



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Aislamiento, cuantificación y evaluación de posibles antioxidantes
presentes en la semilla de tamarindo mexicano residual
(*Tamarindus indica*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JONATHAN TRAPALA REYNA

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

- **PRESIDENTE:** Profesora: **ROCÍO POZAS HORCASITAS**
- **VOCAL:** Profesor: **HERMILO LEAL LARA**
- **SECRETARIO:** Profesor: **LINO JOEL REYES TREJO**
- **1er. SUPLENTE:** Profesora: **NORMA CASTILLO RANGEL**
- **2° SUPLENTE:** Profesora: **JEANETTE ADRIANA AGUILAR NAVARRO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

1. LABORATORIO 208, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
2. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, ÁREA DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRÍCOLA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

ASESOR DEL TEMA: **LINO JOEL REYES TREJO**

FIRMA

SUPERVISOR TÉCNICO: **BENITO REYES TREJO**

FIRMA

SUSTENTANTE: **JONATHAN TRAPALA REYNA**

FIRMA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURA	C
ÍNDICE DE TABLAS	E
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos particulares	4
3. HIPÓTESIS	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Residuos	5
4.1.1. Residuos de alimentos	6
4.1.1.1. Influencia de la regulación en la reducción de los residuos alimenticios y su valorización	10
4.1.1.2. Legislación	10
4.1.1.3. Valorización de los residuos de alimentos	11
4.1.1.4. Residuos de alimentos como materia prima para la obtención de compuestos de interés	12
4.1.1.4.1. Residuos de origen animal como materia prima	12
4.1.1.4.2. Residuos de frutas y vegetales como materia prima.	13
4.1.1.5. Tecnologías convencionales para la recuperación de compuestos de alto valor agregado presentes en los R.A.	18
4.1.1.6. Tecnologías emergentes para la recuperación de compuestos de alto valor agregado presentes en los RA	19
4.2. Antioxidantes	23
4.2.1. Antioxidantes naturales	24
4.2.1.1. Vitaminas	25
4.2.1.2. Carotenoides	27
4.2.1.3. Polifenoles.	28
4.2.2. Métodos de cuantificación y separación de polifenoles	32
4.2.3. Métodos de cuantificación de la actividad antioxidante.	33
4.2.4. Estabilidad oxidativa en lípidos inducida por antioxidantes	36
4.2.5. Comparación entre los antioxidantes naturales y sintéticos	38
4.2.6. Instituciones que certifican el uso de antioxidantes en alimentos	39
4.3. El tamarindo como fuente potencial de antioxidantes naturales	40
4.3.1. La producción de tamarindo en México	41
4.3.2. Composición del fruto y la semilla de tamarindo	44
4.3.3. Polifenoles de la semilla de tamarindo	45
5. METODOLOGÍA	47

5.1. Material vegetal.....	47
5.10. Evaluación de la estabilidad oxidativa de un aceite comercial empleando extractos de semilla de tamarindo residual.....	54
5.10.1. Índice de acidez.....	54
5.10.2. Índice de yodo.....	55
5.10.3. Índice de peróxidos.....	56
5.2. Equipos y reactivos.....	47
5.3. Diagrama general de actividades.....	48
5.4. Limpieza, secado y selección de la semilla.....	49
5.5. Determinación de características físicas de las semillas.....	49
5.6. Determinación de la humedad y extracción del aceite de la semilla de tamarindo.....	49
5.7. Extracción de antioxidantes de las semillas de tamarindo.....	50
5.8. Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu.....	50
5.9. Evaluación de la actividad antioxidante.....	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1. Características físicas de las semillas de tamarindo (<i>Tamarindus indica</i>).....	57
6.2. Determinación de la humedad y extracción del aceite de la semilla de tamarindo.....	57
6.3. Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu.....	57
6.4. Evaluación de la actividad antioxidante con DPPH.....	60
6.5. Estabilidad oxidativa inducida por antioxidantes.....	63
6.5.1. Índice de acidez.....	63
6.5.2. Índice de yodo.....	65
6.5.3. Índice de peróxidos.....	66
7. CONCLUSIONES.....	68
8. BIBLIOGRAFÍA.....	69
9. ANEXO.....	81

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Clasificación de los residuos según su origen.....	5
Figura 2. Clasificación de los residuos alimenticios según su origen.....	7
Figura 3. Cantidad de residuos generado al año por todo el mundo.....	8
Figura 4. Tipos de extracción por microondas.....	21
Figura 5. Tipos de sonicadores.....	23
Figura 6. Clasificación de los antioxidantes naturales.....	25
Figura 7. Estructura del ácido L-ascórbico.....	26
Figura 8. β -caroteno.....	28
Figura 9. Estructura general de un flavonoide.....	29
Figura 10. Ejemplos de flavonoides.....	30
Figura 11. Ejemplo de ácidos fenólicos.....	31
Figura 12. Estructura del reactivo DPPH antes y después de reaccionar.....	34
Figura 13. Moléculas que sirven de referencia para la prueba con DPPH.....	34
Figura 14. Región nativa y naturalizada del tamarindo en el mundo.....	41
Figura 15. Principales estados productores de tamarindo en México.....	42
Figura 16. Fruto obtenido del árbol <i>Tamarindus indica L.</i>	43
Figura 17. Principales componentes polifenólicos presentes en la semilla de tamarindo.....	46
Figura 18. Cuantificación de polifenoles presentes en los extractos de semilla residual de tamarindo empleando extracción asistida por ultrasonido (30 minutos). El método empleado fue el de Folín-Ciocalteu (concentración expresada en mg de equivalentes de ácido gálico sobre gramo de muestra seca, mg EAG/g).....	58
Figura 19. Evaluación de la actividad antioxidante con DPPH expresado en micromolar de equivalentes de trolox sobre gramo de muestra ($\mu\text{g ET/g m.}$).....	61
Figura 20. Índice de acidez de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva extra virgen, E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a una temperatura de 40 °C.....	64
Figura 21. Índice de yodo de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva extra virgen, E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a una temperatura de 40 °C.....	65
Figura 22. Índice de peróxidos de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva extra virgen, E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a una temperatura de 40 °C.....	67
Figura 25. Curva patrón de ácido gálico en acetona al 80% para la determinación de polifenoles totales por el método de Folín-Ciocalteu.....	81

Figura 24. Curva patrón de ácido gálico en agua para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	81
Figura 25. Curva patrón de ácido gálico en etanol al 80% para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	82
Figura 26. Curva patrón de ácido gálico en metanol al 80% para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	82
Figura 27. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en metanol	83
Figura 28. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en agua	84
Figura 29. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en acetona	84
Figura 30. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en etanol	85
Figura 31. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en etanol	85
Figura 32. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en etanol	86
Figura 33. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en etanol	86
Figura 34. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en metanol	87
Figura 35. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en metanol	87
Figura 36. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en metanol	88
Figura 37. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en agua	88
Figura 38. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en agua	89
Figura 39. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en agua	89
Figura 40. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en acetona	90
Figura 41. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en acetona	90
Figura 42. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en acetona	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Generación de residuos alimenticios	9
Tabla 2. Ejemplos de compuestos obtenidos a partir de residuos alimenticios cárnicos.	13
Tabla 3. Ejemplos de aplicación industrial usando la extracción con fluido súper crítico (dióxido de carbono).	20
Tabla 4. Ejemplos de extracciones asistidas por microondas.....	20
Tabla 5. Ejemplos de la extracción asistida por ultrasonido en diferentes matrices alimentarias.	22
Tabla 6. Estructura de los principales tocoferoles y tocotrienoles	27
Tabla 7. Ejemplos de carotenoides presentes en algunos vegetales.	28
Tabla 8. Principales estados de la republica que producen tamarindo	43
Tabla 9: Análisis fisicoquímico proximal de la semilla de tamarindo nigeriano y mexicano	44
Tabla 10. Humedad y contenido de grasa de las semillas de tamarindo	57
Tabla 11. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de polifenoles totales. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05%.	59
Tabla 12. Matriz de la prueba de Tukey para la prueba de polifenoles totales. Nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 53.55.	59
Tabla 13. Valores de actividad antioxidante y polifenoles totales en los cuatro extractos obtenidos de la semilla de tamarindo residual.....	62
Tabla 14. Cantidad de muestra usada para obtener el extracto	83
Tabla 15. Absorbancia obtenida para cada extracto para la prueba de polifenoles totales	83
Tabla 16. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de actividad antioxidante con DPPH .Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% 91	91
Tabla 17. Matriz de la prueba de Tukey para los distintos extractos obtenidos. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa (DHS)de 46.55.	91
Tabla 18. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de acidez en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.	92
Tabla 19. Matriz de la prueba de Tukey para los datos obtenidos en el ensayo de ácidos. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 0.131.	92
Tabla 20. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de índice de yodo en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.	92
Tabla 21. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de índice de peróxidos en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.	92

Tabla 22. Matriz de la prueba de Tukey para los datos de índice de peroxidos. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 0.679.93



RESUMEN

La generación de residuos alimenticios en el mundo es muy grande, por lo que el aprovechamiento de estos es indispensable. Actualmente, estos desechos pueden ser usados como materia prima para la obtención de compuestos de alto valor agregado como los polifenoles.

En este trabajo se usó como materia prima la semilla de tamarindo mexicano residual para la obtención de extracto con alto contenido de polifenoles totales y de actividad antioxidante. La semilla de tamarindo residual previamente desengrasada se usó para la obtención de cuatro extractos diferentes usando como disolventes agua, acetona, metanol y etanol. La técnica empleada para la obtención de estos extractos fue una extracción asistida por ultrasonido usando un sonicador. Se llevó a cabo la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folín-Ciocalteu para cada extracto obteniendo 399.48 ± 6.17 , 323.45 ± 35.78 , 119.84 ± 18.90 , 11.06 ± 1.21 mg de equivalentes de ácido gálico/gramos de muestra seca para los extractos etanólico, metanólico, acetónico y acuoso respectivamente. Posteriormente se determinó la actividad antioxidante de cada extracto cuyos valores fueron 240.44 ± 20.21 , 170.74 ± 7.19 , 138.91 ± 28.05 y 30.47 ± 4.50 μM de equivalentes de Trolox/gramo de muestra para los extractos etanólicos, metanólicos, acuoso y acetónico respectivamente. El extracto etanólico se usó en las pruebas de estabilidad oxidativa y se comparó con el BHA, se observó que el extracto actuó de manera similar que el antioxidante sintético.

Se concluyó que el extracto etanólico de la semilla de tamarindo residual presenta un potencial viable para ser usado como posible antioxidante debido a su alta actividad antioxidante y a los resultados favorables en las pruebas de estabilidad oxidativa.



1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la producción de residuos alimenticios de origen animal o vegetal a nivel mundial es enorme debido a los altos niveles de producción generados por el incremento de los productos consumibles. En el caso particular de los residuos vegetales, por lo general son desechados por las distintas industrias que los generan, lo que promueve la generación de contaminación si estos residuos no son tratados adecuadamente. Las nuevas normativas que se comienzan a desarrollar en algunos países como Inglaterra, China, Estados Unidos de América o México han orillado a los productores de alimentos así como a las industrias alimenticias a buscar opciones que sean viables en el manejo de residuos y su posible utilización.

En los últimos años se han realizado diversos estudios sobre residuos de frutas y vegetales, para ver si estos pueden contener compuestos que sean de interés alimenticio, farmacológico o energético; de esta manera se podrían aprovechar estos residuos y disminuir la producción de desechos. Con lo anterior, las industrias podrían obtener beneficios económicos al desarrollar métodos para la obtención compuestos de alto valor agregado.

México cuenta con una gran biodiversidad, por lo que es posible cosechar un gran número de especies vegetales y frutales. Actualmente existe en el país un gran número de industrias procesadoras de alimentos, como son: productoras de jugos, bebidas, conservas, mermeladas, zumos y confitería entre otros productos. Todas estas industrias generan residuos que en la mayoría de los casos no son aprovechados.

En el caso particular del tamarindo, se produce principalmente en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero y Michoacán, generando una producción anual en el país, de 38 mil toneladas. Este fruto de origen africano se usa principalmente en la obtención de concentrados y confitería provenientes de la pulpa, por lo que el resto del fruto (cascara y semillas) es desechado, generándose con esto, una cantidad de residuos sólidos importante. Estudios recientes han encontrado que la semilla de



tamarindo contiene altas cantidades de compuestos polifenólicos, los cuales podrían ser una posible fuente de antioxidantes de origen natural.

Recientemente, los antioxidantes de origen natural se han estudiado con el propósito de obtener otras alternativas que atraigan al consumidor debido a su origen, que sean seguros, más eficientes y puedan ser usados en alimentos para sustituir a los antioxidantes sintéticos que se encuentran actualmente en el mercado (Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT) y Terbutilhidroxiquinona(TBHQ)). Estos últimos, se usan principalmente en la conservación de aceites comestibles, ya que son compuestos termoestables, eficientes y tienen un bajo costo de producción. Sin embargo, en varios países está restringido su empleo ya que hay estudios toxicológicos que demuestran que estos compuestos generan daño al organismo humano. Debido a esta problemática, un antioxidante que provenga de una fuente natural es una opción que puede ser usada para suplir a los antioxidantes sintéticos actuales.

La semilla de tamarindo mexicano residual, puede contener polifenoles que podrían presentar actividad antioxidante y de esta manera usar estos compuestos como una nueva alternativa para la industria alimentaria en la conservación de alimentos (aceites esenciales, aceites comestibles y grasas, entre otros), contribuyendo así, a la disminución de la generación de residuos.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Proponer a la semilla de tamarindo residual mexicano (*Tamarindus indica*) como posible fuente alternativa de antioxidantes naturales, aprovechando de manera sustentable este material residual y contribuyendo a la disminución de la generación de residuos.

2.2 Objetivos particulares

- Determinar cuál es el mejor disolvente para la extracción de polifenoles en la semilla residual de tamarindo
- Valorar que extracto presenta mayor cantidad de polifenoles totales empleando el método de Folín-Ciocalteu.
- Establecer que extracto presenta mayor actividad antioxidante empleando el método de DPPH.
- Evaluar la estabilidad oxidativa del extracto más activo obtenido, empleando una muestra de aceite comercial y compararlo con un antioxidante sintético de uso común.

3. HIPÓTESIS.

La semilla de tamarindo residual mexicano (*Tamarindus indica*) representará una opción viable como materia prima para la obtención de extractos polifenólicos como posibles antioxidantes naturales con las características adecuadas según la normatividad vigente.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Residuos

Los residuos son actualmente un gran problema a nivel mundial y éste se ha vuelto importante en países en desarrollo, como es la India, China, y Europa. Existen diferentes tipos de residuos que pueden ser clasificados de acuerdo a su origen (Figura 1) como: residuos industriales, sanitarios, agropecuarios y residuos sólidos urbanos, esto basado en su origen (Ki Lin et al., 2013).

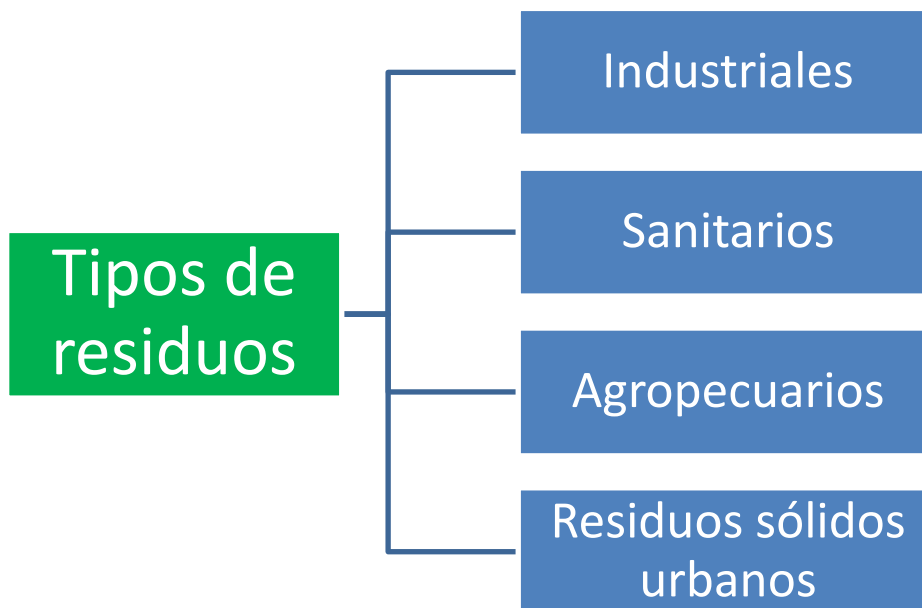


Figura 1. Clasificación de los residuos según su origen.

La generación de residuos ha venido en aumento, por lo que se requiere desarrollar nuevos métodos que ayuden a disminuir su producción y fomenten su aprovechamiento para obtener productos útiles a la sociedad (Ki Lin et al., 2014).

En México en el año 2006 se produjeron 75.73 millones de toneladas tan solo de materia seca, (Valdez-Vazquez et al., 2010). De acuerdo con el inventario de residuos sólidos del Distrito Federal (IRSDF-2013) en el año 2013, se generaron en promedio 12816 toneladas al día de residuos sólidos (SEDEMA, 2015).



Hoy en día se han desarrollado diferentes investigaciones con el fin de aprovechar los residuos que se generan, principalmente en la producción de energía y la obtención de compuestos de interés farmacéutico o alimenticio, entre otras aplicaciones (Ki Lin et al., 2014, Saval, 2012).

4.1.1. Residuos de Alimentos

En 1981 la FAO los definió como el material obtenido de la pérdida, la degradación, o el proceso de descarte en la cadena de abasto de suministros alimenticios para la obtención de productos sanos para consumo humano (FAO, 1981).

Una definición más reciente nos indica que los residuos alimenticios (RA) se pueden definir como los diferentes productos residuales que en su mayoría es materia orgánica que se extiende desde la obtención de la materia prima producto de las distintas actividades agropecuarias, el procesamiento de esta en las diversas industrias alimenticias, el mercadeo y los residuos del hogar . Estos materiales pueden reciclarse o ser utilizados para otros fines. Estos productos tienen un valor económico de materia prima más bajo que el costo que tiene la recuperación y reutilización de este material (Ki Lin et al., 2014).

La producción de RA cubre todo el ciclo de vida de los alimentos, también conocido como cadena de abasto alimentario (Figura 2) (Parfitt et al., 2010). En la primera etapa se obtienen como residuos de las actividades agropecuarias, no tienen un valor comercial ya que son: ramas, hojas, raíces, semillas, escamas o huesos. En la siguiente etapa la materia prima se puede procesar, para obtener productos alimenticios con una vida de anaquel más prolongada, en esta parte de la cadena de suministros se puede generar residuos como son: materia prima o producto terminado que no cuente con las especificaciones, material de salida del proceso (semillas, cascara, huesos, cartílagos, cascarones, etc.), contaminación en el proceso o mal almacenamiento. En la tercera etapa que es el proceso de mercadeo se pueden generar residuos como son: el mal manejo de los productos, exceder el tiempo de consumo ideal (fecha de caducidad) en el almacén.



Figura 2. Clasificación de los residuos alimenticios según su origen.

Por último los residuos generados en el hogar son consecuencia del mal uso o preparación de los alimentos, llegar a la fecha de caducidad y el desperdicio de la población. Todos estos residuos están generados por las distintas variaciones en las técnicas que se usan en las distintas etapas, el mal funcionamiento de los equipos, las diferentes prácticas de manejo en cada etapa y a la falta de conciencia en la población. (Kantor et al., 1997). En la Tabla 1, se muestra un resumen de todas las etapas de la cadena de suministros alimenticios.

De acuerdo a la FAO, cerca de 1.3 billones de toneladas de alimentos incluidos vegetales frescos, fruta, carne, cereales y productos lácteos se pierden a lo largo de la cadena de suministros alimenticios (FAO, 2012). Se ha proyectado que la cantidad de RA se incrementará los siguientes 25 años debido a la economía y al incremento de la población, principalmente en países de Asia. Por ejemplo, la cantidad anual de

residuos alimenticios en las urbes de los países de Asia podría aumentar de 278 a 416 millones de toneladas del 2005 al 2025 (Melikoglu et al., 2013)

Por otro lado, alrededor de ochenta y nueve millones de toneladas de residuos de alimentos se generan cada año en la Unión Europea, siendo el Reino Unido el país que más residuos produce en este rubro con catorce toneladas. De este total, el treinta y ocho por ciento proviene del sector manufacturero y el cuarenta y dos por ciento proviene de los hogares (B.I, 2010).



Figura 3. Cantidad de residuos generados al año por todo el mundo.

En la Figura 3, se puede observar algunas regiones en el mundo donde se aprecia la cantidad que se genera de residuos alimenticios, los R.A. generados en toda la cadena de abasto en el mundo tiene un impacto muy grande en el medio ambiente ya que en algunas regiones en el mundo no se lleva a cabo un manejo responsable de estos residuos.



Debido a la alta producción de RA que se tiene a nivel mundial es momento de buscar alternativas y desarrollar nuevas tecnología, de esta manera se podrían disminuir los problemas asociados con este tipo de residuos que incluyen:

- Problemas de contaminación graves debido a la alta asociación química y a la demanda biológica de oxígeno (Kroyer, 1995).
- Variación de pH y composición química debido a las variaciones estacionales y a los cambios generados por los distintos procesos en los alimentos (Kroyer, 1995).
- Materiales propensos a contaminación microbiana (por ejemplo frutas, verduras, cereales) (Schieber et al., 2001).
- Alta tasa de acumulación lo que ocasiona un problema de logística (Zaror, 1992).

Tabla 1. Generación de residuos alimenticios

	Etapas	Características de los residuos alimenticios
Pre-consumidor	Producción	Residuos de los cultivos como hojas, semillas, raíces. Pérdida de cultivos por enfermedades, plagas o condiciones climáticas severas. Pérdida de alimentos por deficiente infraestructura de transporte
	Procesamiento y manufactura	Residuos a través del envase, contaminación por el almacenamiento
	Venta	Pérdida por el cumplimiento de la regulación
Post-consumidor	Consumo	Preparación de los alimentos ineficientes, confusión sobre las fechas de consumo, desperdicio de la población.



4.1.1.1. Influencia de la regulación en la reducción de los residuos alimenticios.

En todo el mundo existe una gran preocupación por el crecimiento que existe en la generación de residuos alimenticios. Hoy en día se está llevando a cabo un gran esfuerzo para tratar de parar el aumento de RA, realizando desde el aspecto legal diversas normativas en todo el mundo. De esta manera se pretende regular desde el marco legal la generación de RA tratando puntos importantes como lo es el manejo, almacenamiento, tratamiento, y disposición de los residuos. En el mundo, la Unión Europea es un buen ejemplo en materia de estrategia y regulación ya que ha generado y aplicado distintas normativas que se llevan a cabo en todos los países que la conforman.

4.1.1.2 Legislación

Desde una perspectiva legal, cualquier análisis de los RA podría comenzar con las leyes aplicables a los países de origen, disposición de los tratamientos, aunque hay que considerar que pueden surgir consideraciones cuando se contemplan transportar estos residuos a otro país para darles tratamientos (Ki Lin et al., 2013).

Por ejemplo en la Unión Europea comenzaron ocupándose de la problemática de los residuos cerca de 1970, desarrollando una definición uniforme como la base de las leyes y políticas dirigidas a la regulación de la producción, manipulación, almacenamiento, transferencia, tratamientos y disposición de los residuos, con el primordial objetivo de evitar y minimizar el efecto negativo de la generación de residuos en la salud humana y el medio ambiente (Ki Lin et al., 2013). Aunque se han tomado acciones la comisión Europea se ha puesto como meta reducir 50 por ciento los residuos alimenticios para el año 2020. También se requiere iniciativas que fomenten la colaboración entre las universidades e institutos con la industria (Service, 2010).

Otro ejemplo es Hong Kong que es uno de los lugares con una densidad de población muy alta en el mundo, en promedio esta ciudad presentó 6480 personas por kilómetro cuadrado en el 2009. La generación de residuos que se producen en esta ciudad es de aproximadamente 13458 toneladas al día. Entre estos residuos, los RA han sido el



mayor componente en los últimos años, contribuyendo con el 40 por ciento del total de estos residuos sólidos en 2011 (EPD, 2015). Considerando la gran cantidad de residuos generados, el gobierno de Hong Kong propuso un esquema de cobro a la población para poder manejar adecuadamente estos residuos. Lo anterior logró cambiar en buena medida sus hábitos relacionados con la basura, facilitando la reducción de los desechos y mejorando el reciclado.

4.1.1.3. Valorización de los residuos de alimentos

Los residuos producidos durante el ciclo de vida de los alimentos, contienen valiosas moléculas funcionales, tales como: flavonoides, biopolímeros, carotenoides, pectina, ceras, ácidos grasos entre otros compuestos, los cuales tienen un alto valor comercial para diversas industrias (Pfaltzgraaf et al., 2013).

Hasta hace algunos años la valorización de los residuos alimenticios se ha centrado en tres puntos principales: alimentación para animales, composta y la incineración para la obtención de energía. Estas tres actividades se llevan a cabo en algunas partes del mundo, principalmente en países desarrollados; mientras que en países en vías de desarrollo lo más común es que se lleven a depósitos sanitarios (Ki Lin et al., 2014). Estos depósitos presentan un alto costo a largo plazo, ya que producen gases de efecto invernadero y promueven el desarrollo de contaminación microbiológica al suelo y mantos acuíferos presentes en sus alrededores. Lo cual genera efectos negativos a la salud de las personas que habitan en sus cercanías, desencadenando epidemias de cólera, salmonelosis o tifoidea. Adicionalmente, la transportación de los desechos a los depósitos sanitarios y el mantenimiento de estos últimos, producen un alto costo a las industrias y al sector gubernamental (Dhillon et al., 2013).

La recuperación de componentes de alto valor agregado presentes en los RA, podría ser una opción económica viable debido a la alta demanda de nuevos aditivos en la industria farmacéutica y alimenticia. Los compuestos presentes en los residuos alimenticios pueden ser separados de la matriz en la que se encuentran, seleccionando el método de extracción adecuado que no afecte a la molécula de



interés. Además, el proceso de extracción debe ser rentable y amigable con el ambiente (Pfaltzgraaf et al., 2013).

Actualmente, un gran número de investigaciones se han enfocado en la optimización de las condiciones de extracción en diferentes tipos de RA, empleando tecnologías convencionales o emergentes (Baiano et al., 2014).

4.1.1.4. Residuos de alimentos como materia prima para la obtención de compuestos de interés.

El incremento en el concepto de ecología industrial ha considerado el aprendizaje de algo nuevo llamado eco-innovación, el cual se sustenta en una economía de cero residuos. Esta idea se basa en que los residuos deben ser usados como materia prima para producir nuevos productos y aplicaciones (Mirabella et al., 2014).

4.1.1.4.1. Residuos de origen animal como materia prima.

Los desechos de origen animal son muy variados, incluyen residuos de pescados y mariscos. También abarcan remanentes de la ganadería como pieles, pezuñas, cabezas, plumas, vísceras y huesos. Los residuos industriales del procesamiento de productos lácteos como el suero y cuajo son importantes de mencionar, entre otros (Baiano, 2014).

Estos residuos contienen componentes de alto valor agregado, que podrían ser aislados y purificados. De esta manera, los desechos producidos pueden ser aprovechados, ya que contienen moléculas como proteasas, agentes gelificantes, caseinatos, grasas entre otros compuestos (Toldrá et al., 2012).

Los residuos que se obtienen de la industria quesera se han usado para obtener a partir de ellos proteínas, péptidos y lactosa principalmente a través de distintas técnicas (Gauthier et al., 1993). Las proteínas que se encuentran solubles en los residuos se pueden separar por medio de coagulación o floculación. Estas son aisladas mediante filtración con membranas, quedando la lactosa en la fase acuosa. Este carbohidrato se puede recuperar mediante cristalización, para su uso posterior como aditivo en la industria alimenticia (Prazeres et al., 2012).



Por otro lado, en los últimos años se ha notado un incremento en la demanda de materia prima de pescado, lo que promueve una mejor recuperación y utilización de sus residuos como materia prima para la obtención de nutracéuticos y fármacos (Baiano et al., 2014). Por ejemplo, el estómago y las vísceras de los peces carnívoros tienen un gran contenido de pepsina, la cual es aislada mediante procesos de ultrafiltración, concentración y secado (Tabla 2). Se ha observado que se pueden obtener entre 0.5-1 g de pepsina pura a partir de un kilogramo de estómago de bacalao, mientras que los ensilajes y vísceras proporcionan aproximadamente 100 g de peptona por kg (Gildberg , 2004).

Tabla 2. Ejemplos de compuestos obtenidos a partir de residuos alimenticios cárnicos.

Residuo alimenticio cárnico	Compuesto de interés
Suero láctico del queso	Ácido láctico
	Péptidos
	Proteínas
Estomago del bacalao	Pepsina
Vísceras del bacalao	Peptona
Piel, huesos y aletas de pescado	Colágeno y grenetina
Sangre	Plaquetas, Anticuerpos

Es importante mencionar que el aceite de pescado proveniente de residuos del procesamiento del pescado y las vísceras residuales del pollo son una fuente rica en ácidos grasos polinsaturados (principalmente omega 3). Los huesos de pescado, las aletas y la piel son una fuente abundante en colágeno y grenetina (Tabla 2). El colágeno se obtiene mediante tratamiento ácido de los residuos arriba mencionados, mientras que la grenetina se produce empleando un proceso de desnaturalización térmica del colágeno. La grenetina también se puede obtener por hidrólisis enzimática de la piel del pescado (Baiano, 2014).

4.1.1.4.2 Residuos de frutas y vegetales como materia prima.

Debido al aumento en la producción de estos alimentos, la eliminación de sus residuos representa un problema cada vez mayor. Por ejemplo, la India produce al



año 150 millones de toneladas entre frutas y vegetales, de los cuales genera más de 50 millones de toneladas de residuos al año (Jaiganesh et al., 2014). Estos residuos, son generados principalmente por las distintas industrias alimenticias. La obtención de jugos, néctares y concentrados es uno de las principales procesos en los que se generan desechos vegetales. Estos remanentes están constituidos principalmente por: cascaras, semillas, piel y bagazo (Schieber et al., 2001).

En general estos residuos presentan una humedad alta, gran cantidad de sólidos suspendidos y una alta demanda de oxígeno. Su composición orgánica frecuentemente es de 75 por ciento de azúcares y hemicelulosa, 9 por ciento de celulosa y 5 por ciento de lignanos (Kosseva, 2011). Debido a esto, el manejo de estos residuos es complicado debido a la rápida descomposición y a la proliferación de microorganismos. (Ki Lin et al., 2014).

Recientemente, se han realizado un gran número de investigaciones en estos residuos. En ellos se han encontrado moléculas de alto valor agregado como son: carotenoides, polifenoles, tocoferoles, vitamina C entre otros compuestos (Moure et al., 2001). Por lo tanto, el desarrollo de procesos que ayuden a aislar estos compuestos y el análisis de diferentes residuos como materia prima es cada vez más importante (Rosentrater, 2004).

Algunos ejemplos de aprovechamiento de frutas y verduras como materia prima se describen a continuación:

✓ *Manzanas*

Entre el año 2008 a 2009 se produjeron en todo el mundo más de 69 millones de toneladas de manzana de diferentes tipos. Este crecimiento en la producción ha generado también un aumento en la producción de residuos que en su mayoría provienen de la industria alimenticia. Estos residuos han sido explotados en la producción de ácidos orgánicos como ácido cítrico o ácido málico, aromas, enzimas, fibra, pectina y antioxidantes principalmente (Dhillon et al., 2013).



La producción la pectina es considerada una de las razones más importantes para usar los residuos de manzana ya que es un material abundante, económico y ecológico. Esta sustancia tiene una mejor propiedad gelificante en comparación con la pectina obtenida de los cítricos (Schieber et al., 2001).

Los residuos que provienen de la manzana han mostrado ser ricos en polifenoles principalmente en la piel. La mayor cantidad de compuestos aislados e identificados son catequinas, hidroxicinamatos, procianidinas entre otros compuestos. Estos compuestos han demostrado tener una fuerte actividad antioxidante en estudios in vitro (Lu & Foo, 2000). Los polifenoles y algunos componentes relacionados han mostrado un efecto inhibitor en los estreptococos que provocan la caries lo cual sugiere una posible aplicación en productos para higiene bucal (Yanagida et al., 2000).

✓ *Frutos cítricos.*

Los frutos cítricos son considerados en un nivel similar de producción que tiene el café en términos internacionales. En esta clasificación se incluyen la naranja, limón, limas, mandarina y toronja. Los principales países productores son Estados Unidos, Brasil, China, India y España (Ki Lin et al., 2013).

Los residuos provenientes de los cítricos son en su mayoría piel y semillas, que son descartados en el proceso de producción de jugos y concentrados. Los residuos cítricos de los jugos presentan principalmente agua, azúcares solubles, pectina, fibra, ácidos orgánicos, proteína, minerales, aceites esenciales, vitaminas y flavonoides.

Los productos de estos residuos más estudiados han sido la pectina, la fibra y aceites esenciales como el D-limoneno, y flavonoides como por ejemplo hesperidina, eriocitrina, naringina (Mouly et al., 1994).

El D-limoneno es un componente que puede ser destilado como aceite esencial de la piel de los cítricos. Esta sustancia es considerada un biodisolvente que puede ser usado como una alternativa ambiental a los disolventes halocarbonados (Kerton, 2009). Este compuesto es comúnmente usado en fragancias y sabores aunque



también se usa para la producción de resina de adhesión por medio de polimerización (Braddock, 1999).

Los extractos obtenidos de la piel residual de los cítricos y las semillas han mostrado una alta actividad antioxidante, estos ensayos se han realizado in vitro e in vivo. Estos estudios mostraron una protección a la salud; este efecto se le ha atribuido a los flavonoides (Kuo, 1996).

✓ *Jitomate*

Es de los productos vegetales más importantes, ya que es el segundo en mayor producción mundial con 100 millones de toneladas de producto fresco en 144 países (Kalogeropoulos et al., 2012). Este fruto es rico en componentes bioactivos como esteroides, tocoferoles, licopenos, β -carotenos, vitaminas C y E, y varios componentes polifenólicos.

Los residuos del jitomate presentan un gran potencial de componentes polifenólicos como antioxidantes y agentes anticancerígenos. La identificación y cuantificación de componentes incluyen ácidos polifenólicos y flavonoides. En los extractos de jitomate analizados contienen una cantidad considerablemente de polifenoles que exhiben buenas propiedades antioxidantes.

La mayoría de los estudios publicados en la literatura se enfoca principalmente en los licopenos y β -carotenos (Riggi & Avola, 2008). La caracterización de los residuos se ha enfocado principalmente en carotenoides; la cantidad de estos compuestos se ha observado encontrados en los residuos se ven afectados por el lugar y la época en que se cosecho el fruto, está reportado que en verano la cantidad de licopenos y β -carotenos es más alta (Zuorro et al., 2011).

✓ *Uvas*

El cultivo de uvas es una de las actividades agroeconómicas más importantes en el mundo ya que se producen 60 millones de toneladas a nivel mundial cada año. Por ejemplo en el año 2012 se produjeron 67 millones de toneladas en el mundo. La



principal actividad en la que se emplea este fruto es en la producción de vino en países como Francia, Italia, Grecia, Portugal y España (Teixeira et al., 2014).

Actualmente, 9 millones de toneladas de residuos orgánicos se producen por año en el mundo, en promedio constituye al 20 por ciento del total de uvas usadas para la producción del vino (Torres et al., 2002).

Una gran cantidad de productos se pueden obtener de los residuos como ácido cítrico y tartárico, aceite, hidrocoloides de la semillas, al igual que ácidos fenólicos, catequinas, antocianinas y flavonoides principalmente (Mazza, 1995). Principales ácidos fenólicos son ácido tánico, gálico, vainillico, cafeico, sirigico que se encuentran en la piel y las semillas. Las catequinas, epicatequinas, epigalocatequinas son el mayor número de constituyentes de taninos en la piel de los residuos de uva (Souquet et al., 1996).

✓ Olivo

El aceite de olivo es un producto que presenta una actividad económica muy importante para varios países mediterráneos, por ejemplo España es el principal productor de aceite de oliva, que en el año 2006 produjo 850 mil toneladas. Estos niveles de producción también generan una gran cantidad de residuos (Lozano - Sánchez et al., 2011). Estos desechos son ricos en compuestos polifenólicos, los cuales han sido extraídos y evaluados, obteniendo resultados que sugieren su uso como antioxidante por su gran actividad antioxidante. Uno de los componentes más importante aislado en estos desechos es el hidroxitirosol, este compuesto es un polifenoles que después del ácido gálico es considerado como uno de los antioxidantes naturales más potente (Mirabella et al., 2014).

Otro componente de gran interés presente en los residuos es la oleuropeína, esta sustancia fue encontrada al realizar un análisis exhaustivo, debido a que se encuentra presente en todos los subproductos del olivo. Se ha encontrado que este compuesto reduce la presión arterial y dilata las arterias en estudios aplicados a animales, por lo que se tiene un gran interés farmacéutico (Bouaziz et al., 2008).



4.1.1.5. Tecnologías convencionales para la recuperación de compuestos de alto valor agregado presentes en los R A.

La mayoría de las tecnologías de extracción se han enfocado en la obtención de diferentes materiales que pueden ser empleados en la industria alimenticia, farmacéutica o cosmética, de esta manera se busca obtener compuestos con un alto valor agregado en el mercado y proporcionar a las distintas industrias una opción natural.

Los procesos más comunes empleados en la extracción de material de interés presente en los RA son: extracción con disolventes, destilación, precipitación, hidrólisis ácida o básica, entre otros.

La precipitación con alcohol es uno de los métodos más empleados para separar biomoléculas de bajo peso molecular como los antioxidantes. También se usa para aislar macromoléculas como la pectina, fibra dietética, proteínas, péptidos. Este método es usado ya que es barato, no es tóxico y es fácil de usar (Mirabella et al., 2014).

La extracción sólido-líquido permite solubilizar algunos componentes que son removidos del sólido usando solo disolventes orgánicos y haciendo mezclas de ellos. La elección del disolvente debe realizarse cuidadosamente, al fin de minimizar la interferencia con la muestra (Luthria, 2008). Por ejemplo los polifenoles se solubilizan fácilmente en disolvente polares próticos como pueden ser las mezclas hidroalcohólicas. Entre los alcoholes más usados para estas mezclas se encuentra el etanol ya que es barato y posee el reconocimiento como aditivo seguro (Galanakis, 2012).

Si bien los métodos convencionales presentan varias ventajas, muchos de estos procesos requieren de disolventes explosivos, tóxicos o peligrosos. Algunos requieren de acoplar algunas técnicas lo que aumenta el tiempo y costo del proceso (Oreopoulou & Tzia , 2007).



Las investigaciones actuales y futuras están dirigidas a diseñar procesos que sean baratos. También se enfocan a usar disolventes no tóxicos como el agua y que se puedan acoplar con otras técnica (Baiano et al., 2014).

4.1.1.6. Tecnologías emergentes para la recuperación de compuestos de alto valor agregado presentes en los R A

Las tecnologías emergentes son procesos en los cuales se busca aumentar el rendimiento de los productos de interés, tratando de usar métodos que no empleen sustancias contaminantes como los disolventes o que las reduzcan al mínimo. Estos procedimientos buscan reducir la cantidad de energía empleada y en general ser amigables con el medio ambiente (Baiano, 2014). Algunas de las tecnologías emergentes más ocupadas hoy en día son: extracción asistida por microondas, extracción por fluidos súper críticos y extracción asistida por ultrasonido (Rombaut et al., 2014).

- *Extracción de fluidos súper críticos.*

La extracción de fluidos súper críticos es una técnica en la cual generalmente se usa dióxido de carbono como fluido, el cual se somete a condiciones críticas de temperatura y presión (T_c : 31°C, P_c : 7.38 MPa). Por otra parte el CO₂ cuenta con la ventaja de no ser inflamable, tener un bajo costo, ser abundante y a condiciones de presión normales es un compuesto muy volátil, esta condición es muy favorable ya que después de despresurizar el extracto este se encuentra libre del fluido (Rozzi & Singh, 2002). En la Tabla 3 se muestran ejemplos de componentes de interés industrial extraídos con el uso de fluidos súper críticos (Brunner, 2005), (Lumia, 2011).

Los inconvenientes que tiene esta técnica es que se requiere una cantidad de tiempo considerable para optimizar los parámetros de la extracción y la dificultad que tiene para extraer compuestos que son polares (Galanakis, 2012).



Tabla 3. Ejemplos de aplicación industrial usando la extracción con fluido súper crítico (dióxido de carbono).

Aplicaciones	Matriz alimentaria	Extracto
Industria alimenticia	Café verde	Cafeína
	Café tostado	
	Hojas de té	Cafeína
	Lúpulo	Componentes encargados del amargor
	Espicias, plantas aromáticas, algas.	Extracto de especias, aromas naturales, lípidos, colorantes
	Semillas oleaginosas	Aceite con un alto valor agregado
Industria farmacéutica	Tabaco	Nicotina
	Plantas medicinales	Biomoléculas

- *Extracción asistida por microondas.*

El uso de microondas para la extracción de componentes biológicos fue reportado por primera vez en 1986 (Ganzier et al., 1986). Desde ese momento la tecnología de extracción asistida por microondas fue encontrando diversas aplicaciones como la extracción de aromas, pigmentos, antioxidantes y componentes orgánicos de interés como se muestran en la Tabla 4 (Morais & Bogel-Lukasik, 2013).

Tabla 4. Ejemplos de extracciones asistidas por microondas.

Matriz alimentaria	Extracto
Albaca y tomillo	Aceites esenciales
Hojas de romero	Aceite esencial
Semillas de uva	Polifenoles
Granos de café	Ácido clorogénico
Frambuesas	Antocianinas

La energía de las microondas es capaz de calentar rápidamente el disolvente y de esta manera acelerar la transferencia del analito de la muestra al disolvente. Esta técnica es fácil de manejar y requiere de una cantidad moderada de disolvente (Oreopoulou & Tzia, 2007).

El desarrollo de las investigaciones en esta tecnología dieron lugar a tres técnicas principalmente: la primera es la extracción con disolvente asistida por microondas (EDAM), la segunda es la extracción libre de disolvente (ELD) y la tercera es la extracción con microondas combinado con gravedad e hidrodifusión (EMGH). Las tres técnicas se representan en la Figura 4 (Rombaut et al., 2014).

Hoy en día para realizar la extracción de los AE por lo general se usa la extracción libre de disolvente asistida con microondas, por ejemplo se aplica en muestras de orégano, la piel de los cítricos, albaca y tomillo (Morais & Bogel-Lukasik, 2013).

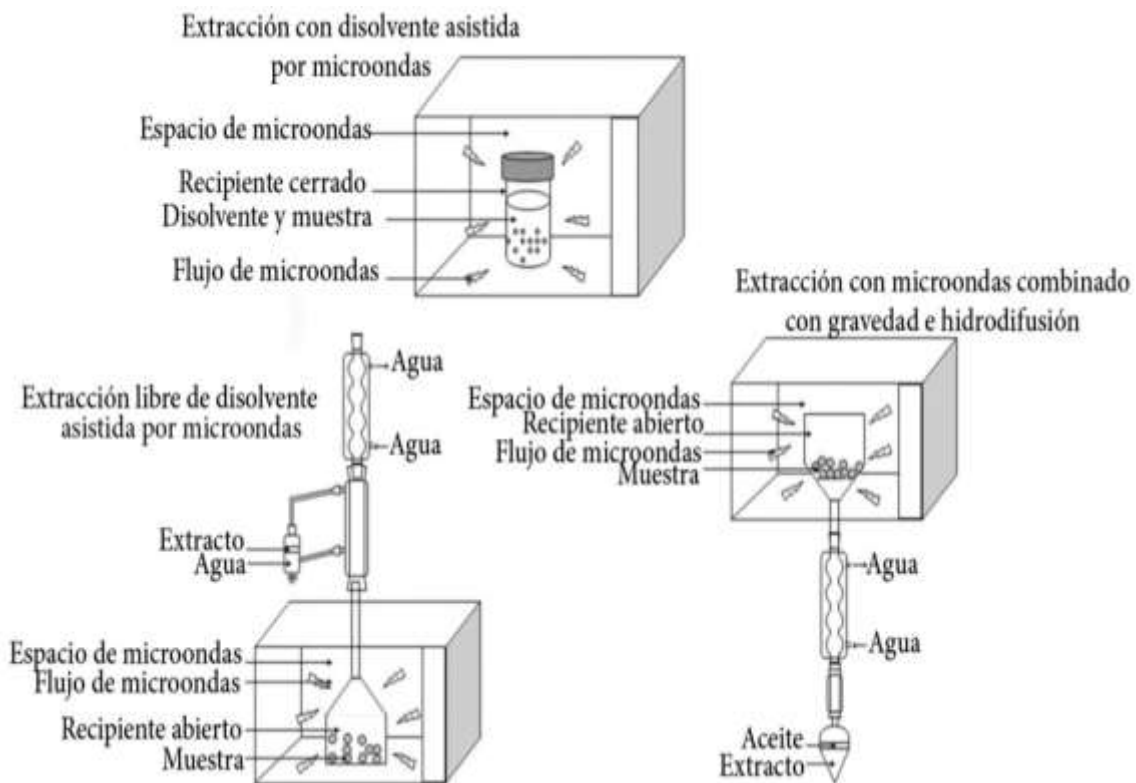


Figura 4. Tipos de extracción por microondas.

Al comparar la extracción convencional con la ELD, los resultados muestran que el uso de esta nueva tecnología requiere una cantidad de tiempo menor que si se usan las técnicas convencionales (30 minutos de ELD es comparada con 4 horas de hidrodestilación). Aunque también la composición de los aceites esenciales exhibe una composición diferente al realizarse la comparación (Périno-Issartier et al., 2013).



- *Extracción asistida por ultrasonido.*

La sonoquímica está basada en el ultrasonido de poder, el cual usa un intervalo de frecuencias baja. Al efecto que causa el ultrasonido en el medio de extracción se le denomina fenómeno de cavitación (Chernat et al., 2011). Este fenómeno se produce cuando un líquido en movimiento roza la superficie de un sólido, provocando una caída de presión local. Esto permite alcanzar la presión de vaporización del líquido a la temperatura de trabajo (Castells, 2012), causando la generación rápida de pequeñas burbujas, dado que la presión es menor a la presión de vapor del medio. Las burbujas formadas viajan a zonas de mayor presión e implosionan bruscamente, produciendo una estela de gas, un calentamiento acelerado y la transferencia de masa. Este fenómeno provocaría la ruptura de la pared celular de muestras vegetales, por mencionar un ejemplo (Zbigniew & Darlus, 2011). Debido a esto, los componentes que se encuentran en el interior de una célula, se dispersan en el disolvente. Algunos ejemplos de extracción asistida por ultrasonido en algunas matrices de origen vegetal, se muestran en la Tabla 5 (Chernat et al., 2011).

Tabla 5. Ejemplos de la extracción asistida por ultrasonido en diferentes matrices alimentarias.

Matriz alimentaria	Extracto
Hojas de menta	Aceite esencial de mentol
Vainas de vainilla	Aceite esencial de vainilla
Tomates	Licopenos
Frambuesas	Antocianinas
Salvado de trigo	Compuestos polifenólicos
Semillas de lino	Aceite

Al aparato que se utiliza para generar el ultrasonido de poder se le denomina sonicador. En general, en el mercado existen dos tipos de sonicadores, el primero es el sonicador de tina (A) y el segundo se le denomina sonicador de sonda (B), ver Figura 5 (Rombaut et al., 2014).

La extracción asistida por ultrasonido, puede efectuarse en cuestión de minutos, con una alta reproducibilidad y un bajo consumo de disolvente. Pero después de este

proceso es necesario realizar una filtración de la muestra y el extracto (Morais & Bogel-Lukasik, 2013).

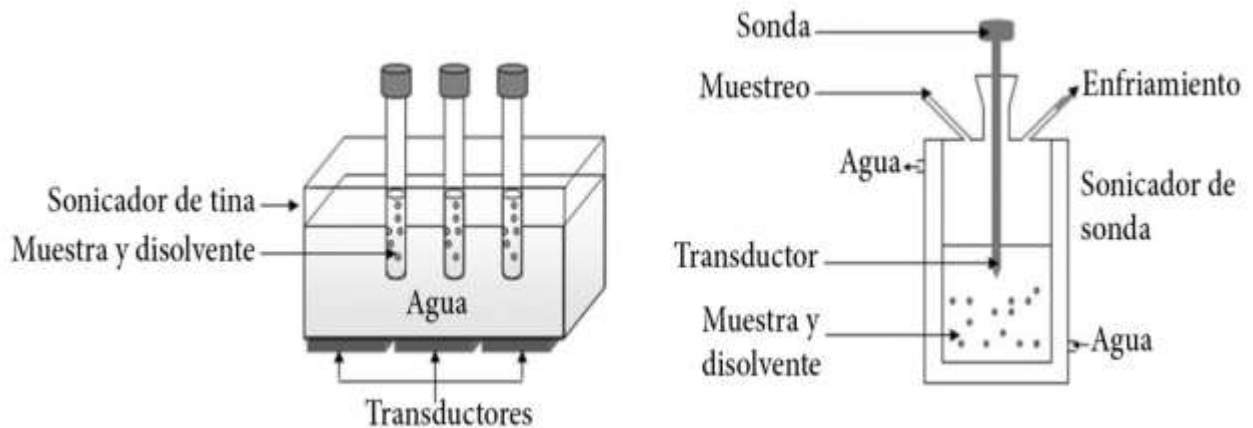


Figura 5. Tipos de sonificadores

La extracción asistida por ultrasonido es un campo que ha demostrado ser una tecnología de extracción verde; los trabajos recientes han intensificado la extracción en medios acuosos, consumiendo baja energía y aumentando la calidad de los extractos cuando se compara con los métodos convencionales, por ejemplo, la maceración (Morais & Bogel-Lukasik, 2013).

4.2. Antioxidantes

El oxígeno es un elemento esencial para la vida, ya que desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular. También es el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como estrés oxidativo, el cual es un desbalance en las células debido a un aumento en la cantidad de radicales libres (o especies oxidantes) y/o una disminución de especies antioxidantes (Saha et al., 2011). Este fenómeno provoca cambios bioquímicos y fisiológicos que pueden desencadenar la muerte celular, debido a uno o más de los siguientes procesos: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, ruptura de ADN o degradación proteica. En el ser humano, el estrés oxidativo conduce a varias condiciones patológicas, tales como artritis, enfermedades autoinmunes, disfunción



cardiovascular, enfermedades neurodegenerativas entre otras complicaciones (Tiwari, 2001).

Los antioxidantes son sustancias que estabilizan o desactivan a los radicales libres, y a bajas concentraciones retrasan la oxidación de proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN (Sindhi et al., 2013). Los antioxidantes pueden ser principalmente de dos tipos: primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que reaccionan con especies reactivas de oxígeno como iones superóxido, peróxidos, o radicales libres como el radical hidroxilo, metoxilo etc. Los antioxidantes secundarios actúan mediante varios mecanismos: reacción con metales pesados, captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de luz ultravioleta o desactivación de oxígeno singulete (Pokorny et al., 2001).

En la naturaleza existe una amplia gama de antioxidantes que se han desarrollado a lo largo del tiempo, con el propósito de proteger a las células del estrés oxidativo. De esta manera, los seres vivos se han adaptado al medio ambiente oxidante en el que se han desarrollado (Oroian & Escriche, 2015).

4.2.1. Antioxidantes presentes en frutas y vegetales

Los antioxidantes naturales incluyen varios tipos de compuestos, los cuales pueden ser moléculas muy sencillas (polifenoles y vitaminas) o biomoléculas muy complejas (enzimas). Estas sustancias pueden ser generadas en los organismos vivos mediante diversas vías metabólicas (Ignat et al., 2011). En general los antioxidantes naturales pueden ser de naturaleza enzimática o no enzimática, ver Figura 6 (Singh et al., 2013).

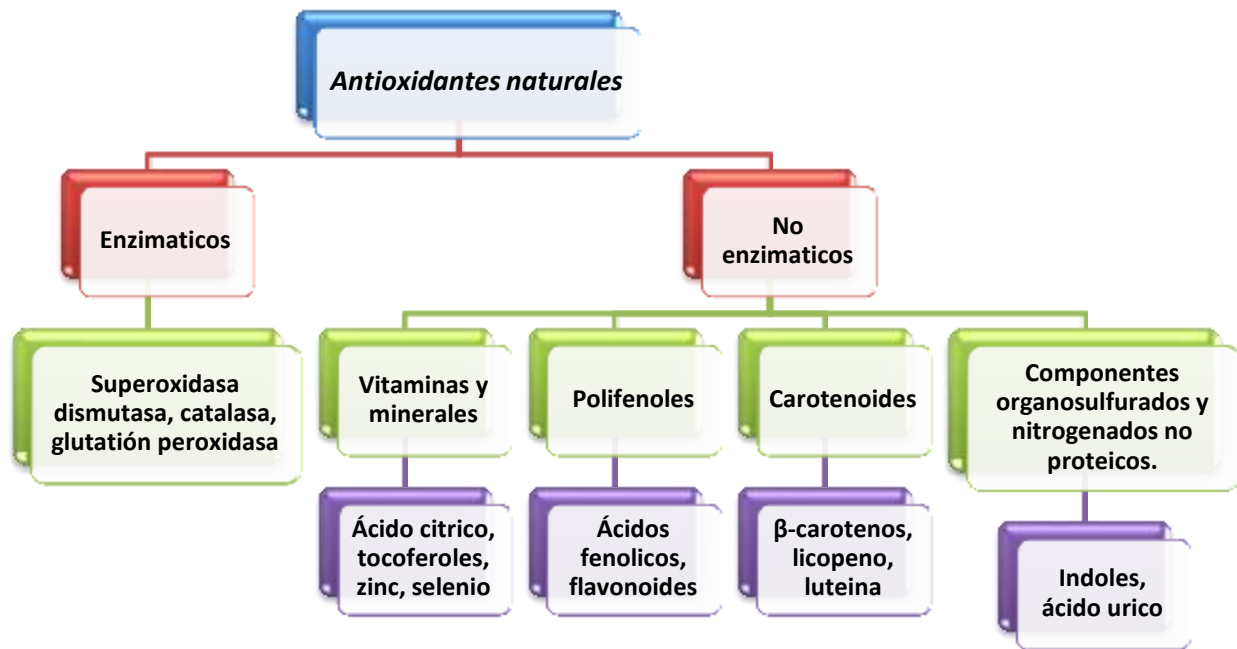


Figura 6. Clasificación de los antioxidantes naturales.

Los vegetales y frutas cuentan con un gran sistema de antioxidantes de origen enzimático, pero las moléculas no enzimáticas juegan un papel muy importante en el equilibrio oxidativo. Estos metabolitos no solo se encargan de ser antioxidantes en la célula, también cumplen otras funciones como la de proporcionar color, ser agentes antimicrobianos o anti fúngicos. Los agentes antioxidantes presentes en vegetales y frutas tienen un alto valor agregado, debido a que se emplean en la elaboración de productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios (Ghosh & Kadam, 2010). Por tal motivo, se han desarrollado diversas investigaciones en el mundo, las cuales buscan desarrollar procedimientos eficientes para llevar a cabo la extracción, caracterización y purificación (Baiano, 2014).

4.2.1.1. Vitaminas.

Las vitaminas, conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres o los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera, el potencial oxidativo destructor de estos (Chao et al., 2002).



➤ Vitamina C.

La vitamina C es un antioxidante que es un derivado ácido de la glucosa, se encuentra en mayor proporción en los vegetales y frutos. Esta vitamina es conocida también como ácido L-ascórbico (Figura 7).

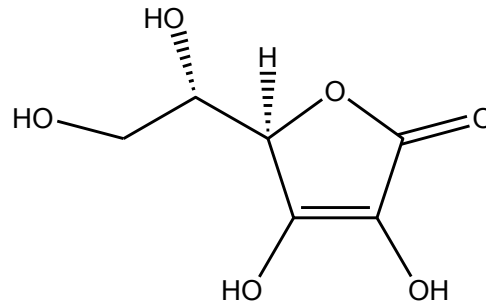


Figura 7. Estructura del ácido L-ascórbico

El ácido L-ascórbico presenta un grupo lactona y un par de grupos hidroxilos asociados a un doble enlace, estos grupos funcionan como agentes reductores de alta reactividad. Esto permite, su participación en la reducción directa de los radicales libres. En este proceso el ácido ascórbico es oxidado al ácido dehidroascórbico de manera reversible (Djilas & Cétkovic, 2002).

➤ Vitamina E

Otra vitamina antioxidante de gran importancia es la vitamina E, término empleado para referirse a dos familias de compuestos. Tocoferoles y tocotrienoles. Estas sustancias contienen en su estructura un anillo de cromano y un grupo alcohol en la posición 6, ver Tabla 6. Los miembros de ambas familias son designados por las letras griegas α , β , γ y δ dependiendo de la posición que ocupe el grupo metilo en el sistema cromano (Benítez, 2006).

Los tocoferoles y tocotrienoles poseen estructuras similares, la diferencia entre ellos se establece en la cadena lateral. Los tocoferoles no presentan insaturaciones en esta cadena, mientras que los tocotrienoles si las presentan (Tabla 6). El α -tocoferol es el componente más abundante y potente de la Vitamina E presente en los alimentos (80%).



Tabla 6. Estructura de los principales tocoferoles y tocotrienoles

<u>Tocoferoles</u>		R ₁	R ₂	R ₃	Nom
		CH ₃	CH ₃	CH ₃	α
		CH ₃	H	CH ₃	β
		H	CH ₃	CH ₃	γ
		H	H	CH ₃	δ
<u>Tocotrienoles</u>		R ₁	R ₂	R ₃	Nom
		CH ₃	CH ₃	CH ₃	α
		CH ₃	H	CH ₃	β
		H	CH ₃	CH ₃	γ
		H	H	CH ₃	δ

Es importante mencionar que la Vitamina E es un antioxidante liposoluble, capaz de proteger a la membrana celular contra el estrés oxidativo. De esta forma el α-tocoferol actúa como un inhibidor de radicales libres, interrumpiendo la reacción en cadena de estos, la cual puede causar daños severos a la membrana celular (Torres et al., 2002).

4.2.1.2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en vegetales como la lechuga, brócoli y en frutas como el jitomate (Tabla 7), entre otros (Carranco et al., 2011). Estos compuestos se clasifican de acuerdo a su estructura química, los compuestos que sólo contienen carbono e hidrógeno, se conocen como carotenos (por ejemplo, β-caroteno, Figura 8) mientras que los carotenoides que contienen oxígeno, reciben del nombre de oxicarotenoides o xantofilas (García et al., 2004).

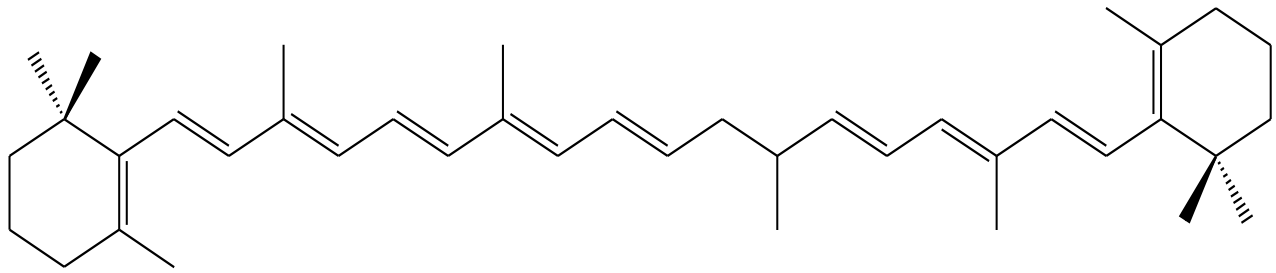


Figura 8. β -caroteno

Los carotenoides protegen a los lípidos del daño oxidativo mediante la inactivación del oxígeno del medio, metales y peróxidos. El β -caroteno es uno de los carotenoides con mayor actividad antioxidante y se encuentra en mayor abundancia en los vegetales. Este compuesto funciona como precursor de la vitamina A en mamíferos (Gordon & Bauernfeind, 1982).

Otro carotenoide importante es el licopeno, el cual se encuentra principalmente en el jitomate, papaya y sandía. Esta sustancia al ser ingerido produce un efecto benéfico en contra de enfermedades cardiovasculares y cáncer, presumiblemente, por su actividad antioxidante (Carranco et al., 2011.)

Tabla 7. Ejemplos de carotenoides presentes en algunos vegetales.

Carotenoides	Vegetal
Luteína	Cualquier vegetal verde
Violaxantina	Cualquier vegetal verde
Licopeno	Tomates
Capsantina	Pimentón
α -caroteno	Cualquier vegetal verde
β -caroteno	Cualquier vegetal verde

4.2.1.3. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios producidos por un gran número de especies vegetales. Estos compuestos proporcionan características sensoriales y calidad nutricional a los frutos y vegetales. Estos últimos utilizan las



sustancias polifenólicas para su crecimiento, reproducción y protección contra patógenos y depredadores (Ignat et al., 2011).

Los polifenoles pueden presentar estructuras diversas, por ejemplo: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, derivados hidroxilados de estilbenos y lignanos (D'Archivio et al., 2007). Los flavonoides consisten generalmente de 15 átomos de carbono, arreglados en una configuración de $C_6-C_3-C_6$ (Figura 9). Esencialmente la estructura consiste en dos anillos aromáticos A y B unido por un puente de 3 carbonos, usualmente en forma de anillo heterocíclico C (Merken & Beecher, 2000).

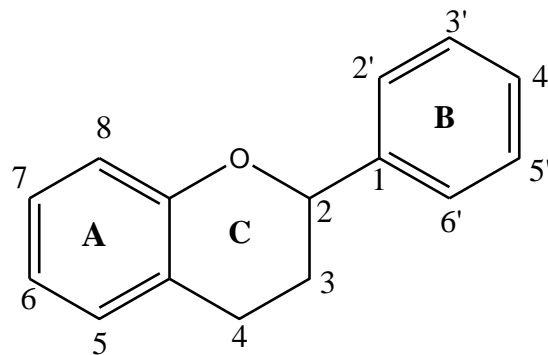


Figura 9. Estructura general de un flavonoide

Las variaciones en los sustituyentes del anillo C resultan en una gran cantidad de flavonoides formando varias subclases como por ejemplo: flavonoles, flavonas, catequinas, isoflavonas, antocianidinas (Hollman & Katan, 1999). Algunos ejemplos se muestran en la Figura 10.

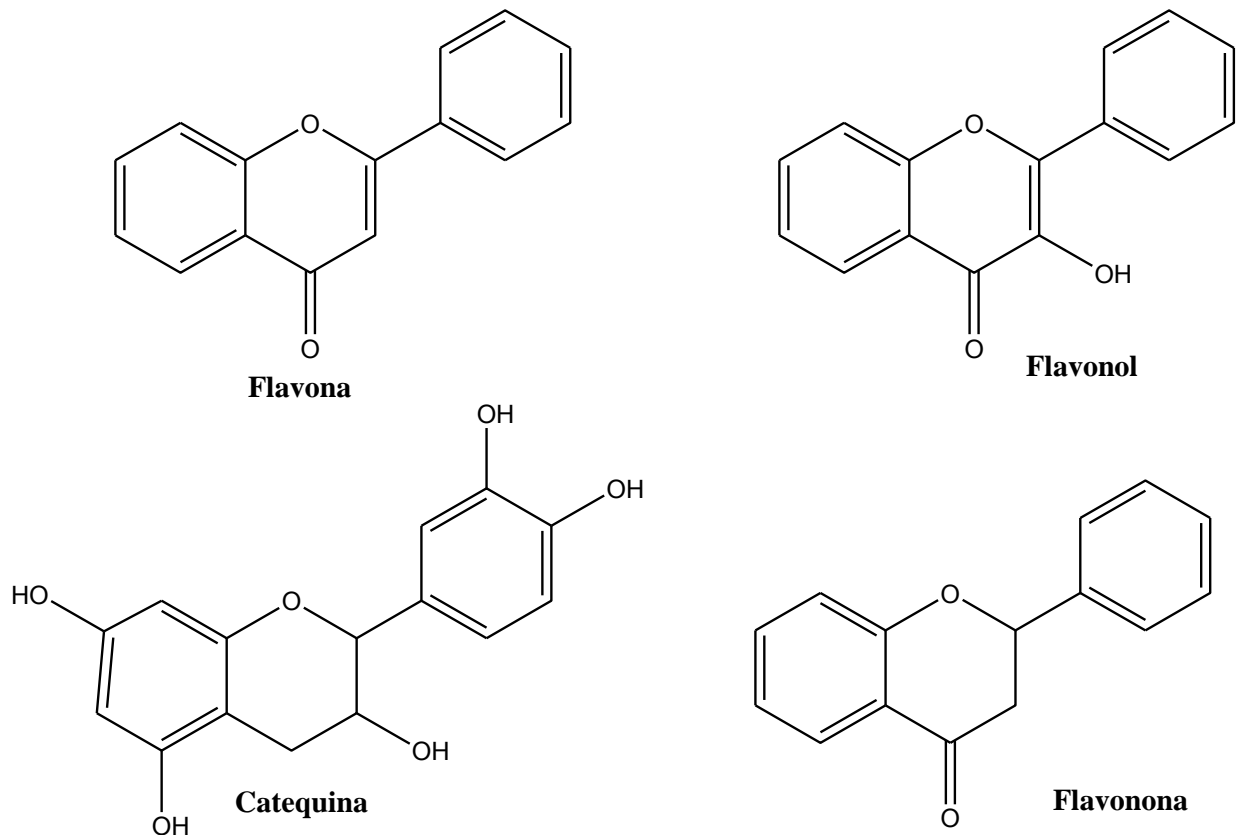


Figura 10. Ejemplos de flavonoides

Estos compuestos actúan como agentes reductores, donadores de hidrógenos y además son capaces de formar complejos con algunos metales (Tsao & Yang, 2003). Los flavonoides se encuentran principalmente en frutas como las fresas, uvas, algunos cítricos como el limón o la naranja entre otros. El consumo de estos productos ha estado asociado a beneficios a la salud, el cual podría estar relacionado con el estrés oxidativo (Sindhi et al., 2013).

Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos principalmente: en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Figura 11). En el primer grupo se encuentran los ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, vainillico, sirigico, mientras que en el segundo se puede ubicar al ácido cafeico (Bravo, 1998).

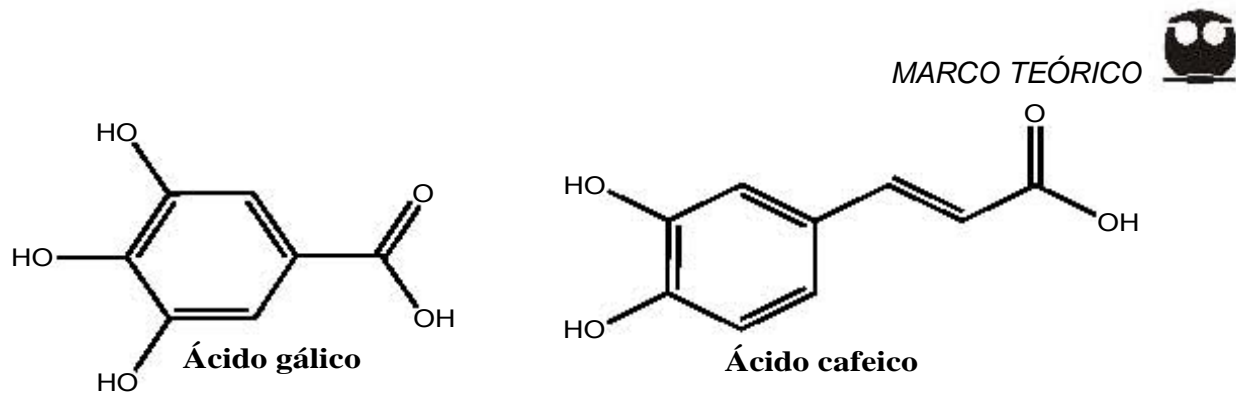


Figura 11. Ejemplo de ácidos fenólicos

Los ácidos hidroxicinámicos exhiben una actividad antioxidante más alta comparada con los ácidos hidroxibenzoico (Balasundram et al., 2005).

Los taninos constituyen un grupo muy importante de polifenoles, estos pueden ser de dos tipos: hidrosolubles y condensados. Los taninos condensados también se conocen como proantocinidinas. Los taninos hidrosolubles son derivados esterificados del ácido gálico. Los taninos tienen diversos efectos en los sistemas biológicos ya que tienen el potencial de quelar iones metálicos, precipitar proteínas y servir como antioxidantes biológicos (Ignat et al., 2011).

Los derivados hidroxilados del estilbeno son los polifenoles menos abundantes en la dieta, debido a que se encuentran en menor cantidad. Un ejemplo de estos derivados es el resveratrol, el cual puede presentarse glucosilado o como isómero cis y trans. Este compuesto es producido por las plantas en respuesta a infecciones por patógenos en condiciones de estrés. Se ha detectado que más de 70 especies de plantas incluyendo a las uvas, cacahuates y pequeños frutos contienen importantes cantidades de resveratrol (Bavaresco, 2003).

Todos estos polifenoles se encuentran en diferentes concentraciones en las frutas, verduras y plantas. La principal función que tienen en estos organismos es de proteger de patógenos, para su crecimiento y reproducción, pero principalmente como sistemas antioxidantes para combatir el estrés oxidativo.



4.2.2. Métodos de cuantificación y separación de polifenoles.

- *Métodos de cuantificación*

Debido a la importancia que ha adquirido el uso de antioxidantes como compuestos útiles en el área de alimento y de la salud, se ha incrementado el número de investigaciones en esta área. En particular, se han desarrollado nuevos métodos de análisis, con alta selectividad y sensibilidad para determinar polifenoles. Otras investigaciones se han enfocado en la separación y cuantificación de diferentes polifenoles, especialmente, se pretende realizar determinaciones cuantitativas simultáneas de los diferentes grupos de polifenoles (Tsao & Yang, 2003).

Un gran número de métodos espectrofotométricos se han desarrollado para llevar a cabo la cuantificación de polifenoles en las plantas. Estos ensayos están basados en diferentes principios y se utilizan las diferentes estructuras de los grupos presentes en los compuestos polifenólicos (Lapornik et al., 2005). El ensayo de Folín-Ciocalteu es ampliamente usado para la determinación de estos compuestos, el reactivo consiste en una mezcla de molibdato de sodio, tungstenato de sodio y otros agentes. La reacción con polifenoles produce un color azul que absorbe en un intervalo de longitudes de onda de 700 a 750 nm. Este compuesto de color azul se debe a la formación de un complejo debido a la interacción de un polifenol con el molibdeno (V) (Singleton & Rossi, 1965).

Por otro lado el contenido de flavonoides puede ser determinado usando métodos colorimétricos basados en la formación de complejos de estos compuestos con el Aluminio III. Todos estos ensayos espectrofotométricos tienen como desventaja que solo dan una estimación del contenido total de los compuestos polifenólicos. Ninguno de estos métodos puede separar los componentes ni tampoco logra medir cada componente individualmente (Ignat et al., 2011).

- *Métodos de separación*

Se han desarrollado distintas técnicas cromatográficas para separar y cuantificar individualmente los compuestos polifenólicos (Sakakibara et al., 2003). Una de las



técnicas más usadas es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, una de las desventajas de esta técnica es la dificultad para analizar extractos crudos, por lo que primero se deben pre concentrar y purificar los polifenoles de la matriz antes de usar el equipo correspondiente (Ignat et al., 2011).

La cromatografía de gases (GC) es otra técnica que ha sido desarrollada para la separación e identificación de compuestos polifenólicos, la cual requiere la derivatización previa de componentes volátiles (metilación, trifluoroacetilación, etc). La GC presenta una alta sensibilidad y selectividad cuando se usa acoplada a espectrometría de masas, pero presenta serios inconvenientes propios de la técnica (Naczki & Shahidi, 2006).

4.2.3. Métodos de cuantificación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo (Robards et al., 1999). Una de las técnicas más aplicadas en la cuantificación in vitro de la capacidad antioxidante total de una muestra, consiste en hacerla reaccionar con una sustancia cromógena. Esta sustancia tiene naturaleza radical, que al entrar en contacto con la muestra reacciona, cambiando de color de manera proporcional a su concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas in vitro nos dan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo, debido a la complejidad de la matriz (Kuskoski et al., 2005).

En la actualidad es común emplear el radical DPPH (2,2,-difeníl-1-picrilhidracilo) para evaluar la actividad antioxidante, ya que esta especie de color morado es muy estable, fácil de adquirir (Figura 12). Esta prueba fue desarrollada por Brand-Williams en 1995, quien observó que a 515 nm el reactivo DPPH va perdiendo su coloración morada al reaccionar con un antioxidante (Brand-Williams et al., 1995).

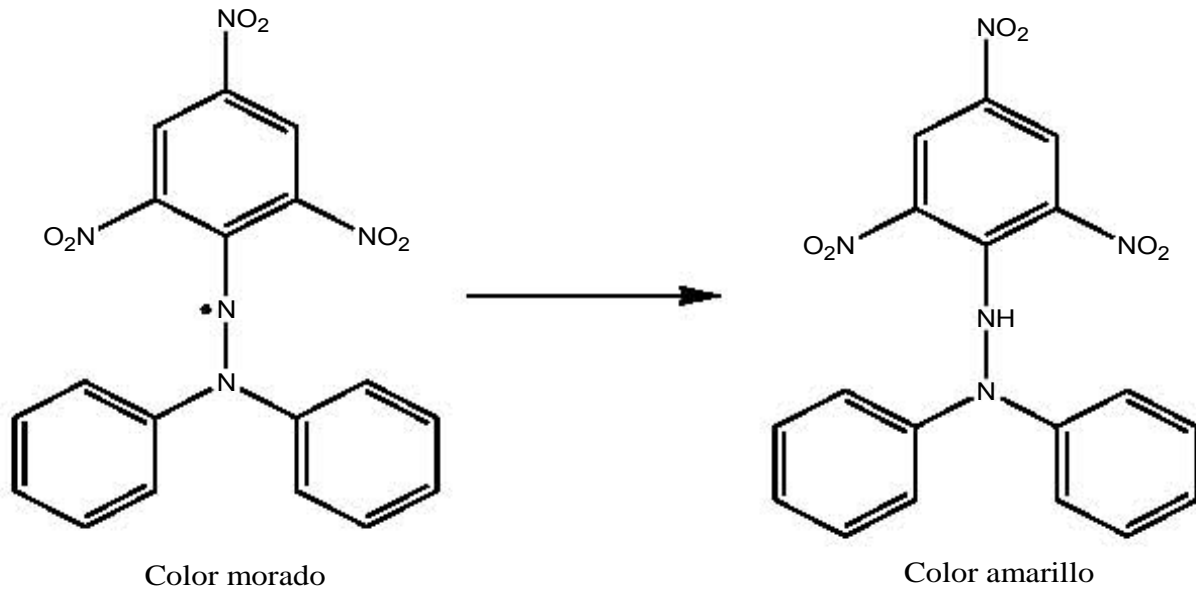


Figura 12. Estructura del reactivo DPPH antes y después de reaccionar.

La concentración que se requiere para disminuir el 50 por ciento del radical DPPH se define como EC_{50} . Esta prueba resulta fácil de realizar, además de que solo se requiere de un espectrofotómetro, generalmente se usan sustancias que sirven como referencia para esta prueba (BHA, ácido ascórbico o BHT, Figura 13). Otra sustancia de referencia comúnmente empleada, es el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

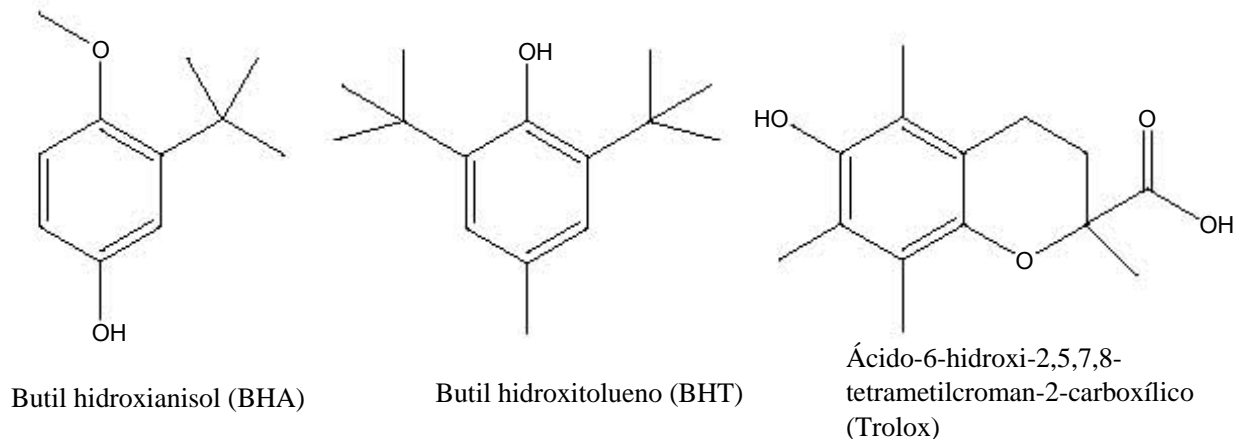


Figura 13. Moléculas que sirven de referencia para la prueba con DPPH

Otra prueba muy usada para evaluar la actividad antioxidante de una muestra, considera la capacidad de absorción de los radicales oxígeno (ORAC; por sus siglas



en inglés). Esta prueba mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente después de haber sido mezclada con generadores de radicales libre tales como compuestos azoderivados. Se considera que estas sustancias como por ejemplo el AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) producen radicales peroxilo por calentamiento. Estas especies al reaccionar con la molécula fluorescente la degradan generando de esta forma la pérdida de la fluorescencia. Los antioxidantes estabilizan a los radicales protegiendo a la molécula fluorescente y de esta forma evitan la pérdida de la fluorescencia (Ghiselli et al., 1995). La actividad antioxidante puede ser expresada como tiempo de retraso o el área integrada neta en la curva de fluorescencia (Prior et al., 2005). Los valores de la prueba ORAC son reportados como equivalentes de trolox. En estudios anteriores la β -ficoeritrina fue utilizada como agente fluorescente (absorción a 495 nm, Emisión a 595 nm) pero presentaba inconsistencia de los resultados. Actualmente la fluoresceína o diclofluoresceína es la que se emplea debido a su estabilidad.

El ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC; por sus siglas en inglés) fue reportado por primera vez por Miller et al (1993). En una versión mejorada, el radical ABTS fue generado con ABTS de amonio y persulfato de potasio a temperatura ambiente en un intervalo de tiempo de 12 a 16 horas, generando una solución de color azul oscuro (Knasmüller et al., 2008). La muestra problema se disuelve en esta solución y se mide su absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-visible, a diferentes concentraciones. Los diferentes valores de absorbancia obtenidos se trazan frente a las concentraciones de antioxidantes para dar una línea recta. Debido a su simplicidad operativa, el ensayo TEAC ha sido utilizado en muchos laboratorios de investigación para el estudio de la capacidad antioxidante.

Estas pruebas son solo un ejemplo de todas las metodologías que se emplean para medir la actividad antioxidante, a partir de este valor se puede estimar que tan buen antioxidante es una sustancia con respecto a otra. Cabe aclarar que estos valores son diferentes entre las distintas pruebas ya que el fundamento de cada técnica difiere entre si (Singh et al., 2013).



4.2.4. Estabilidad oxidativa en lípidos inducida por antioxidantes.

La mayoría de las pruebas que se realizan para monitorear la función de los antioxidantes consisten en medir diferentes parámetros que indiquen la presencia de productos obtenidos por oxidación de lípidos. Esta oxidación causa grandes problemas económicos en la industria de alimentos, ya que genera productos tóxicos, así como sabores y olores anómalos y afectación de la calidad nutritiva de los alimentos (Fennema, 2000).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación de lípidos involucra la formación de radicales libres en el paso de iniciación por efecto del oxígeno singulete, el cual es una especie más reactiva que el oxígeno triplete. Los hidroperóxidos resultantes del proceso anterior generan una reacción en cadena convencional de radicales libres (Djilas & Cétkovic, 2002).

En la reacción de iniciación para generar los primeros radicales libres, actúan los antioxidantes primarios, retardando el proceso y evitando que se desencadene la reacción. De esta manera se retrasa la aparición de compuestos indeseables, alargando la vida de anaquel de los productos alimenticios (Camacho, et al., 2011). Estas sustancias indeseables, así como ciertas sustancias lipídicas se pueden monitorear para realizar un seguimiento del producto, mediante la evaluación de los parámetros de calidad: índice de acidez, índice de yodo, índice de peróxidos, índice de Kreis entre otros (Bartee, et al., 2007).

✓ Índice de yodo

El índice de yodo permite evaluar el grado de insaturación de un aceite o grasa. El monitoreo de este parámetro permite analizar la pérdida de insaturaciones en los triacilglicerolos durante un periodo de tiempo determinado, ya que durante la autooxidación, las dobles ligaduras son atacadas por radicales libres o electrófilos (Pearson, 1999). Entre más alto sea el valor de índice de yodo más sensible será el aceite a la oxidación (Moreno-Álvarez et al., 2007).



✓ El índice de acidez

Este parámetro es importante ya que es una medida de los ácidos grasos libres, contenidos en una muestra de grasa o aceite. Esta propiedad se ve influenciada por el tipo de materia prima utilizada y el grado de envejecimiento de la misma, aunque también la acidez puede ser generada durante el proceso de producción. Por lo tanto, el valor del índice de acidez es un parámetro que indica el grado de envejecimiento de la muestra durante su almacenamiento, ya que éste valor aumenta gradualmente debido a la degradación de sus componentes (Bartee et al., 2007).

✓ Índice de peróxidos

Esta prueba establece la cantidad de grupos peróxidos e hidroperóxidos que se encuentran en una muestra de aceite o grasa, ayudando a medir el deterioro de la muestra en la fase de iniciación. Entre más alto sea el valor de esta parámetro, más alta será la probabilidad de llegar a la fase de propagación y en consecuencia, a un deterioro oxidativo más alto (Nielsen, 1998).

Se ha establecido en la norma para grasas y aceites comestibles, que el valor de índice de peróxidos sea menor a 15 miliequivalentes de peróxidos en un kilogramo de grasa para un aceite virgen o prensado en frío. En aceites o grasas que contienen algún aditivo, el límite máximo de este índice, deberá ser menor a 10 miliequivalentes de peróxido en un kilogramo de muestra (CODEX, 1981).

✓ El índice de Kreis

Este índice es una prueba rápida que se puede medir por espectrofotometría visible. En esta prueba la floroglucina reacciona en medio ácido con las grasas oxidadas, dando una coloración roja que se puede medir a 540 nm. La intensidad aumenta con el deterioro de la grasa, debido probablemente a la presencia de aldehído malónico o epihidrónico, los cuales son productos de deterioro de los lípidos (Aurand et al., 1987).



4.2.5. Comparación entre los antioxidantes naturales y sintéticos

Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butilhidroxianisol y Butilhidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su potencial carcinogenicidad. Se ha encontrado que en dosis altas, algunos antioxidantes inducen el deterioro de la reproducción por teratogénesis, retraso del crecimiento y alteraciones en el metabolismo hepático (Sang-Hee et al., 2005). También se ve afectado el metabolismo de las hormonas esteroideas, tiroideas y otras hormonas relacionadas con la reproducción. El BHA por ejemplo se sospecha que actúa como estrógeno por su afinidad al receptor de estrógeno en pruebas in vitro además de que induce la proliferación de células MCF-7 (Soto et al., 1995).

Se ha establecido que los antioxidantes naturales son una opción viable en la preservación de alimentos, ya que estos compuestos se consumen en la dieta sin presentar efectos adversos en la salud de las personas. Estos compuestos se han extraído de diversas fuentes naturales, principalmente de vegetales y frutas (Rajkumar & Naragarajan, 2011).

Se han efectuado estudios que señalan a los polifenoles naturales como antioxidantes alternativos para preservar los alimentos (Bouaziz et al., 2008). Estos polifenoles también tienen un rol importante en la protección contra un número significativo de patologías, tales como: arterioesclerosis, disfunciones cerebrales y cáncer (Ignat et al., 2011).

Es importante mencionar que los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con sustituciones alquílicas, mientras que los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos que no presentan estas sustituciones. Se ha sugerido que la presencia de estos grupos alquilo son el origen de la toxicidad que presentan los antioxidantes sintéticos (Balasundram et al., 2005).



4.2.6. Instituciones que certifican el uso de antioxidantes en alimentos

Entre las instituciones que certifican y aprueban el uso de aditivos en alimentos se encuentra la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) que publica el Codex Alimentarius que sirve como referencia a nivel global para el uso de aditivos, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) por sus siglas en inglés que se encuentra en Estados Unidos de Norteamérica, la Dirección General de Sanidad y Consumidores de la Comisión Europea que se encarga de la aprobación de aditivos en la Comunidad Europea, y en México la institución que se encarga de certificar y regular el uso de aditivos es SAGARPA.

La FDA es una de las instituciones que se encarga de aprobar el uso de aditivos en los alimentos, ya que cuenta con laboratorios en los cuales se llevan a cabo pruebas toxicológicas para certificar su uso en los alimentos (Ki Lin et al., 2013).

Hoy en día ya se han aprobado algunos extractos de origen vegetal para que sean usados como aditivos principalmente como antioxidantes, por ejemplo el extracto de pulpa de oliva está autorizado por la FDA otorgándole la certificación GRAS para usarse en diferentes alimentos como antioxidante en bebidas, cereales, salsas, aderezos, condimentos, snacks y alimentos funcionales en un nivel máximo de 3000 miligramos por kilogramo en el alimento final (FDA, 2015). Otro extracto aprobado por la FDA para su uso en alimentos como antioxidante es el que se obtiene a partir de semillas y la pulpa de la uva con una concentración de hasta 210 miligramos por kilogramo de producto final.

Se ha reportado que el extracto de la semilla de tamarindo presenta actividad antioxidante (Tamil et al., 2012, Chandrasekaran & Rose, 2011, Siddhuraju, 2007) por lo cual este extracto podría ser viable como posible fuente de antioxidantes naturales.



4.3. El tamarindo como fuente potencial de antioxidantes naturales

Según datos de la comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México se ubica entre los cinco primeros países llamados mega diversos, que albergan entre 60 y 70 por ciento de la diversidad biológica conocida del planeta. La diversidad conjunta de especies del territorio mexicano representa aproximadamente 12 por ciento del total mundial; es decir, 12 de cada 100 especies conocidas en el mundo se encuentran en México. Las ventajas de esta gran diversidad para nuestra nación, residen en una mayor gama de opciones del manejo de la riqueza de sus recursos vivos, ejemplo de esto es la agricultura. En este sentido, nuestro país representa el tercero con más extensiones de áreas de cultivo en Latinoamérica, siendo uno de los principales productores de vegetales y frutas (Valdez et al., 2010). Por ejemplo el tamarindo es unos de los frutos que se cultivan en varias regiones en el país.

El árbol de tamarindo es de gran tamaño, conocido comúnmente como tamarindo; es nativo de las sabanas secas del África tropical (Figura 14), se ha plantado y naturalizado extensamente en las regiones tropicales y subtropicales presentes en los cinco continentes, con gran presencia en Asia, Oceanía, América central, el caribe.

El tamarindo se ha adaptado a regiones con clima cálido semiseco, sin embargo también prospera en climas húmedos. Este árbol es de lento crecimiento, pero de gran longevidad (150 años), de tamaño mediano a grande de 10 a 25 metros. Se caracteriza por tener una copa redondeada, extendida y abierta, con follaje denso, ramas bajas y una cobertura de 6 a 10 metros (Silva & Lucatero, 2006)

El cultivo del tamarindo se divide en 2 categorías básicas: dulce y amargo. El tipo amargo constituye cerca del 95 por ciento de la producción total mundial. Aun cuando la mayoría de los países productores de tamarindo no crecen en una escala comercial, se ha generado un aumento en la última década (Colima, 2015). La principal parte del árbol que se aprovecha es el fruto, cuya disponibilidad es estacional pero que puede encontrarse en el mercado todo el año.

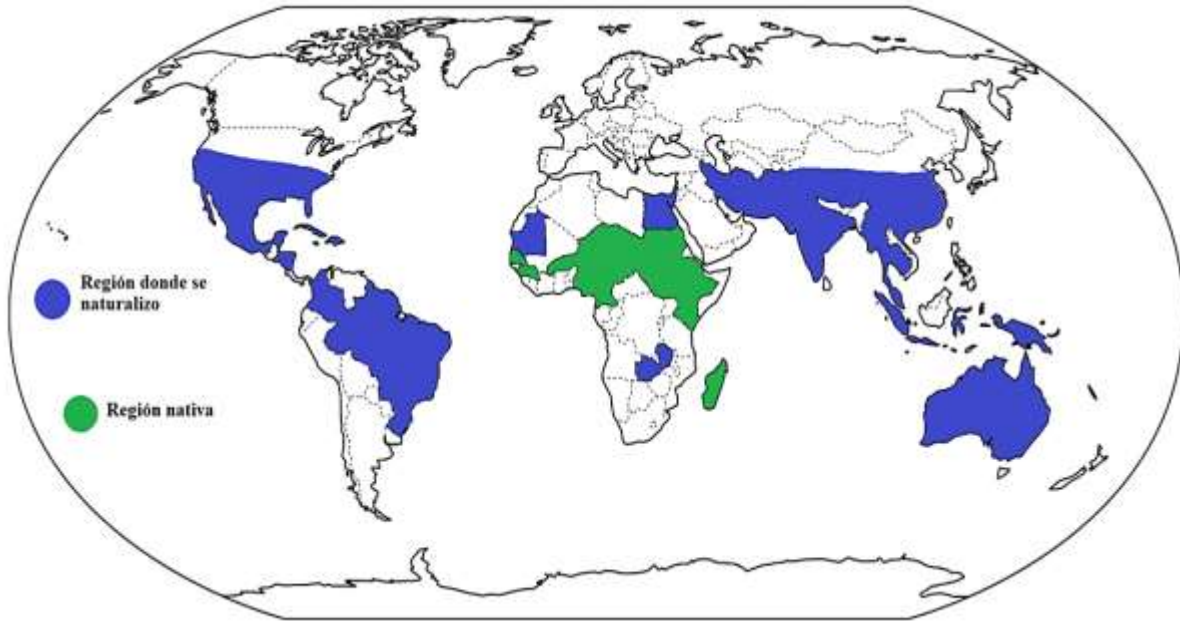


Figura 14. Región nativa y naturalizada del tamarindo en el mundo.

La India es productor de tamarindo a escala comercial y es el mayor productor de tamarindo amargo. Una gran parte de su producción se exporta a Asia Occidental, Europa y América, donde se utiliza para las especialidades de alimentos; su producción anual es de alrededor de 300 mil toneladas (Colima, 2015).

4.3.1. La producción de tamarindo en México

El tamarindo en México se ha adaptado a regiones con clima semiseco y, también prospera en climas cálidos húmedos. Este fruto se produce en zonas tropicales del país, desde la península de Yucatán y hasta el estado de Tamaulipas. Por el litoral del Pacífico, los cultivos de tamarindo se distribuyen desde Chiapas hasta Sinaloa. Encontrándose también en el altiplano, en parte de los estados de México, Querétaro y Puebla (Figura 15).

En el año 2013, se determinó una superficie de 8025 hectáreas de cultivo de tamarindo. Teniendo una producción de 35410 toneladas de este fruto equivalente a un estimado de \$ 244 millones de pesos (SAGARPA, 2015).

Los 5 estados de la república que produjeron más tamarindo en el año 2013 se muestran en la Tabla 8, en ella se puede observar que el principal estado productor

es Jalisco. También se puede notar que el estado de Colima, con una menor superficie de cultivo, produjo una mayor cantidad de tamarindo. Esto se debió a la aplicación de nuevas tecnologías en el cultivo de este producto, como el uso de semillas mejoradas y un sistema de riego más adecuado a las necesidades del producto (SAGARPA 2015).



Figura 15. Principales estados productores de tamarindo en México.

Los productos derivados del tamarindo tienen una gran diversidad de aplicaciones; su madera es utilizada en el medio rural para la fabricación de implementos de labranza, utensilios de cocina y carbón vegetal. Pero el producto de mayor interés es el fruto que genera el árbol.



Tabla 8. Principales estados de la republica que producen tamarindo

Estado	Superficie sembrada (Hectáreas)	Superficie cosechada (Hectáreas)	Producción (Toneladas)	Valor estimado de la producción (millones de pesos)
Jalisco	3180	2290	10643	91.34
Colima	1965	1888	11719	89.67
Guerrero	1464	1456	7305	31.78
Michoacán	883	883	3556	24
Oaxaca	234	234	679	2.7

El árbol de tamarindo generalmente comienza a producir fruta entre los 7 y los 10 años de edad. Es una vaina (permanece cerrada cuando madura), oblonga o linear, comprimida lateralmente y comúnmente curva, con una capa externa (pericarpio) café canela que se quiebra con facilidad (Figura 16). También tiene una capa mediana (mesocarpio) pulposa combinada con fibras y una capa interna (endocarpio). Este fruto puede contener de 1 a 12 semillas (Silva & Lucatero, 2006).

Figura 16. Fruto obtenido del árbol *Tamarindus indica* L.



4.3.2. Composición del fruto y la semilla de tamarindo

La pulpa de la fruta que comprende casi la mitad del peso de la vaina, es fuente de vitaminas (ácido ascórbico, riboflavina, niacina). En 100 gramos de fruto maduro se encuentran: 57 gramos de carbohidratos, 0.6 gramos de lípidos, 3 gramos de proteína y de 3 a 5 gramos de fibra. Además, se ha determinado que el fruto contiene minerales como calcio, fósforo y hierro y un contenido de humedad del 30 por ciento (Colima, 2015).

La pulpa que se encuentra en el fruto tiene aplicaciones en la industria por sus cualidades como goma espesante y contenido de polisacáridos. También existe una diversidad de productos a base de tamarindo, como son: bebidas, polvo para preparar bebidas o como condimento y productos de confitería (Viveros et al., 2012).

Al desprender la pulpa del fruto, tanto las semillas como las pequeñas fibras del fruto son desechadas. Estas semillas son ovaladas, comprimidas lateralmente, lisas de color café, carecen de endospermo y se pueden conservar por un largo período de tiempo (Silva & Lucatero, 2006).

Tabla 9: Análisis fisicoquímico proximal de la semilla de tamarindo nigeriano y mexicano

Parámetro	Semillas de tamarindo nigeriano (por ciento)	Semillas de tamarindo mexicano (por ciento)
Lípidos	3.11	5.4
Proteína	36.65	13.3
Fibra cruda	4.02	8.8
Cenizas	5.10	4.1
Humedad	5.10	11.3
Carbohidratos	46.02	57.1

Se ha observado que las variedades de tamarindo que se producen en el mundo presentan diferencia en su composición. Por ejemplo, en la Tabla 9, se muestra el



análisis fisicoquímico de la semilla de tamarindo nigeriano (Adewuyi et al., 2011) y mexicano (CONABIO, 2015). Como se puede observar, el contenido de humedad y proteínas es distinto, lo cual se ha asociado a diferentes factores, como el clima, la composición del suelo entre otros.

La semilla de tamarindo es un residuo del proceso de despulpado del fruto, y generalmente se destina a la producción de composta o se deposita en vertederos. Algunos grupos de investigación han usado la semilla para obtener extractos que presentan compuestos con actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, antiparasitaria o bioinsecticida (Aengwanich et al., 2009).

En el año 2005 un grupo de investigadores encontraron en la semilla de tamarindo un inhibidor de tripsina con una alta actividad (Araújo et al., 2005); en este trabajo probaron este compuesto como bioinsecticida realizando pruebas in vivo e in vitro. En las pruebas in vitro se usaron diferentes tripsinas presentes en los sistemas digestivos de diferentes coleópteros principalmente los que son plagas importantes, en estas pruebas encontraron que este compuesto presento una alta afinidad a las tripsinas de estos insectos; en las pruebas in vivo en las cuales se usaron como modelo las larvas de la mosca de la fruta y el gorgojo del frijol, se encontraron resultados muy prometedores.

En otro estudio realizado en 2011, se encontró que la fracción de los extractos de las semillas ricos en flavonoides presentan actividad antimicrobiana en pruebas in vitro tanto contra bacterias gram negativas como gram positivas a una concentración de 100 µg/mL de extracto y usando como control positivo tetraciclina a una concentración de 10 µg/mL. También se encontró que este extracto presenta actividad contra parásitos en particular contra *Eisonia fatida* y *Taenia solium* (Bhandoriya et al., 2011).

4.3.3. Polifenoles de la semilla de tamarindo

La mayoría de las investigaciones en las que han trabajado con semilla de tamarindo se han enfocado al estudio de los polifenoles presentes en ella y a determinar la actividad antioxidante (Razali et al., 2012, Siddhuraju, 2007). También se a



encontrado cual es la composición principal de de polifenoles en la semilla. Estos compuestos principalmente son proantocianidinas (Sudjaroen et al., 2005), estos polimeros estas constituidos principalmente por catequinas, epicatequinas, taxifolina, apigenina entre otros flavonoides (Figura 17).

En estas estudios se han utilizado como materia prima las semillas que fueron retiradas de frutos frescos y no se han usado las semillas producto de algún proceso de despulpado. Estas semillas residuales son de gran interés ya que pueden ser viables como fuente de antioxidantes naturales y además ayudaría a disminuir la generación de residuos alimenticios.

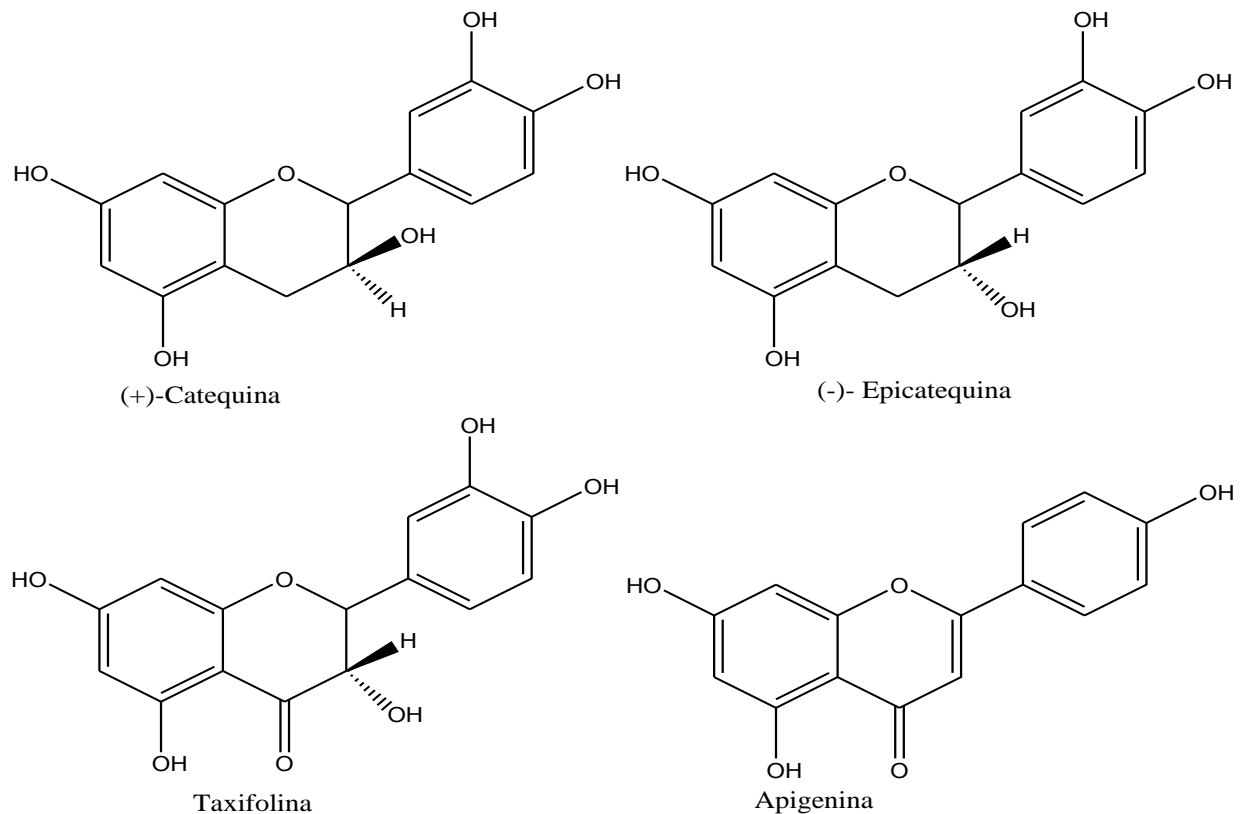


Figura 17. Principales componentes polifenólicos presentes en la semilla de tamarindo



5. METODOLOGÍA

5.1. Material vegetal

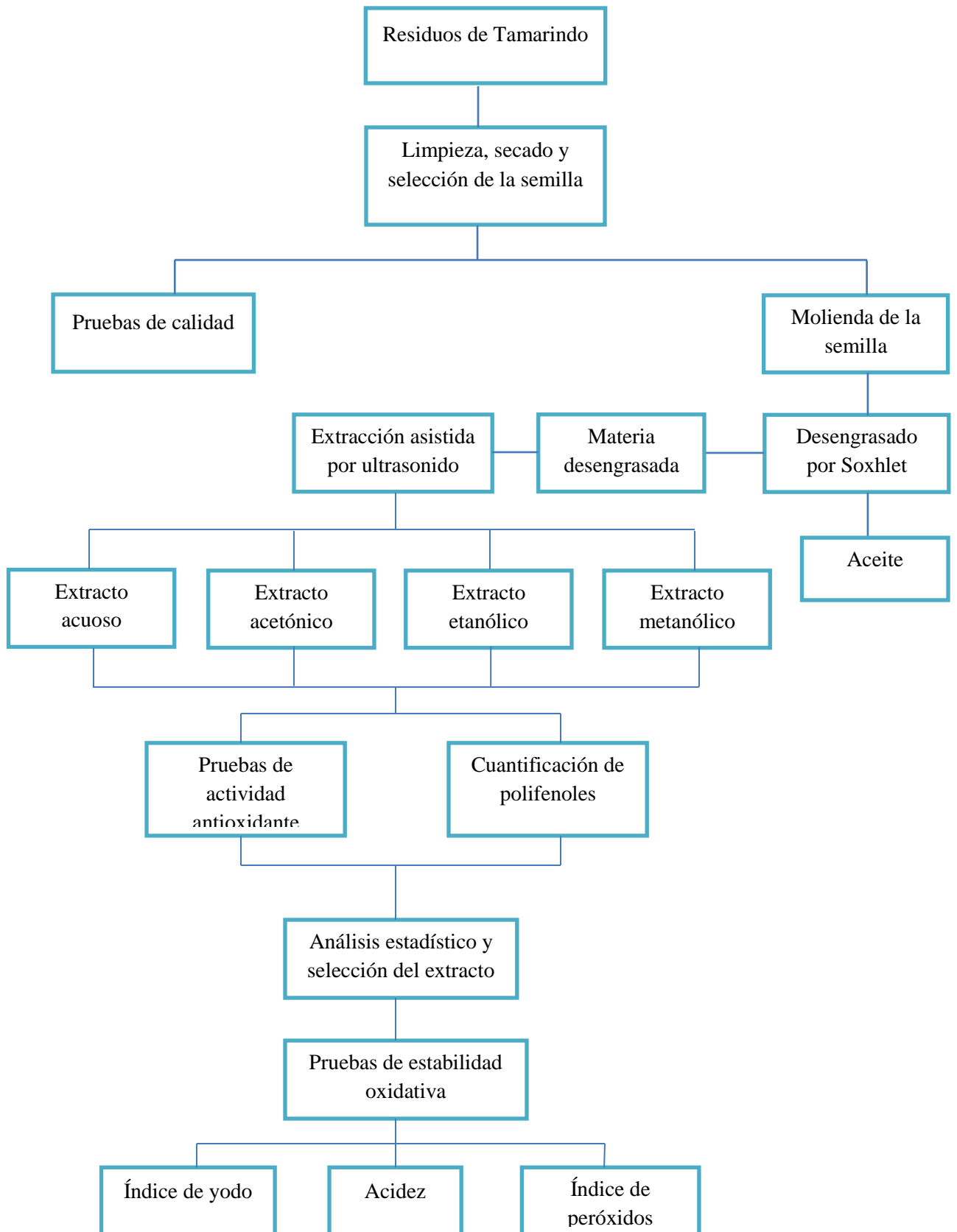
Las semillas de Tamarindus indica fueron donadas por la empresa “Extractos y aromáticos botánicos S.A. de C.V.” que se ubica en la calle Matlame No 48, Col. Zapata Vela, Delegación Iztacalco, México D.F. que se encuentra a cargo del Ing. Raúl Juárez Santiago.

5.2. Equipos y reactivos.

Equipos	
Balanza analítica marca Scientech modelo SA T20	Sonicador ultrasonic cleaner marca SperScientific modelo 10004
Vernier marca Pretul	Rotavapor marca Buchi modelo R124
Lector de microplacas con dispensadores automaticos marca BioTek modelo Synergy 2	Parrillas
Termobalanza marca Sartorius modelo MA35	

Reactivos	
Hexano	Yoduro de potasio
Metanol	Almidon para yodimetría
Etanol	Diclorometano
Agua destilada	Cloroformo
Acetona	Hidróxido de potasio
Reactivo de Wijs	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)
Tiosulfato de sodio	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
Ácido gálico	Aceite de oliva extra virgen
Butilhidroxianisol (BHA)	Fenolftaleina
Ácido acetico	Reactivo de Folin-Ciocalteu
Carbonato de sodio	Ácido clorhídrico

5.3. Diagrama general de actividades





5.4. Limpieza, secado y selección de la semilla

La limpieza se llevo a cabo lavando las semillas con agua para retirar los restos de pulpa y suciedad adherida. Una vez limpia se colocaron sobre papel adsorbente y se dejaron secar a la sombra durante una semana. Ya que estuvieron limpias y secas las semillas, se llevo a cabo la selección que consistió en retirar aquellas semillas que presentaban algún tipo de daño físico.

5.5. Determinación de características físicas de las semillas.

Se tomó una muestra de 30 semillas de tamarindo aleatoriamente de un total de 3 kilogramos aproximadamente. Cada semilla se pesó en una balanza analítica, se midió su longitud, ancho y grosor empleando un Vernier. Con los datos obtenidos de cada dimensión se cálculo la media, desviación estándar y coeficiente de varianza.

5.6. Determinación de la humedad y extracción del aceite de la semilla de tamarindo residual

Una muestra aleatoria de semillas de tamarindo se sometieron a un proceso de molienda en un molino mecánico para obtener harina de esta semilla. Este proceso se llevo a cabo para tres muestra de semillas diferentes. Para cada muestra se determinó la humedad usando una termobalanza.

Posteriormente, la muestra de harina se colocó en un cartucho y se pesó aproximadamente 30 gramos de harina para después llevarse a cabo el desengrasado de las muestras por el método de Soxhlet usando hexano como disolvente. Este proceso se realizó por 18 horas para efectuar una extracción exhaustiva de los lípidos contenidos en la muestra. Una vez terminado este proceso, se deja evaporar el disolvente residual a temperatura ambiente. El aceite obtenido de cada muestra se concentró en un rotavapor, recuperando el disolvente empleado. Una vez concentrado se pesó el aceite para determinar su rendimiento.



5.7. Extracción de antioxidantes de las semillas de tamarindo

La extracción de antioxidantes se llevó a cabo con 4 disolventes distintos para realizar un comparativo entre ellos (Razali et al., 2012), los disolventes empleados fueron: agua destilada, etanol, metanol y acetona. En un matraz se pesó aproximadamente 0.8 gramos de muestra desengrasada del primer cartucho, posteriormente se colocó 40 mililitros de agua destilada y se llevó a un pH de 3 con ayuda de ácido clorhídrico concentrado. Este proceso se repitió para cada disolvente empleado.

La extracción que se empleó fue asistida por ultrasonido usando un sonicador. Cada muestra se colocó 30 minutos de ultrasonido (Ghafoor et al., 2009) cuidando la temperatura del agua del sonicador. Después de terminado este tiempo, la muestra se filtró y se aforó en un matraz de 50 mililitros con el mismo disolvente empleado en la extracción. Los extractos obtenidos se colocaron en viales color ámbar y se guardaron en congelación.

Este procedimiento también se llevó a cabo para las tres diferentes muestras que se emplearon. De cada muestra se obtuvieron 4 extractos diferentes.

5.8. Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

A cada extracto obtenido se le realizó una dilución antes de realizar la prueba. Para el extracto etanólico fue de 2 en 100, para el metanólico y acetónico fue 2.5 en 100 y para el extracto acuoso no se llevó a cabo ninguna dilución. Después se realizó la cuantificación de Polifenoles totales realizando para cada disolvente una curva patrón de ácido gálico para poder determinar los polifenoles.

La cuantificación de posibles compuestos polifenólicos se hizo a través del método colorimétrico de Folin- Ciocalteu (Zhang et al., 2006, Siddhuraju, 2007). Se pesó aproximadamente 0.0120 gramos de ácido gálico y se aforó en un matraz de 25 mililitros con agua destilada. Después se realizaron diluciones de esta solución para obtener las siguientes concentraciones : 0.0192, 0.0384, 0.0576, 0.0960, 0.1152, 0.1344, 0.1536, 0.1728, 0.1920, 0.2112 mg/mL de ácido gálico. Estas



diluciones se ocuparán para llevar a cabo la realización de la curva patrón con ácido gálico en agua destilada. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para realizar las curvas patrón de ácido gálico en etanol al 80 por ciento, metanol al 80 por ciento y acetona al 80 por ciento.

En una microplaca de 96 pozos se mezclaron, en cada pozo, 25 μL de cada concentración de la curva patrón de ácido gálico y de los diferentes extractos obtenidos, 30 μL de carbonato de sodio al 20 por ciento, 125 μL de agua destilada y 20 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 por ciento. Cabe mencionar en el agua destilada y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adicionados automáticamente haciendo uso del sistema de inyección automática del lector de microplacas. Para esta determinación, los blancos que se usaron fueron agua destilada, etanol al 80 por ciento, metanol al 80 por ciento y acetona al 80 por ciento respectivamente para cada curva patrón.

Las mezclas en cada pozo de la microplaca se dejaron reaccionar por 40 minutos en la obscuridad, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 725 nm. Cada determinación se realizó por triplicado y el contenido de polifenoles totales se reportó como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca.

Para obtener el valor de polifenoles totales se ocupó la cantidad de muestra y absorbancia medida (Tabla 14 y 15, Anexo). Como se muestra en el siguiente ejemplo:

Extracto etanólico muestra 1, ecuación de la curva patrón de ácido gálico en etanol $y = 15.702x + 0.0011$. Usando la absorbancia de la Tabla 14 y la ecuación se obtiene un concentración de 0.0141 mg/mL. Posteriormente usando la cantidad de muestra de 0.8192 g que se aforo a 50 mL, el factor de dilución del extracto 2 en 100 y tomando en cuenta el volumen que se colocó de muestra y el final se realizó el cálculo.

$$\text{Conc. polifenoles} = \left(\frac{0.0141 \text{ mg EAG}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{0.2 \text{ mL}}{0.025 \text{ mL}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL}}{2 \text{ mL}} \right) \left(\frac{50 \text{ mL}}{0.8777 \text{ g m.seca}} \right) =$$

$$392.205 \frac{\text{mg EAG}}{\text{g de muestra seca}}$$



Una vez obtenidos los resultados para cada extracto se realizó un análisis de la varianza asociada a una variable (ANOVA por sus siglas en inglés) con un nivel de significancia del 5 por ciento, siendo la variable el disolvente empleado para la extracción. Posteriormente si en la prueba anterior se obtuvo un valor calculado de “F” superior al valor crítico de “F” se concluye que hay diferencia significativa entre las muestras y se realiza un segundo análisis llamado prueba de Tukey. Este análisis consiste en calcular la diferencia entre las muestras para compararlas con un valor llamado diferencia honestamente significativa (DHS). Este valor se calculó usando los grados de incertidumbre del error, la suma de cuadrados del error y el valor de Q_{α} que se puede obtener de cualquier tabla para prueba de Tukey usando un nivel de significancia del 5 por ciento. Si la diferencia es menor a el DHS se considera que las muestras comparadas son similares.

5.9. Evaluación de la actividad antioxidante con el reactivo de DPPH

La actividad antioxidantes se determinó a través del ensayo de la capacidad de remoción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH por sus siglas en inglés) de acuerdo al método de Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, (1995) y a las modificaciones de Cheng, Moore, & Yu, (2006). Una disolución de DPPH 0.234 mM en acetona al 80 por ciento fue preparada el mismo día de su uso, a partir de una disolución stock de DPPH 31.7 mM.

El ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), compuesto hidrosoluble se utilizó como referencia para esta prueba. Se partió de un stock de trolox 500 μM , posteriormente se realizaron diferentes diluciones para obtener las siguientes concentraciones: 2.50 μM , 5 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM , 100 μM , 140 μM y 180 μM .

A los diferentes extractos se le realizaron diluciones tomando diferentes alícuotas y aforando a un mililitro con el disolvente correspondiente. Las alícuotas fueron: 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL , 600 μL , 800 μL y 1000 μL .

En una microplaca de 96 pozos se distribuyeron 100 μL de cada una de las concentraciones de trolox y de las diferentes diluciones de los extractos, se



adicionó 100 μL de la solución de DPPH 0.234 mM a cada pozo. Para esta técnica se usaron como cuantros blancos, cada uno con 200 μL del disolvente ocupado, también se usaron 4 controles cada uno con 100 μL de disolvente y 100 μL de reactivo de DPPH. Cabe mencionar que los 100 μL que se dispensaron de DPPH para cada muestra o control se empleó el dispensador automático del lector de microplacas. Posteriormente a la adición del reactivo de DPPH se agitó la microplaca por 30 segundos y se leyó a una absorbancia de 515 nm en intervalos de un minuto durante un período de 30 minutos. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

La realización del cálculo de actividad antioxidante expresado como RDSC se realiza para tener un valor más confiable. Este método compara las muestras con un reactivo que sirve como estándar (trolox), a través de un modelo matemático de regresión lineal (Cheng et al., 2006). Este método se basó en medir el EC50 y ABC50 tanto del trolox como la muestra, de esta manera se relacionan ambos valores para determinar la actividad antioxidante. A continuación se muestra un ejemplo con el extracto etanólico de la muestra 1. Primero se determina el EC50 del trolox en etanol usando la ecuación de % de DPPH degradado que es $y = 1.6783x + 8.5289$ y calculando a al 50% de degradación (Figura 30, Anexo). Este valor es de 24.71 μM , posteriormente se determinó el valor de ABC50 que es el área bajo la curva a la concentración anterior, usando la ecuación $y = 27.939x + 112.16$. El valor calculado es 802.53. Este mismo procedimiento se realizó con la muestra, obteniendo un valor de EC50 de 0.074 mg/mL y el ABC50 es de 627.96. Con estos valores se puede determinar el valor de capacidad de captación de radicales (RDSC).

$$RDSC = \left(\frac{ABC50 \text{ muestra}}{ABC50 \text{ trolox}} \right) \left(\frac{IC50 \text{ trolox}}{IC50 \text{ muestra}} \right) = \left(\frac{627.96}{802.53} \right) \left(\frac{24.71 \mu\text{M}}{0.074 \text{ mg/mL}} \right)$$

$$= 261.28 \frac{\mu\text{M E. Trolox}}{\text{g de muestra}}$$

El valor obtenido de actividad antioxidante se reportó como capacidad de captación de radicales libre en μM equivalentes de Trolox por gramo de muestra.



Al igual que en la cuantificación de polifenoles, se llevo a cabo un los análisis estadísticos de ANOVA y prueba de Tukey para observar si existe diferencia significativa entre el uso de diferentes disolventes para la obtención de los extractos.

5.10. Evaluación de la estabilidad oxidativa de un aceite comercial empleando extractos de semilla de tamarindo residual.

Una vez realizados los análisis estadísticos y comparar los diferentes extractos, se eligió el extracto que presentara el valor de actividad antioxidante más alto.

A una muestra de aceite de oliva extra-virgen de la marca Great value ® lote L-31243-077-2 se le adicionó 92 ppm del extracto de semilla de tamarindo residual, el cual fue disuelto en 3 mL de etanol para su incorporación. Posteriormente se colocó en agitación por 30 minutos y se dejó reposar 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento pero usando BHA como antioxidante, se llevo a cabo la adicción del antioxidante usando como referencia la norma NMX-f-223-scfi-2011 para no rebasar los límites permitidos para este aditivo (100 ppm de BHA), se usó el mismo criterio para la cantidad adicionada del extracto.

Se emplearon tres grupos de viales de color ámbar, cada grupo con 4 viales cada uno. Al primer grupo de viales se le colocó 26 g de aceite sin antioxidante, el cual sirvió como control, al segundo grupo de viales se le colocó 26 g de aceite con el extracto y el tercero se le colocó 26 g de aceite con BHA.

Todos los viales se colocaron en una incubadora metálica a 40 °C y se efectuaron monitoreos cada 7 días de índice de yodo, acidez y de índice de peróxidos. Lo anterior se realizó por triplicado para cada muestra de aceite, por un intervalo total de tiempo de 28 días.

5.10.1. Índice de acidez

A un gramo de muestra se le adicionó 20 mL de etanol agregándose tres gotas de fenolftaleína como indicador, se calentó hasta llegar a 50°C y una vez alcanzada esta temperatura se tituló con una solución valorada de hidróxido de



potasio 0.0098 N y usándose agitación vigorosa hasta alcanzar una coloración rasa pálido que fuera estable por lo menos por 30 segundo como marca la norma NMX-f-101-scfi-2006. Se registró el volumen utilizado de la solución valorada de KOH, y se realizo un blanco para estimar el índice de acidez usándose la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(V_1 - V_2)(\text{Normalidad de KOH})(28.2 \text{ mg KOH})}{g \text{ de muestra}}$$

Donde V_1 es el volumen de la muestra, V_2 es el volumen de KOH ocupado en el blanco. El índice de acidez se expresa en mg de KOH por gramo de aceite, usando como referencia al ácido oleico, ya que este ácido graso es el que se encuentra en mayor proporción.

5.10.2. Índice de yodo

En un matraz de yodo de 250 mL se peso 0.1 gramos de muestra aproximadamente, luego se cubrió de papel aluminio asegurándose de que no hubiera ningún paso de luz, luego se adicionó 10 mL de diclorometano y 10 mL de reactivo de wijs, el matraz se tapó y se dejó reposar 30 minutos en la obscuridad. Pasando el tiempo de reposo, se adicionó 10 mL de yoduro de potasio al 10 por ciento y 100 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada, posteriormente se tituló con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.104 N hasta alcanzar una coloración amarillo paja. A continuación se agregó un mililitro de solución de almidón al 1 por ciento como indicador y se continua la titulación hasta que la solución quede incolora como se indica en la norma NMX-F-152-scfi-2005. Se registra el volumen de tiosulfato de sodio utilizado. Para determinar el valor de índice de yodo, también se realizó la titulación de un blanco.

La ecuación utilizada para calcular el valor del índice de yodo es la siguiente:

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V_2 - V_1)(\text{Normalidad del tiosulfato de sodio})(12.69)}{g \text{ de muestra}}$$



Donde V_2 es el volumen ocupado en la titulación del blanco, V_1 es el volumen ocupado para la muestra.

5.10.3. Índice de peróxidos.

Se pesó 3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se disolvió la muestra en 30 mL de una solución de ácido acético con cloroformo (3:2). Se colocó en la mezcla anterior 0.5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio, después de un minuto de reposo se adicionó 30 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada. Se tituló la muestra con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.0104 N usando una solución de almidón al 1% como indicador (Rajkumar & Naragarajan, 2011).

La ecuación utilizada para calcular el valor del índice de peróxidos es la siguiente:

$$\text{Índice de peroxidos} = \frac{(V_1 - V_2)(\text{Normalidad del tiosulfato de sodio})(1000)}{g \text{ de muestra}}$$

Donde V_1 es el volumen de tiosulfato de sodio ocupado para la muestra, V_2 es el volumen que se ocupó en el blanco. El resultado se expresa en meq de peróxido/kg de aceite.

Una vez terminadas las pruebas de estabilidad oxidativa durante el tiempo propuesto, se realizó un análisis estadístico de ANOVA para comparar la función como antioxidante en una matriz alimentaria entre el extracto de la semilla de tamarindo residual con el antioxidante sintético (BHA).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Características físicas de las semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*).

Las semillas de tamarindo residual mostraron una coloración café rojiza, una forma ovalada, lisas, están comprimidas lateralmente y presentan una cascara muy delgada. El promedio de peso y dimensiones se obtuvo de una muestra de 30 semilla. El peso promedio fue de 1.06 ± 0.19 g y las dimensiones fueron: 1.29 ± 0.17 cm, 0.78 ± 0.05 cm, 1.78 ± 0.14 cm de ancho, grosor y largo respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en muestras de semilla de tamarindo de otras regiones del mundo (De Caluwé & Van Damme, 2010, Silva & Lucatero, 2006).

6.2. Determinación de la humedad y extracción del aceite de la semilla de tamarindo residual

La humedad y el contenido de la grasa se determinaron en tres muestra de harina de semilla residual de tamarindo, ver Tabla 10. Como se puede observar, el promedio de la cantidad de grasa y humedad de estas semillas es ligeramente mayor que el promedio obtenido a nivel nacional (CONABIO, 2015). Es importante hacer notar que el contenido de grasa y humedad de las semillas de tamarindo nigeriano es considerablemente menor que el determinado en muestras mexicanas de semilla de este fruto.

Tabla 10. Humedad y contenido de grasa de las semillas de tamarindo

Muestra	g de grasa/g de muestra fresca	g de agua/g de muestra
Semilla residual mexicana	6.36 ± 0.33	12.39 ± 0.33
Semilla mexicana	5.4	11.3
Semilla nigeriana	3.11	5.10

6.3. Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles totales de cada extracto fue evaluado por el ensayo de Folin-Ciocalteu y los resultados se muestran en la Figura 18. En esta figura se puede



observar que el extracto etanólico presenta un valor más alto de polifenoles totales (399.48 ± 6.17 mg EAG/ g), seguido por el extracto metanólico (323.45 ± 35.78 mg EAG/ g). El extractos acetónico (119.84 ± 18.90 mg EAG/ g) y el extracto acuoso (11.06 ± 1.21 mg EAG/ g) fueron los que presentaron valores más bajos para esta determinación. Lo anterior indica que el orden de rendimiento de extracción fue el siguiente: etanol > metanol > acetona > agua. Esto muestra que el etanol es el mejor disolvente para la extracción de los polifenoles presentes en la semilla de tamarindo residual.

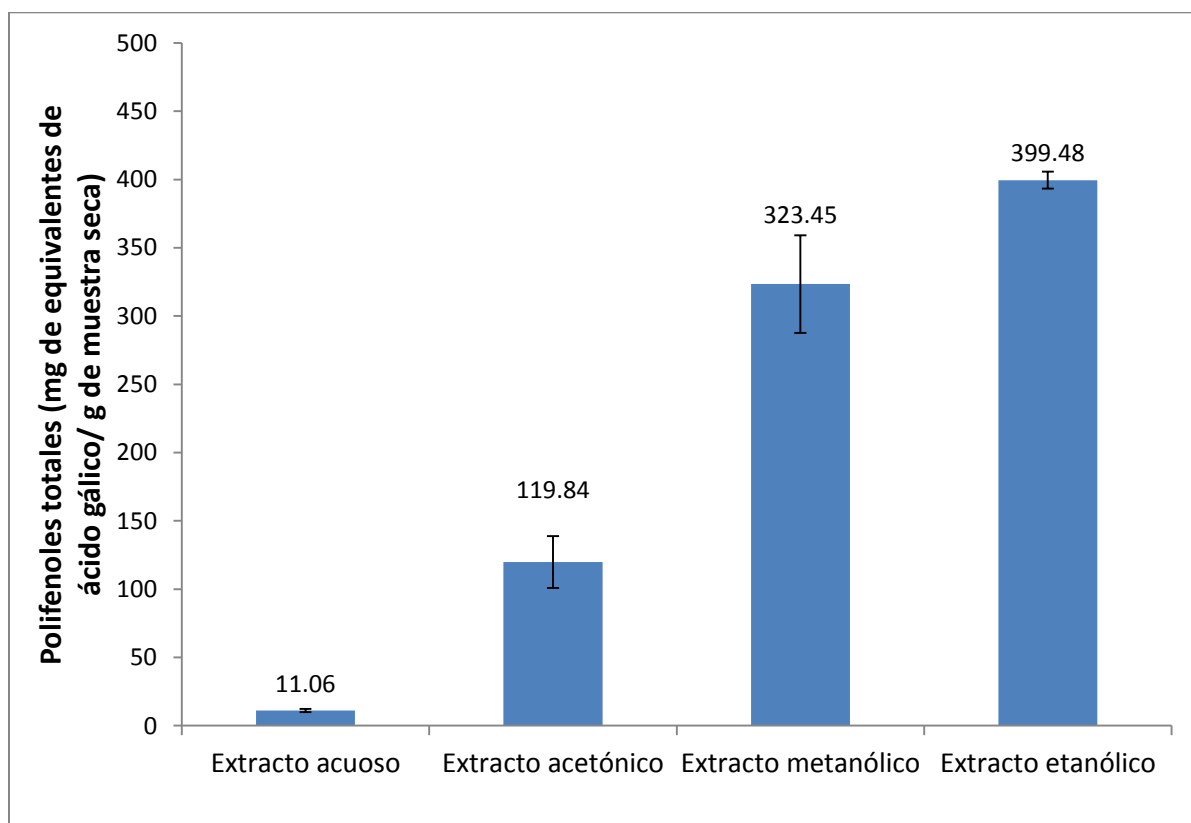


Figura 18. Polifenoles en extractos de semilla residual de tamarindo empleando extracción asistida por ultrasonido (30 minutos).

Con el propósito de establecer si existe diferencia significativa entre los valores obtenidos de polifenoles totales en cada extracto se realizó un análisis de ANOVA (Tabla 11).



Tabla 11. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de polifenoles totales. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05%.

<i>Tratamiento</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Agua	3	11.06	229.99	4.07
Acetona	3	119.84		
Metanol	3	323.45		
Etanol	3	399.48		

El valor de F calculado (229.99) para esta determinación es superior al valor crítico de F (4.07), esto indica que las muestras tienen concentración de polifenoles diferentes a nivel estadístico.

Tabla 12. Matriz de la prueba de Tukey para la prueba de polifenoles totales. Nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 53.55.

	Etanol	Metanol	Acetona	Agua
Etanol				
Metanol	76.03			
Acetona	279.64	203.61		
Agua	388.42	312.39	108.78	

Para comparar que extractos podrían ser iguales estadísticamente se llevó a cabo la prueba de Tukey (Tabla 12). Comparando las muestras entre sí, todas las comparaciones superan el valor honestamente significativo por lo que ningún extracto se puede considerar semejante. Estos datos sugieren que los componentes del extracto difieren entre sí, debido a que se solubilizan de manera diferente según el disolvente que se emplee (Siddhuraju, 2007).

Resulta complicado comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros investigadores, debido a las diferentes técnicas de extracción empleadas en cada estudio. Por ejemplo, en este estudio se encontró que el extracto metanólico de la semilla de tamarindo de Malasia contiene 272 mg EAG/ g (Razali et al., 2012), mientras que una muestra de la India de este extracto presenta un valor de



324.4 (Siddhuraju, 2007), cantidad similar a la obtenida en el presente estudio (323.45 ± 35.78 mg EAG/ g). La diferencia entre estos valores podría estar asociada al tipo de extracción que se llevó a cabo en cada trabajo. La extracción que aplicó Razali consistió en colocar la muestra en disolvente a temperatura ambiente por un lapso de 24 horas, en tanto que la muestra de semilla de la India se sometió a un tratamiento de extracción con Soxhlet durante 51 horas. En el presente estudio se empleó una extracción con disolventes asistida por ultrasonido. Se ha establecido que este método de separación es más eficiente que los convencionales, por ejemplo: consume menor energía y disminuye el tiempo de extracción (Morais & Bogel-Lukasik, 2013).

6.4. Evaluación de la actividad antioxidante con DPPH.

Los polifenoles, comúnmente se encuentran en frutas y semillas, se ha reportado que estos compuestos presentan actividad antioxidante debido a que estas moléculas estabilizan a los radicales libres. Esto ha causado que se relacione el contenido de polifenoles totales con la actividad antioxidante (Jayaprakasha & Patil, 2007). Debido a esto se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante en los extractos obtenidos usando el reactivo de DPPH (Figura 19). Esta prueba se calculó como ensayo de alto rendimiento para evaluar la capacidad de captación de radicales libres (RDSC por sus siglas en inglés).

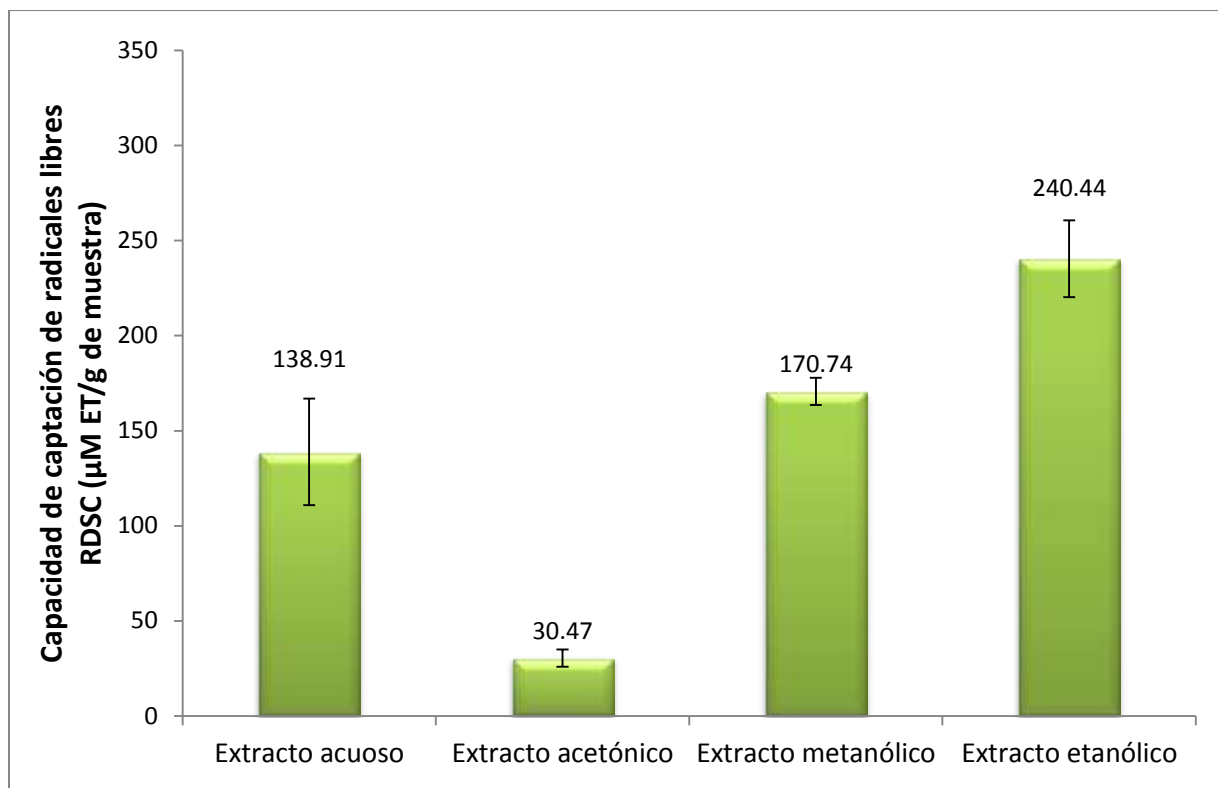


Figura 19. Actividad antioxidante con DPPH

El extracto etanólico fue el que presentó un valor más alto de RDSC ($240.44 \pm 20.21 \mu\text{M ET/g m}$) seguida por el extracto metanólico ($170.74 \pm 7.19 \mu\text{M ET/g m}$). Los extractos que presentaron los valores más bajos de actividad antioxidante fue el acuoso ($138.91 \pm 28.05 \mu\text{M ET/g m}$) y el acetónico ($30.47 \pm 4.50 \mu\text{M ET/g m}$). Ya con estos resultados se realizó un análisis estadístico de ANOVA para saber si estos valores son diferentes a nivel estadístico (Tabla 16, anexo). El valor obtenido de esta prueba de 72.38 que es superior al valor crítico que es de 4.07, debido a esto se puede asumir que la actividad de los extractos es diferente. Posteriormente se realizó un análisis usando la prueba de Tukey (Tabla 17, anexo) para saber que extractos podrían ser iguales estadísticamente. Al realizar el comparativo, se encontró que el extracto metanólico y el acuoso tienen una diferencia de 31.83 que es inferior al valor de DHS (46.55). Por lo tanto no hay diferencia en la actividad antioxidante entre ambos extractos a nivel estadístico.

El extracto acuoso a pesar de que no presentó la actividad antioxidante más alta, es comparable al extracto metanólico y superior al extracto obtenido con acetona. La ventaja de usar agua en la extracción comparada con los otros disolventes es que esta



sustancia no es toxica, tiene un bajo precio y los residuos generados son de fácil manejo (Baiano, 2014).

Tabla 13. Valores de actividad antioxidante y polifenoles totales en los cuatro extractos obtenidos de la semilla de tamarindo residual

Determinación	Extracto*			
	Acuoso	Acetónico	Metanólico	Etanólico
Polifenoles totales (mg de equivalente de ácido gálico (EAG) sobre gramo de muestra seca)	11.06 ± 1.21	119.84 ± 18.90	323.45 ± 35.78	399.48 ± 6.17
Actividad antioxidante (µM de equivalentes de trolox sobre gramo de muestra)	138.91 ± 28.0	30.47 ± 4.50	170.74 ± 7.19	240.44 ± 20.21

*Las condiciones de todos los extractos son 30 minutos de sonicación a pH= 3
 Todos los resultados fueron obtenidos del promedio de tres muestras analizadas ± la desviación estándar.

Como se esperaba el extracto etanólico que fue el que presentó un valor más alto de polifenoles totales también tiene el valor más alto de actividad antioxidante (Tabla 13) ya que se cree que estos dos parámetros están relacionados. Sin embargo, el contenido de polifenoles en los extractos acuoso y acetónico no están correlacionados con su actividad antioxidante. El extracto acetónico presentó un valor alto de polifenoles totales mientras que su actividad antioxidante es la más baja de los cuatro extractos. El extracto acuoso presentó un actividad antioxidante alta similar estadísticamente a la del extracto metanólico pero su contenido de polifenoles totales es el más bajo (Tabla 13). La relación particular que existe entre la actividad antioxidante y la cantidad de polifenoles totales es difícil de explicar usando solo análisis básicos de cuantificación. Esto se debe a que la actividad antioxidante no solo se debe a la cantidad de polifenoles, sino también a la interacción que ocurre entre ellos y otros componentes que puedan influir en este parámetro (Zaporozhets et al., 2004).



En la actualidad, no se ha reportado el valor de RDSC para la semilla de tamarindo. Lo que se puede encontrar en la literatura es el valor de EC50 que es de 25.24 $\mu\text{g/mL}$ en extracto etanólico (Vyas et al., 2009). Este valor es la concentración necesaria de muestra para degradar el 50 por ciento de reactivo de DPPH. El valor obtenido de EC50 para el extracto de etanol en la semilla de tamarindo residual es de 83.12 $\mu\text{g/mL}$. La diferencia entre estos valores podría estar asociado a los diferentes métodos de extracción empleados y al tipo de semilla. En los datos obtenidos por Vyas se empleó la técnica de Soxhlet y se ocupó como materia prima semilla proveniente de frutos frescos. En este trabajo se empleó la extracción asistida por ultrasonido y se ocupó semilla de tamarindo de origen residual que fueron colectadas del proceso de despulpado. Los demás extractos obtenidos a partir de metanol, acetona y agua de la semilla residual de tamarindo tienen un valor de EC50 de 148.46 $\mu\text{g/mL}$, 472.4 $\mu\text{g/mL}$ y 148.99 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Debido a esto, se decidió tomar el extracto etanólico para realizar las pruebas de estabilidad oxidativa inducida por antioxidantes, y compararlo con un inhibidor sintético de la oxidación como el BHA.

6.5. Estabilidad oxidativa inducida por antioxidantes.

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, la estabilidad oxidativa inducida por antioxidantes, es un método que permite medir el estado de oxidación de los alimentos. Esta estabilidad oxidativa se puede ir monitoreando en un lapso de tiempo evaluando los parámetros de calidad del aceite, tales como: índice de peróxidos, índice de yodo y el índice de acidez, entre otros (Bartee et al., 2007). En el presente estudio se realizó un seguimiento de la calidad del aceite de oliva extra virgen, estabilizado con el extracto etanólico, mediante la determinación de los parámetros de calidad arriba mencionados.

6.5.1. Índice de acidez

En la Figura 20 se presenta la variación del índice de acidez con respecto al tiempo para el aceite de oliva extra virgen tratado con el extracto etanólico (92 ppm) obtenido de la semilla de tamarindo residual y con BHA. En general se observa un ligero aumento en las tres muestras del día cero hasta el día 14, posteriormente, se aprecia

un incremento del índice de acidez de la muestra control con respecto a las otras. Es importante hacer notar que el efecto antioxidante del extracto de tamarindo es mayor al efecto que tiene el BHA

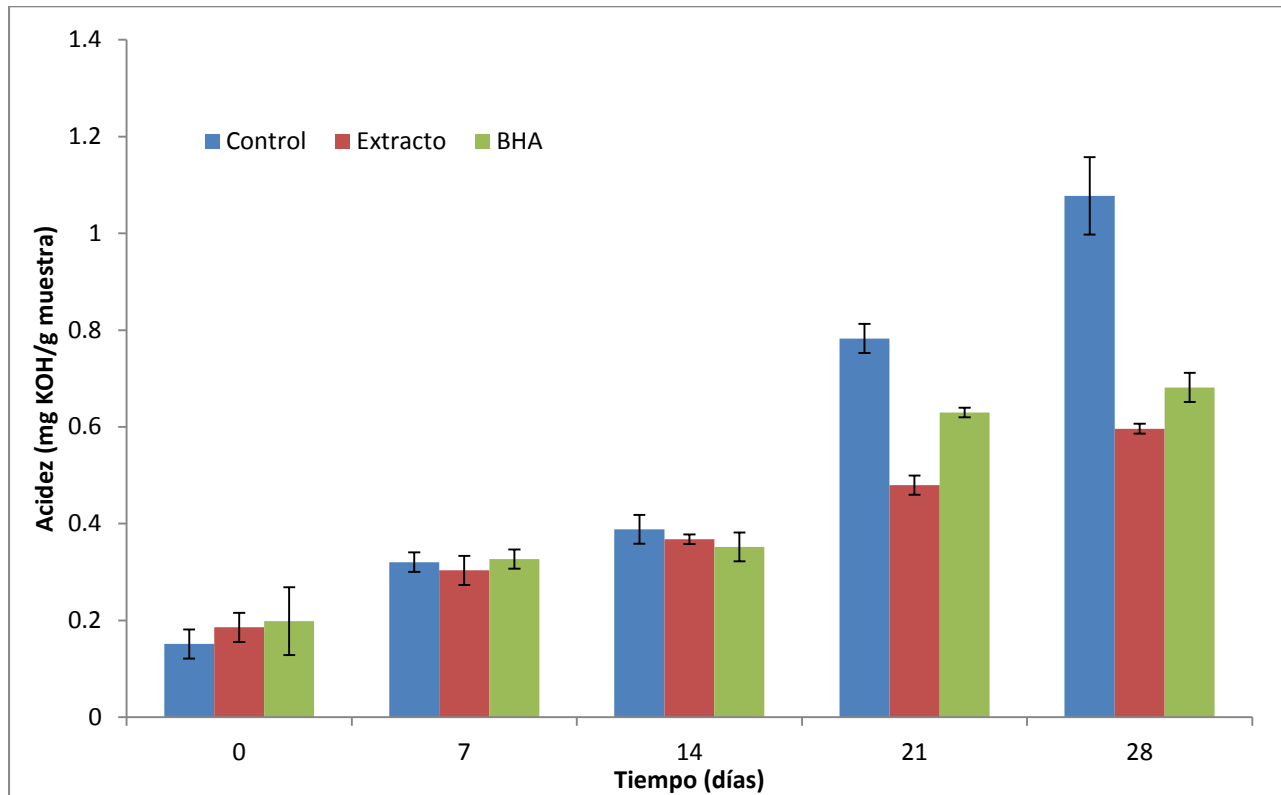


Figura 20. Evolución del índice de acidez del aceite de oliva extra virgen adicionado con E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a 40 °C.

También puede observarse que las muestras que contenían el extracto y el antioxidante sintético BHA se mantienen por debajo de los valores del control.

El resultado de esta prueba nos indica que para el día 28, el índice de acidez presenta diferencia significativa entre las tres muestras (Tabla 18, Anexo). Debido a esto, se realizó un análisis de Tukey para determinar entre que muestras hay diferencia. Esta prueba estadística indica que las muestras donde se adicionó extracto y el antioxidante sintético son diferentes comparadas con el control. Entre la muestra con extracto y el antioxidante no hay diferencia significativa (Tabla 19, Anexo)

6.5.2. Índice de yodo

Los resultados obtenidos del índice de yodo determinado en las muestras de aceite de oliva durante el período de ensayo de estabilidad oxidativa se muestran en la Figura 21. Es posible observar que las muestras de aceite analizadas no presentan variaciones significativas de índice de yodo con respecto al tiempo de estudio (ver Tabla 20, Anexo). Esto indica que no hay un cambio apreciable en el nivel de insaturación de los triacilglicerol del aceite, debido a su bajo grado de insaturación, su índice de yodo es de 90.32 cg de I₂/gramo. Entre más alto sea el índice de yodo más reactivo será el aceite a la oxidación (Moreno-Álvarez et al., 2007).

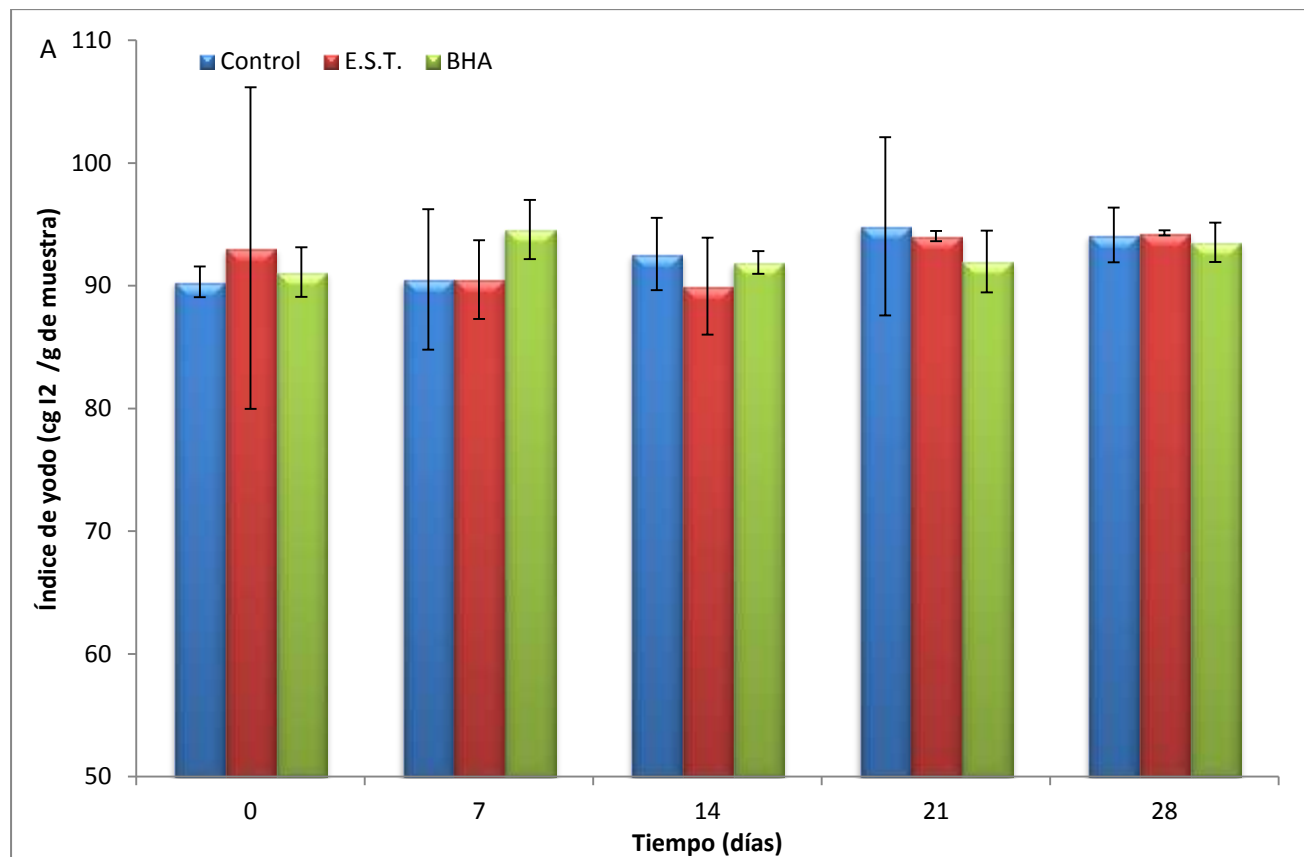


Figura 21. Evolución del índice de yodo del aceite de oliva extra virgen adicionado con E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a 40 °C.



6.5.3. Índice de peróxidos

Un ensayo importante de la estabilidad oxidativa inducida por antioxidantes, es el índice de peróxidos, este valor indica la cantidad de peróxidos que se generan durante un período de tiempo en un aceite vegetal o en una grasa. Estos peróxidos están relacionados con la rancidez del aceite, ya que se generan naturalmente en el proceso de rancidez y aumentan conforme la reacción de oxidación se desarrolla (Bartee et al., 2007). En la Figura 22 se puede observar a diferentes tiempos, el mayor aumento en la cantidad de peróxidos en la muestra control con respecto a las que contienen el extracto etanólico de tamarindo y el antioxidante BHA. Se puede observar que al comparar el control con las muestras con antioxidantes existe una diferencia de prácticamente la mitad del valor de este índice en los días 7 y 14. Este se debe a que las muestras adicionadas con antioxidantes (E.S.T. ó BHA) están inhibiendo la iniciación del proceso de autooxidación del aceite. Estas sustancias son eficaces reaccionando con el oxígeno singulete evitando de esta manera la formación de peróxidos y también reaccionando con los radicales formados en la descomposición de los peróxidos (Fennema, 2000). Posteriormente, se puede observar que en los monitoreos del día 21 y 28 la diferencia es pequeña entre el control y las muestras con aditivo. Este fenómeno se debe a que hay un efecto protector de los antioxidantes que comienza a disminuir debido a que solo actúan retardando el proceso de iniciación (Rajkumar et al., 2011).

Realizando un análisis estadístico ANOVA en las diferentes muestras en el día 28 (Tabla 21, Anexo), se observa que hay una diferencia significativa entre los tratamientos de estabilización empleados. La prueba de Tukey (Tabla 22, Anexo), estableció que hay diferencia significativa entre el control y las muestras del extracto etanólico de semilla de tamarindo y el BHA. Al comparar los resultados obtenidos entre estos dos últimos antioxidantes no se encontró diferencia significativa entre sus valores de índice de peróxidos. Esto puede indicar que el extracto de semilla de tamarindo tiene la misma eficiencia para retardar la oxidación lipídica que el BHA.

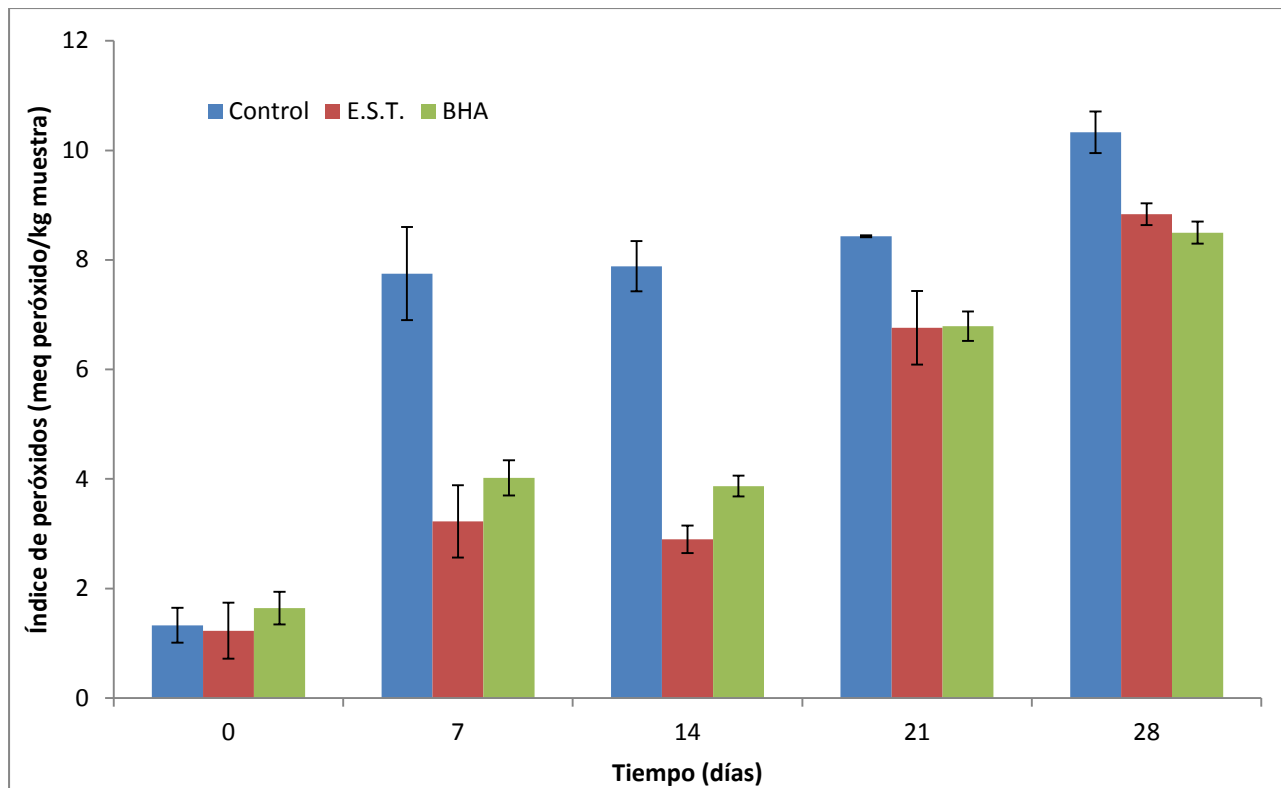


Figura 22. Evolución del índice de peroxidos del aceite de oliva extra virgen adicionado con E.S.T. (Extracto de semilla de tamarindo residual, 92 ppm) y BHA (Butilhidroxianisol, 92 ppm) a 40 °C.

Lo anterior puede sugerir que el extracto etanólico de semilla de tamarindo puede ser una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos, ya que presenta cualidades antioxidantes similares al BHA, proviene de una fuente natural y además ayuda al aprovechamiento de los residuos alimenticios generados en otros procesos industriales.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la actividad antioxidante de varios extractos de semilla de tamarindo residual (*Tamarindus indica*) de origen nacional.
- ✓ Los antioxidantes de la semilla de tamarindo se efectuó mediante extracción con disolventes (agua, metanol, etanol y acetona), asistida por ultrasonido.
- ✓ En la prueba de polifenoles totales se encontró que el extracto con mayor contenido de polifenoles totales fue el etanólico ya que presentó un promedio de 399.48 mg EAG/ g de muestra seca. Los otros extractos presentaron valores inferiores.
- ✓ El extracto etanólico de semilla de tamarindo presentó el valor más alto de actividad antioxidante (reportado como RDSC, 240.44 $\mu\text{M ET/g m.}$).
- ✓ Las evaluaciones de estabilidad oxidativa del extracto etanólico de semilla de tamarindo (a un tiempo de 28 días y temperatura de 40°C), mostraron la misma estabilidad que el BHA en muestras de aceite de oliva extravirgen.
- ✓ El extracto etanólico obtenido de las semillas de tamarindo residual puede ser una alternativa viable como antioxidante en alimentos, fármacos y cosméticos.



8. BIBLIOGRAFÍA

Adam, F., Nikitchenko, S. & Chemat, F., 2011. *Extraction assistée par ultra-sons*. París: Dunod.

Adewuyi, A. y otros, 2011. Proximate analysis of the seeds and chemical composition of the oils of *Albizia saman*, *Millettia griffoniana* and *Tamarindus indica* from Nigeria. *Annals food science and technology*, pp. 123-129.

Aengwanich, W., Suttajit, M., Srikhun, T. & Boonsorn, T., 2009. Antibiotic effect of polyphenolic compound extracted from tamarind (*Tamarindus indica*) seed coat on productive performance of broilers. *International journal of poultry science*, 8(8), pp. 749-751.

Araújo, C. y otros, 2005. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tree (*Tamarindus indica*). *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 4381-4387.

Aurand, L. W., Woods, A. E. & Wells, M. R., 1987. *Food composition and analysis*. New York: An AVI book.

Baiano, A., 2014. Recovery of biomolecules from food waste- a review. *Molecules*, pp. 14821-14842.

Baiano, A. y otros, 2014. Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid waste. *Journal of food engineering*, pp. 135-145.

Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S., 2005. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry*, pp. 191-203.

Bartee, S. D., Kim, H. J. & Min, D. B., 2007. Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of American oil chemical society*, pp. 363-368.

Bavaresco, L., 2003. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under experimental and clinical research*, pp. 181-187.

Benítez, D., 2006. Vitaminas y oxidoreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 25(2).



- Bhandoriya, S. y otros, 2011. In vitro anthelmintic and antimicrobial potential of flavonoid rich fraction from Tamarindus indica seed coat. *Pharmacologyonline*, pp. 412-420.
- Bouaziz, M. y otros, 2008. Production of antioxidants from olive processing by-products. *The Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, pp. 3231-3236.
- Braddock, R., 1999. *Handbook of citrus by-products and processing technology*. Weinheim: Wiley-Interscience.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-food science and technology*, pp. 25-30.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition reviews*, p. 333.
- British Standard Association , 2010. *PAS 110:2010, Specification for whole digestate, separated liquor and separated fibre derived from anaerobic digestion of source-segregated iodegradable materials*. s.l.:s.n.
- Brunner, G., 2005. Supercritical fluids:technology and application to food processing. *Journal Food Engineering*, pp. 21-33.
- Camacho, B. y otros, 2011. Efecto de extractos de oregano (origanum vulgare) ante la oxidación en aceite vegetal comestible. *Revista de la facultad de agronomía* , pp. 628-635.
- Carranco, M., Calvo, M. & Pérez-Gil, F., 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 61(3), pp. 233-241.
- Castells, X. E., 2012. *Nuevas tecnologías para el tratamiento y conversión energética de residuos..* Madrid: Díaz de Santos.
- Chantaro, P., Devahastin, S. & Chiewchan, N., 2008. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-food science and technology*, pp. 1987-1994.
- Chao, J. C., Yuen, M. D., Chen, P. Y. & Chien, S. W., 2002. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hem dialysis patients. *The journal of nutritional biochemistry*, pp. 653-663.
- Chedea, V. S., Kefalas, P. & Socaciu, C., 2010. Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel waste. *Journal of food biochemistry* , pp. 101-110.



Cheng, Z., Moore, J. & Yu, L., 2006. High-Throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 7429-7436.

Chernat, F., Huma, Z. & Khan, M. K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason sonochem*, pp. 813-835.

CODEX, 1981. Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. *CODEX STAN*, Issue 19, pp. 1-5.

Colima, G. d., 2015. *Secretaría de desarrollo rural de Colima*. [En línea] Available at: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/2610/Tamarindo.pdf>

CONABIO, 2015. *CONABIO*. [En línea] Available at: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/22-legum52.pdf

D'Archivio, M. y otros, 2007. Polyphenols dietary sources and bioavailability. *Annali dell'istituto superiore di Sanita*, 4(43), pp. 348-361.

De Caluwé, E. H. K. & Van Damme, P., 2010. *Tamarindus indica* L.- A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika focus*, 23(1), pp. 53-83.

Defra, 2011. *Department for environment, food and rural affairs*. [En línea] Available at: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69401/pb13540-waste-pollcy-review110614.pdf

Dhillon, G. S., Kaur, S. & Kaur Brar, S., 2013. Perspective of apple processing waste as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, pp. 789-805.

Di Mauro, A. y otros, 1999. Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of extracts on styrene-divinybenzene resin. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 4391-4397.

Djilas, S. & Cétkovic, G., 2002. Antioxidants in food. *Chem. Ind.*, 3(56), pp. 105-112.

EPD, 2015. *Environmental resources management*. [En línea] Available at: <https://www.wastereduction.gov.hk/chi/materials/info/msw2011tc.pdf>



FAO, 1981. Food loss prevention in perishable crops. *FAO Agricultural Service Bulletin*, Issue 43.

FAO, 2012. Towards the future we want: End hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems. *Food and agriculture organization of the United Nations Rome*.

FDA, 2015. *U.S. food and drugs administration*. [En línea] Available at: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=459&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=advanced&search=extract%C2%A4extract%C2%A4%C2%A4

Fennema, O., 2000. *Química de los alimentos*. s.l.:Acribia.

Galanakis, C. M., 2012. Recovery og high added-value components from food waste: convetional, emerging technologies and commercialized applications. *Food Science and Technology*, pp. 68-87.

Galanakis, C. M., Tornberg , E. & Gekas, V., 2010. A study of the recovery of the dietary fibres from olive mill wastewater and the gelling ability of the soluble fibre fraction. *LWT-Food Science and Technology*, pp. 1009-1017.

Ganzier, K., Saigo, A. & Valkó, K., 1986. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of chromatography A*, pp. 299-306.

García, M., Quintero, R. & López-Munguía, A., 2004. *Bioteconología alimentaria*. Distrito Federal : Limusa.

Gauthier, S. F., Paquin, P., Pouliot , Y. & Turgeon, S., 1993. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *Journal of dairy science*, pp. 321-328.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. & Jo, I. H., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal oof agricultural and food chemistry*, pp. 4988-4994.

Ghiselli, A. y otros, 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidan capability. *Free radical biology and medicine*, pp. 29-36.

Ghosh, R. & Kadam, P., 2010. In-vitro antioxidant activity of “Kumbhajatu”-A pollyphenol formulation. *International journal of pharmaceutical research and development*, 1(10).



- Gildberg , A., 2004. Enzymes and bioactive peptides from fish waste related to fish silage, fish feed and fish sauce production. *Journal of aquatic food product technology*, pp. 3-11.
- Gordon, H. & Bauernfeind, J., 1982. Carotenoids as food colorants. *Critical reviews in food science and nutrition*, Issue 18, pp. 59-97.
- Hollman, P. & Katan, M., 1999. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and chemical toxicology*, pp. 937-942.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry* , pp. 1841-1856.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry* , pp. 1821-1835.
- Jaiganesh, V., Nagarajan, P. & Geetha, A., 2014. Solid state bio methane production from vegetable waste current state and perception. *Renewable and sustainable energy reviews*, Issue 40, pp. 432-437.
- Jayaprakasha, G. & Patil, B., 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extraction form citron and blood orange. *Food chemistry*, Issue 101, pp. 410-418.
- Kabir, F. y otros, 2015. Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable waste and by-products. *Food chemistry*, Issue 167, pp. 358-362.
- Kalogeropoulos, N., Pyriovhou, V., Peristeraki, A. & Karathanos, V., 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-food science and technology*, pp. 213-216.
- Kantor, L. S., Lipton , K., Manchester, A. & Oliveira, V., 1997. Estimating and addressing America's food losses. *Food Revist International* , pp. 2-12.
- Katami, T., Yasuhara, A. & Shibamoto, T., 2004. Formation of dioxins from incineration of food found in domestic garbage. *Environ Sci Technol*, pp. 1062-1065.
- Kerton, F., 2009. *Alternative solvents for green chemistry*. Londres: RSC.
- Ki Lin, C. S. y otros, 2014. Current and future trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels a global perspective.. *Biofuels bioproducts and biorefining*.



- Ki Lin, C. S. y otros, 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemical, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy and environmental science*, Volumen 6, pp. 426-464.
- Kim, W. C., Lee, D. Y., Lee, C. H. & Kim, C. W., 2004. Optimization of narirutin extraction during washing step of the pectin production from citrus peels. *Journal of food engineering*, pp. 191-197.
- Knasmüller, S. y otros, 2008. Use of conventional and omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *British journal of nutrition* , pp. 3-52.
- Kosseva, M., 2011. Management and processing of food waste, In: Moo-Young. *Environmental biotechnology and safety* .
- Kroyer, T., 1995. Impact of food processing on the environment-an overview. *Technol*, pp. 547-552.
- Kuo, S., 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer letters*, pp. 41-48.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. & Mancini-Filho, J., 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e tecnologia de alimentos*, pp. 726-732.
- Lapornik, B., Prosek, M. & Golc, W., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering* , pp. 214-222.
- Lozano -Sánchez, J. y otros, 2011. Waste generated during the storage of extra virgen olive oil as a natural source of phenolic compounds. *Journal of agricultural food chemistry*, pp. 11491-11500.
- Lumia, G., 2011. *Extraction par fluides supercritiques. Eco-extraction du végétal..* París: s.n.
- Luthria, D., 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food chemistry*, Issue 1047, pp. 745-752.
- Lu, Y. & Foo, L. Y., 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food chemistry* , pp. 81-85.



Lv, J. y otros, 2012. Phenolic composition and nutreaceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint. *Food chemistry*, Issue 132, pp. 1442-1450.

Mazza, G., 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. Critical reviews. *Food science and nutrition* , pp. 341-371.

Melikoglu , M., Lin, C. & Webb, C., 2013. Analysing global food waste problem: pinpointing the facts and estimating the energy contentent. *Cent Eur J Eng* , pp. 157-164.

Merken, H. & Beecher, G., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chmatography: a review. *Journal of agricultural and food chemistry* , Issue 48, pp. 577-599.

Mirabella, N., Castellani, V. & Sala, S., 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of cleaner production*, pp. 28-41.

Morais , A. & Bogel-Lukasik, R., 2013. Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustainable chemical processes*, pp. 1-18.

Moreno-Álvarez, M. J. y otros, 2007. Estabilidad del aceite de soja acondicionados con extractos orgánicos de grapefruit (citrus paradisis Macf). *Revista de la facultad de agronomía* , pp. 709-724.

Mouly, P., Arzouyan, C., Gaydou, E. & Estienne, J., 1994. Differentiation od citrus juices by factorial discrimant analysis using liquid chomatography of flavonone glycosidesl. *Journal of agricultural and food chemistry* , pp. 70-79.

Moure, A. y otros, 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, Issue 72, pp. 145-171.

Naczk, M. & Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, Issue 41, pp. 1523-1542.

Nielsen, S., 1998. *Food analysis second edition*. Maryland: An aspen publication .

Oreopoulou , V. & Tzia , C., 2007. *Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants*. New York: Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry.

Oroian, M. & Escriche, I., 2015. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food research international*.



Ortuño, M., 2006. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Primera ed. s.l.:Aiyana ediciones.

Pagan, J., Ibarz, A., Llorca, M. & Coll, L., 1999. Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperature. *Innovative food science and emerging technologies*, pp. 1038-1042.

Parfitt, J., Barthel, M. & Macnaughton, S., 2010. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical transactions of the royal society*, pp. 3065-3081.

Pearson, D., 1999. *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*. Zaragoza: Acribia.

Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G. & Chemat, F., 2013. A comparison of essential oils obtained from lavadin via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation.. *Journal of Chromatography*, pp. 41-47.

Peschel, W. y otros, 2006. An industrial in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit waste. *Food chemistry*, Volumen 97, pp. 137-150|.

Pfaltzgraaf, L. A. y otros, 2013. Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, pp. 307-314.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. H., 2001. *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas..* Zaragoza: Acribia.

Prazeres, A. R., Carvalho, F. & Rivas, J., 2012. Cheese whey management: a review. *Journal of environmental management*, pp. 48-68.

Prior, R., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 4290-4302.

Rajkumar, G. & Naragarajan, A., 2011. Antioxidant activity of lettuce tree (*Pisonia morindifolia*) and tamarind tree (*Tamarindus indica* L) and their efficacy in peanut oil stability. *Food science and biotechnology*, pp. 1669-1677.

Razali, N. y otros, 2012. Effects of various solvents on the extraction of antioxidant phenolics from the leaves, seeds, veins and skins of *Tamarindus indica* L.. *Food chemistry*, pp. 441-448.

Riggi, A. & Avola, G., 2008. Fresch tomato packinghouses waste as high added-value biosource. *Resource conservation and recycling*, pp. 96-106.



Robards, K. y otros, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, Issue 66, pp. 401-436.

Rombaut, N., Tixier, A., Bily, A. & Chemat, F., 2014. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, bioproducts & biorefining*, pp. 530-544.

Rosentrater, K., 2004. *Strategic methodology for advancing food manufacturing waste management paradigms*. Bellingham: Environmentally conscious manufacturing.

Rozzi, N. L. & Singh, R. K., 2002. Supercritical fluids and the food industry. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, pp. 33-44.

SAGARPA, 2015. SIAP. [En línea] Available at: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Saha, P. y otros, 2011. Anticancer activity of methanol extract of Cucurbita maxima against Ehrlich ascites carcinoma. *International journal of research in pharmaceutical sciences*, 2(1), pp. 52-59.

Sakakibara, H. y otros, 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetable, fruits and teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, Issue 51, pp. 571-581.

Sang-Hee, J. y otros, 2005. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, pp. 49-62.

Saval, S., 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), pp. 14-46.

Schieber, A., Stintzing, F. & Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in food science & technology*, pp. 401-413.

SEDEMA, 2015. SEDEMA. [En línea] Available at: <http://www.sedema.df.gob.mx/sedema/images/archivos/temas-ambientales/programas-generales/residuos-solidos/inventario-residuos-solidos-2013/capitulo-1.pdf>

Semarnat, 2003. *Ley general de prevención y gestión integral de los residuos*. Ciudad de México: s.n.

Service, B., 2010. *Preparatory study on food waste across E.U. 27 for the commission*, s.l.: s.n.



Siddhuraju, P., 2007. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT-food science and technology*, pp. 982-990.

Silva, R. & Lucatero, S. E., 2006. *Diagnostico de la cadena del sistema producto tamarindo (Tamarindus indica L), en el estado de Colima*, s.l.: Universidad de Colima.

Sindhi, V. y otros, 2013. Potencial applications of antioxidants. *Journal of pharmacy research* , pp. 828-835.

Singh, S., Gupta, A. K. & Verma, A., 2013. Review on-natural compounds used for antioxidant activity. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical*, pp. 936-949.

Singleton, V. & Rossi, J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture*, pp. 144-158.

Soto, A. M. y otros, 1995. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental health perspectives*, pp. 113-122.

Souquet, J., Cheynier, V., Brossaud, F. & Moutounet, M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grapes skins. *Phytochemistry*, pp. 509-512.

Sudjaroen, Y. y otros, 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food and chemical toxicology*, Issue 43, pp. 1673-1682.

Tamil, A. y otros, 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of leaves extract (*Tamarindus indica*) and its phytochemical characterisation. *Journal of pharmacy research* , pp. 4435-4438.

Teixeira, A. y otros, 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of molecular sciences*, pp. 15638-15678.

Tesco, 2015. *Tesco and society: using our scale for good*. [En línea] Available at: http://www.tescopl.com/files/pdf/reports/tesco_and_society_2013-14_halfyear_summary.pdf

Tiwari, A., 2001. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multiple approach of natural antioxidant therapy. *Current science*, pp. 1179-1187.



Toldrá, F., Aristoy, M. & Reig, M., 2012. Innovation in value-addition of edible meat by-products. *Meat science*, Issue 92, pp. 290-296.

Torres, J. y otros, 2002. Valorization of grape (*vitus vinifera*) by-products. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of agricultural chemistry*, pp. 7548-7555.

Torres, M. y otros, 2002. Aspectos farmacológicos relevantes de las vitaminas antioxidantes (E, A y C). *Archivos venezolanos de farmacología terapéutica*, pp. 22-27.

Tsao, R. & Yang, R., 2003. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, pp. 29-40.

U.E., 2003. *Regulation 1831/2003 of the 22nd, September 2003, on additives for use in animal nutrition*, s.l.: s.n.

Valdez, V. I., Acevedo, B. J. & Cuitláhuac, H. S., 2010. Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in México.. *Renewable and sustainable energy reviews*, pp. 2147-2153.

Viveros, J. C. y otros, 2012. Sistema de manejo y comercialización de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) en tres municipios de Veracruz. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, pp. 1217-1230.

Vyas, N., Gavatia, N., Gupta, B. & Tailing, M., 2009. Antioxidant potential of tamarindus indica seed coat. *Journal of pharmacy research*, 2(11), pp. 1705-1706.

World Economic Forum, 2010. *Driving sustainable consumption, value chain waste*. [En línea] Available at: <http://www.members.wef>

Yamashita, N. y otros, 1998. tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper (II) ions. *Chemical research in toxicology*, pp. 855-862.

Yanagida, A. y otros, 2000. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 5666-5671.

Zaporozhets, O., Krushynska, O., Lipkovska, N. & Barvinchenk, V., 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of agricultural and food chemistry*, Issue 52, pp. 21-25.



Zaror, C., 1992. Controlling the environmental impact of the food industry: an integral approach. *Food control*, pp. 190-199.

Zbigniew, J. & Darlus, M., 2011. *Ultrasonically assisted diffusion processes. Enhancing extraction processes in the food industry*. Cambridge: CRC press.

Zhang, Q. y otros, 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of applied phycology*, pp. 445-450.

Zuorro, A., Fidaleo, M. & Lavecchia, R., 2011. Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato proxessing waste. *Enzyme microbial and technology*, pp. 567-573.

9. ANEXO

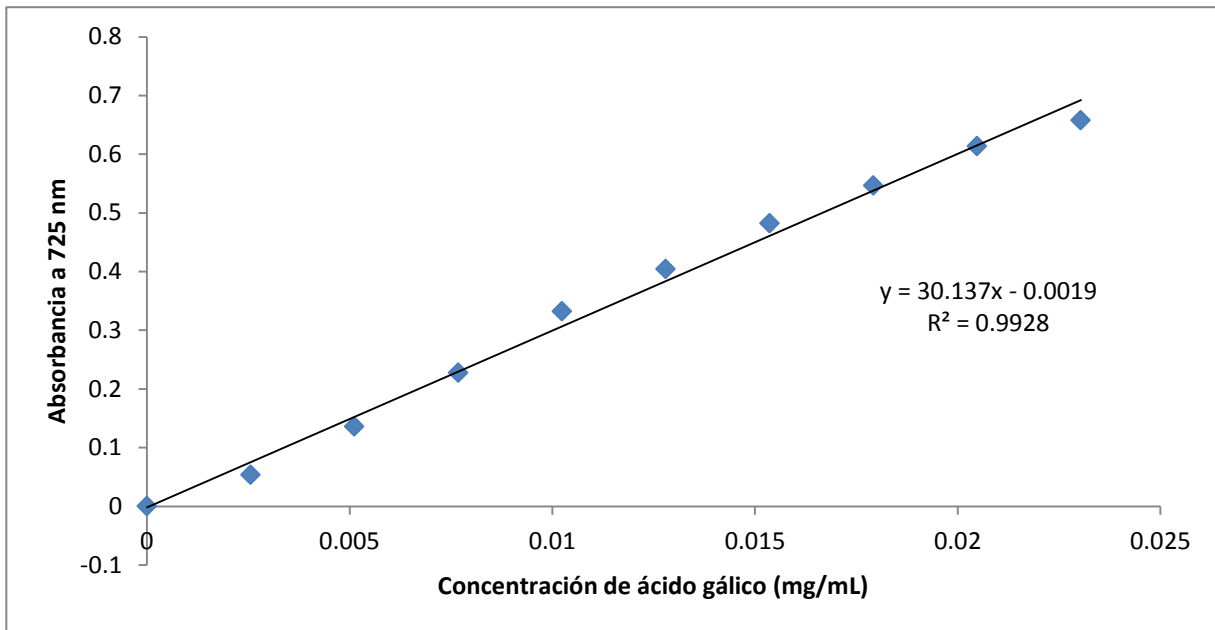


Figura 23. Curva patrón de ácido gálico en acetona al 80% para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

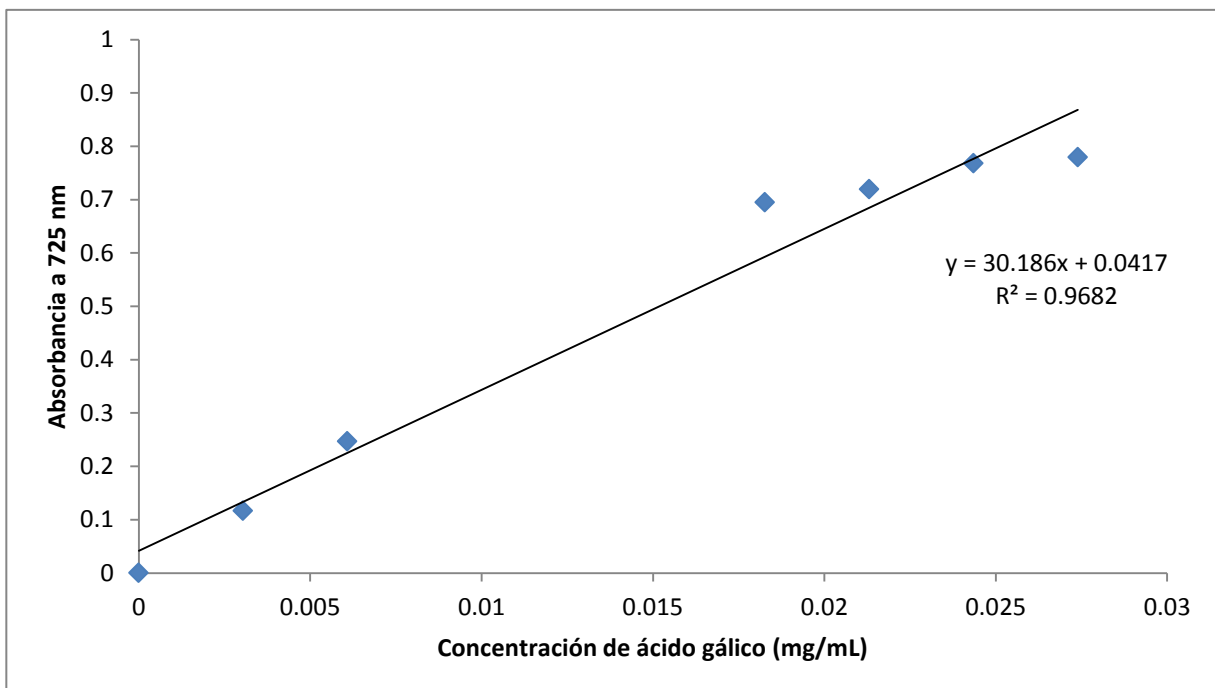


Figura 24. Curva patrón de ácido gálico en agua para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

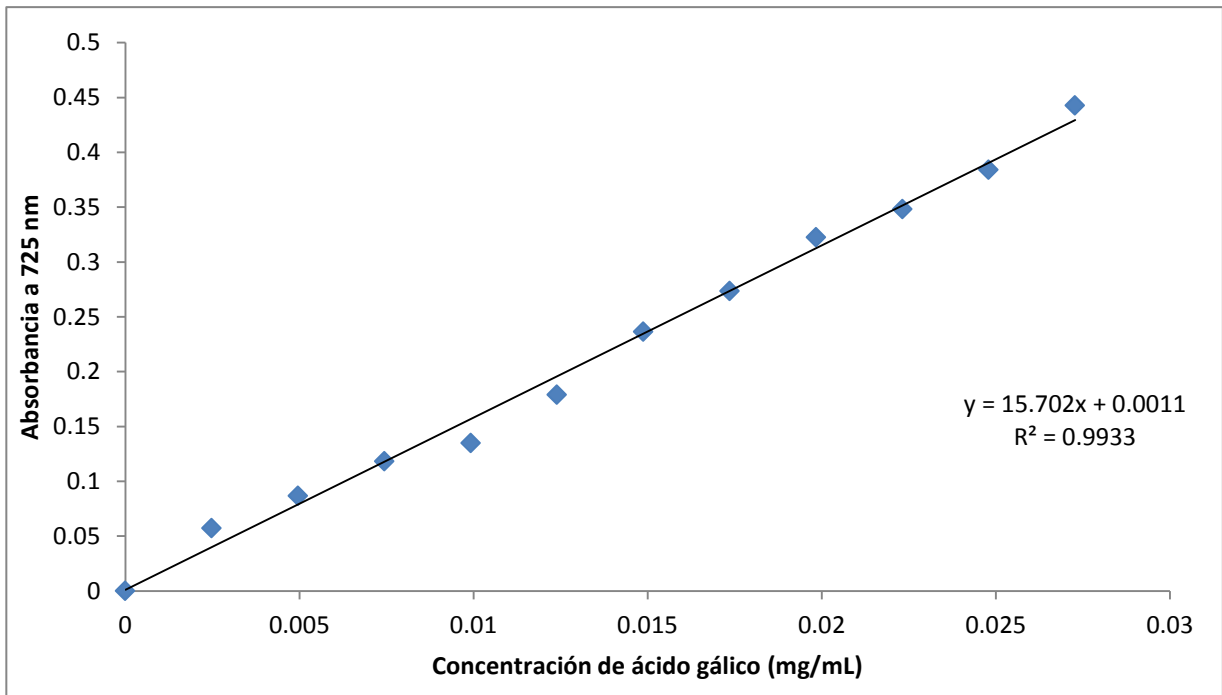


Figura 25. Curva patrón de ácido gálico en etanol al 80% para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

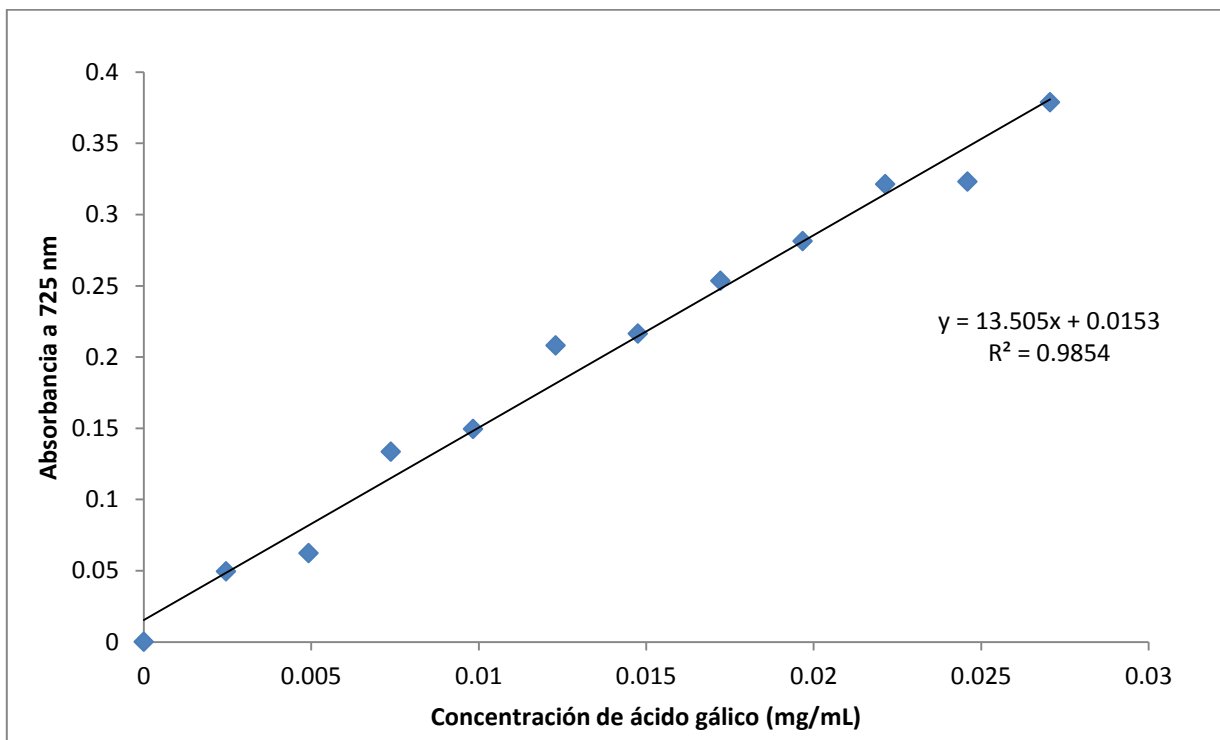


Figura 26. Curva patrón de ácido gálico en metanol al 80% para le determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Tabla 14. Cantidad de muestra usada para obtener el extracto

Muestra	Cant. Muestra en Etanol (g)	Cant. Muestra en metano (g)	Cant. Muestra en Acetona (g)	Cant. Muestra en Agua (g)
1	0.8192	0.812	0.8192	0.8052
2	0.8518	0.8063	0.8518	0.7981
3	0.8625	0.8093	0.8625	0.8176

Tabla 15. Absorbancia obtenida para cada extracto para la prueba de polifenoles totales

Muestra	Absorbancia del extracto etanólico	Absorbancia del extracto metanólico	Absorbancia del extracto acetónico	Absorbancia del extracto acuoso
1	0.223	0.210	0.152	0.629
2	0.237	0.228	0.145	0.560
3	0.241	0.188	0.199	0.708

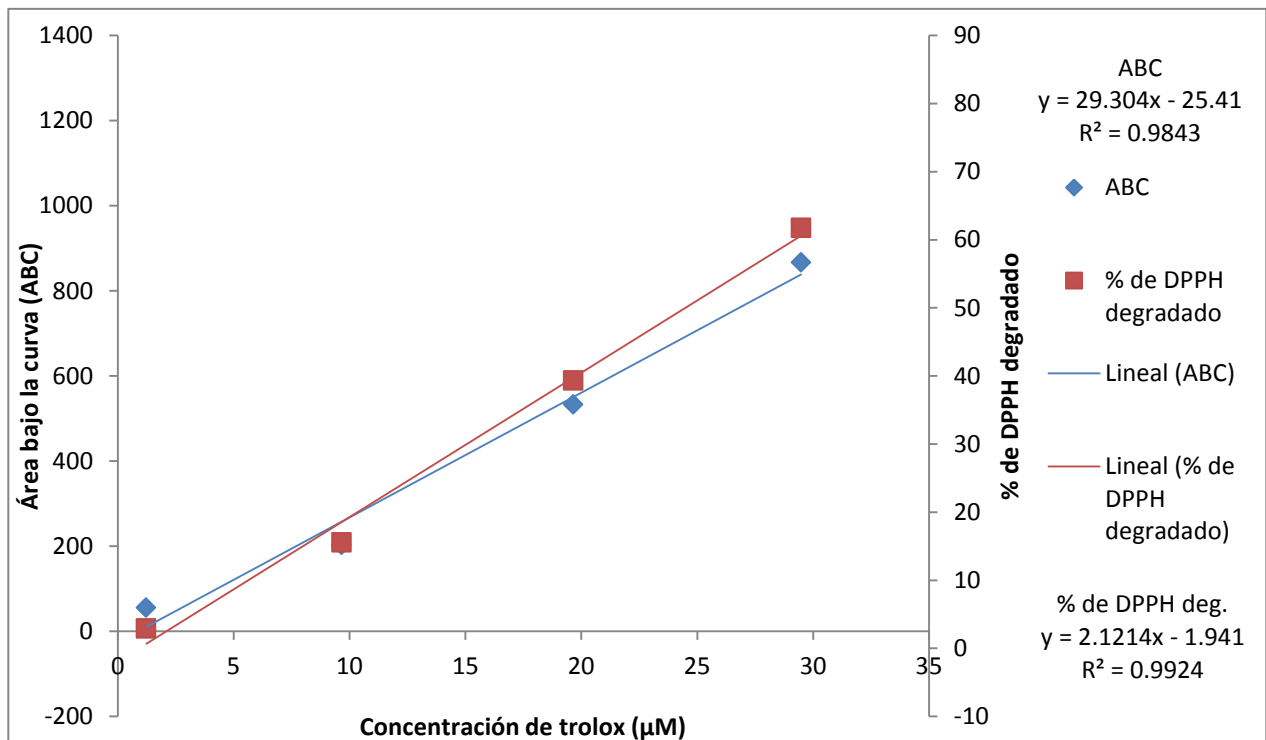


Figura 27. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en metanol

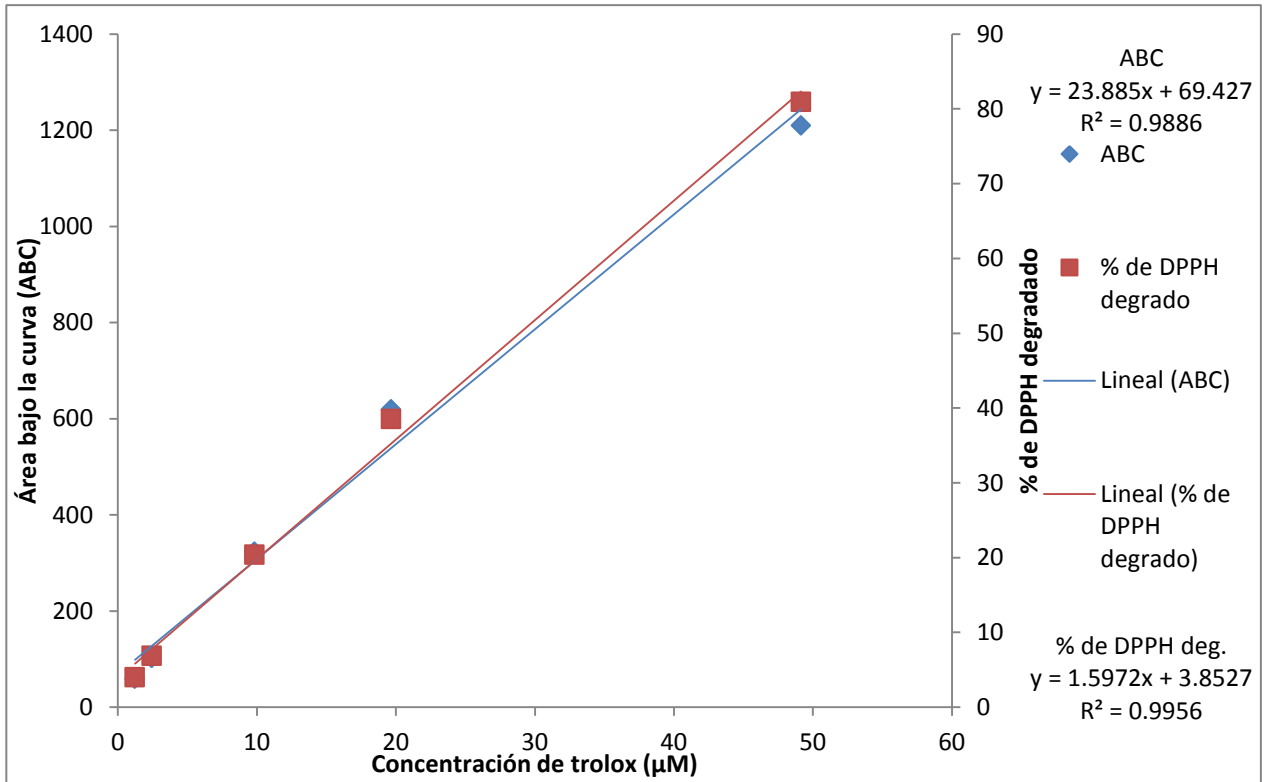


Figura 28. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en agua

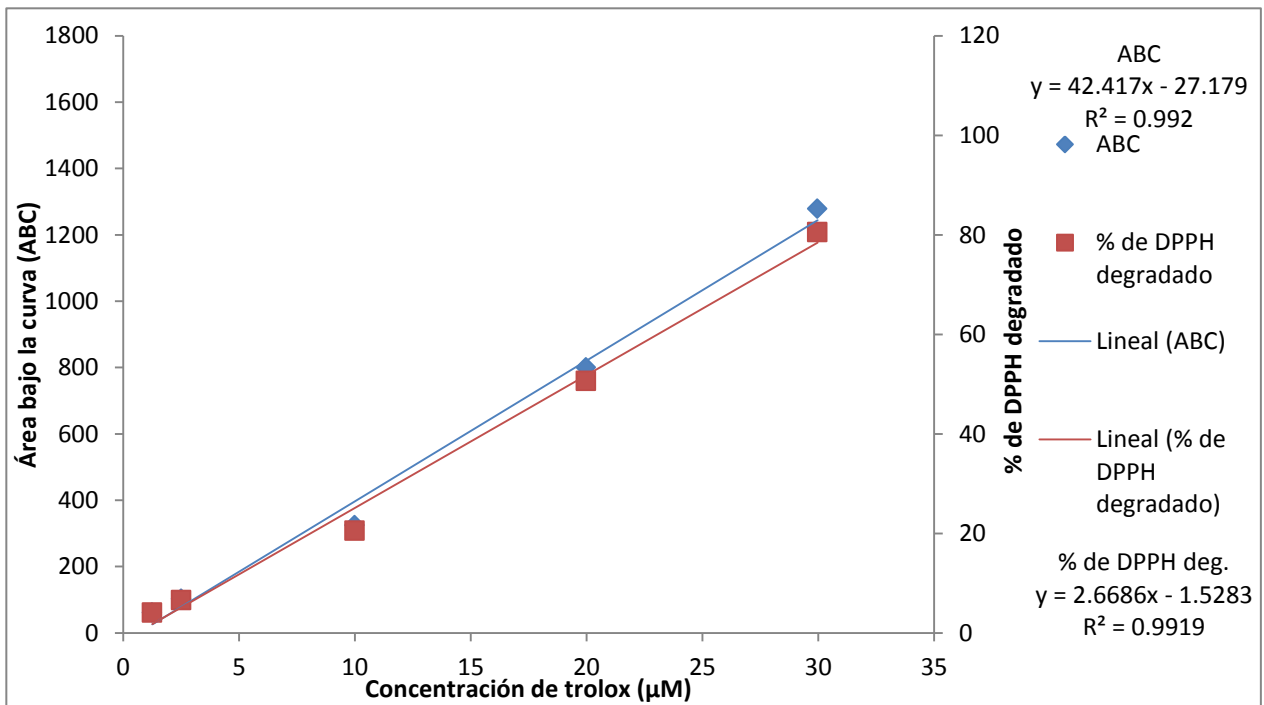


Figura 29. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en acetona

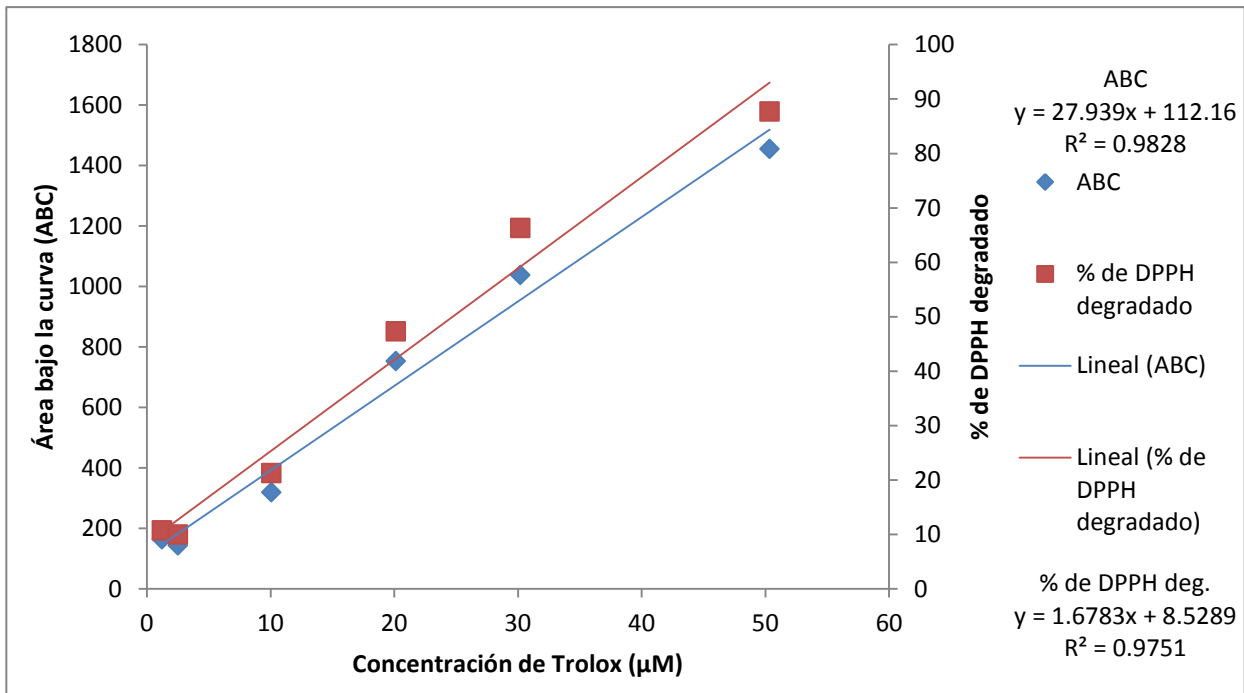


Figura 30. Prueba de actividad antioxidante usando trolox en etanol

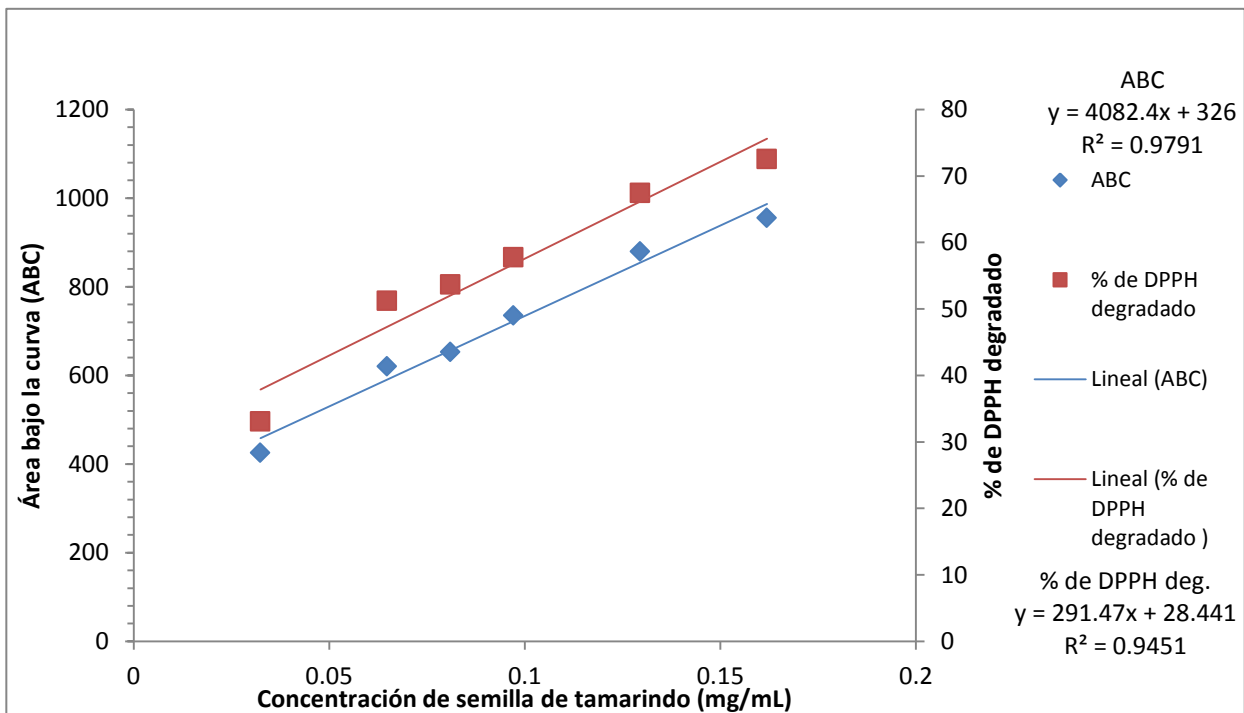


Figura 31. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en etanol

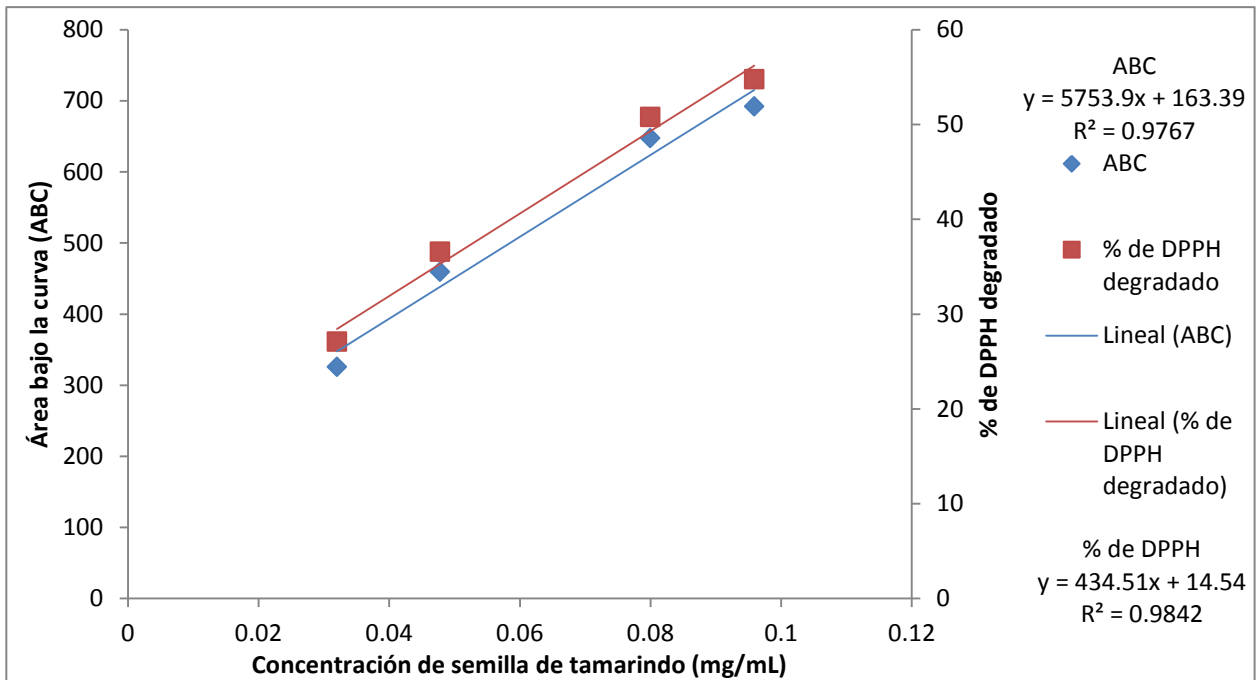


Figura 32. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en etanol

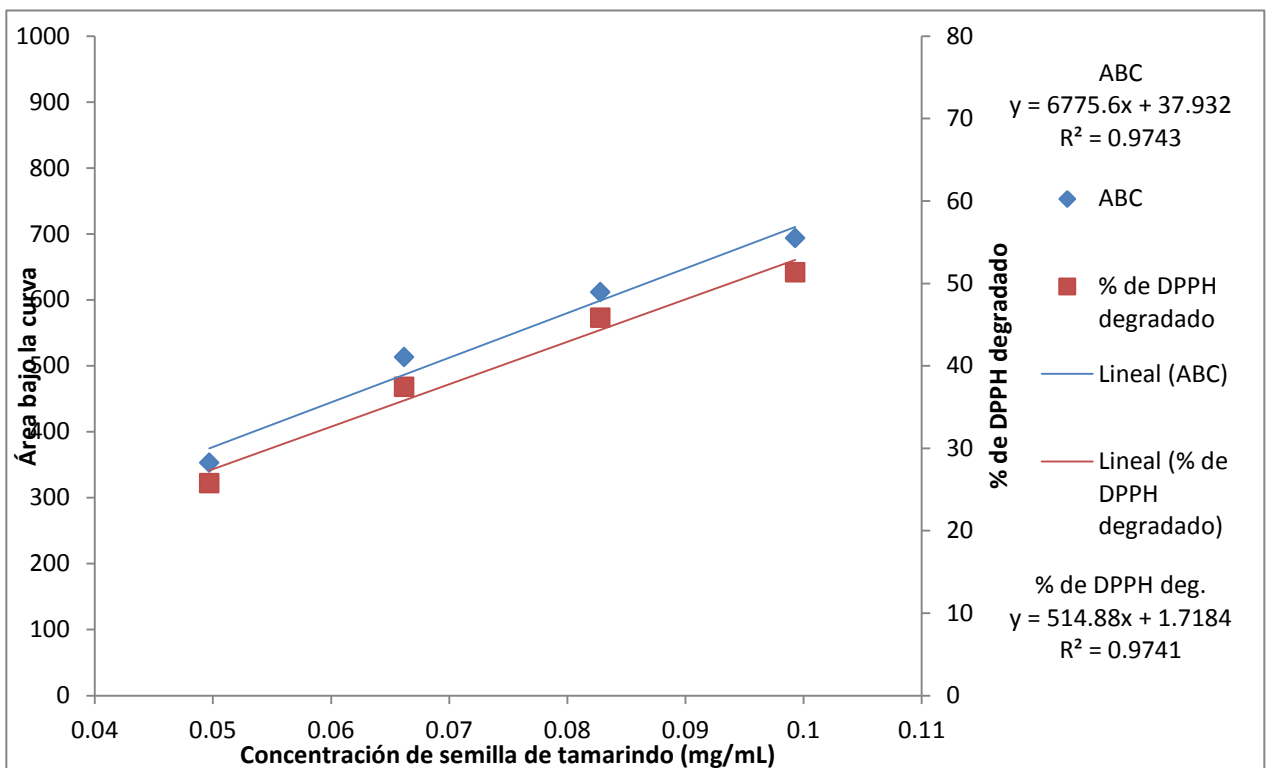


Figura 33. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en etanol

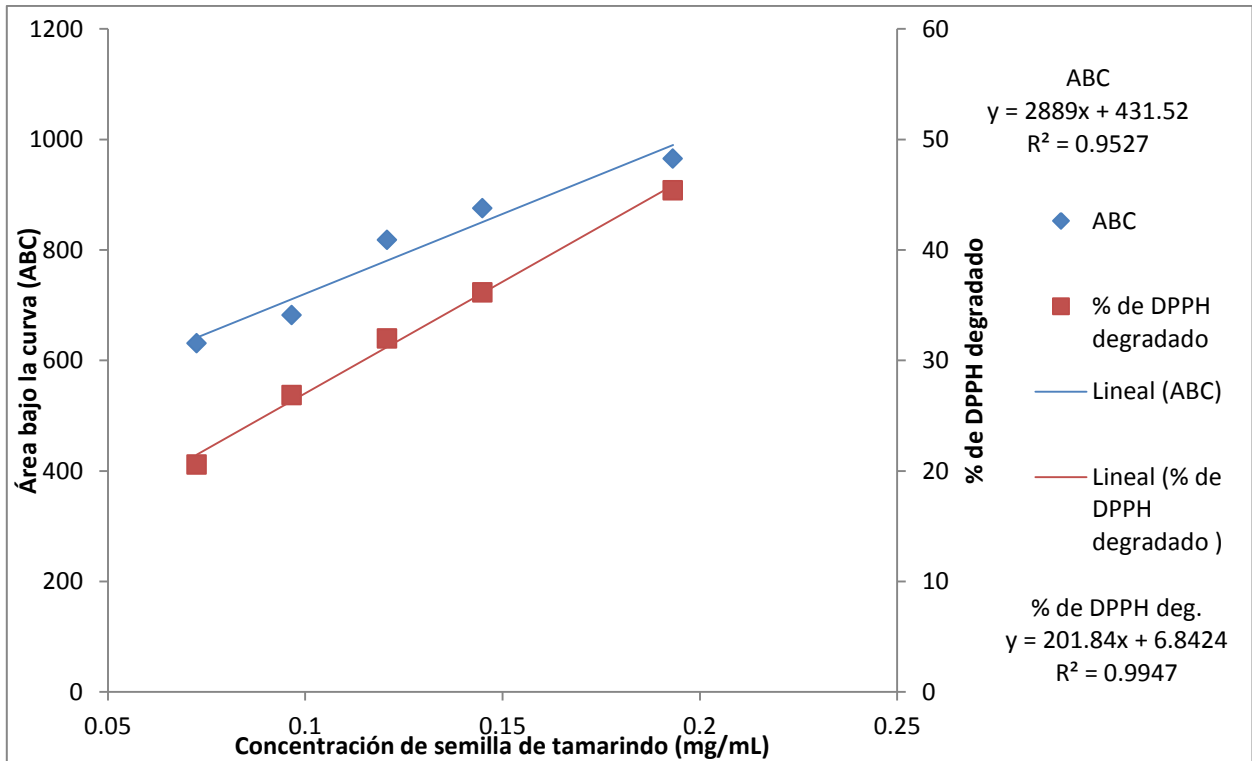


Figura 34. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en metanol

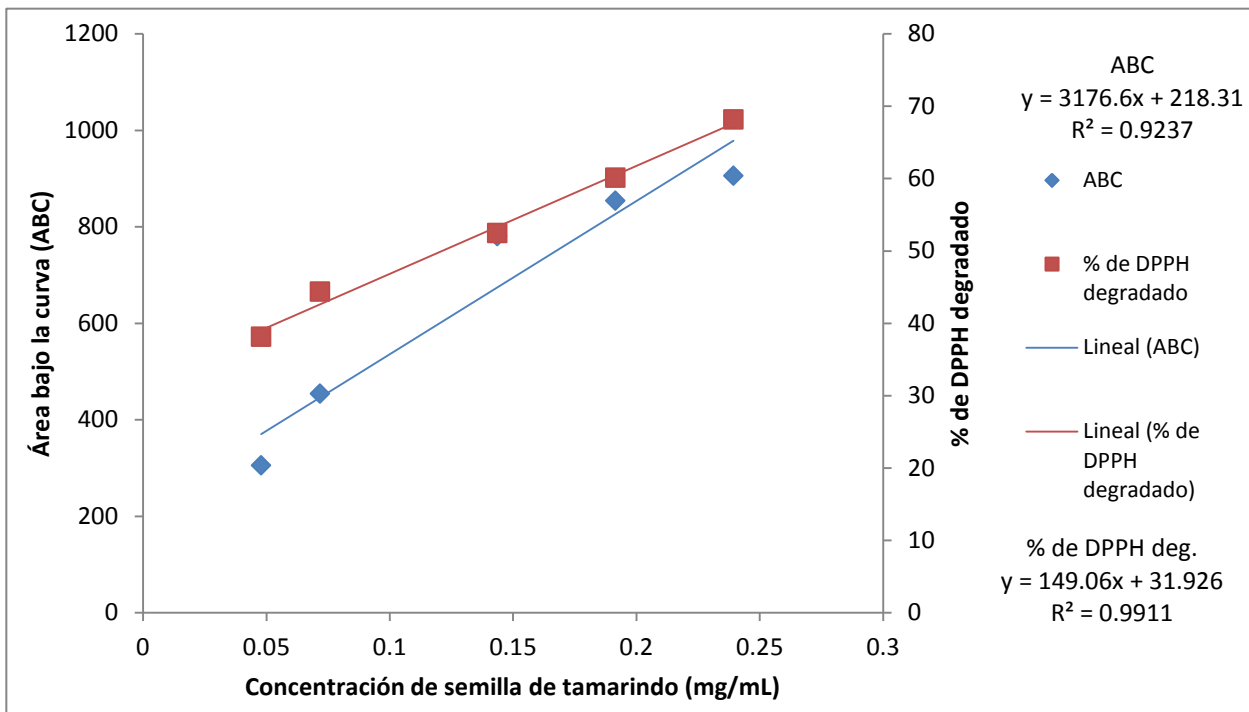


Figura 35. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en metanol

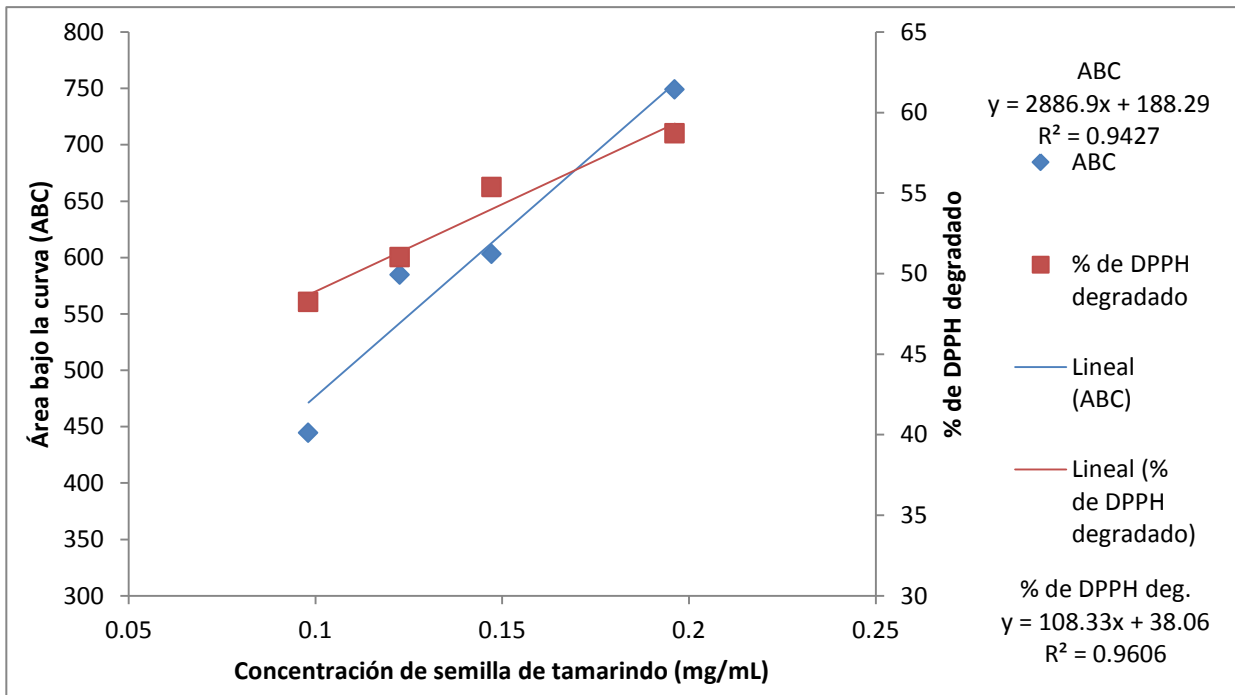


Figura 36. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en metanol

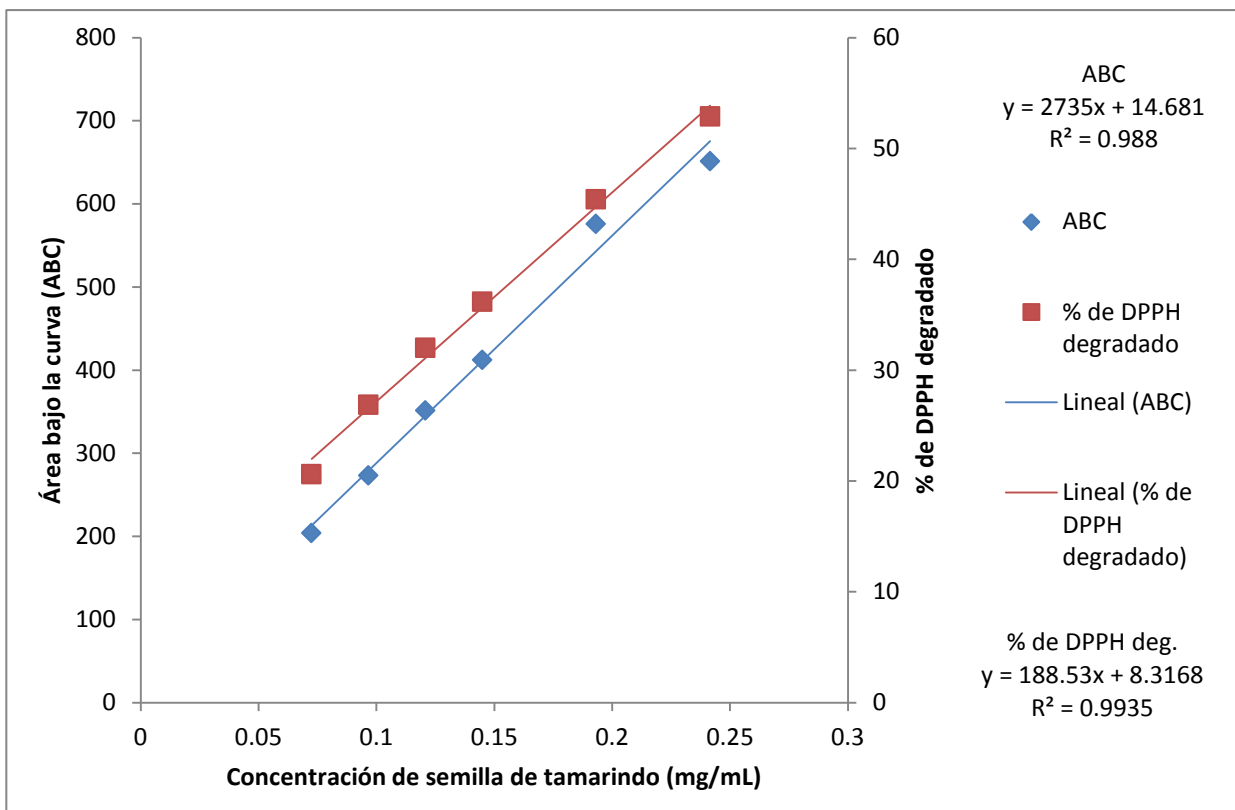


Figura 37. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en agua

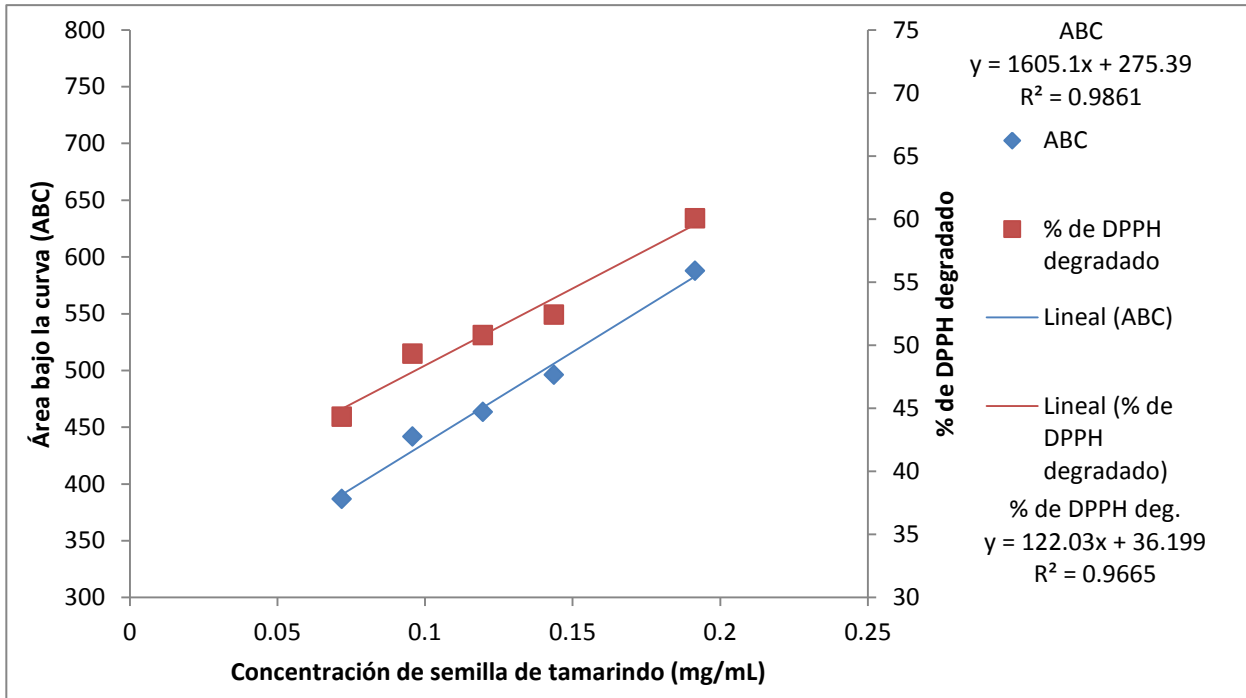


Figura 38. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en agua

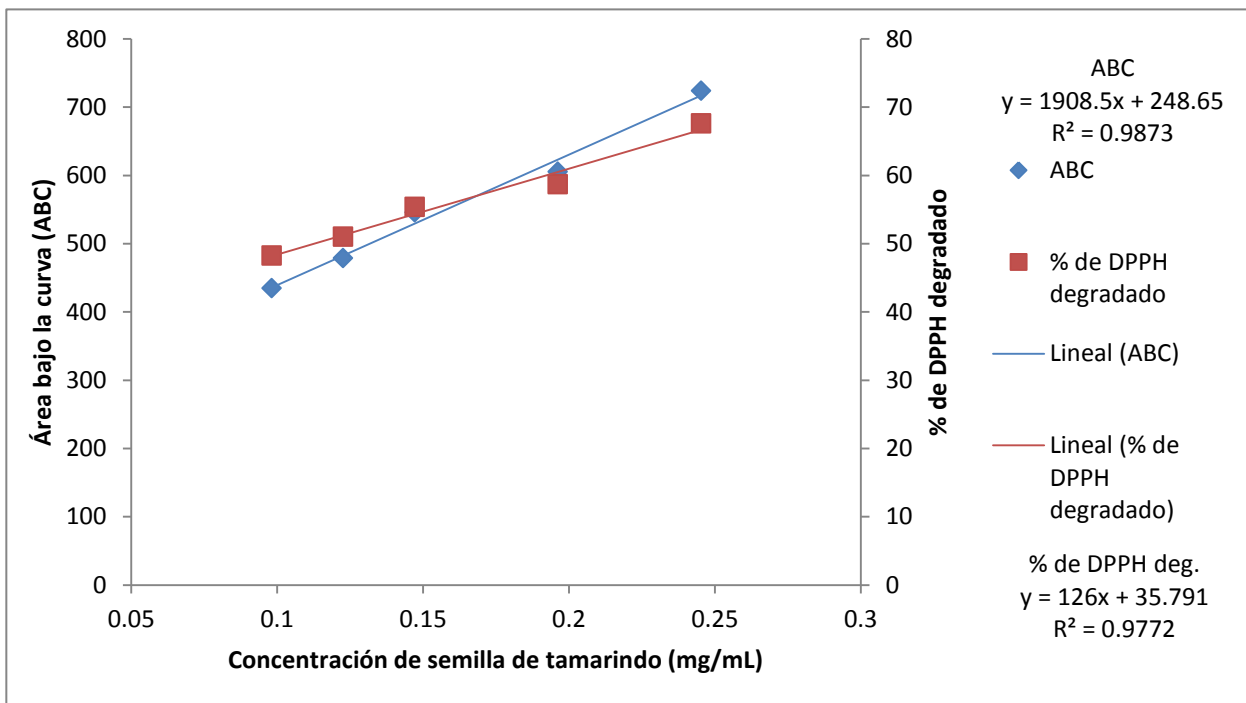


Figura 39. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en agua

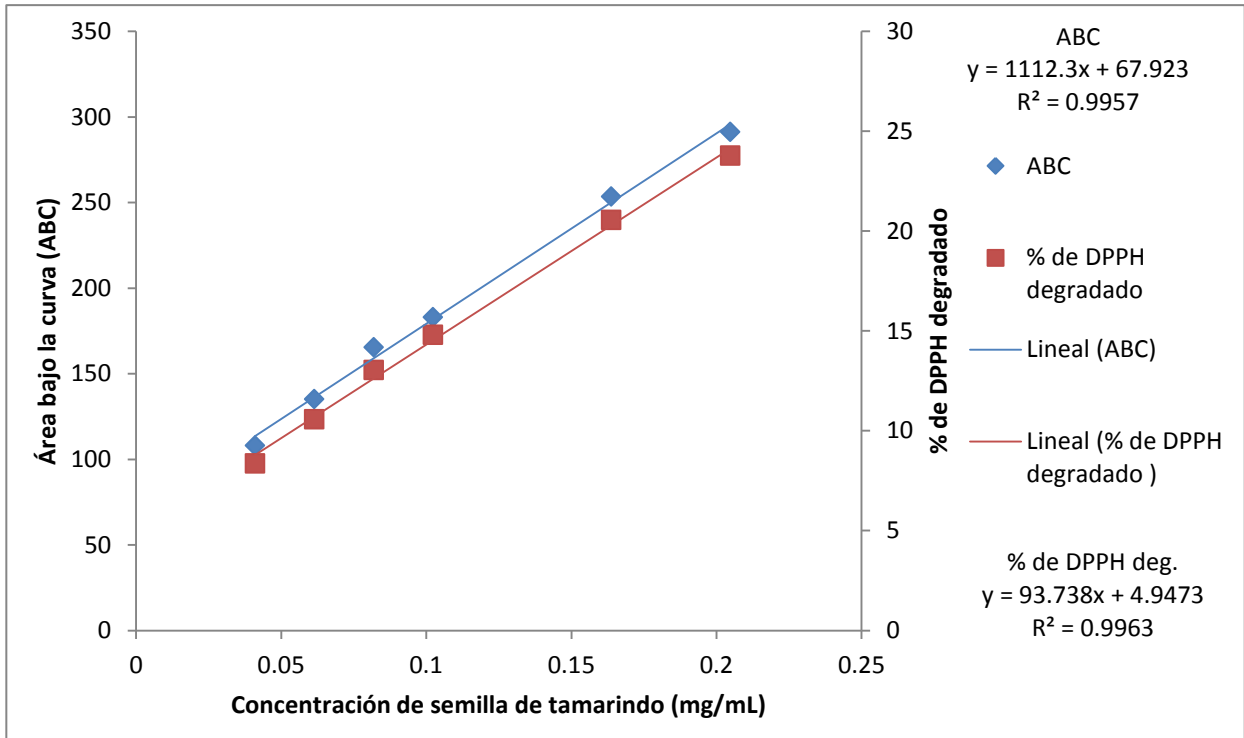


Figura 40. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 1 en acetona

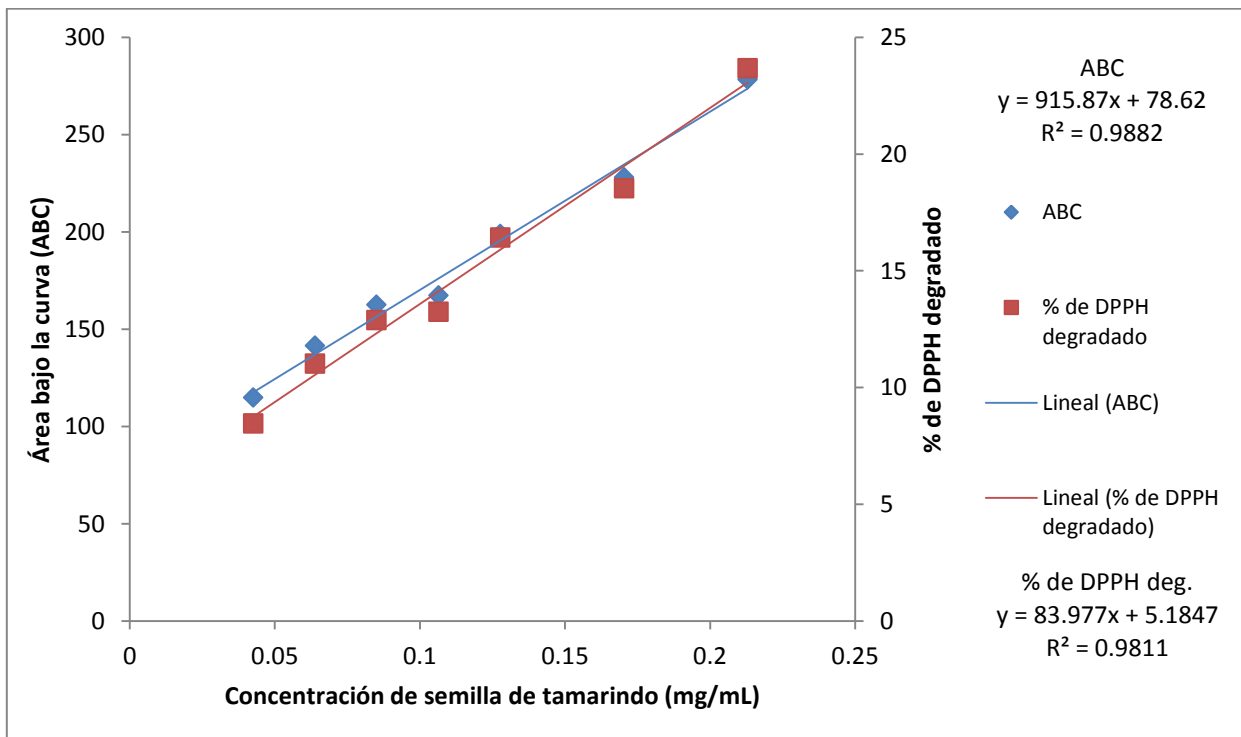


Figura 41 .Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 2 en acetona

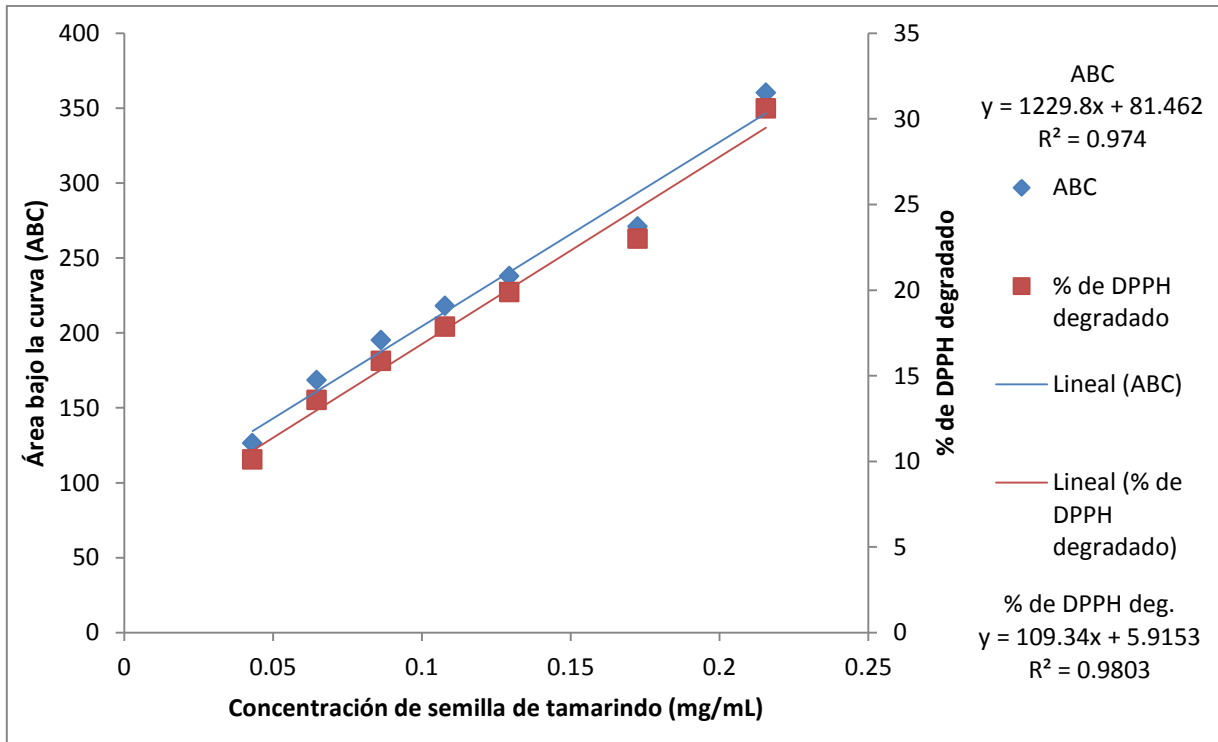


Figura 42. Prueba de actividad antioxidante usando la muestra 3 en acetona

Tabla 16. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de actividad antioxidante con DPPH. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05%

Tratamiento	Cuenta	Promedio	F	Valor crítico para F
Etanol	3	240.44	72.38	4.07
Metanol	3	170.74		
Acetona	3	30.47		
Agua	3	138.91		

Tabla 17. Matriz de la prueba de Tukey para los distintos extractos obtenidos. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa (DHS) de 46.55.

	Etanol	Metanol	Acetona	Agua
Etanol				
Metanol	69.69			
Acetona	209.97	140.27		
Agua	101.53	31.83	108.44	

Tabla 18. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de acidez en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.

<i>Tratamientos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>F</i>	<i>Valor critico F</i>
Control	3	1.08	71.44	5.14
Extracto	3	0.60		
BHA	3	0.68		

Tabla 19. Matriz de la prueba de Tukey para los datos obtenidos en el ensayo de acides. Esta prueba de estadística se realizo con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 0.131.

	Control	Extracto	BHA
Control			
Extracto	0.481		
BHA	0.396	0.085	

Tabla 20. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de índice de yodo en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.

<i>Tratamientos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>F</i>	<i>Valor critico F</i>
Control	3	94.15	0.19	5.14
Extracto	3	94.31		
BHA	3	93.54		

Tabla 21. Análisis estadístico de ANOVA para la prueba de índice de peroxidos en el día 28 , con un nivel de significancia del 0.05%.

<i>Tratamientos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>F</i>	<i>Valor critico F</i>
Control	3	10.33	38.87	5.14
Extracto	3	8.84		
BHA	3	8.50		

Tabla 22. Matriz de la prueba de Tukey para los datos de índice de peroxidados. Esta prueba de estadística se realizó con un nivel de significancia de 0.05% y una diferencia honestamente significativa de 0.679.

	Control	Extracto	BHA
Control			
Extracto	1.495		
BHA	1.833	0.338	