran tendencia a formar radicales libres, estos radicales reaccionan con el oxígeno y forman gran cantidad de peróxidos lipídicos, estos peróxidos se rompen en varias etapas formando una amplia variedad de productos de descomposición, dichos productos son los responsables del enranciamiento de los aceites (3).

Debido a este proceso de degradación oxidativa, se ha considerado al escaldado, como la etapa principal para la inactivación enzimática, generalmente su optimización está en función del tipo de enzima a inactivar y los atributos que se

deben mantener; también depende de la combinación de tiempo y temperatura que se aplique. El proceso de escaldado es sugerido por otros autores para disminuir la actividad de enzimas oxidativas, y de esta manera retardar la oxidación de los ácidos grasos (166).

Tabla 21. Datos obtenidos del índice de peróxidos para el aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) en el tiempo.

Semana	Índice de peróxidos (meq de O ₂ /kg)	Rango superior	Rango inferior	Promedio	Desviación estándar
0	0	0	0	0	0
	0				
	0				
1	0	0	0	0	0
	0				
	0				
2	0	0	0	0	0
	0				
	0				
3	0	0	0	0	0
	0				
	0				
4	0	0	0	0	0
	0				
	0				

5	23.3145	23.3145	23.1660	23.2635	0.0690
	23.1660				
	23.3100				
6	35.3912	35.3912	35.3773	35.3842	0.0057
	35.3773				
	35.3842				
7	21.6237	21.8427	21.6237	21.7366	0.0895
	21.8427				
	21.7434				
8	35.0603	35.0603	34.6820	34.8416	0.1309
	34.6820				
	34.7826				
9	19.5694	19.5694	19.5579	19.5643	0.0048
	19.5579				
	19.5656				

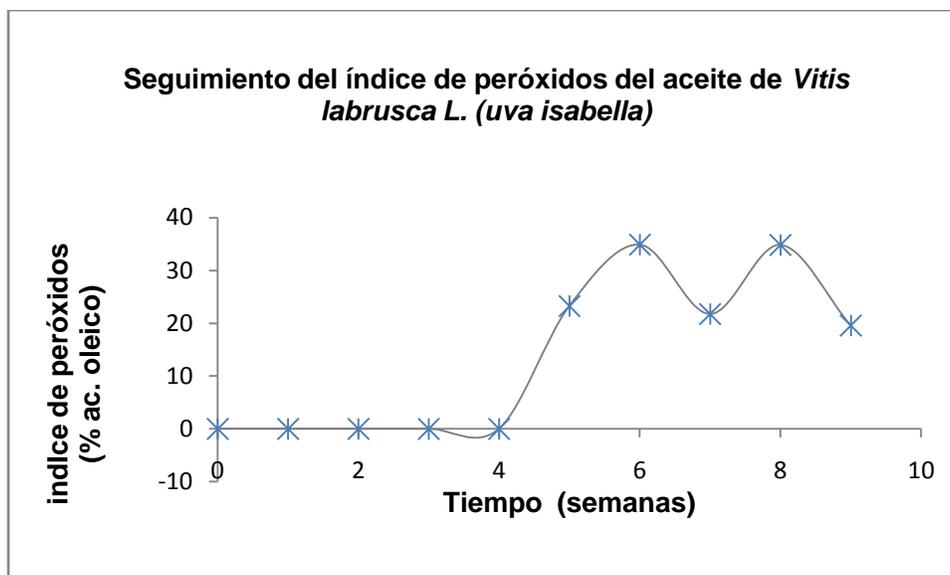


Figura 42. Seguimiento del índice de peróxidos del aceite de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella)

7.10 Comparación de las propiedades físicas y químicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) con las propiedades del aceite de semillas de *Vitis vinífera* L.

La inmensa producción de residuos que genera la actividad normal del hombre sobre nuestro planeta es uno de los principales problemas a los que nos enfrentamos en la actualidad. Estos residuos provocan una progresiva degradación de nuestro entorno que puede llegar a ser, en algunos casos, irreversible. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de procesos que permitan la eliminación controlada de los mismos. Algunos de estos residuos, sobre todo los procedentes de las industrias agroalimentarias, no deberían ser eliminados sin más, ya que podrían ser utilizados para diversas aplicaciones, obteniéndose una interesante rentabilidad económica. De esta forma, se conseguiría que un residuo se convirtiera en un subproducto (5).

Por esta razón, se plantea la búsqueda de alternativas de estos residuos y no sólo su eliminación efectiva e inocua, debido a que esta posibilidad, además de evitar trastornos medioambientales, crearía nuevas fuentes de riqueza que aportarían una mayor rentabilidad al proceso industrial de partida. Dentro de los

subproductos industriales generados en la comunidad está el procedente de la industria del vino y el de las despulpadoras, el orujo de uva, constituido por restos de raspón, piel y semillas de uva (5).

Se realizó la comparación de las propiedades físicas y químicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella) con las propiedades del aceite de semillas de *Vitis vinífera* L. (tablas 22,23), donde los resultados mostraron que la concentración de aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. fue de 9,6190% mientras que en el aceite de *Vitisvinifera* L. la concentración varió entre 12,35 y 16,00%. La densidad promedio para el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. fue de 0,9246 g/cm³, y para el aceite de las semillas de *Vitis vinifera* L. oscilo entre 0,9223-0,926 g/cm³. El índice de refracción de las semillas de *Vitis labrusca* L. se reporto a 1,475 mientras que los de semilla de *Vitis vinifera* L. oscilaron entre 1,473-1,477. Los valores del contenido en los distintos ácidos grasos analizados se han encuadrado dentro de los intervalos exigidos por la Reglamentación Técnico - Sanitaria de los aceites vegetales comestibles para la semilla tanto de *Vitis labrusca* L. como de *Vitisvinifera* L. (palmítico 5-10%; esteárico 3-5%; oleico 12-26%; linoleico 58-77%). El β + γ tocotrienol fue el tocotrienol más abundante en el aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. Aunque también se encontraron α y δ -tocotrienol a bajas concentraciones, no se detectó la presencia de β -tocotrienol. Los extractos de aceite de las semillas de *Vitisvinifera* L., mostraron el contenido de γ -tocotrienol más alto comparado con las semillas en diferentes variedades. Los fitoesteroles encontrados fueron similares tanto para *Vitis labrusca* L. como para *Vitis vinífera* L. (14, 26, 154, 155, 5, 16).

De acuerdo a esto el aceite de semilla de *Vitis labrusca* L. tiene propiedades similares al aceite de semilla de *Vitis vinífera* L. Las cáscaras y semillas son un desecho aprovechable de la uva que se obtiene del proceso de despulpado del fruto. Una vía alternativa de aprovechamiento industrial del aceite contenido en las semillas de *Vitis vinífera* L. es su uso para obtener antioxidantes naturales y aceites vegetales tanto para uso comestible como para uso cosmético (14).

Entre sus componentes, existen compuestos antioxidantes que pueden servir, utilizando estas cáscaras y semillas desecadas y trituradas, como materia prima base para el preparado de alimentos semi-procesados, como mermeladas, harina, fibra dietaria, entre otros (20,132).

Estudios han demostrado que el aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* y *Vitis vinífera L.* es una fuente potencial de nutrientes, ácidos grasos y compuestos fenólicos. Las diferentes partes de la uva: piel, pulpa y semillas, así como el aceite extraído de las mismas, se utilizan como fuentes de antioxidantes en la industria, son utilizados como nutracéuticos y además proporcionan información importante sobre la producción de vino en la industria (20, 132).

Tabla 22. Cuadro comparativo de las propiedades físicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) y las propiedades reportadas por otros autores para el aceite de semillas de *Vitis vinífera L.*

Propiedades físicas	<i>Vitis labrusca L.</i> (uva Isabella)	<i>Vitis vinífera L.</i> (reportados para Diferentes variedades)
Densidad	0,9246 (g/cm ³)	0,923-0,926 (g/cm ³)
Índice de Refracción	1,4753 a 23°C	1,473-1,477

Tabla 23. Cuadro comparativo de las propiedades Químicas del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) y las propiedades reportadas por otros autores para el aceite de semillas de *Vitis vinífera L.*

Propiedades químicas	<i>Vitis labrusca L.</i> (uva Isabella)	<i>Vitis vinífera L.</i> (reportados para diferentes variedades)
Índice de acidez	2,1870 (% ácido oleico)	0,2- 1,20(% ácido oleico)
Índice de peróxidos	0 (meq de O ₂ /kg)	0-10(meq de O ₂ /kg)
Índice de yodo	136,6853	130-138
Índice de saponificación	175,1161 (mg KOH/g)	186-194(mg KOH/g)
Ácidos grasos	Acido linoleico conjugado (53,843%), Acido Oleico (E) (24,671 %), Acido palmítico (13,922 %). Acido esteárico (6,790%) Acido palmitoleico (0,550%) Acido margárico (0,123%)	Acido Mirístico (0,08%) Acido Palmítico (8,47%) Acido Esteárico (4,60%) Acido Oleico (24,88%) Acido Linoleico (60,94%) Acido Linolénico (0,46%) Acido Araquídico (0,15%)

fitoesteroles	<p>Campesterol (9,691%), Estigmasterol (10,161%), Campestanol (7,276%) β-sitosterol (72,870%).</p>	<p>Brasicasterol (0,2%) Campesterol (10,2%) Estigmasterol (10,9%) β-sitosterol (67,4%) δ-5-avenasterol (3,0%) δ-7-estigmasterol (1,2%) δ-7-avenasterol (0,7%)</p>
Contenido de tocoferoles y tocotrienoles	<p>δ-Tocotrienol, (4) β+γ-Tocotrienol, (283) α-Tocotrienol, (80) δ-Tocoferol, (12) β+γ-Tocoferol, (78) α-Tocoferol, (44)</p>	<p>δ-Tocotrienol,(16,8) γ-Tocotrienol,(482,5) α-Tocotrienol,(215,7) δ-Tocoferol, (nd) γ-Tocoferol, (16,8) β-Tocoferol, (48,4) α-Tocoferol, (47,3)</p>

CONCLUSIONES

- De acuerdo a la caracterización física realizada, el aceite presentó una densidad:(0.9246g/cm³) e índice de refracción (1.4753 a 23°C). De acuerdo a la caracterización química: índice de acidez (2,1870 % de ácido oleico), índice de peróxidos (0 meq de O₂/Kg), índice de saponificación (175.1161) meq KOH/g) e índice de yodo (136.6853 cg de I₂/g).
- El aceite fresco de uva Isabella (*Vitis labrusca L.*) presentó un índice de acidez de 2,1870% de ácido oleico, este valor ha superado el máximo permitido por la norma ICONTEC para aceite de semilla de *Vitis vinífera L.*
- El análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite de *Vitis labrusca L.*(uva Isabella), mostró que los ácidos grasos más importantes son el linoleico conjugado(53,843%), el oleico (E) (24,671 %) y el palmítico (13,922 %), y en pequeñas concentraciones se encontró los ácidos esteárico (4,81%), palmitoleico (0,550%), margárico (0,123) y linoléico (0,1004%).
- Según el análisis preliminar por CG-EM de la materia insaponificable del aceite de uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), se pudo evidenciar la presencia de los fitosteroles: Campesterol (9,691%), Estigmasterol (10,161%), Campestanol (7,276%), siendo el Beta-sitosterol el mayoritario (72,870%).
- El aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) evaluado presentó una alta actividad atrapadora del radical DPPH(42,62% de inhibición).

- En el análisis de vitamina E por CLAE del aceite de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) se identificaron los isómeros que la conforman: δ -Tocotrienol 4ppm, $\beta+\gamma$ -Tocotrienol 283ppm, α -Tocotrienol 80ppm, δ -Tocoferol 12ppm, $\beta+\gamma$ -Tocoferol 78 ppm, α -Tocoferol 44ppm.
- De acuerdo con el seguimiento de estabilidad realizado al aceite de uva Isabella (*Vitis labrusca L.*), se pudo observar que el aceite sufre un deterioro oxidativo a partir de la cuarta semana, por lo que se requiere de más estudios para establecer que métodos de extracción y conservación pueden ser convenientes para obtener un aceite para uso cosmético.
- Los resultados de este trabajo constituyen un primer estudio exploratorio de caracterización química y física del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella), por lo tanto se hace necesario complementarlo con otros estudios, tanto desde el punto de vista toxicológico y nutricional como de propiedades físicas, a fin de explorar futuras aplicaciones alimenticias, cosméticas e industriales.

RECOMENDACIONES

- Realizar un control exhaustivo desde el proceso de despulpado, recolección, lavado y secado de las semillas de uva Isabella hasta la molienda que garantice un mínimo de humedad en las semillas de la uva antes de la extracción del aceite ya que estos factores aceleran los procesos de degradación.
- Realizar un análisis elemental de la torta resultante de la extracción del aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) con el fin de determinar su composición y su posible aplicación, contribuyendo así al aprovechamiento integral del fruto.
- Someter las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) a un proceso de escaldado y secado, para la posterior extracción del aceite por el método Soxhlet, con el fin de disminuir la actividad de enzimas oxidativas y de esta manera retardar el enranciamiento del aceite.
- Realizar un seguimiento microbiológico al aceite de las semillas de *Vitis labrusca L.* (uva Isabella) con el fin de evaluar su inocuidad frente a normatividad vigente para uso alimenticio y cosmético en el tiempo.
- Realizar un análisis de los fitoesteroles empleando estándares que permitan su identificación y cuantificación.

BIBLIOGRAFIA

(1) MIRANDA, Omar; PARERA, Carlos. Uva de mesa: descripción de la estructura productiva de países competidores de Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Microrregión Gran Cuyo, Estación Experimental San Juan, Agosto, 1999.

(2) RUBIO, M., PARDO, J.E., FERNÁNDEZ, E., ALVARRUIZ, A., LÓPEZ, E., NÚÑEZ, J.M., ALFARO, A. y ALONSO, G.L. Caracterización del aceite de semilla procedente de distintas variedades de uva. II. Composición en ácidos grasos y esteroides, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA), Campus Universitario, Albacete (España).

(3) GARCÍA, Ledyamil, ANDRADE, Adrián, MIERES PITRE, Alberto, LONDOÑO, Peggy. Extracción de aceite de la semilla de uva variedad Criolla negra y su caracterización, Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química, Venezuela.

(4) CREWS, Colin; HOUGH, Patrick; GODWARD, John; BRERETON, Paul; LEES, Michelle; GUIET, Sebastien; WINKELMANN, Wilfried. Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin Central Science Laboratory, United Kingdom, Eurofins Scientific. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 6261-6265.

(5) ROCKENBACH, Ismael Ivan; VALDEMIRO GONZAGA, Luciano; RIZELIO, Viviane Maria; DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES, Any Elisa; GENOVESE, Maria Inés; FETT, Roseane. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. Department of Food Science and Technology Federal University of Santa Catarina, Brazil. Food Research International 44 (2011) 897–901.

(6) KASHIF, Ghafoor; FAHAD, Al-juhaimi; YONG, Heechoi. Effects of grape (*Vitis labrusca* B.) Peel and seed extracts on phenolics, antioxidants and anthocyanins in grape juice. Department of Food and Nutrition Sciences, King Saud University, Saudi Arabia. Pak. J. Bot., 43(3): 1581-1586, 2011.

(7) MANSUR MACHADO, Michel; FRANCIELE, Greice; DOS SANTOS MONTAGNER, Feyh; BOLIGON, Aline; ATHAYDE, Margareth Linde; UGALDE, Marques da Rocha; BARRIO LERA, Juan Pablo; BELLÓ, Caroline; MÂNICA DA CRUZ, Ivana Beatrice. Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. Universidad de Federal de Santa Maria, Brasil. Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, 798-803, 2011.

(8) DURAN OSORIO, Daniel y HERNANDEZ, José. Comparación físico- química de la uva Isabella cultivada en Villa del Rosario (N.S.) Y en el Valle del Cauca. Instituto de Investigaciones en Ciencia, Ingeniería y Tecnología de Alimentos, ICITAL. Universidad de Pamplona-Colombia, 2007.

(9) DALMOLIN Irede; MAZUTTI Marcio A; BATISTA Eduardo A.C; MEIRELES M. Angela; OLIVEIRA J. Vladimir. Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. J Chem Thermodynamics 42 (2010) 797–801.

(10) Ismael Ivan Rockenbach , Eliseu Rodrigues a, Luciano Valdemiro Gonzaga a, Vinícius Caliari ,Maria Inés Genovese , Any Elisa de Souza Schmidt Gonçalves c, Roseane Fett a Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chemistry 127 (2011) 174–179

(11) LUTTERODT, Herman; SLAVIN, Margaret; WHENT, Monica; TURNER Ellen; YU ,Liangli (Lucy). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and anti-proliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. Food Chemistry 128 (2011) 391–399

(12) Leandra Pereira Santos, Damila Rodrigues Morais, Nilson Evelázio Souza, Solange Maria Cottica, Marcela Boroski, Jesuí Vergílio Visentainer. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. Food Research International 44 (2011) 1414–1418

(13) NAVAS H, Petra Beatriz. Physicochemical characterization of *grape (Vitis vinifera)*, seed oil by solvent cold extracted. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 27: 270-288. 2010.

(14) NILGÜN GÖKTÜRK Baydar ; GÜLCAN, Özkan; EMINE SEMA, Çetin. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. Grasas y aceites, 58 (1), enero-marzo, 29-33, 2007.

(15) GOKTURK BAYDAR, Nilgun. AKKURT, Murat. Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds. Suleyman Demirel University Faculty of Agriculture Department of Horticulture, Isparta – TURKEY. Turk J Agric For 25 (2001) 163-168

(16) BAIL, Stefania; STUEBIGER, Gerald; KRIST, Sabine; UNTERWEGER, Heidrun; BUCHBAUER Gerhard. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. Food Chemistry 108 (2008) 1122–1132.

(17) Thorsten Maier a, Andreas Schieber a,b, Dietmar R. Kammerer a,* , Reinhold Carle Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 112 (2009) 551–559

(18) NAVAS H, Petra Beatriz. Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinífera* L.) con énfasis en los componentes minoritarios. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela Vol. 59 N° 2, 2009

(19) GUERRA, E G.; ZUÑIGA, M E. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pepa de uva, *Vitis vinífera*, por prensado en frío. Escuela de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso, Grasas y Aceite Vol. 54. Fasc. 1 (2003), 53-57

(20) RUBIO, Manuela. ALVAREZ ORTIZ, Manuel. ALVARRUIZ, Andrés. FERNANDEZ, Enrique. And PARDO, Jose E. Characterization of Oil Obtained from Grape Seeds Collected during Berry Development. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Castilla-La Mancha, Spain. *J. Agric. FoodChem.* 2009, 57, 2812–2815.

(21) PARDO, José Emilio. FERNANDEZ, Enrique. RUBIO, Manuela. ALVARRIZ, Andrés. And GONZALO Luis Alonso. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos (ETSIA), Albacete, Spain. *Eur. J. LipidSci. Technol.* 2009, 111, 188–193

(22) FARIAS CAMPOMANES, Ángela María.; MATOS CHAMORRO, Alfredo. Influencia de la Temperatura y Tamaño de Partícula en el Proceso de Extracción de Aceite de Semilla de uva (*Vitis vinífera*). Universidad Peruana unión. Vol. 1 N°1 2009. Revista de investigación universitaria.

(23) CASTRO M, E.; MASSON S, L.; VALENZUELA G, F. Modelo cinético de la calidad de aceite de pepita de uva. Departamento de ciencia de los alimentos y tecnología química. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile. P. 374

(24) ALMANZA M, Pedro José. CHAVEZ C. Bernardo. Caracterización físico-química del fruto de la uva (*Vitis vinifera* L.) 'PinotNoir' durante su crecimiento y desarrollo en condiciones de trópico alto. Agronomía colombiana, vol. XXVIII

(25) PRADO MARTIN, José Guilherme; PORTO, Ernani; BANI CORRÊA, Cristina; DE ALENCAR, Severino Matias; MICOTTI DA GLORIA, Eduardo; SIMONE, Ingridy; CABRAL, Ribeiro; DE AQUINO, LúgiaMaria. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. Food and Nutrition Department, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil. Journal of Natural Products, Vol. 5(2012): 27-36

(26) S.M. El-Shami; M.H. El-Mallah; SS. Mohamed. Studies on the lipid constituents of grape seeds recovered from pomace resulting from white grape processing. Fats and Oils Dept., Cairo, Egypt .Vol. 43 Fase. 3 (1992), ISSN: 0017-3495.

(27) J. Santos; R. Dariva; A. Mossi; G. Stuart; I. Nascimento. Preliminary study of the influence of CO₂ extraction conditions on the ester, aldehyde, ketone and Hydrocarbon content of grape bagasses from jam production. Department of Food Engineering, Brazil. Brazilian Journal of Chemical Engineering Vol. 24, No. 04, pp. 637-642, October-December, 2007.

(28) PASSOSA, Claudia P.; SILVA, Rui M.; DA SILVA, Francisco A.; COIMBRAB, Manuel A.; SILVA, Carlos M. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil: Effect of the operating conditions upon oil composition and

antioxidant capacity. Departamento de Química, Universidad de de Aveiro, Portugal. Journal 160 (2010) 634–640.

(29) LLUIÀS TORRES, Josep; VARELA, Begona; GARCIA, Marià Teresa; CARILLA, Josep; MATITO, Cecilia; CENTELLES, Josep J.; CASCANTE, Marta; SORT, Xavier; BOBET, Raul. Valorization of Grape (*Vitis vinifera*) Byproducts: Antioxidant and Biological Properties of Polyphenolic Fractions Differing in Procyanidin Composition and Flavonol Content. Department of Peptide and Protein Chemistry, Department of Surfactant Technology, and Thermal Analysis Laboratory, Institute for Chemical and Environmental Research (IIQAB-CSIC), Barcelona, Spain; J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 7548-7555.

(30) YILMAZ, Yusuf; TOLEDO, Romeo T. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. Department of Food Science and Technology, The University of Georgia, Athens, Georgia. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 255-260.

(31) NAKAMURA, Yumiko; TSUJI, Sumiko; TONOGAI, Yasuhide. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. Division of food chemistry, National institute of health sciences. Japon, Journal of health science, 49(1) 45-54 (2003).

(32) BAOSHAN Sun; CONCEICAO Leandro; RICARDO DA SILVA, Jorge M.; SPRANGER, Isabel. Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. Instituto Nacional de Investigacao Agraria, Estacao Vitivinicola Nacional, Dois Portos, Portugal. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1390-1396.

(33) J.M. Luque-Rodriguez; M.D. Luque de Castro; P. Perez-Juan. Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. Analytical Chemistry Division, University of Cordoba, Cordoba, Spain. Talanta 68 (2005) 126–130.

(34) MULERO, Juana; PARDO, Francisco; ZAFRILLA, Pilar. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. Department of Food Technology and Nutrition, Catholic University of San Antonio, Murcia, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (2010) 569–574.

(35) TANGOLAR, Serpil Gök; ZOGUL, Fatih Ö.; TANGOLAR, Semih; YAGMUR, Cahide. Tocopherol content in fifteen grape varieties obtained using a rapid HPLC method. Vocational School of Adana, University of Cukurova, Adana, Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 481–486.

(36) SÁNCHEZ V^{*1}, SANDOVAL C², FRANCO C¹. Evaluación de la liberación de polifenoles desde vehículos cosméticos An evaluation of polyphenol release from cosmetic formulations., Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

(37) ZÚÑIGA, Mmaría cecilia. Caracterización de fibra dietaria en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva. Proyecto de grado Universidad de Chile. facultad de ciencias agronómicas. Escuela de agronomía. Santiago, Chile. 2005

(38) MEYER, Justin and R, Hernández.. Seed tannin extraction in Cabernet Sauvignon. *Am. Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 21, nº4, 184-188. 1970

(39) BOMBARDELLI E; MORAZZONI P; CARINI M. Biological activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L. *Biofactors*, Instituto Chimico Farmaceutico Tossicologico, Università di Milano, Italy 429-431.

(40) PALADINO, Silvia Cristina; Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis Maister Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. Sede Mendoza: Facultad de Ciencias Agrarias – UN Cuyo.

(41) Rice-Evans CA.et al., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radical Biology & Medicine*, 1996:20:933-956.

(42). Ramón Rodrigo; CastilloRodrigo; CarrascoR; HuertaPatricio; Moreno Manuel. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. Life SciencesV. 76, N° 8, 7. P 889–900 January 2005.

(43) LOVISO, C.; CONDES, C.; OROSCO, E.A; SANGORRIN, M.P; VOGET, C.; CABALLERO, A.C. Identificación de levaduras aisladas en las diferentes etapas de fermentación de vitis labrusca variedad Isabella. XII Congreso Argentino de ciencia y tecnología de los alimentos, 2009.

(44) OROZCO, Eugenia A; LOVISCO, Claudia; SEPULVEDA, Claudia; AVILA, German; VELARDE, Irene; VOGET, Claudio. Vinificación de Vitis Labrusca variedad Isabella. El vino de la costa de Berisso. XII Congreso Argentino de ciencia y tecnología de los alimentos, 2009.

(45) RIZZON ANTENOR Luis, GASPARIN Andre M. The calcium carbonate in the desacidification of Isabell wine.En: Ciencia Rural, Universidad Federal de Santa Maria, Brazil. Mayo-Junio 2005. P.P 720-723. ISSN-0120-0178.

(46) MIELE, A. Teores de manganês e de cobre no mosto das uvas 'Isabel' e 'Concord'. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 22, n. 9/10, p. 897-901, 1987

(47) PASSOS, L.P. Resposta da videira a variacao da epoca de poda seca. II. Efeitos naqualidade do fruto do cv. Isabel. 1982

(48) TONIETTO, J.; MIELE, A.; SILVEIRA JUNIOR, P. O ácido giberélico no desenvolvimento de bagassementes da uva 'Isabel'. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 18, n. 4, p. 381-386, 1983.

(49) ALFARO BOLAÑOS, J. Evaluación del crecimiento de raíces y la brotación de yemas en estacas de uva (*Vitis vinífera* y *Vitis labrusca*) con el uso de hormonas. Grecia (Costa Rica), 1988. Trabajo de grado. Ingeniería agrónoma.

(50) ROMERO, M.; AVILA, G.; M.Z. Y BALATTI, P. Análisis de *Vitis labrusca* cv. Isabella empleada en la elaboración del Vino de la Costa mediante marcadores ISSR. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

(51) MATTOS, C.S.; PASQUAL, M.; PETRI, J.L. Comportamento da cultivar isabel (*Vitis labrusca*) em dois sistemas de conducao (Espaldeira e latada) na região do Alto Rio do Peixe. Santa Catarina, Brasil.

(52) SALAZAR SANCHEZ, Raúl Arnulfo.; Sondeo de agentes causales de enfermedades de etiología viral en uva (*Vitis vinífera* y *Vitis labrusca* L.) en el departamento del Valle del Cauca. (Universidad del Cauca). 2001.

(53) TORO, J.C.; GALINDO, J.J. Problemas Principales de la Vid (uva Isabella) en el Valle del Cauca. ICA y CENIUVA, Cali, Colombia. 1996. 119p.

(54) GALINDO, J.J. TORO, J. C GARCIA, A. Manejo Técnico del cultivo de la Vid (uva Isabella) en el Valle del Cauca. CENIUVA, Cali, Colombia. Boletín Técnico No.1 52p. 1996.

(55) GALINDO, J.J y TORO, J.C Manejo integrado del mildiu, *Plasmopara Vitícola*, de la vid cv "Isabella" en Ginebra, Valle. Colombia. Memorias XVII, Cong. Nal. Fitopat., Paipa, Colombia. 132 p. 1996.

(56) GALINDO, José.; SATIZABAL, Javier.; Paquete tecnológico para el manejo del cultivo de la uva Isabella. Ceniuva.

(57) BENAVIDES PALACIOS, Ángela Viviana.; PALMA POLO, Ronald francisco. Efecto de la aplicación fraccionada de calcio en la maduración, producción y calidad de la vid *Vitis labrusca* C.V Isabella, en el municipio de la unión, valle del cauca. Trabajo de grado. Pasto 2007. Universidad de Nariño. Ingeniería agrónoma.

(58) GUTIERREZ PEREZ, Jorge Alberto. Comportamiento de algunos componentes no volátiles durante la fermentación alcohólica de la uva Isabella. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia). Departamento de Química. Tesis (Químico). Bucaramanga (Colombia). 1994. 94 p

(59) HERNÁNDEZ C, José D.; TRUJILLO N, Janine Y.; DURÁN O, Daniel S. Contenido fenolico e identificación de lavaduras de importancia vínica de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de villa del rosario (Norte de Santander). Vitae, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. Volumen 18 número 1, año 2011. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 17-25

(60) BOTINA TUPAZ, Carola Fernanda.; BRAVO RUALES, Maritza Silvana Estudio de factibilidad para el montaje de una planta procesadora de jugo y pulpa a partir de uva Isabella (*Vitis labrusca*) en el municipio de ginebra, departamento del valle del cauca. Trabajo de grado. San Juan de Pasto 2003. Universidad de Nariño. Ingeniería agroindustrial.

(61) TASCÓN, José Antonio. Exploración de productos a partir de *Vitis labrusca* en Colombia y en los principales países productores. Corporación Biotec Universidad San Buenaventura.

(62) CONSORCIO UVA ISABELLA. Por la reactivación económica y social del Sector Agrícola del Valle del Cauca. (Cámara de Comercio de Cali).No. 7 Oct. 1999.

(63) JACKSON, Ronald S. Wine science: Principles and applications. 3ED. Canadá: Academy Press, 2008. Cap 2. p. 16-43. ISBN: 978-0-12-373646-8

(64) TESSIER, C., DAVID, J., THIS, P., BOURSQUOT, J.M. y A. CHARRIER. 1999. "Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L.". Theor. Appl. Genet. 98, 171-177.

(65) HERNÁNDEZ C, José D.; TRUJILLO N, Janine Y.; DURÁN O, Daniel S. Contenido fenólico e identificación de lavaduras de importancia vinícola de la uva Isabella (*Vitis labrusca*) procedente de villa del rosario (Norte de Santander). Vitae, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. Volumen 18 número 1, año 2011. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 17-25

(66) GRIGOLETTI A, Sônego OR. Principais doenças fúngicas da videira no Brasil. 1ª Rev. ed. Brasília, DF, Brasil: EMBRAPA; 1993. 36 p.

(67) ZANUZ MC. Efeito da maturação sobre a composição do mosto e qualidade do suco de uva. Tesis magistral. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1991

(68) BOBILLO, M.^a Teresa SANTOS, ALONSO BEATO M.^a Teresa, LADERO SANTOS Ignacio, MARTÍN RODRÍGUEZ, M.^a Asunción. Plantas medicinales españolas. *Vitis vinifera* L. Subsp. *Vinifera* (vitaceae), Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, España.

(69) HERNANDEZ, Macías.; HUMBERTO, I. Manual práctico de viticultura. México 1993. P. 15

(70) LOZANO GARCIA, Jairo.; FIGUEROA, Lilly.; OCAMPO Luis Augusto.; FORERO, Freddy.; VERA, Luis Felipe. Generación de un modelo de zonificación edafoclimáticas y Socioeconómica a nivel departamental y municipal, para la

producción de mora, lulo, maracuyá, chulupa, granadilla, uva y tomate de árbol en el departamento del Huila. Marzo 2007. P. 92-94

(71) COELHO DE SOUZA, Patricia. Producción de uva de mesa en Brasil. Horticultura Internacional 21, agosto 1998.

(72) RAMIREZ SALGADO, Francisco.; J, José.; SATIZABAL TASCÓN, Javier.; PUERTO GUERRERO, Oswaldo. Manejo pos cosecha y comercialización de la uva. Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, Colombia 2001. P. 10, 15-16

(73) CONTRERAS, E. ESCOBAR L. Un sector exportador maduro: la fruta fresca en auge exportador chileno (Meller; p, saez, R Ed) CIEPLAN/Dolmen Santiago, 137-185

(74) KAMMERER D, Claus A.; CARLE R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. J Agri Food Chem. 2004 Jul 14; 52 (14): 4360-4367.

(75) PINELO M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends Food Sci Technol. 2006 Nov; 17 (11): 579-590.

(76) SANDOVAL, Miguel.; LAZARTE, Karen.; ARNAO Inés. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2008

(77) SOLOMONS, Graham. Química Orgánica. 2 ED. Editorial Limusa Wiley. Universidad del Sur de Florida, 1999, México.

(78) CAMPBELL, Mary; FARRELL, Shawn. Bioquímica. 4 ED. Editorial Thomson, 2004. México.

(79) CHRISTIE, W.W., *Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis*. Advances in lipid methodology, 1993. 2: p. 69-111.

(80) MANZUR, Fernando; SUÁREZ, Amileth y MONERIZ, Carlos. Efectos y controversias de los ácidos grasos omega-3 Omega-3. En: Revista Colombiana de Cardiología. Vol.13, No.3. (Noviembre 2006). p .3.

(81) CORTÉS Lilia Yadyra; CORREDOR Carlos; MORALES Ludis. Aspectos estructurales y funcionales de la vitamina E. RMNC Vol. 1 N. 1. Mayo de 2010

(82) SAYAGO A; MARÍN M.I.; APARICIO R; y MORALES M.T. Vitamina E y aceites vegetales Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Grasas y aceites, 58 (1), enero-marzo, 74-86, 2007, ISSN: 0017-3495

(83) HALL, Wendy; JEANES, Yvonne and. LODGE, John. Hyperlipidemic Subjects Have Reduced Uptake of Newly Absorbed Vitamin E into Their Plasma Lipoproteins, Erythrocytes, Platelets, and Lymphocytes, as Studied by Deuterium-Labeled -Tocopherol Biokinetics. Octubre 13. (Citado 28 ene 2009). p.58.

(84) FRANK, Jan; BUDEK, Alicia; LUNDH, Torbjørn; PARKER, Robert; SWANSON, Joy; LOURENCO, Cátia; GAGO, Bruno; LARANJINHA, João; VESSBY, Bengt and KAMAL-ELDIN, Afaf. Dietary flavonoids with a catechol structure increase α -tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. En: Journal of Lipid Research. Vol. 48 (2007). p. 2718.

(85) SONG, Bao-Liang; DEBOSE-BOYD, Russell A. Insig-dependent ubiquitination and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase stimulated by δ - and γ -tocotrienols. En: The Journal of Biological Chemistry. Vol. 281, No. 35. (Septiembre 2006). p. 25055

(86) MARTINEZ de la Cuesta, PJ, RUS MARTINEZ E, GALDEANO Chaparro M. 1995. Oxidative rancidity of vegetable oils in the presence of α - tocopherol. *GrasasAceites* v.46, p. 349-53.

(87) ELMADFA I, WAGNER KH. Vitamin E and stability of vegetable oils. *Fett. Lipid*, 99, 234-238.1997.

(88) CHARNOCK JS. Vitamin E, edible oils, and cardiac arrhythmia. *Nutr.Lipids, Health, Dis.*, [Proc. UNESCO Conf.], Meeting Date 1994, 300-5. Edited by: Ong ASH, Niki E, Packer L. AOCS Press: Champaign, Ill.

(89) NISHIMOTO Y, FUKUSHIMA N. Cosmetics containing borage oil. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 09077633 A2* (25 Mar 1997).

(90) LERONDEAU C, MONCLUS D. Antiaging cosmetic compositions containing vegetable oils rich in essential fatty acids. *Fr. Demande FR 2763843 A1* (4- 12- 1998).

(91) MUÑOZ JÁUREGUI Ana María; ALVARADO ORTÍZ Ureta Carlos; ENCINA ZELADA Christian. Fitoesteroles y Fitoestanoles: Propiedades saludables. *Revista Horizonte Médico Volumen 11(2)*, Julio - Diciembre 2011

(92) DRAGO SERRANO María Elisa; LÓPEZ LÓPEZ Marisol; SAINZ ESPUÑES Teresita del Rosario. COMPONENTES BIOACTIVOS DE ALIMENTOS FUNCIONALES DE ORIGEN VEGETAL *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, octubre-diciembre, año/vol. 37, número 004 Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México pp. 58-68

(93) VALENZUELA Alfonso, RONCO Ana María. FITOESTEROLES Y FITOESTANOLES: ALIADOS NATURALES PARA LA PROTECCION DE LA

SALUD CARDIOVASCULAR Laboratorio de Lípidos y Antioxidantes, Laboratorio de Hormonas y Receptores, Universidad de Chile. Casilla 138-11, Santiago, Chile. RevChilNutr Vol. 21, Suplemento N° 1, Noviembre 2004, pásg: 161-169

(94) MATISSEK, Reinhard; SCHENEPEL, Frank-M; STEINER, Gabriele. Análisis de los alimentos. Zaragoza España. Editorial, Acriba, S.A. 2000. Pág 44-54.

(95) M.D. Luque de Castro*, L.E. GarcõÂa-Ayuso. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cordoba, Cordoba, Spain, 1998. AnalyticaChimicaActa 369 (1998) 1-10.

(96) P. Manirakiza, A. Covaci, and P. Schepens. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. Toxicological Centre, University of Antwerp, 2000. Journal of food composition and analysis (2001) 14, 93-100.

(97) Norma Colombiana ICONTEC N. 336. Grasa y Aceites. Método de determinación de la densidad. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santafé de Bogotá 1999.

(98) MATISSEK, R., SCHNEPEL, F., STEINER, G., Análisis de alimentos: Caracterización de Grasas y Aceites. Berlin, Alemania. 1992. Editorial Springer-Verlag GMBH & Co. K6. Pág 1-4.

(99) Aceites y Grasas. Métodos analíticos en alimentaria. Editorial. Montplet y Esteban S.A. octubre 1984. p.27.

(100) Norma colombiana ICONTEC N. 286. Grasas y Aceites. Método de determinación del Índice de Refracción. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá (1969).

- (101) Norma colombiana ICONTEC N.218. Grasas y Aceites Comestibles. Método de determinación de Acidez. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá (1999).
- (102) Norma colombiana ICONTEC N.236. Grasas y Aceites. Método de determinación del Índice de Peróxidos. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá (1999).
- (103) Norma colombiana ICONTEC N.235-2. Grasas y Aceites. Método de determinación del Índice de saponificación. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá (1970).
- (104) Norma colombiana ICONTEC N.283. Grasas y Aceites. Método de determinación del Índice de Yodo. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá (1969).
- (105) DÍAZ, F. Amaya, L. Extracción y caracterización del aceite de luffa cilíndrica con o sin beneficio procedente de dos diferentes departamentos del país. Pereira 2005. Tesis de grado. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química.
- (106) LOURDES B., GARCIA L., ROJO D., ZANCHEZ E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. Revista Cubana Investigación Biomédica. 20: 231-235.
- (107) AVELLO M., SUWALSKY M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 492: 161-172.
- (108) OLGUIN G., MELENDEZ G., ZUÑIGA A., PASQUETTI A. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. Revista de Endocrinología y Nutrición. 4: 199-206.
- (109) CESPEDES T., SANCHEZ D. (2000). Algunos aspectos sobre estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Revista cubana de Cardiología. 14: 55-60.

(110). BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity..LWT - Food Science and Technology 28, 25-30, 1995.

(111) MCNAIR, Harold; ESQUIVEL, Benjamín. Cromatografía Líquida de Alta Presión. Secretaría General de la OEA, Universidad Estatal de Blackburg, Virginia, Estados Unidos, 1973.

(112) SKOOG Douglas A., HOLLER F. James, NIEMAN Timothy A., Principios de Análisis Instrumental, Mc Graw Hill, Quinta edición, Madrid, 2001

(113) DOMINGUEZ S., Xorge Alejandro. Cromatografía en Papel y en Capa Delgada. Monografía n°16, Serie Química. Secretaría General de la OEA. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, México, 1975.

(114) ROUESSAC, Francis; ROUESSAC, Annick. Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques. Wiley&Sons, Segunda edición. Universidad de Le Mans, Francia, 2007.

(115) STAMBUK Jorge D. Manual práctico de cromatografía de gases. Ediciones Guadalupe, Colombia, 1970.

(116) YAVUANO, M; INDRAYANTO, G. Gas chromatography system instrumentation. Tomado de Cazes, J. Encyclopedia of chromatography 2002, Marcel Dekker, Inc; New York.

(117) MCNAIR Harold M. Cromatografía de gases. Secretaría General de la OEA, Universidad Estatal de Blackburg, Virginia, Estados Unidos, 1981.

(118) OLGUÍN PÉREZ Laura Patricia; RODRÍGUEZ MAGADÁN Héctor M. Métodos en biotecnología: cromatografía de gases. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Junio de 2004.

(119) McNAIR, H.M. and J.M. MILLER, Basic Gas Chromatography, ed. I. JOHN WILEY & SONS. 1997.

(120) WALKER, John. Chromatography fundamentals, applications, and troubleshooting. p. 11, 12, 34-39, 56, 86.

(121) QUATTROCCHI, Oscar Alberto; DE ANDRIZZI, Sara Abelaira; LABA, Raúl Felipe. Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro S.A. 1992.

(122) ANAYA, Luisa; ESPINOSA, Francisco y CRUZ, Rocío. Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Editores. Plaza y Valdes. 2001. p.186

(123) SNYDER Lloyd R; KIRKLAND Joseph J; DOLAN John W. Introduction to modern liquid chromatography. third edition. Wiley.

(124). OSORIO, M, Catherine., Estudio de la calidad del aceite de crisálida del Bombix mori L de capullos dobles. Proyecto de grado. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.

(125) LOPEZ, V, Juan. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilesteres de ácidos. Proyecto de grado. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. PEREIRA 2008

(126) Norma colombiana ICONTEC N. 235-2. Determinación de materia insaponificable Método de extracción con hexano. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá.

(127). PICARD, H; GUYOT, B; VINCENT, J; Café cacao thé. Vol. XXVIII, no 1. Laboratoire de chimie et de technologie. Institut de recherche du café, du cacao et d'autres plantes stimulantes. France. 1984

(128). MOLYNEUX, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarín. 2004. *Journal Science and Technology* 26, 211-219.

(129) SHARIFIFAR, F; DEHGHN-NUDEH, G; MIRTAJALDINI, M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium*L. 2009. *Food Chemistry* 112, 885–888.

(130) ORHAN, I; KARTAL, M; ABU-ASAKER, M; SENOL, F.S; YILMAZ, G; SENER, B. Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants.2009. *Food Chemistry* 114, 276–281.

(131) Norma colombiana ICONTEC NTC 287. Grasas y aceites animales y vegetales. determinación del contenido de humedad y materia volátil. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santa Fe de Bogotá.

(132) BAILEY, Alton Edward. Aceites y grasas industriales. 2 ED: España. Editorial Reverté S.A., ISBN: 84- 291- 7901-1. 1984.

(133) LUQUE DE CASTRO, M.D.; GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. University of Córdoba, Spain, 1998. *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 1-10.

(134) LUQUE-RODRÍGUEZ, J.M.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; PÉREZ-JUAN, P. Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. University of Córdoba, Spain, 2005. *Talanta* 68 (2005) 126–130.

(135) Norma Colombiana ICONTEC 265 (Segunda actualización). Grasas y Aceites comestibles vegetales. Aceite de semillas o pepitas de uva. Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Santafé de Bogotá.

(136) Decreto N° 32243-MEIC-Reglamento Técnico RTCR:386:2004 Aceites Vegetales Especificados. Especificaciones

(137) ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MÉDICA. Código alimentario Argentino: Alimentos grasos, Aceites alimenticios. Argentina: ANMAT, actualizado al 11/2010. 19 p. (Capítulo VII, Artículos: 520 al 552).

(138) SAN SALVADOR. MINISTERIO DE ECONOMÍA. Norma Salvadoreña Recomendada: Aceite de pepitas de uva comestibles NSR67.00.109.99. San Salvador: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), 2000. 3 p. (NSR CODEX STAN 127-1981)

(139) BELEN, D, LOPEZ, I. BARRANCO, J. Caracterización fisicoquímica del aceite desemilla de Piritu (*Bactris piritu*). Grasas y Aceites, volumen 55, Fasc 2, 2004, 138-142.

(140) JURADO, Javier; MUÑOZ, Lilia. Caracterización del aceite de las semillas de *Solanumquitoense* Lvariedad la selva y evaluación de su actividad antioxidante. Proyecto de grado. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. PEREIRA 2009.

(141). SILVERSTEIN, R; WEBSTER, F. Spectrometric identification of organic compounds. Sixth edition. Wiley-India Edition. Capitulo 2, pág 28.

(142). MALAFFERTY, F. TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. Cuarta Edición, ed. U.s books. 1993, Sausalito, California. Pág 266.

(143) CHRISTIE, William W. Gas Chromatography and Lipids. Captiulo 7 “ Gas

Chromatography – Mass Spectrometry and Fatty Acids. Publicado por P.JBarnes & Associates (The Oily Press Ltd). Bridgwater in 1989.

(144). NIETO, I.; VALENCIA, M. Esteroles, ácidos grasos e hidrocarburos de los cuerpos fructíferos de ganoderma austral. En: Boletín de la Sociedad Chilena de Química. Vo.47, No.4 (2002).

(145). SANTOS, Rita; LIMAS, Eunice; SOUSA, Mualide; CASTILHO, Maria da Conceicao; RAMOS, Fernando; NORONHA DA SILVEIRA, Maria Irene. Optimization of analytical procedures for GC–MS determination of phytosterols and phytosterols in enriched milk and yogurt. Universidade de Coimbra, Portugal. Food Chemistry 102 (2007) 113–117 2006.

(146). SILVERSTEIN, Robert M; WEBSTER, Francis X; KIEMLE, David. Spectrometric: identification of organic compounds. 7 Ed. Originally published in 1962

(147). MÄÄTTÄ, Kaisu; LAMPI, Anna; PETERSON, Jan; FOGELFORS Birgitta; PIIRONEN, Vieno and Kamal, Afaf. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. En: Journal of the Science of Food and Agriculture (1999).p. 1021-1027

(148). RUBIO, Manuela, ALVAREZ-ORTIZ, Manuel, ALVARRUIZ, Andres, FERNANDEZ, Enrique, PARDO, Jose E. Characterization of Oil Obtained from Grape Seeds Collected during Berry Development. Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain. J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 2812–2815.

(149). CHARIDRA DUTTAL, Paresh; APPELQVIST, Lars-Ake. Saturated Sterols (Stanols) in and Hydrogenated Edible Vegetable Unhydrogenated Oils and in Cereals Lipids. University of Agricultural, Sweden. J Sci Food Agric 1996, 71, 383-391.

(150)LAGARDA, M.; GARCÍA, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1486–1496.

(151) JIA, X; EBINEA, N; WANGB, Y; AWADC, A; JONES, P; Effects of different phytoesterol analogs on clonic mucosal cell proliferation in hamsters. *Journal of nutritional biochemistry* 17 (2006), 396-401.

(152). DEWICK, Paul M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3 Ed. John Wiley & Sons, Reino Unido, 2009. ISBN: 978-0-470-74168-9.

(153)CHUNA, Jiyeon; LEEB, Junsoo; YEA, Lin; EXLERC, Jacob; R, EITENMILLERA Ronald. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2006) 196–204

(154). Dessi MA, Deiana M, Rosa A, Crobu V, Isola M, Banni S, Corongiu FP. 2001. Oxidative stability of extra virgin olive oil in relation to antioxidant components. *Prog Nutr*. 3, 12-16.

(155) A. Sayago; M.I. Marín; R. Aparicio; M.T. Morales. Vitamina E y aceites vegetales Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. *Grasas y aceites*, 58 (1), enero-marzo, 74-86, 2007, ISSN: 0017-3495

(156). GÖKTÜRK BAYDAR, N. and ÖZKAN, G. (2006) Tocopherol contents of some Turkish wine byproducts. *European Food Research Technology* 223, 290–293

(157) TOKIOKA, K; KISHIMOTO, S. *Cosmetic, Agos*. [Documento electrónico] Feb. 2000. (Citada: Enero 2012) < ep.espacenet.com >

(158) MATSUMOTO, M; KOBAYASHI, Y; Preparation for External use for skin.[Documento electrónico].Feb. 2000. (Citada: mayo 2012)<ep.espacenet.com>

(159) SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H. y NÚÑEZ, J. 1995. Pepitas de uva como fuente de aceite y proteína. Alimentación, equipos y tecnología. Abril: 49-55.

(160) FLANZY, C. 2000. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. A. Madrid Vicente,Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa. 783 p

(161) ZÚÑIGA, GONZALES, M. Caracterización de la fibra dietaria en orujo y la capacidad antioxidante en vino, orujo y semilla de uva.Universidad de Chile. 2005.

(162) CHOI, Youngmin; LEE Junsoo.Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. Food Chemistry 114 (2009) 1386–1390

(163) KIMSo-Young, JEONG Seok-Moon, PARK Woo-Po, K.C. Nam, D.U. Ahn, LEE Seung-Cheol. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. Food Chemistry 97 (2006) 472–479

(164) BARRERA-ARELLANO, Daniel. Estabilidad y utilización de nitrógeno en aceites y grasas. Lab. Óleos e gorduras, DTA Faculdade de Engenharia de Alimentos. Brasil. Grasas y Aceites.Vol. 49.Fase. 1 (1998), 55-63.

(165) MURAI, A; Cosmetic for growing and raising hair, [Documento electrónico].Feb. 1995. (Citada: mayo 2012) < ep.espacenet.com >

(166) MONTOYA BALLESTEROS, Luz del Carmen; AYALA CHÁVEZ, GeidiMerary; MARTINEZ NÚÑEZ, Yésica Judith;ROBLES-OZUNA, Luis Enrique. Efecto del escaldado sobre la actividad de lipoxigenasa (lox) y los ácidos grasos libres en nuez pecanera (Caryaillinoensis).Coordinación de Tecnología de

Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. México. XI Simposio Internacional de Nogal Pecanero, p. 142-148.

(167) GLISZCZYŃSKA, Anna; SWIGŁO, Ewa Sikorska. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048 (2004) 195–198

ANEXOS

Anexo 1 .Composición en ácidos grasos de aceites vegetales comunes.

Aceites Vegetales	COMPOSICIÓN PROMEDIO DE ÁCIDOS GRASOS (mol %)						
	SATURADOS			INSATURADOS			
	C14	C16	C18	C16	C18	C18	C18
	Ácido Mirísítico	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Palmitoleico	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolénico
Oliva	0-1	5-15	1-4		67-84	8-12	
Cacahuete		7-12	2-6		30-60	20-38	
Maíz	1-2	7-11	3-4	1-2	25-35	50-60	
Semilla de algodón	1-2	18-25	1-2	1-3	17-38	45-55	
Soya	1-2	6-10	2-4		20-30	50-58	5-10
Linaza		4-7	2-4		14-30	14-25	45-60

Anexo 2. Sustituyentes del anillo aromático en la vitamina E. (Tomadode: IUPAC-IUB, 1982)

Vitámero	R1	R2	R3
α -Tocoferol/tocotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -Tocoferol/tocotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ -Tocoferol/tocotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ -Tocoferol/tocotrienol	H	H	CH ₃

Anexo 3. Preparación del derivado metilado de los ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).



MN
Since 1911

MACHEREY-NAGEL

1911-2011 Feiern Sie mit uns!
Celebrate with us!



Home Chromatography Search applications

Methylation with TMSH

	Method:	Matrix
	GC	
		Application-No.:
		213060

Substances: trimethylsulphonium hydroxide; TMSH

Column: Derivatisation reagent: TMSH

Phase: TMSH

MN catalog number: 701520.101

Sample pretreatment: Dissolve 100 mg sample (e. g. butter) in 5 ml of a suitable solvent (e. g. tert.-butyl methyl ether). Add 50 µl reagent to 100 µl of this solution. The mixture is injected directly. The temperature of the injector must be at least 250 °C.

Conditions: Methylation with TMSH [W. Butte, J. Chromatogr. 261 (1983) 142] is recommended for free acids, chlorophenoxyacetic acids, their salts and derivatives as well as for phenols and chlorophenols. One great advantage is simplification of the sample preparation. Lipids or triglycerides can be converted to the corresponding fatty acid methyl esters (FAMES) by a simple transesterification. Isomerisations of multiple unsaturated fatty acids have not been observed.
This reaction is very elegant and convenient, because it is just necessary to add the reagent (0.2 M in methanol) to the sample solution. Removal of excess reagent is not required, since in the injector of the gas chromatograph at 250 °C pyrolysis to volatile methanol and dimethylsulphide will occur. Due to the high reactivity, complete derivatisation is often obtained at ambient temperature. However, heating (e. g. 10 min at 100 °C) in a closed sample vial may be necessary.

Detection Subsequent analysis: GC;
For GC separation of FAMES from natural butter fat after derivatisation with TMSH see Appl. No. **201680**

Author(-s): MACHEREY-NAGEL

Source: GC department (2007)

Keywords: derivatisation; methylation; trimethylsulphonium hydroxide; TMSH; free organic acids; chlorophenoxyacetic acids; phenols; chlorophenols; FAMES

Chromatogram:

Legend:

www.mn-net.com



Concerning questions to literature applications please contact the cited author/s. Chemicals mentioned in applications are not manufactured or sold by MACHEREY-NAGEL. Applications mentioned in MACHEREY-NAGEL literature or databases are provided for informational purposes only. MACHEREY-NAGEL does not warrant that all applications have been tested in MACHEREY-NAGEL laboratories using MACHEREY-NAGEL products.
MACHEREY-NAGEL does not warrant the correctness of the applications.

Copyright 2011 by MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Imprint / Impressum Privacy Statement Terms Of Use

Anexo 4. Certificado de análisis del estándar comercial de Metilesteres.



Certificate of Analysis

110 Benner Circle
 Bellefonte, PA 16823-8812
 Tel: (800)356-1688
 Fax: (814)353-1309

Mfg. by: Restek

FOR LABORATORY USE ONLY-READ MSDS PRIOR TO USE.

Lot No.: A076760

Pkg Amt: _____

Storage: 0°C or below

Catalog No. : 35078

Description : NLEA FAME Mix

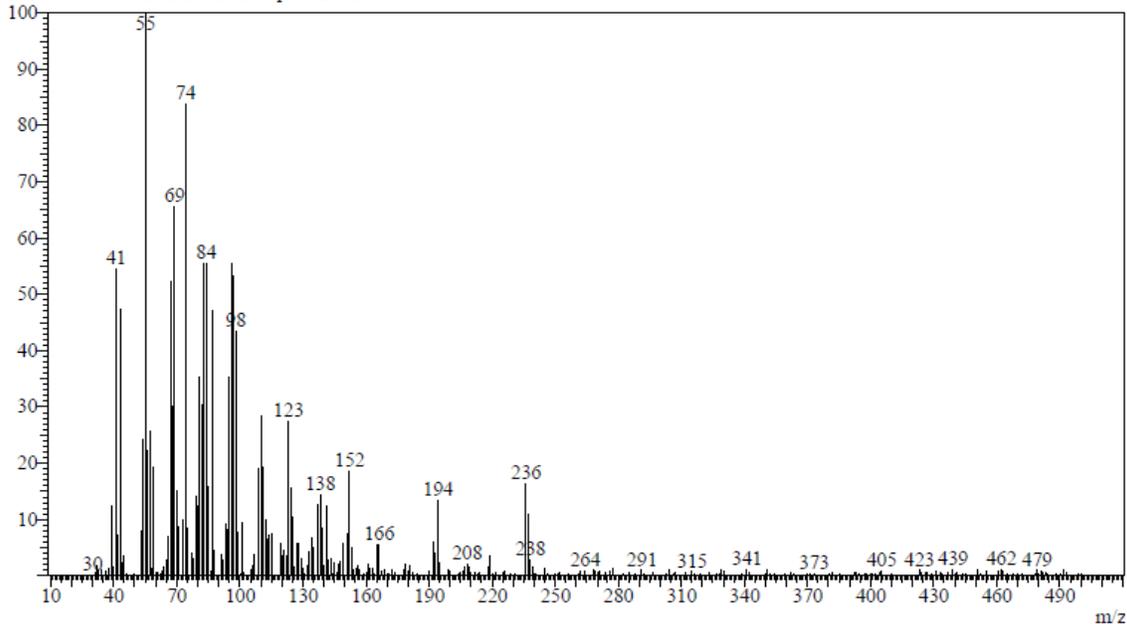
Container Size : 2 ml

Expiration Date : See Note

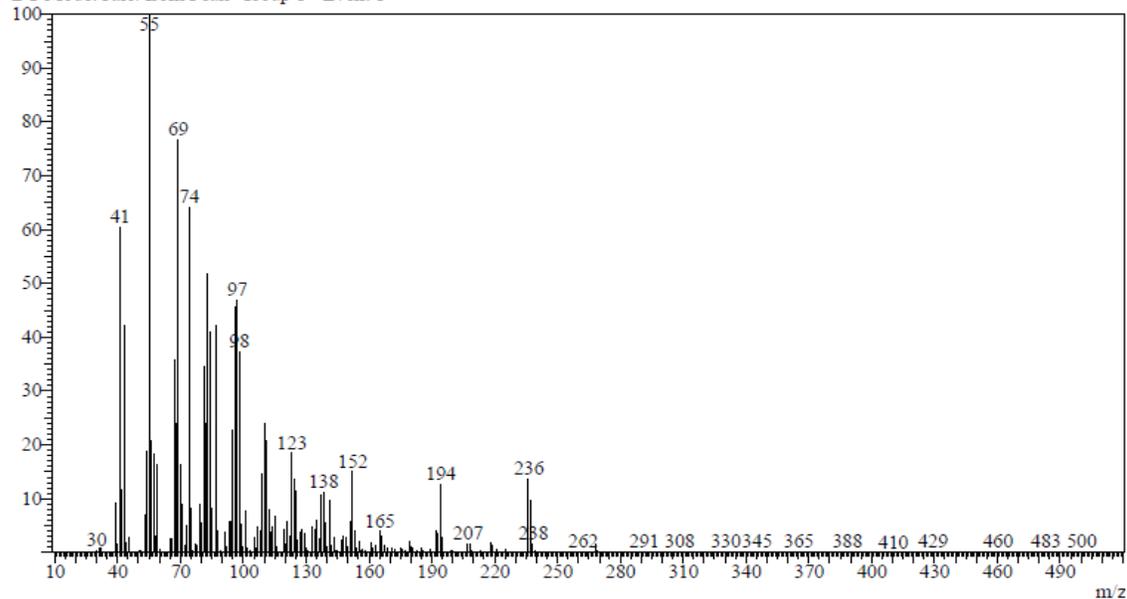
Elution Order	Compound	CAS #	Percent Purity	Grav. Conc. (weight/volume)
1	Methyl butyrate (C4:0)	632-42-7	99%	1.5 weight %
2	Methyl hexanoate (C6:0)	106-70-7	99%	1.5 weight %
3	Methyl octanoate (C8:0)	111-11-5	99%	2.0 weight %
4	Methyl decanoate (C10:0)	1110-42-9	99%	2.5 weight %
5	Methyl undecanoate (C11:0)	1731-86-8	99%	2.5 weight %
6	Methyl laurate (C12:0)	111-82-0	99%	5.0 weight %
7	Methyl tridecanoate (C13:0)	1731-88-0	99%	2.5 weight %
8	Methyl myristate (C14:0)	124-10-7	99%	2.5 weight %
9	Methyl myristoleate(cis-9) (C:14:1)	56219-06-8	99%	1.5 weight %
10	Methyl pentadecanoate (C15:0)	7132-64-1	99%	1.5 weight %
11	Methyl palmitate (C16:0)	112-39-0	99%	10.0 weight %
12	Methyl palmitoleate(cis-9) (C16:1)	1120-25-8	99%	5.0 weight %
13	Methyl heptadecanoate (C17:0)	1731-92-6	99%	2.5 weight %
14	Methyl stearate (C18:0)	112-61-8	99%	5.0 weight %
15	Methyl elaidate(trans-9) (C18:1)	1937-62-8	99%	2.5 weight %
16	Methyl oleate(cis-9) (C18:1)	112-62-9	99%	15.0 weight %
17	Methyl linoelaidate(trans-9,12) (C18:2)	2566-97-4	99%	2.5 weight %
18	Methyl linoleate(cis-9,12) (C18:2)	112-63-0	99%	10.0 weight %
19	Methyl arachidate (C20:0)	1120-28-1	99%	2.5 weight %
20	Methyl eicosenoate(cis-11) (C20:1)	1120-28-1	99%	1.5 weight %
21	Methyl linolenate(cis-9,12,15) (C18:3)	301-00-8	99%	5.0 weight %
22	Methyl behenate (C22:0)	929-77-1	99%	2.5 weight %
23	Methyl erucate(cis-13) (C22:1)	1120-34-9	99%	1.5 weight %
24	Methyl tricosanoate (C23:0)	2433-97-8	99%	1.5 weight %
25	Methyl eicosapentaenoate(cis-5,8,11,14,17) (C20)	2734-47-6	99%	2.5 weight %
26	Methyl lignocerate (C24:0)	2422-49-1	99%	2.5 weight %
27	Methyl nervonate(cis-15) (C24:1)	2733-88-2	99%	2.5 weight %
28	Methyl docosahexaenoate (C22:6)	28061-46-3	99%	2.5 weight %

Anexo 5. Espectro de masas de los ácidos grasos del aceite de las semillas de *Vitis labrusca* L. (uva Isabella).

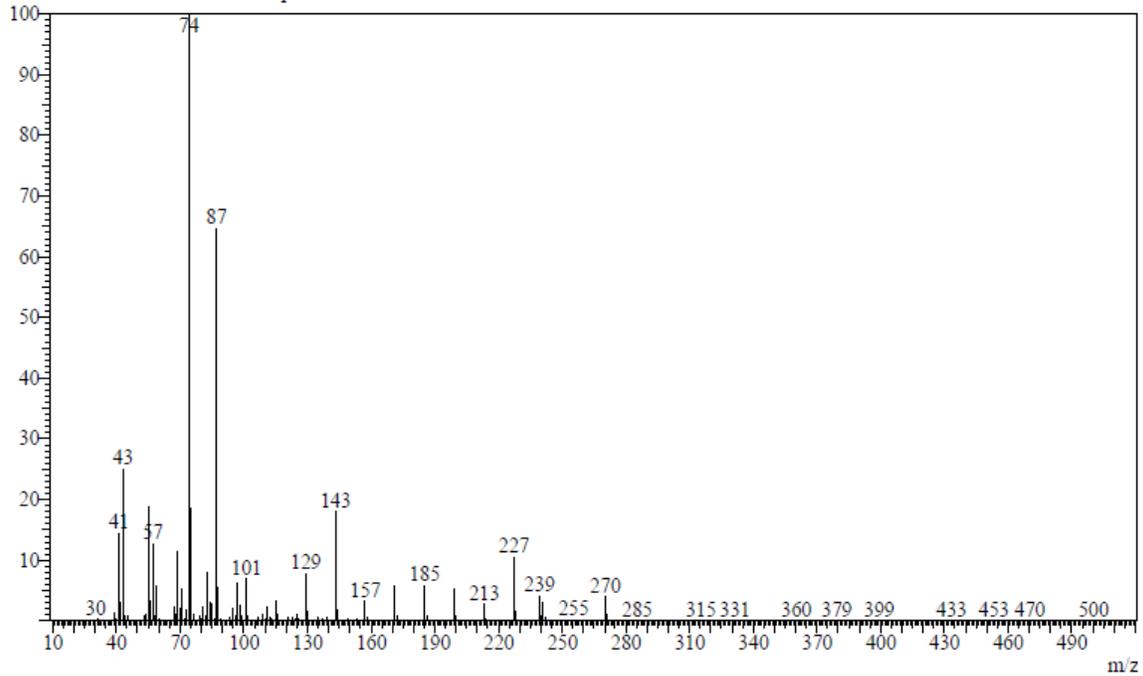
Line#:9 R.Time:18.1(Scan#:1810)
MassPeaks:311
RawMode:Averaged 18.1-18.1(1809-1811) BasePeak:55(3907)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



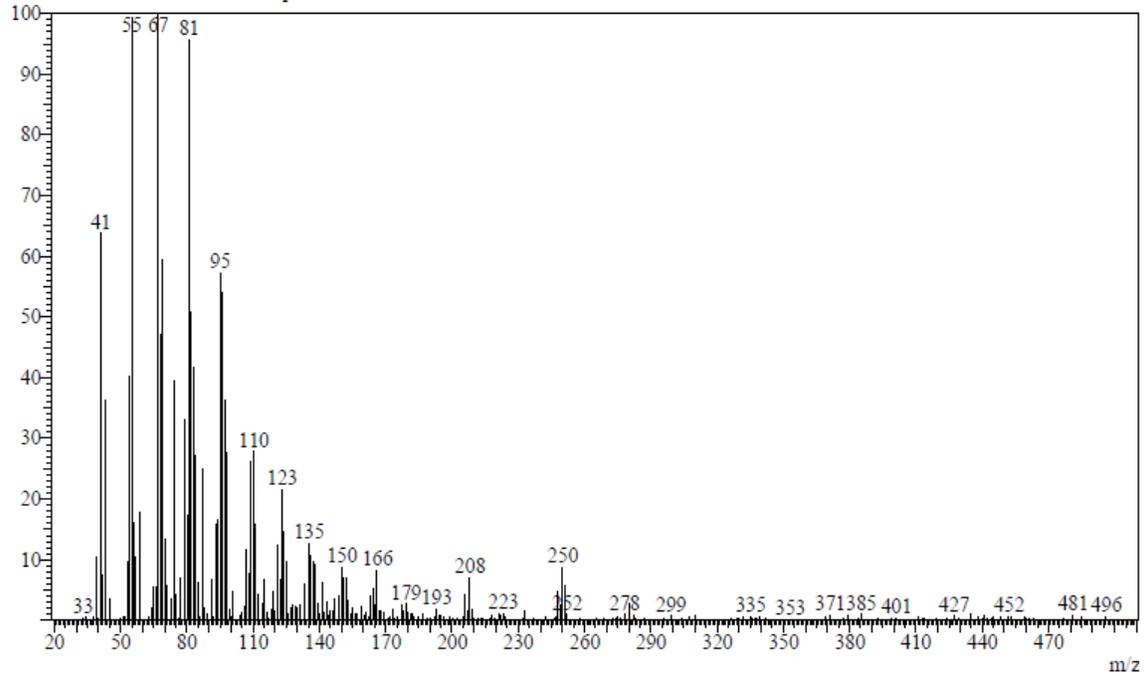
Line#:10 R.Time:18.1(Scan#:1818)
MassPeaks:308
RawMode:Averaged 18.1-18.2(1817-1819) BasePeak:55(33158)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



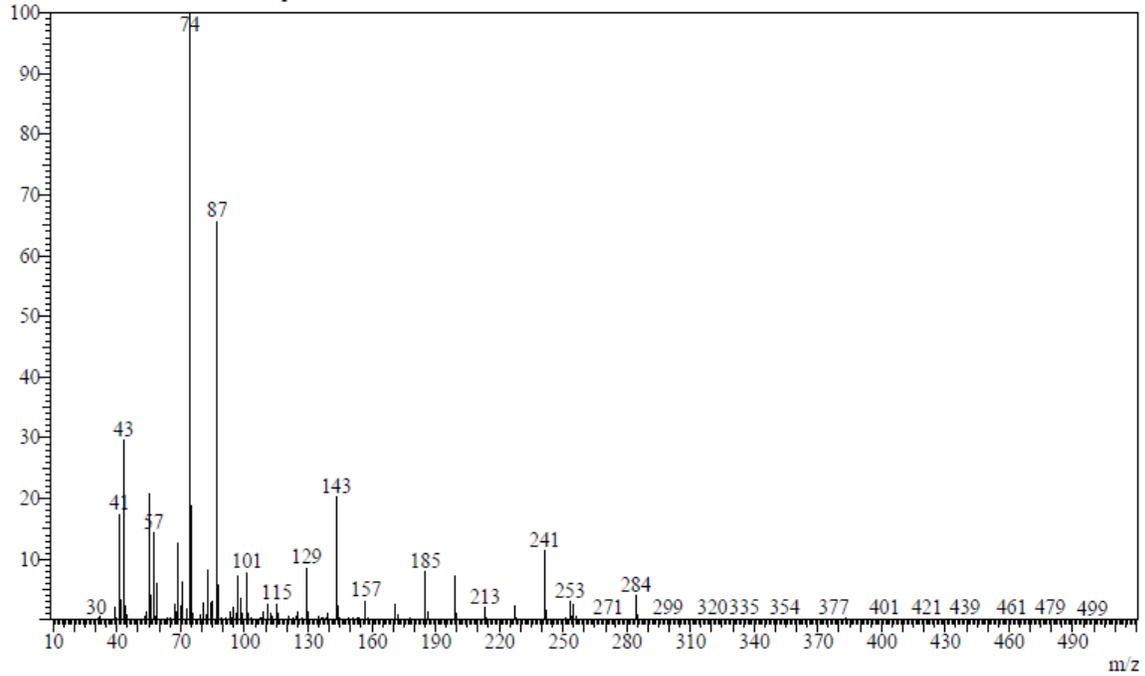
Line#:11 R.Time:18.4(Scan#:1853)
MassPeaks:300
RawMode:Averaged 18.4-18.4(1852-1854) BasePeak:74(2785883)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



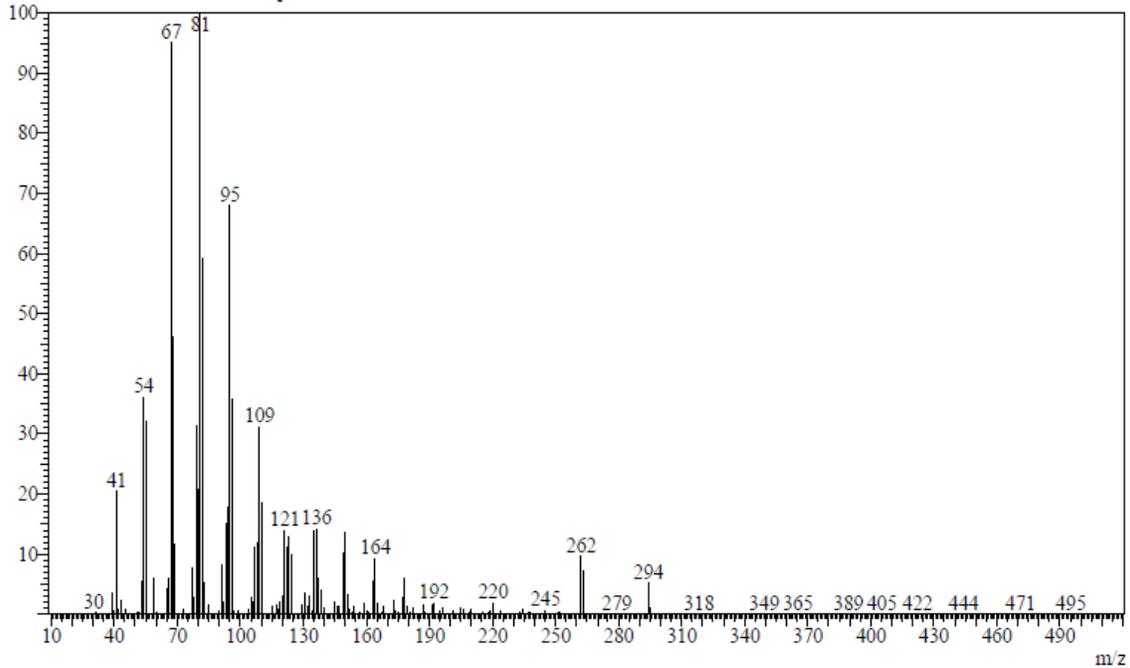
Line#:12 R.Time:19.5(Scan#:1981)
MassPeaks:290
RawMode:Averaged 19.5-19.5(1980-1982) BasePeak:67(5542)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



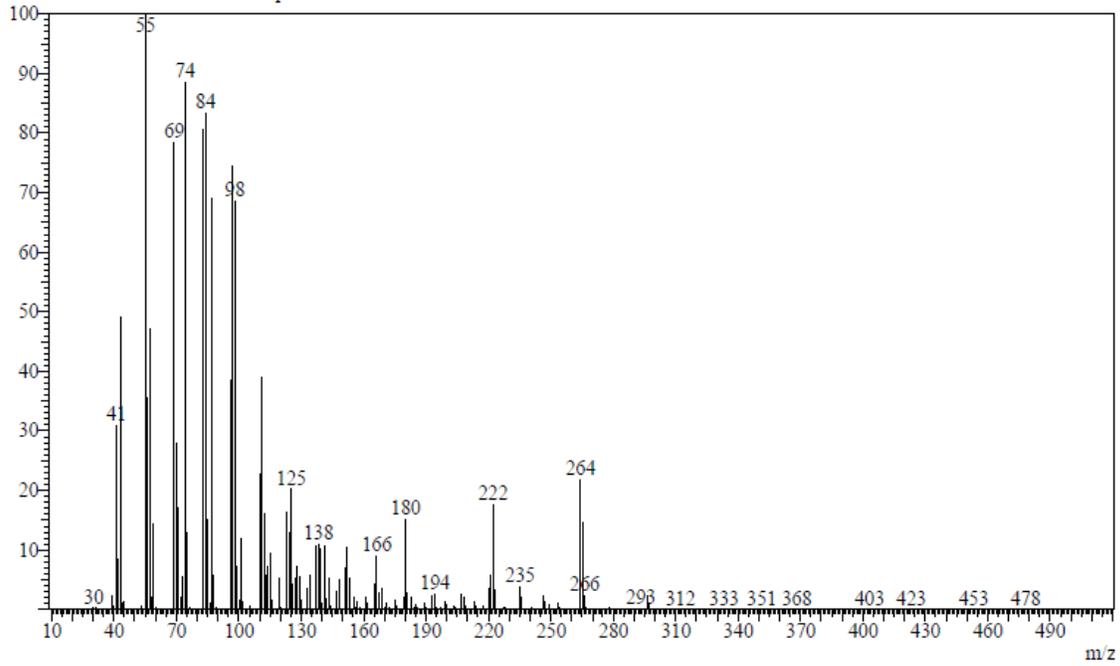
Line#:13 R.Time:19.8(Scan#:2018)
MassPeaks:282
RawMode:Averaged 19.8-19.8(2017-2019) BasePeak:74(24045)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



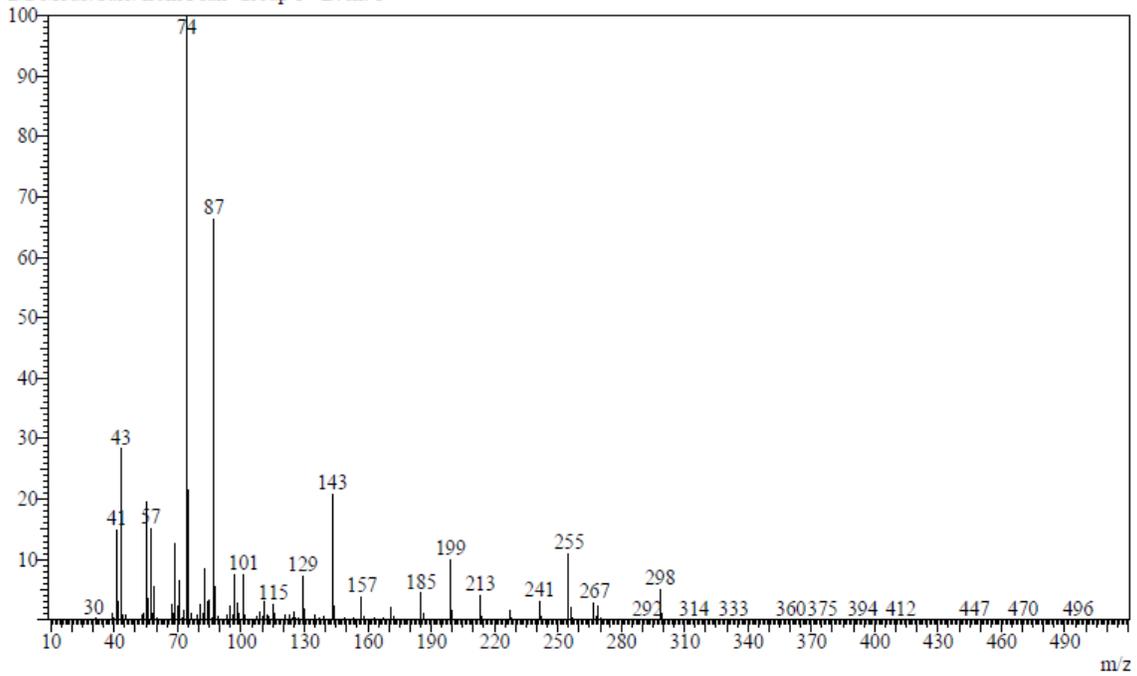
Line#:14 R.Time:20.8(Scan#:2136)
MassPeaks:266
RawMode:Averaged 20.8-20.8(2135-2137) BasePeak:81(1203340)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



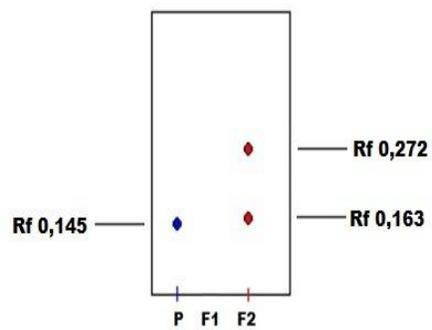
Line#:15 R.Time:20.9(Scan#:2146)
MassPeaks:249
RawMode:Averaged 20.9-20.9(2145-2147) BasePeak:55(509724)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



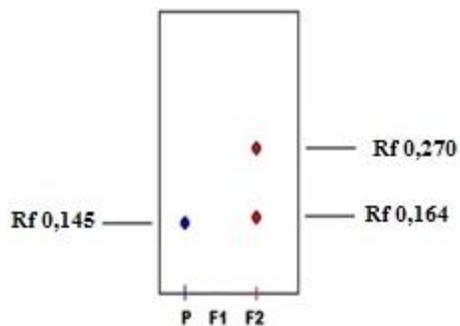
Line#:16 R.Time:21.2(Scan#:2179)
MassPeaks:291
RawMode:Averaged 21.1-21.2(2178-2180) BasePeak:74(1275808)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Anexo 6.Control por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida, empleando el sistema de elución 1.

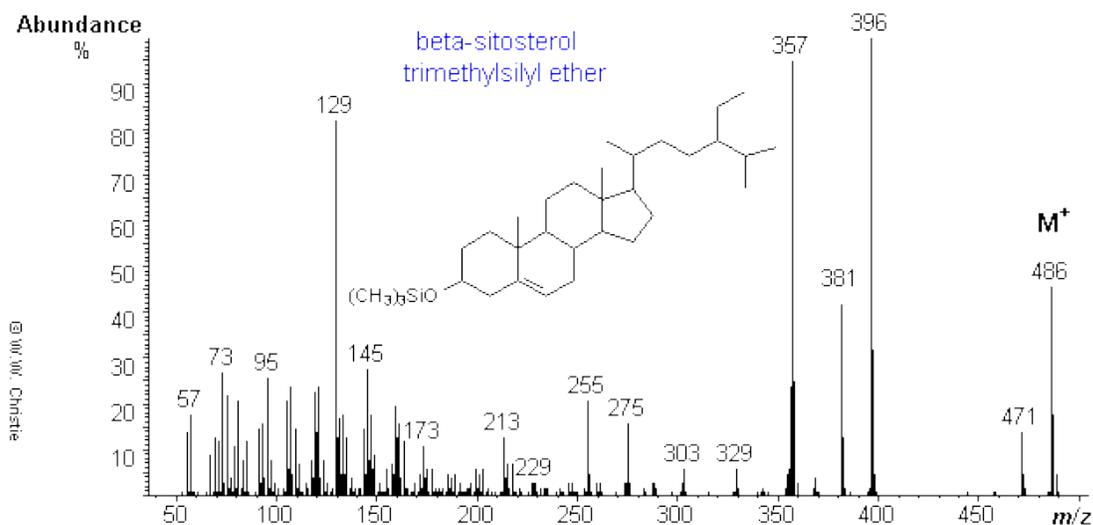


Anexo 7.Control por CCD de fracciones obtenidas por separación en fase sólida, empleando el sistema de elución 2.

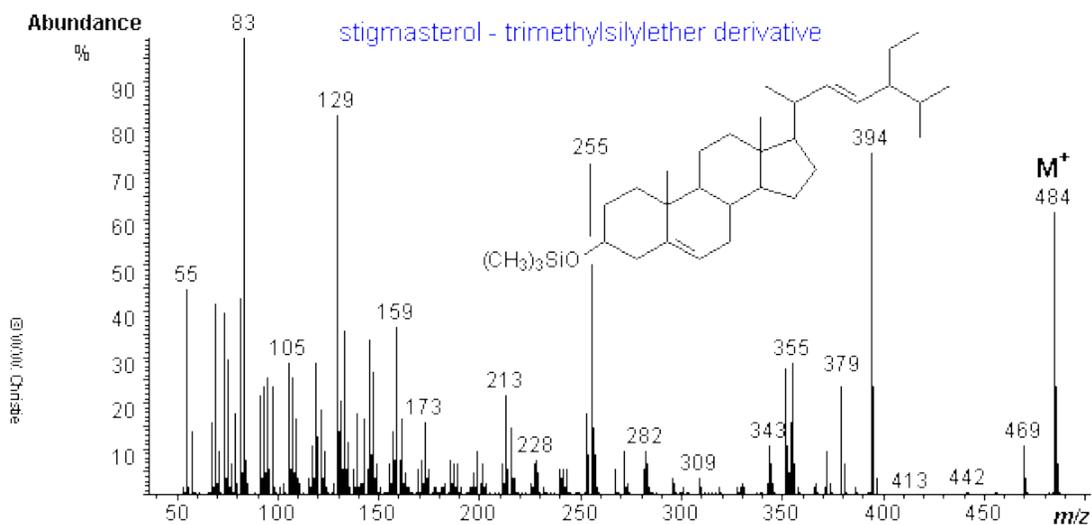


Anexo 8. Espectros de la base de datos del equipo WILEY ACCESS PAC 7ED.

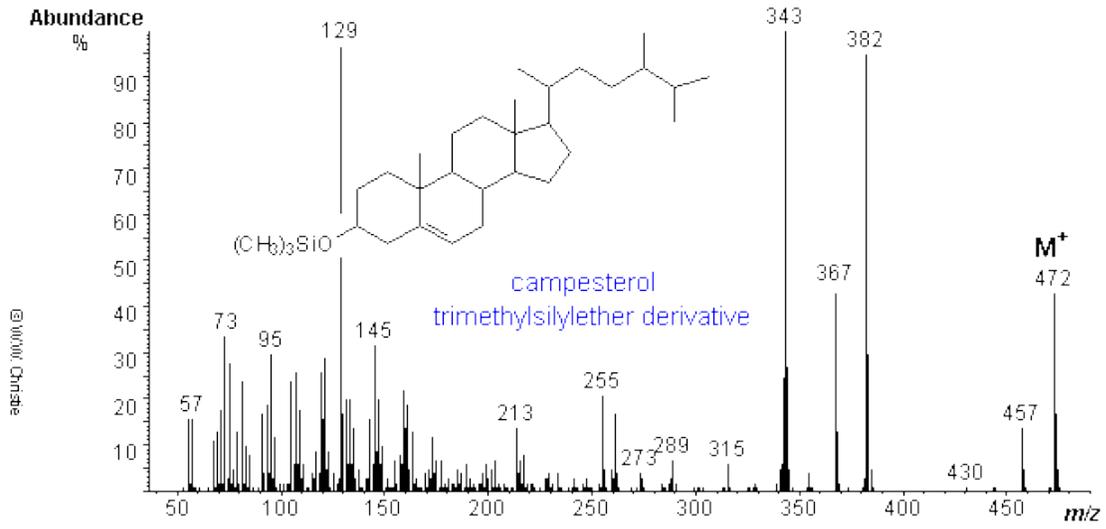
Espectro de masas del Beta-sitosterol-TMS ether



Espectro de masas del Estigmasterol-TMS ether



Espectro de masas del Campesterol-TMS ether



Espectro de masas del Campestanol-TMS ether

