



Extracción del aceite de la semilla de uva
variedad “Criolla negra” y su caracterización
*Oil extraction process from the seed of the
“Criolla negra” grape and its characterization*

ALBERTO MIERES PITRE¹

albertopitre@gmail.com

Universidad de Carabobo

ADRIÁN ANDRADE²

nerdrian@gmail.com

SENCAMER

LEDYAMIL GARCÍA³

ledyamil@gmail.com

SENCAMER

PEGGY LONDOÑO⁴

peggylondono@hotmail.com

Universidad de Carabobo

Recibido: 21/07/2010

Aceptado: 16/11/2010

¹ Licenciado en Química con Maestría en Tecnología de los alimentos. Profesor Titular de la Universidad de Carabobo, PPI Nivel II. Integrante de la comisión de la Maestría de Ingeniería de Procesos

² Ingeniero Químico, fue preparador de Química General I (periodo: 2006-2007) por dos semestres consecutivos. Recibió Mención Honorífica en su tesis de pregrado. Ha participado en diferentes congresos y conferencias relacionadas con Ingeniería de alimentos. Actualmente laborando en SENCAMER como analista de Control de Calidad en el área de Ingeniería Química. Cursando Maestría en Ingeniería de Procesos en la Universidad de Carabobo

³ Ingeniero Químico, fue preparadora de Química General II (periodo: 2006-2007) por dos semestres consecutivos. Recibió Mención Honorífica en su tesis de pregrado. Ha participado



Resumen

Se evaluó el proceso de extracción de aceite de la semilla de uva variedad Criolla Negra, provenientes de los residuos del proceso de prensado en la producción de vinos. La extracción se llevó a cabo en laboratorio en un equipo Soxhlet, utilizando hexano como solvente extractor, a una temperatura constante de 70 °C. Los factores analizados en el diseño fueron tamaño de partícula, tiempo de extracción y masa de semilla; seleccionándose tres niveles por cada factor, originándose un total de 27 corridas experimentales. Una vez extraído el aceite, se caracterizó fisicoquímicamente y se encontró a partir de cromatografía de gases la composición de ácidos grasos. Posteriormente se analizó la estabilidad oxidativa del aceite crudo de la semilla de uva, comparándolo con la estabilidad oxidativa del aceite de oliva, empleando pruebas aceleradas para su determinación. Se encontró que la variable con mayor influencia en el proceso de extracción fue el tamaño de partícula; el aceite presentó mayor porcentaje de ácido linoleico, ácido graso esencial Omega 6 y gran estabilidad oxidativa al ser comparada con el aceite de oliva utilizado como patrón. Los resultados de las pruebas de identidad del aceite se encontraron cercanos a los reportados para el aceite refinado de la semilla de uva, mientras que las pruebas de calidad superaron los valores de referencia.

Palabras clave: Orujo de uva, semilla de uva, extracción de aceite, estabilidad oxidativa.

Abstract

The oil extraction process of grape seed from Criolla negra variety was evaluated from residues of the press process on wine production. The extraction was taken at a laboratory level in an Soxhlet equipment using hexane like solvent, to a constant temperature of 70 °C. The factors analyzed in the design were a particle size, extraction time and seed mass; three levels

en diferentes congresos y conferencias relacionadas con Ingeniería de alimentos. Actualmente laborando como Coordinadora en SENCAMER Valencia. Cursando Maestría en Ingeniería de Procesos en la Universidad de Carabobo

- ⁴ Ingeniero Químico con Maestría en Administración de Empresas Mención Gerencia, actualmente finalizando una Maestría en Biotecnología Alimentaria. Profesora a tiempo convencional de la Universidad de Carabobo, Asistente del Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, PPI Nivel Candidato.



were selected for every factor; originating a whole of 27 experimental runs. Once extracted the oil, it was characterized physical and chemically and the composition of oily acids was found from gas chromatography. Later, it was analyzed the oxidative stability of the raw oil of the grape seed comparing it with the oxidative stability of the olive oil, using accelerated tests for its determination. It was found that the variable with major influence in the process of extraction was the particle size; the oil shows major percentage of linoleic acid, oily acid essential Omega 6; the grape oil shows great oxidative stability when compared with the olive oil used as standard. The results of the identity tests of the oil were nearby the reported bibliographical for the refined oil of the grape seed in the Codex Alimentarius, whereas the qualities tests overcame the bibliographical values.

Key words: grape pomace, grape seed, oil extraction, stability.

Introducción

La variedad Criolla Negra es un híbrido nativo entre las variedades *Vitis vinífera* y *Vitis caribaea*, cultivada en la estación experimental de Tarabana en Cabudare, estado Lara, con un clima de escasa nubosidad, alta insolación que alcanza hasta 6,5 horas diarias y poca pluviosidad, con un promedio de precipitación anual de 585 mm. Este híbrido es utilizado para la elaboración de sangrías y también como portainjertos para otras variedades cultivadas en la estación experimental del Instituto de la Uva, en El Tocuyo, estado Lara. Mide aproximadamente 1 cm y posee un promedio de cuatro semillas por bayas y el racimo es piramidal [1]. El orujo de uva es un subproducto que se obtiene del proceso de vinificación, el cual consiste en someter al fruto a un proceso de extracción del jugo, que junto con la pulpa y cascarilla se depositan en tanques de fermentación, se separa el jugo fermentado de toda la materia sólida que lo acompaña y, por un lado, se obtiene el jugo que pasa a destilación; por otro el orujo de uva, el cual está constituido en peso por un 45% de cascarilla u hollejo, 30% de semillas y 25% de palillos. Se estima que el orujo constituye el 12% del peso de la uva fresca y presenta un contenido



de humedad de 65% [2]. Una vía alternativa de aprovechamiento consiste en la extracción del aceite contenido en las pepitas o semillas de uva. Estudios realizados demuestran que, independientemente de la variedad de uva utilizada, el aceite extraído posee buenas cualidades organolépticas y fisicoquímicas para el consumo del hombre [3]. Entre las ventajas que posee el consumo de aceite de la semilla de uva, se encuentra la capacidad que tiene de elevar el colesterol bueno HDL y bajar el colesterol malo LDL, lo cual es atribuido al alto contenido en ácido linoleico (omega 6). Reduce la agregación plaquetaria, ayuda a prevenir la hipertensión y a normalizar las lesiones causadas por la diabetes y la obesidad. Dentro de los compuestos activos de la semilla de uva se pueden encontrar abundantes polímeros derivados de catequina y epicatequina, denominados procianidinas, los cuales tienen un gran valor farmacéutico por su actividad antioxidante para el cuidado y conservación de la piel [4].

El orujo de uva es utilizado actualmente en Venezuela para la realización de compostaje, subestimando los potenciales del residuo; por esta razón se evaluó el proceso de extracción de aceite proveniente de la semilla y así determinar la factibilidad de aprovechar parte de este subproducto en la industria alimenticia y en la elaboración de nuevos productos.

Materiales y métodos

Materia prima: La variedad de uva utilizada es la Criolla negra, un híbrido nativo entre las variedades *Vitis vinifera* y *Vitis caribaea*, cultivada en Tarabana, Barquisimeto, estado Lara. Una vez que la uva alcanza el punto óptimo de maduración de 18 a 20 °Brix y 10% de acidez, se corta y se lleva al Instituto de la Uva, en donde es prensada para la elaboración de sangrías. El residuo proveniente del prensado obtenido de la cosecha del mes de noviembre del año 2008, fue el utilizado para la realización de esta investigación.

Métodos analíticos: Los análisis fisicoquímicos realizados al aceite de la semilla de uva se efectuaron siguiendo los métodos descritos en la norma venezolana para aceites y grasas vegetales (Norma general



COVENIN 30:1997) [5], para realizar la determinación del perfil de ácidos grasos.

Extracción del aceite: Para llevar a cabo el proceso de extracción, primero se seleccionaron los factores y niveles del diseño, escogiéndose la masa de semilla alimentada, el tiempo de extracción y el tamaño de partícula como factores, ya que son las variables influyentes en el proceso de extracción. Para la selección de niveles se consideraron los siguientes aspectos: disponibilidad de materia, efectividad del tamizado y tiempo, estableciéndose tres niveles para cada factor.

Se decidió analizar las variables independientes siguiendo un diseño multifactorial 3^k de efectos cruzados, donde K representa los factores seleccionados y 3 los niveles fijados para cada uno de ellos. Se realizaron tres réplicas para cada experimento de la extracción, lo cual permitió estimar errores y corroborar datos. En total se realizaron 27 experimentos.

Una vez separadas la totalidad de las semillas del resto de los componentes del orujo de uva, se colocaron a la luz del sol durante 72 horas para la eliminación de la humedad. La molienda de la semilla se realizó mediante el uso de un molino mecánico The Straub Co. PHILA PA. DODEL 4E, del cual se obtienen diferentes tamaños de partículas. Luego del secado y la reducción del tamaño de la semilla, se procedió a realizar la selección de tamaños para la extracción usando una batería de tamices de la U.S. Standard Sieve Series - A.S.T.M. Specifications. El método consistió en tomar seis cedazos más un plato recolector y colocarlos en serie uno sobre el otro. El cedazo de mayor abertura se colocó en la parte superior y el resto, de menor abertura, se colocó en forma descendente, uno debajo del otro y, por último, el plato colector. Una vez definido el diseño, se realizaron todas las corridas experimentales para la obtención del aceite. Para la extracción del aceite se utilizó un equipo Soxhlet, variando el tiempo en 3h, 5h y 7h, el tamaño de partícula en 250 $\mu\text{m.}$, 500 $\mu\text{m.}$ y 850 $\mu\text{m.}$, y la masa alimentada entre 7 g, 10 g y 13 g. Una vez concluidas las corridas experimentales, se calculó el rendimiento de la extracción empleando la ecuación 1:

$$R = \frac{m_{bll} - m_{bv}}{m_M} * 100 \quad (1)$$

Donde:

R: rendimiento del proceso de extracción (%).

m_{bll} : masa del balón lleno de aceite (g).

m_{bv} : masa del balón antes de la extracción (g).

m_M : masa de semilla adicionada al dedal (g).

Luego, cada uno de estos resultados se sometió a un análisis estadístico, utilizando el *software* estadístico Minitab 13.0. Para la caracterización fisicoquímica del aceite obtenido se utilizaron los métodos oficiales expuestos en la norma general de grasas y aceites Covenin 30:1997.

Para realizar la determinación del contenido de ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo de gases HP modelo 5890. Este posee un detector de ionización a la llama y una columna capilar del tipo HP-FFAP, el cual tiene 25 m de longitud, 0,20 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0,33 μm . Se utilizó como gas de arrastre, nitrógeno (N_2) y un flujo de 80 mL/min. El gradiente de temperatura fue de 140 a 180 $^\circ\text{C}$, con una velocidad de calentamiento de 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Se inyectó 1 μL de muestra y bajo las mismas condiciones se inyectaron los patrones de ésteres de los ácidos grasos. La composición de los ácidos grasos del aceite se obtiene por medio de las áreas bajo la curva correspondientes a cada éster.

La evaluación de la estabilidad del aceite se realizó basándose en la medición del índice de acidez e índice de peróxidos en función del tiempo, por un lapso de 5 horas, para el aceite extraído de la semilla de uva (I) y el aceite de oliva prensado en frío (II) utilizado como patrón. La medición de estos índices se llevó a cabo a una temperatura constante de 85 $^\circ\text{C}$.

Resultados y discusión

Para el estudio de los datos obtenidos a través del programa estadístico se hace necesario el planteamiento de una hipótesis estadística,



la cual implícitamente se define al momento de seleccionar la masa de la semilla, el tamaño de partícula y el tiempo de extracción, como variables de estudio en el proceso. De esta manera se establece la hipótesis verdadera (H_V), en la cual se afirma que dichas variables influyen en el rendimiento de la extracción de aceite y la hipótesis nula (H_N), que indica lo contrario.

Si se consideran los factores de Fisher (F) para cada una de las variables estudiadas por separado, se comprueba que para todas las variables el factor de Fisher experimental (F_{EXP}) es mayor que el factor de Fisher teórico (F_{TEO}), pero se escoge el tamaño de partícula como la variable con mayor influencia sobre el proceso de extracción, ya que presenta un factor de F_{EXP} muy superior y desviado del F_{TEO} (4,98). Tanto la masa de semilla como el tiempo de extracción son variables con menor influencia, pero igualmente significativas. Se verifica a través de los valores de P y F que existe interacción entre la masa de la semilla y el tamaño de partícula, siendo igualmente influyente y significativa su interacción en el proceso de extracción, incluso en mayor proporción que la existente si se considera la variable masa de la semilla y tiempo de extracción por separado. Las condiciones de operación más adecuadas para la extracción de aceites es aquella que involucre menor tamaño de partícula (250 μ m), independientemente de la cantidad de masa de semilla y del tiempo de extracción, ya que no existe una diferencia relevante en el porcentaje de rendimiento para estas variaciones.

Los resultados del rendimiento (16%) son cercanos a lo reflejado por trabajos de investigación anteriores. Por ejemplo, Göktürk N. y col. (2007) [6] determinaron que la concentración de aceites de la semilla de uva oscilaba entre 12,35% y 16%, lo cual se verificó durante la realización de esta experimentación, cuyos valores están comprendidos entre 9% y 13%. En la Tabla 1 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados al aceite de la semilla de uva a partir de los requisitos de identidad. La densidad del aceite de la semilla de uva a 20 $^{\circ}$ C medida con respecto a la densidad del agua a 20 $^{\circ}$ C, se encuentra bastante aproximada al rango establecido en la norma para el aceite crudo para semilla de uva (0,920 - 0,926).

TABLA 1
REQUISITOS DE IDENTIDAD Y CALIDAD DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE UVA

CARACTERÍSTICA FÍSICOQUÍMICA	UNIDADES	VALOR
Densidad relativa ($d_R \pm 0,00004$)	Adim.	0,90654 ^{20 °C}
Índice de refracción ($n_R \pm 0,0005$)	Adim.	1,4732 ^{25 °C} 1,4681 ^{40 °C} 1,4614 ^{60 °C}
Índice de saponificación ($I_S \pm 1$)	mg KOH/1 g	233
Índice de yodo ($I_I \pm 0,4$)	cg I ₂ /g	105,0
Color	UA UR UAZ	Amarillo : 70 Rojo: 6 Azul: 9
Índice de acidez ($I_A \pm 0,08$)	mg KOH/1 g	65,36
Índice de peróxidos ($I_p \pm 2$)	meq O ₂ /kg	44

El índice de refracción del aceite de la semilla de uva se encontró dentro del rango (1,4670-1,4770) para las temperaturas de 25 °C y 40 °C. Comparando con el rango reportado en la norma venezolana general para aceites vegetales comestibles, los índices a las diferentes temperaturas se encuentran dentro de los rangos establecidos. Para 25 °C (1,463-1,476), para 40 °C (1,457-1,470) y para 60 °C (1,441-1,462). De igual manera, los resultados obtenidos para la semilla de uva concuerdan con los obtenidos por Göktürk N. y col. (2007) (1,460-1,466).

El índice de saponificación del aceite de la semilla de uva indica la gran capacidad de saponificación que éste posee, el cual excede el máximo exigido por la norma venezolana general para aceites vegetales comestibles (180,0-210,0). Teóricamente el índice de saponificación para este aceite se encuentra comprendido entre (188,0-194,0); pero el valor experimental se encuentra por encima del máximo establecido, lo cual



indica la presencia del alto porcentaje de ácidos grasos libres. El índice de yodo para el aceite de la semilla de uva se encuentra desviado del valor reportado (128,0-150,0), lo cual indica una menor presencia de ácidos grasos, debido a que este índice es una medida de los ácidos grasos libres. Esta divergencia se debe al proceso de oxidación que sufre el aceite, ya que tiene teóricamente un índice alto como el mencionado, favoreciéndose mucho más el proceso de oxidación de lípidos, debido a que los dobles enlaces son propensos a reaccionar con el oxígeno y así formar peróxidos. Según la norma venezolana general para aceites vegetales comestibles, el rango para el índice de yodo está comprendido entre 56,0 y 145,0, lo cual aplica para el aceite en estudio.

El color del aceite para las unidades de amarillo y rojo se encuentra dentro de lo exigido, mientras que las unidades de azul se encuentran un poco más elevadas. Es de vital importancia hacer notar que el patrón de referencia es el aceite de semilla de uva refinado, por lo tanto es de esperarse que los valores sean superiores para el aceite crudo; esto, debido a la posible oxidación de los ácidos grasos del aceite, por las altas temperaturas en el proceso de extracción usando el equipo Soxhlet, o el tiempo y condiciones de almacenamiento. Además de esto se realizó la determinación de color de saponificación, arrojando los siguientes resultados: amarillo (70 UA), rojo (13 UR) y azul (14 UAZ); los valores se encuentran desviados de lo reportado en el manual de grasas y aceites 1997 para el aceite de semilla de uva, pero aun así son características controlables dentro de la industria jabonera a través del proceso de refinación de la grasa.

La acidez y el índice de acidez del aceite de la semilla de uva se encuentran muy por sobre el nivel exigido tanto por la norma venezolana general para aceites vegetales comestibles, cuyos valores oscilan entre (2,0-1,0) respectivamente. Este valor tan alto del índice de acidez se debe al elevado contenido de ácidos grasos libres presentes en el aceite, los cuales son los responsables de la oxidación de lípidos en el aceite, y por lo tanto contribuyen a la rancidez del mismo. Estos ácidos grasos libres se han formado por cadenas de ácidos grasos hidrolizadas desde

la estructura básica del triglicérido. 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. Además de esto, el método de separación del aceite y el solvente involucran presencia de calor y contacto con oxígeno, lo cual ocasiona el mismo efecto, afectando en cierta medida la calidad del aceite obtenido. (Larrañaga y col., 1997) [7].

El índice de peróxidos obtenido para el aceite de la semilla de uva no se encuentra dentro de las especificaciones de la norma venezolana general para aceites vegetales comestibles, ya que ella estipula que éste debe encontrarse en un rango de 2,0-5,0, tampoco cumple con lo establecido (máx. 10). Para este caso, el índice de peróxidos resultó (44 ± 2) mg KOH/g, lo que indica que el aceite ha sufrido un acelerado proceso de oxidación. Esto concuerda con lo descrito anteriormente y sugiere una marcada oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en el aceite.

Los resultados obtenidos de la composición en ácidos grasos libres fue: palmitito (9,3126%), esteárico (5,9768%), oleico (15,3157%), linoleico (67,0422%), y una fracción de 2,3526% de compuestos no identificados.

Los valores del contenido en los distintos ácidos grasos analizados se encuentran dentro de los intervalos reportados por la normativa: palmítico (5,5%-11,0%), esteárico (3,0%-6,5%), oleico (12,0%-28,0%) y linoleico (58,0%-78,0%). El aceite obtenido posee un elevado contenido en ácido linoleico (omega 6), un ácido graso esencial en la dieta humana, ya que no se sintetiza en las células y debe ser ingerido a través de la alimentación. Los valores del índice de acidez y peróxidos inicialmente se encontraron bastante elevados, debido a la degeneración que sufre el aceite por la presencia de altas temperaturas en el proceso de extracción. 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, entre los cuales se



pueden mencionar los aldehídos, las cetonas, furanos y ácidos carboxílicos; dichos productos son los responsables de la peroxidación de los aceites y grasas, tal como lo expone Larrañaga y col. (1997).

La medición de los índices de acidez y peróxidos se realizó durante un período de cinco horas, tanto para el aceite de la semilla de uva como para el aceite de oliva usado como patrón. En la Tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos de índices de acidez y peróxidos en el tiempo de estudio.

TABLA 2
ESTABILIDAD DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE UVA Y DEL ACEITE DE OLIVA
A PARTIR DE LA MEDICIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ Y PERÓXIDOS
EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Tiempo de evaluación ($T_e \pm 1$) min	Índice de acidez ($I_A \pm 0,08$) mg KOH/g		Índice de peróxidos ($I_p \pm 2$) meq O_2 /kg	
	I	II	I	II
0	193,38	5,35	44	9
60	198,43	5,14	50	30
120	205,32	5,26	57	31
180	208,20	6,42	63	39
240	210,43	7,07	65	43
300	210,94	11,72	72	47

I: Aceite de semilla de uva.

II: Aceite de oliva prensado en frío.

Tal como se puede apreciar en dicha tabla, los valores de los índices de acidez y peróxidos no presentan variaciones significativas o grandes fluctuaciones en el tiempo sometidos a calentamiento, lo cual es un indicativo de la estabilidad de ambos aceites frente a la oxidación de sus ácidos

grasos Dicho comportamiento se puede apreciar con mayor claridad en las Figuras 1 y 2.

FIGURA 1

**ÍNDICE DE ACIDEZ DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE UVA
Y DEL ACEITE DE OLIVA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO**

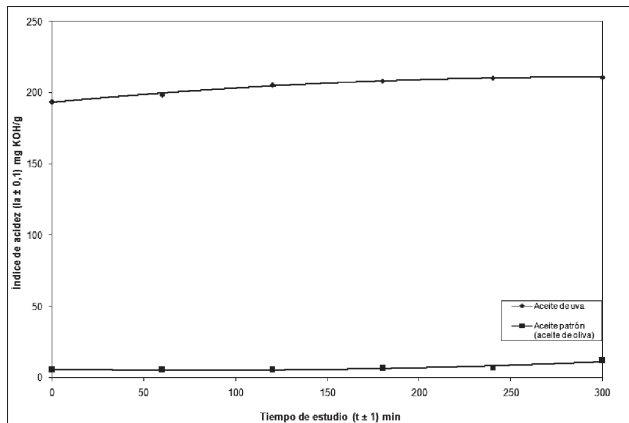
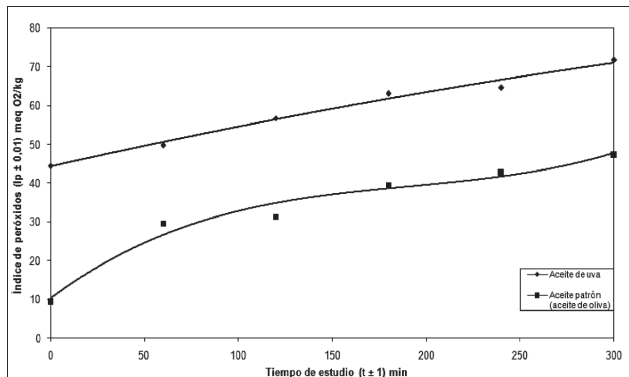


FIGURA 2

**ÍNDICE DE PERÓXIDOS DEL ACEITE DE LA SEMILLA DE UVA
Y DEL ACEITE DE OLIVA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.**





La diferencia tan grande que existe en el índice de acidez y peróxidos entre ambos aceites es debido principalmente a los métodos de obtención de los mismos; cabe resaltar que el aceite de oliva utilizado como patrón, se obtuvo a través de prensado en frío, por lo tanto no fue sometido a ningún tratamiento térmico. Asimismo, es un aceite comestible ya refinado, proceso en el cual se eliminan los ácidos grasos libres presentes en el aceite; por lo tanto, es lógico que los valores sean mucho menores que para el aceite crudo de la semilla de uva.

Conclusiones

La variable que afectó en mayor proporción el rendimiento del proceso de extracción de aceite de la semilla de uva fue el tamaño de partícula. El índice de yodo, el índice de saponificación, al igual que la acidez y peróxidos, son una medida de los ácidos grasos insaturados del aceite. El valor del índice de saponificación sugiere el uso de este aceite en la industria química. El aceite de la semilla de uva se oxida fácilmente, favorecido por el contenido de ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y por el aumento de temperatura. Para obtener un aceite con baja rancidez es necesario extraerlo por un método en el que no sea sometido a calentamiento, por ejemplo el prensado en frío.



Referencias

- VALOR, O. (2008). *Comunicación personal sobre la variedad de uva donada por el Instituto Nacional de la Uva, sistema de plantación, explicación del proceso, entre otras cosas*. Instituto Nacional de la Uva, El Tocuyo, Venezuela.
- FANTOZZI, P. y BETSCHAT, A. (1981). "Grape seed: potential source of protein". *Journal Am oil chem soc.*
- RUBIO, M.; PARDO, J.; FERNÁNDEZ, E.; ALVARRUIZ, A.; LÓPEZ, E.; NÍÑEZ, J.; ALFARO, A.T. ALFONSO, G. (2007). *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). Albacete España.
- GUERRA, E. y ZÚÑIGA, M. (2003). "Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinífera*, por prensado en frío". *Grasas y aceites*, vol. 54, fasc. 1. Chile.
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN) (1997). Norma N° 30: 1997. Aceites y grasas vegetales. Norma general. FONDO-NORMA, Caracas, Venezuela.
- GOKTURK, B.; OSKAN, G. y SEMA, E. (2007). *Resumen de caracterización de extractos de aceite de orujo y pepita de uva*. Universidad de la Rioja.
- LARRAÑAGA, I.; CARBALLO, J.; RODRÍGUEZ, M. y FERNÁNDEZ, J. (1997). *Control e higiene de los alimentos*. México: McGraw-Hill. 2^{da} edición.