



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE POSIBLES ANTIOXIDANTES
PRESENTES EN LA SEMILLA DE SANDÍA
MEXICANA RESIDUAL (*Citrullus lanatus*)**

TESIS

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

PRESENTA

GUADALUPE JUDITH ISLAS RIVERA



Ciudad Universitaria, CDMX

2018



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:** **PROFESOR JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET**
- **VOCAL:** **PROFESOR LINO JOEL REYES TREJO**
- **SECRETARIO:** **PROFESORA MARTHA MENES ARZATE**
- **1^{ER} SUPLENTE:** **PROFESORA BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN**
- **2^{DO} SUPLENTE:** **PROFESOR HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

1. LABORATORIO 208, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO B, 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:

DR. LINO JOEL REYES TREJO

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. BENITO REYES TREJO

SUSTENTANTE:

GUADALUPE JUDITH ISLAS RIVERA



1.3 Técnicas para la extracción de compuestos bioactivos en residuos vegetales.....	22
1.3.1 Técnicas convencionales de extracción.....	22
1.3.1.1 Extracción por maceración.....	23
1.3.1.2 Extracción asistida por Soxhlet.....	23
1.3.2 Técnicas modernas de extracción.....	23
1.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	24
1.3.2.2 Extracción asistida por microondas.....	25
1.3.2.3 Extracción por fluidos supercríticos.....	25
1.4 Métodos para la cuantificación de polifenoles.....	27
1.4.1 Métodos de cromatografía.....	27
1.4.2 Espectrometría de masas.....	28
1.4.3 Ensayo de Folín- Ciocalteu.....	28
1.5 Métodos para la evaluación de actividad antioxidante.....	28
1.5.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil).....	29
1.5.2 Método ORAC.....	30
1.5.3 Método FRAP.....	30
1.6 Evaluación de la estabilidad oxidativa de un aceite.....	31
1.6.1 Índice de peróxidos.....	31
1.6.2 Índice de yodo.....	32
1.6.3 Índice de acidez.....	32
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	33
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	48
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64



ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Nombre</u>	<u>Página</u>
Figura 1.	Clasificación de residuos de acuerdo a sus características y origen.	4
Figura 2.	Producción de residuos alimentarios en países desarrollados.	6
Figura 3.	Plan de manejo integral de residuos sólidos.	7
Figura 4.	<i>Citrullus lanatus subsp. Vulgaris.</i>	11
Figura 5.	Producción de sandía en México en el año 2016.	13
Figura 6.	Estructuras de antioxidantes sintéticos.	16
Figura 7.	Clasificación de antioxidantes naturales.	17
Figura 8.	Estructura de ácido L-ascórbico.	18
Figura 9.	Estructura química de α -tocoferol.	18
Figura 10.	Estructura química del licopeno.	19
Figura 11.	Estructura básica de los flavonoides.	20
Figura 12.	Estructura general de las antocianinas.	21
Figura 13.	Estructura química de un tanino (ácido elágico).	22
Figura 14.	Sistema de fluidos supercríticos.	26
Figura 15.	Estructura del radical DPPH y su forma oxidada.	29
Figura 16.	Evaporación del disolvente a presión reducida mediante rotaevaporador Büchi modelo R – 124.	37
Figura 17.	Extracción de posibles compuestos antioxidantes con el equipo Soxhlet.	38
Figura 18.	Extracción de posibles antioxidantes por maceración.	39
Figura 19.	Extracción de posibles compuestos antioxidantes asistida por sonicación.	40
Figura 20.	Lector de microplacas con dispensadores automáticos (Bio Tek, modelo Synergy 2).	42



ÍNDICE DE GRÁFICAS

<u>Gráfica</u>	<u>Nombre</u>	<u>Página</u>
Gráfica 1.	Rendimiento de los extractos de la semilla de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>), empleando las técnicas de Soxhlet y maceración, con diferentes disolventes.	50
Gráfica 2.	Rendimiento de los extractos de semilla de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>) asistida por sonicación a diferentes tiempos, empleando metanol como disolvente.	51
Gráfica 3.	Polifenoles totales en los extractos de semilla de sandía residual (<i>Citrullus lanatus</i>), empleando diferentes métodos de extracción: Soxhlet, maceración y sonicación.	53
Gráfica 4.	Actividad antioxidante presente en los extractos de semilla de sandía residual (<i>Citrullus lanatus</i>), empleando diferentes técnicas de extracción y disolventes.	55
Gráfica 5.	Índice de peróxidos de las muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.	57
Gráfica 6.	Índice de yodo de las muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.	59
Gráfica 7.	Índice de acidez de las muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.	61



ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Nombre</u>	<u>Página</u>
Tabla 1.	Compuestos bioactivos obtenidos de residuos de frutas.	10
Tabla 2.	Composición química de las semillas de sandía.	12
Tabla 3.	Caracterización física de las semillas de sandía (<i>Citrullus lanatus</i>).	49
Tabla 4.	Polifenoles totales presentes en los extractos de semilla de sandía.	52
Tabla 5.	Actividad antioxidante de los extractos de semillas de sandía.	54
Tabla 6.	Índice de peróxidos en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	58
Tabla 7.	Índice de yodo en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	60
Tabla 8.	Índice de acidez en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	62



RESUMEN

Los lípidos de los alimentos sufren un proceso de oxidación; un conjunto de reacciones inevitables que conducen a la formación de productos volátiles, los cuales afectan su calidad nutricional, haciéndolos inaceptables para el consumo humano. Para evitarlo, se utilizan antioxidantes sintéticos que retrasar estos procesos con la consiguiente prolongación de la vida útil del alimento. Sin embargo se pretende el uso de antioxidantes de origen natural ya que estos tienen mayor aceptación por el consumidor. Algunas investigaciones sobre la sandía (*Citrullus lanatus*) han destacado sus altos contenidos de nutrientes esenciales, los efectos antiinflamatorios y la actividad antioxidante que presentan las diferentes partes del fruto (corteza, pulpa y semilla). En esta investigación se evaluaron los posibles antioxidantes presentes en la semilla de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*). Se realizó una comparación de métodos de extracción para determinar cuál de ellos es el más eficiente: Soxhlet, maceración y sonicación.

Se determinó el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, dando los siguientes resultados: Soxhlet _{etanol} 59.879 mg de EAG/g de extracto > Sonicación _{metanol 75 min} 51.498 mg de EAG/g de extracto > Sonicación _{metanol 60 min} 51.310 mg de EAG/g de extracto. La actividad antioxidante se determinó usando el radical 1,1-difenilpicril-hidrazilo (DPPH) obteniendo los resultados que a continuación se muestran expresados en IC₅₀: Maceración _{acetona} 0.7088 mg/mL < Soxhlet _{metanol} 0.7525 mg/mL < Maceración _{metanol} 0.8389 mg/mL < Sonicación _{metanol 75 min} 1.0068 mg/mL

Finalmente se llevó a cabo una comparación entre el extracto de sonicación metanólico a los 75 minutos y el antioxidante sintético BHT (butilhidroxitolueno) para determinar la eficiencia en la estabilización de los aceites vegetales.



INTRODUCCIÓN

Los residuos de alimentos se producen en toda la cadena de producción y consumo, recientes informes de la FAO (Food and Agriculture Organization) estiman que hasta un 50 % de los alimentos producidos en el mundo se pierde antes y después de llegar al consumidor final. La industria de alimentos produce grandes cantidades de residuos, entre estos se encuentran los provenientes de las frutas, residuos que pueden ser aprovechados de diversas formas. Recientemente ha tomado un auge el uso de estos residuos para reducir la contaminación ambiental en algunos países ya que estos son fuente importante en la obtención de biogás, en la extracción de aceites esenciales, pectinas, flavonoides, polifenoles, entre otros.

En el caso particular de la sandía (*Citrullus lanatus*), su producción en México es de 946,458.12 toneladas anuales. De esta cantidad sólo se aprovecha la pulpa, desechándose cascara y semilla. Sin embargo, las semillas pueden aprovecharse ya que estas contienen 21.9% de aceite, el cual es valorado por sus propiedades nutrimentales o farmacológicas. Aunque se han publicado estudios sobre la actividad antioxidante de extractos de semilla de sandía, no existen análisis de este tipo en semillas de este fruto cultivado en México. El presente trabajo tiene como objetivo principal: la evaluación de posibles antioxidantes presentes en la semilla de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*), con el propósito de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible, como una alternativa más segura y efectiva que pueda sustituir a los antioxidantes sintéticos (BHA y BHT).



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los posibles antioxidantes presentes en la semilla de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*), con el propósito de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

Objetivos particulares

- Definir el método de extracción que proporciona el mayor rendimiento (Soxhlet, maceración y sonicación), utilizando como disolventes, metanol, etanol y acetona.
- Determinar cuál es el procedimiento y disolvente que presenta mayor concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante, empleando los métodos de Folín-Ciocalteu y DPPH respectivamente.
- Evaluar el extracto que presenta las mejores características de rendimiento, cantidad de polifenoles y actividad antioxidante en la estabilización de aceite de girasol comparándolo con el antioxidante sintético BHT.

HIPÓTESIS

La semilla de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*), será una opción viable como fuente de antioxidantes naturales que pueda sustituir al empleo de antioxidantes sintéticos.



CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 Residuos

Los residuos se definen formalmente como los materiales o productos que se desechan ya sea en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, que se contienen en recipientes o depósitos, y que necesitan estar sujetos a tratamiento o disposición final con base en lo dispuesto en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR, 2003). Los residuos se clasifican de acuerdo a sus características y orígenes en tres grupos: residuos sólidos urbanos (RSU), residuos de manejo especial (RME) y residuos peligrosos (RP) (Figura 1).



Figura 1. Clasificación de residuos de acuerdo a sus características y origen.
Fuente: LGPGIR, 2003.



1.1.1 Residuos sólidos urbanos (RSU)

Los residuos sólidos urbanos son aquellos generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de materiales orgánicos e inorgánicos. Estos materiales provienen de las actividades domésticas, de actividades dentro de establecimientos o en vía pública. Los cuales pueden ser envases, embalajes o empaques de los productos que se consumen, siempre que no sean considerados por esta Ley como residuos de otra índole (SEMARNAT^a, 2017).

En México se generaron diariamente 102,895 toneladas de RSU en el año 2017, de las cuales se recolectó un 83.93% y el 78.54% se colocaron en sitios de disposición final, reciclando únicamente el 9.63% de los residuos generados. En el país sigue predominando el manejo básico de los RSU, que consiste en recolectar y disponer los residuos en rellenos sanitarios, desaprovechando aquellos residuos que son susceptibles a reincorporarse al sistema productivo. Lo anterior disminuye la demanda y explotación de nuevos recursos, a diferencia de países como Suiza, Países Bajos, Alemania, Bélgica, Suecia, Austria y Dinamarca; donde la disposición final de los residuos es de menos del 5% en rellenos sanitarios. (SEMARNAT^b, 2017).

1.1.2 Residuos de alimentos

Los residuos alimentarios pueden definirse como la materia orgánica que se ha generado en las diferentes etapas de la cadena de procesamiento de los productos destinados al consumo humano. La producción de estos residuos abarca todo el ciclo de vida de los alimentos: desde la cosecha hasta la fabricación y elaboración industrial, el consumo minorista y el consumo de los hogares (Ki Lin, 2013).

En los países desarrollados el 42% de los residuos de alimentos son producidos en los hogares (Figura 2), mientras que el 39% se producen en la industria manufacturera de los alimentos, el 14% en el sector de los servicios alimentarios y el 5% en comercio y distribución (Mirabella *et al.*, 2014).

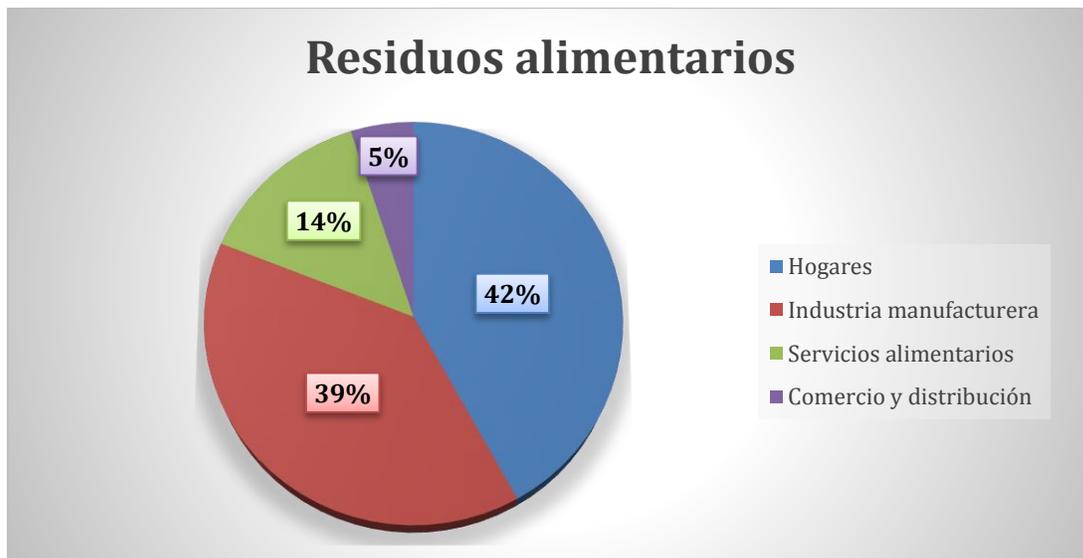


Figura 2. Producción de residuos alimentarios en países desarrollados.

Fuente: Mirabella *et al.*, 2014

La gran cantidad de residuos producidos por la industria alimentaria, además de ser una gran pérdida de materiales valiosos, también plantea serios problemas de gestión, tanto desde el punto de vista económico como ambiental (Mirabella *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Gestión de residuos de alimentos

El aumento en la generación de residuos sólidos asociado al crecimiento poblacional y la globalización que genera una cultura consumista, ha llevado a la aplicación de tecnologías apropiadas para la disposición final de residuos sólidos que permitan un control racional de su impacto al medio ambiente y a la salud pública. Es por esto que la implementación de acciones para el aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos, es fundamental para su gestión integral (Jaramillo & Zapata, 2008).

Los residuos alimentarios son inevitables, siempre estarán presentes en la producción de alimentos, por lo que se sigue un plan de manejo integral de residuos sólidos (Figura 3), el cual consiste en: minimización de los residuos, recolección, separación y utilización, reciclaje, valorización y disposición final (LRSDF, 2003).

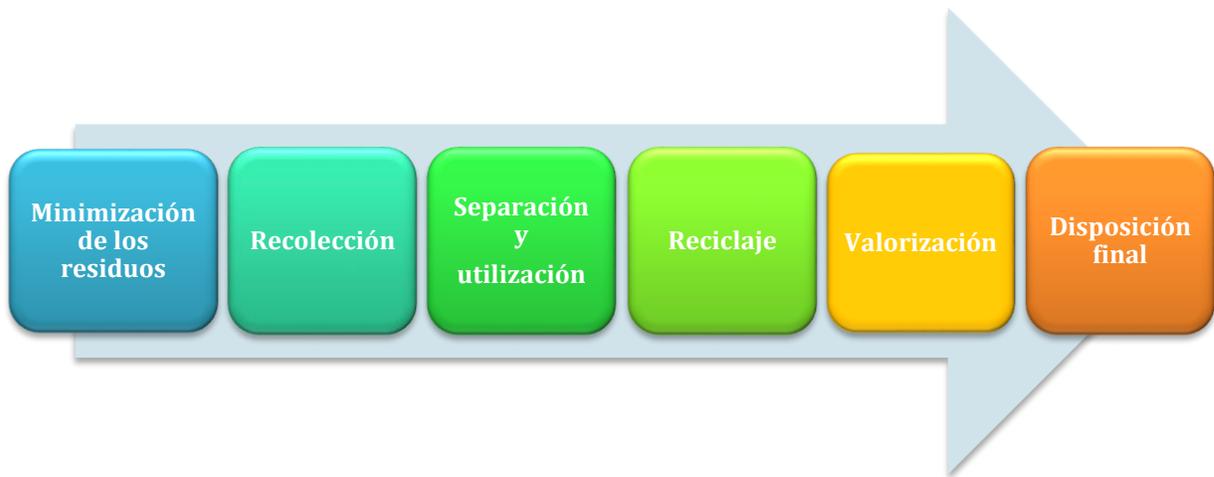


Figura 3. Plan de manejo integral de residuos sólidos.
Fuente: LRSDF, 2003

1.1.2.2 Valorización de residuos alimentarios

La valorización de residuos se define como el conjunto de acciones asociadas cuyo objetivo es recuperar el valor remanente o el contenido energético de los materiales que componen los residuos, mediante su reincorporación a procesos productivos, bajo criterios de eficiencia ambiental, tecnológica y económica (LRSDF, 2003).

Los residuos producidos en las diferentes etapas de la cadena de suministro de alimentos (desde la producción, el manejo post-cosecha, el procesamiento, la distribución y el consumo) se caracterizan por no ser de interés en el proceso que los generó pero pueden utilizarse o transformarse para generar un producto con valor comercial (Saval, 2012). Lo anterior es posible debido a que en diversos estudios de composición de residuos vegetales se sugiere la presencia de una amplia gama de compuestos bioactivos encontrados en diferentes fracciones residuales (Banerjee *et al.*, 2017). Estas valiosas moléculas funcionales son esencialmente metabolitos primarios y secundarios de las plantas, tales como: biopolímeros, carotenoides, pectina, ceras, ácidos grasos, flavonoides, polifenoles entre otros compuestos, los cuales tienen un alto valor comercial para diferentes industrias (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).



La disponibilidad mundial de los residuos de alimentos y su potencial no explotado ha alentado a los investigadores a realizar estudios detallados acerca de su valor agregado (Banerjee *et al.*, 2017). Para ello se necesitan de tecnologías actuales capaces de recuperar, reciclar y dar sustentabilidad a la obtención de compuestos de alto valor agregado. Un ejemplo de estas tecnologías es la biorrefinería, basada en biomasa y residuos como materia prima, que combina procesos biológicos, térmicos y químicos, que aprovechan las sinergias existentes entre las distintas tecnologías (sostenibles y de bajo impacto ambiental), dando como resultado un completo abanico de valiosos productos (Ki Lin *et al.*, 2013).

1.1.2.2.1 Criterios para la selección de residuos con fines de aprovechamiento

A través de los años se han definido principios para la selección de residuos que pueden ser aprovechados con fines biotecnológicos (Saval, 2012). Los siguientes criterios son algunos de ellos:

- El residuo debe estar disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- No debe tener otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se pretende promover.
- Que no requiera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.
- La disponibilidad del residuo debe permitir planificar el proceso para el cual se va a utilizar.
- El residuo debe ser resistente al ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes que tenga un mercado demandante.
- El residuo debe ser estable, es decir, que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.



1.1.2.2 Ejemplos de valorización de residuos de frutas

La valorización de residuos como aditivo para la mejora del suelo es un enfoque común que se sigue ampliamente en muchos países. El compostaje tiene una larga historia en la agricultura y se ha utilizado para promover la productividad agronómica durante siglos (Sener *et al.*, 2015). Sin embargo en la actualidad, existen otros ejemplos de valorización de residuos de alimentos como la generación de electricidad a través de la digestión anaeróbica, generación de combustible mediante la conversión de celulosa en bioetanol, producción de alimentos para animales y la extracción de pectina, flavonoides y D-limoneno a partir de la cascara de naranja (Pfaltzgraff *et al.*, 2013).

La cascara, pulpa y semillas de residuos de alimentos pueden ser una buena materia prima para la recuperación de compuestos bioactivos tales como pectina, lípidos, flavonoides, fibras dietéticas, etc. (Banerjee *et al.*, 2017). Por ejemplo, los fenoles y carotenoides de los subproductos de la fruta, podrían aplicarse como conservadores naturales de alimentos o bebidas, ya que prolongan la vida útil del producto, retrasando la formación de sabores desagradables y rancidez (Oreopoulou & Tzia, 2007; Galanakis, 2012).

En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos obtenidos de diferentes residuos vegetales:



Tabla 1. Compuestos bioactivos obtenidos de residuos de frutas.

Compuesto bioactivo	Materia prima	Actividad biológica	Referencia
Flavonoles	Cáscara de naranja Semillas de tamarindo Cáscara de mango Cáscara de granada	Antioxidante	(Cam <i>et al.</i> , 2014)
Ácidos fenólicos	Semillas de guayaba Cáscara y semilla de mango Residuos de germen de trigo Cascara de naranja	Antioxidante	(Kothari & Seshadri, 2010)
Flavononas	Cáscara de pepino Cáscara de jitomate	Antioxidante	(Attard <i>et al.</i> , 2014)
Antocianidinas	Residuos de uva Pericarpio y semillas de litchi	Colorante alimentario Antioxidante	(Yu <i>et al.</i> , 2007)
Carotenoides	Cascara de jitomate Cascara de mango Cascara de papaya	Antioxidantes	(Huchin <i>et al.</i> , 2013)
Antocianinas	Cáscara de sandía	Antioxidante	(Al-Sayed & Ahmed, 2013)
Pectinas	Cáscara de mango Cáscara de cítricos	Aditivo alimentario: agente espesante	(Emaga <i>et al.</i> , 2008)
Lignanós y xiloglucanos	Corteza de sandía Semillas de tamarindo	Fibra dietética Aditivo alimentario	(Al-Sayed & Ahmed, 2013)
Glucósidos	Cáscara de manzana Pedúnculo de plátano	Anticancerígeno Antioxidante	(Milner & Romagnolo, 2010)



1.1.3 Sandía y valorización de sus residuos

La sandía (*Citrullus lanatus*) pertenece a la familia Cucurbitaceae y es un fruto originario de África, aunque hoy en día se cultiva de manera extendida por todo el mundo (SIAP, 2017). *Citrullus lanatus* incluye tres subespecies: *Citrullus lanatus subsp. lanatus*, que crece de forma natural en el sur de África; *Citrullus lanatus subsp. mucosospermus*, que tiene grandes semillas comestibles con un pericarpio carnoso y *Citrullus lanatus subsp. Vulgaris* (Figura 4), que representa el dulce grupo que dio origen a la sandía moderna que se cultiva. Esta cucurbitácea es un importante cultivo, que representan el 7% de la superficie mundial dedicada a la producción de hortalizas, por lo que es una de las cinco frutas frescas más consumidas (Guo *et al.*, 2013).

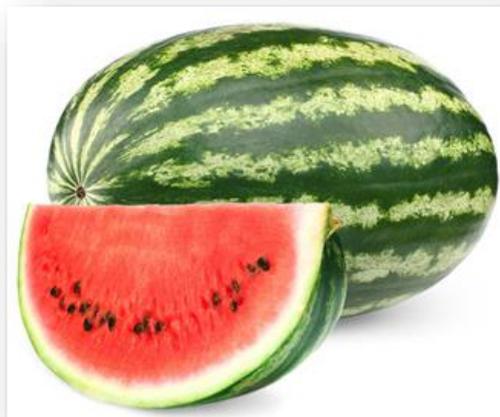


Figura 4. *Citrullus lanatus subsp. Vulgaris*.

1.1.3.1 Composición química de la sandía

La sandía es una fruta tropical que contribuye a la dieta de los humanos, la pulpa es consumida debido a sus aportes nutritivos, contiene un 91% de agua en peso y es una fuente rica de compuestos biodisponibles que incluyen licopeno, β -caroteno y otros carotenoides, citrulina, y vitaminas A y C (Tamburini *et al.*, 2017).



No obstante a las semillas se les da poca importancia y es común desecharlas, sin embargo su composición química (Wani *et al.*, 2007) indica que es rica en proteínas, carbohidratos, fibra y gran cantidad de ácidos grasos insaturados, monoinsaturados y poliinsaturados (Tabla 2), así como vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales como triptófano y leucina (Tarek & Khaled, 2001).

Tabla 2. Composición química de las semillas de sandía (*Citrullus lanatus*).

Compuesto	%
Humedad	6-7
Lípidos	21.9
Carbohidratos	26.3
Celulosa	31
Hemicelulosa	17
Proteína cruda	16.3-17
Cenizas	2.4
Fibra cruda	22.2

Fuente: Wani *et al.*, 2007

1.1.3.2 Importancia de la sandía en México (producción y exportación)

México es de los principales productores de frutos en el mundo, la producción anual de sandía es de 946,458.12 toneladas, ocupa el primer lugar de exportación de sandía en el mundo, provee el 22.9% del comercio mundial. Como se muestra en la Figura 5, en el año 2016, los estados con mayor producción de sandía fueron Sonora con 440,106 toneladas, Jalisco 123,175 toneladas y Chihuahua con 97,222 toneladas (SAGARPA, 2017).

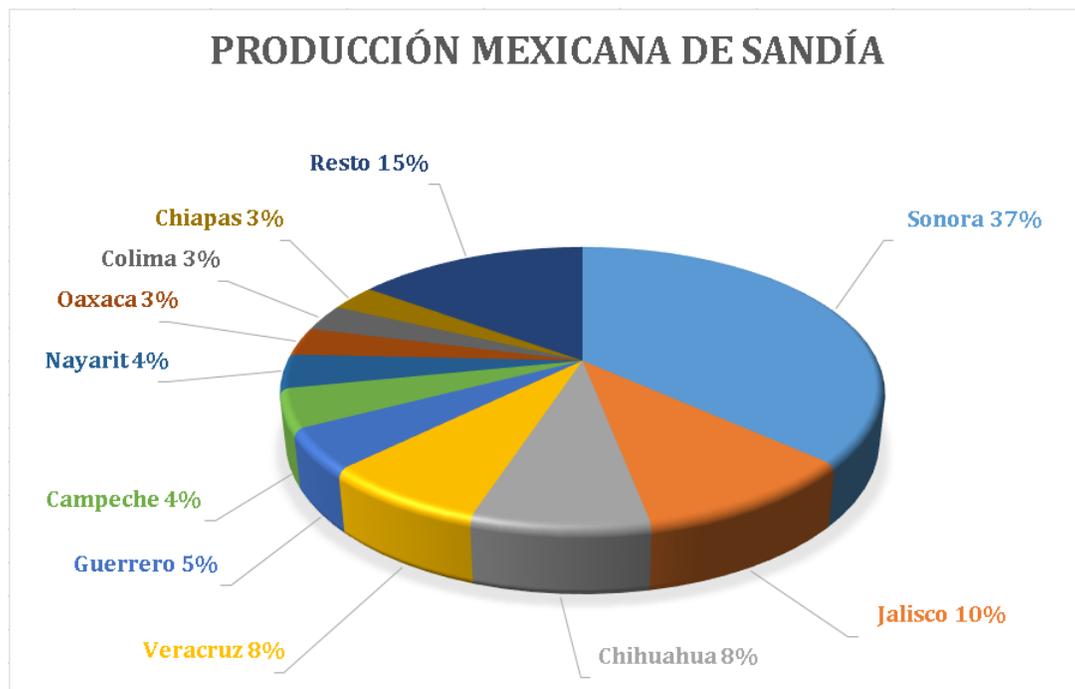


Figura 5. Producción de sandía en México en el año 2016.
Fuente: SAGARPA, 2017

El mayor exportador de sandía del mundo en el año 2016 fue México. El volumen que destinó al mercado externo representó el 64.2% de la producción nacional de la fruta, por la cual obtuvo 140.5 millones de dólares. Prácticamente el total de las exportaciones mexicanas de la sandía se comercializa en Estados Unidos. Sin embargo, los mercados potenciales para la exportación de este fruto mexicano son Alemania, China y Canadá (SAGARPA, 2017).

1.1.3.3 Valorización de los residuos de sandía

La industria de sandía produce miles de toneladas de desechos en porciones no comestibles que presentan un problema ambiental y de manejo. Estos subproductos podrían reutilizarse, en particular, para obtener compuestos bioactivos (Tarazona *et al.*, 2011). La biomasa de la sandía se puede categorizar como tres componentes principales que son: pulpa que contribuye aproximadamente el 68% del peso total, corteza con el 30% y las semillas con el 2%; siendo la corteza y las semillas de los principales residuos sólidos generados por varios restaurantes, productores de zumos de frutas e industrias alimenticias (Prakash *et al.*, 2014).



La pulpa de sandía contiene gran cantidad de fitonutrientes como el licopeno, un precursor del β -caroteno, un carotenoide de gran interés debido a su capacidad antioxidante (Fraser & Bramley, 2004).

La corteza de sandía es una fuente rica de aminoácidos (no esenciales) como la citrulina, un eliminador de radicales hidroxilo eficiente y un fuerte antioxidante. Además es un intermediario en la síntesis de arginina, un aminoácido esencial que tiene un papel importante en los sistemas reproductivo, pulmonar, renal, gastrointestinal, hepático e inmunológico (Collins *et al.*, 2007). Otros compuestos importantes que se extraen de la corteza de sandía son las pectinas (Prakash *et al.*, 2014), las cuales son una mezcla compleja de polisacáridos que constituyen aproximadamente un tercio de la pared celular de la mayoría de las plantas. Estas pectinas se utilizan como aditivos alimentarios, pueden ser espesantes, aglutinantes de agua, estabilizantes y sustitutos de grasa texturizante para imitar la sensación bucal de los lípidos en alimentos bajos en calorías (Wang *et al.*, 2007).

Por otro lado, las semillas de sandía contienen un alto nivel de proteínas y aceite, por lo cual, tienen un buen potencial para su uso en formulaciones de alimentos (Shetty *et al.*, 2012). De acuerdo a diversos estudios se ha encontrado que las semillas de sandía contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Rahman *et al.*, 2013).

1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retardan las reacciones de oxidación actuando en la etapa de iniciación debido a que se combinan preferentemente con los radicales libres para formar moléculas menos reactivas (Landines & Zambrano, 2009).

Una de las formas de deterioro de alimentos más importante es la oxidación de los lípidos. Esto representa un factor limitante en la vida útil de muchos alimentos (Monahan, 2012). Entre los métodos empleados para controlar la oxidación de los lípidos, el uso de antioxidantes es el medio más efectivo, conveniente y económico.



Los fabricantes de alimentos de todo el mundo usan antioxidantes para estabilizar los lípidos de los alimentos y así evitar el deterioro de la calidad de estos productos (Shahidi & Zhong, 2010).

Los antioxidantes pueden clasificarse como sintéticos o naturales, de acuerdo a su origen (Siddhuraju, 2007). También se clasifican en función de su modo de acción, ya sea como antioxidantes primarios o secundarios. Los primarios, como la mayoría de los compuestos fenólicos, rompen la reacción en cadena de la oxidación, mediante la eliminación de intermediarios de radicales libres, ya que son capaces de neutralizarlos mediante la donación de un átomo de hidrógeno. Los antioxidantes secundarios pueden evitar o retardar la oxidación: mediante la supresión del iniciador de la oxidación, incluidos iones metálicos, de oxígeno singulete, enzimas pro-oxidantes, entre otros oxidantes, o mediante la regeneración de antioxidantes primarios a través de la reposición de átomos de hidrógeno (Shahidi & Zhong, 2010).

1.2.1 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son moléculas de estructura fenólica que tienen sustituciones alquílicas, estas son obtenidas mediante procesos químicos y se han utilizado desde principios del siglo pasado, sin embargo, se han impuesto medidas de precaución con respecto a su uso y se ha restringido su empleo en ciertos alimentos y en cantidades limitadas debido a su toxicidad (Jeong *et al.*, 2005). A pesar de lo anterior, estos antioxidantes se siguen utilizando debido a su bajo costo y a su alta efectividad para prevenir el deterioro oxidativo (Figura 6). Ejemplos de estos compuestos son: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroxiquinona (TBHQ) (Rajkumar & Naragarajan, 2011).

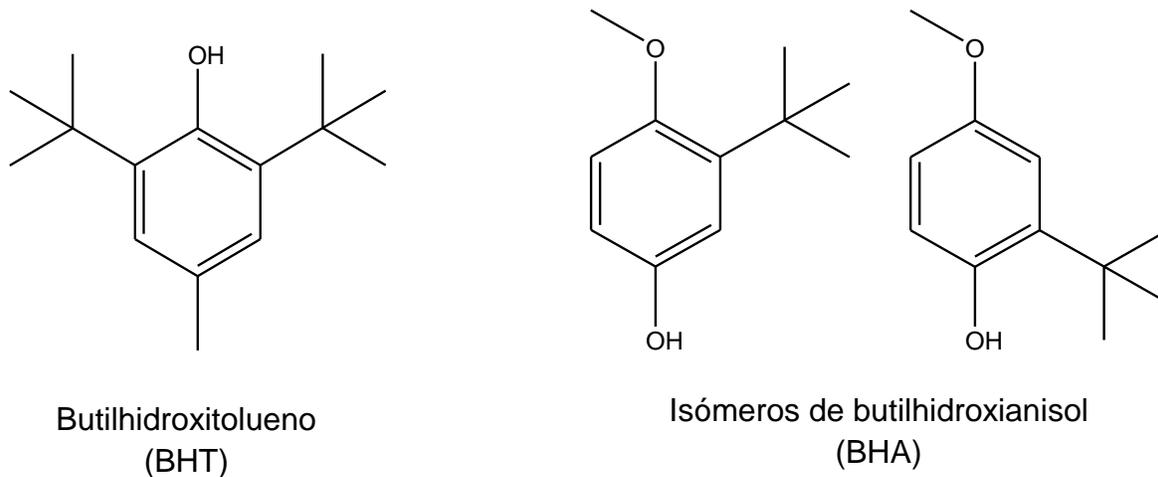


Figura 6. Estructuras de antioxidantes sintéticos.

1.2.2 Antioxidantes naturales

Las sustancias antioxidantes se distribuyen ampliamente en los materiales vegetales, los tejidos animales y los microorganismos, protegiendo a los organismos del estrés oxidativo y proporcionando antioxidantes naturales a los humanos. Los antioxidantes se pueden aislar como compuestos puros a partir de fuentes naturales y se usan para la conservación de alimentos, suplementos nutricionales y fines medicinales (Shahidi & Zhong, 2010).

Los antioxidantes naturales se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos (Figura 7). Entre los antioxidantes enzimáticos se ubican las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Algunos ejemplos de antioxidantes no enzimáticos son: vitaminas y minerales, carotenoides, polifenoles, compuestos organosulfurados y nitrogenados no proteicos (Badui, 2006; Singh *et al.*, 2013).

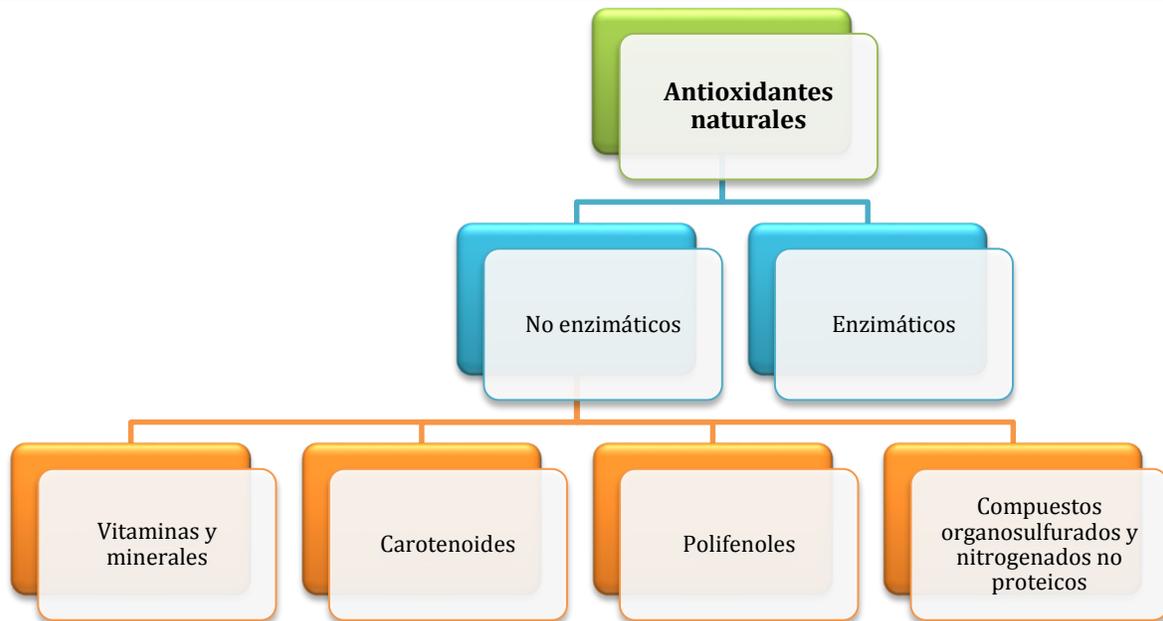


Figura 7. Clasificación de antioxidantes naturales.
Fuente: Singh *et al.*, 2013

1.2.2.1 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 también conocida como ácido L-ascórbico (Figura 8) es un nutriente requerido para una variedad de funciones biológicas. Es un compuesto derivado del ácido gulónico, el cual se sintetiza a partir de la glucosa (Traber & Stevens, 2011).

El ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble que se encuentra principalmente en vegetales y frutos cítricos. Ejerce su efecto antioxidante a través de múltiples mecanismos, que incluyen la extinción de diversas formas de oxígeno, la reducción de radicales libres y la regeneración de antioxidantes primarios. El efecto del ácido ascórbico en la estabilidad de los lípidos se debe principalmente a sus interacciones sinérgicas con otros antioxidantes.



Muestra una excelente sinergia con α -tocoferol, ácido cítrico, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y quelantes de metales (Shahidi & Zhong, 2010). En su estructura, el ácido 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. En este proceso el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico de manera reversible (Djilas & Cetkovic, 2002).

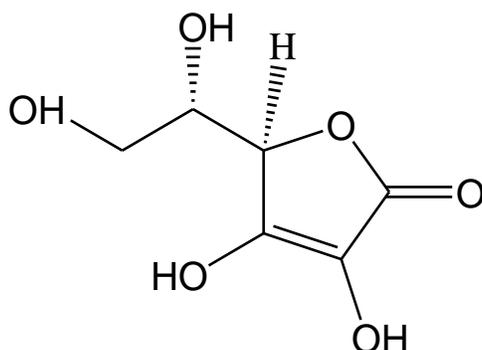


Figura 8. Estructura de ácido L-ascórbico.

- **Vitamina E**

La vitamina E (α -tocoferol) constituye uno de los antioxidantes esenciales lipofílicos más eficientes (Figura 9). El término vitamina E agrupa a dos familias de compuestos (tocoferoles y tocotrienoles), de los cuales el tocoferol es el principal compuesto y está conformado por cuatro isoformas (α , β , γ y δ), siendo el α -tocoferol el más activo. Estas sustancias contienen en su estructura un anillo de cromano y un grupo alcohol en la posición 6 (Benitez, 2006).

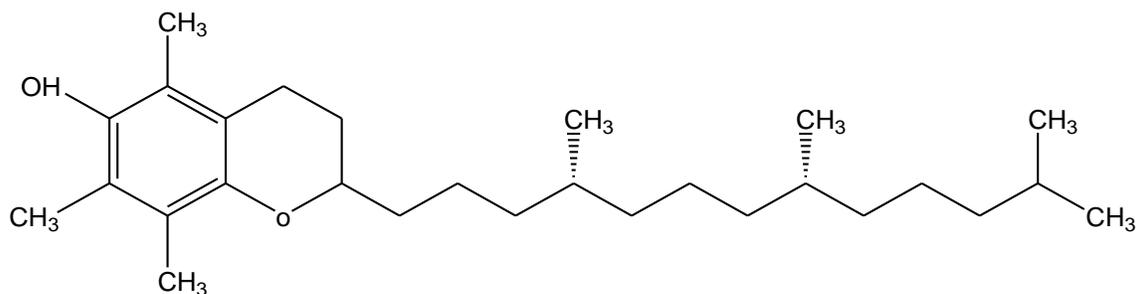


Figura 9. Estructura química de α -tocoferol.



La vitamina E, un potente captador de radicales peróxido, es un antioxidante que rompe cadenas y previene la propagación de radicales libres en las membranas y en las lipoproteínas del plasma (Traber & Stevens, 2011). Esta vitamina se encuentra en una gran variedad de alimentos y es una de las vitaminas de mayor distribución. Las principales fuentes son los aceites de soja, cacahuate, algodón, girasol, además de algunas leguminosas (Gatica, 2017).

1.2.2.2 Carotenoides

Los carotenoides son estructural y funcionalmente un grupo muy diverso de pigmentos naturales del tipo isoprenoide (Fiedor & Burda, 2014). De acuerdo a su estructura química, estos compuestos pueden clasificarse como carotenos, que son aquellos que en su estructura química sólo contienen carbono e hidrógeno (por ejemplo, licopeno y β -caroteno), mientras que los carotenoides que además de carbono e hidrógeno contienen oxígeno, reciben el nombre de oxicarotenoides o xantofilas (García *et al.*, 2004). Los carotenoides están abundantemente presentes en las frutas y verduras frescas. Las frutas amarillo-anaranjado-rojas y las verduras de hoja verde son especialmente ricas en carotenoides nutricionales (Fiedor & Burda, 2014).

El licopeno (Figura 10) es un pigmento natural, presente principalmente en tomate y sandía, que pertenece a la familia de los carotenoides y más precisamente al subgrupo de los carotenos, ya que está compuesto exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno ($C_{40} H_{56}$) (Britton *et al.*, 2004). Como la mayoría de los carotenoides, el licopeno es un tetraterpeno. Entre los carotenos, el licopeno se caracteriza por una estructura simétrica y acíclica que contiene dobles enlaces conjugados linealmente dispuestos (Müller *et al.*, 2015).

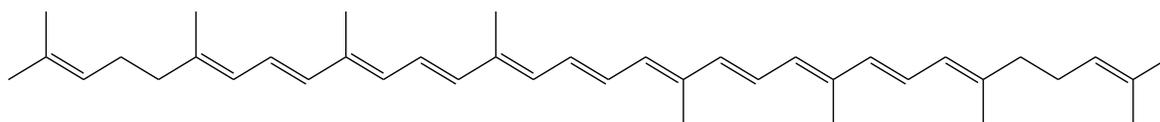


Figura 10. Estructura química del licopeno.



1.2.2.3 Polifenoles

Existen alrededor de ocho mil tipos de compuestos polifenólicos, que contienen un anillo aromático dentro de su composición química (Wang *et al.*, 2013). Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno. Ellos se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color y el valor nutricional. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos y flavonoides como el ácido cumárico y la quercetina y los taninos, entre los cuales el más activo biológicamente es la epicatequina. Estos fenoles con peso molecular relativamente alto tienen un poder antioxidante 20 veces más fuerte que la vitamina E (Padilla *et al.*, 2008).

- **Flavonoides**

Los flavonoides son una serie de metabolitos secundarios de las plantas. La estructura química básica de los flavonoides consiste en dos anillos bencénicos (A y B) enlazados a tres carbonos comúnmente ciclados con oxígeno (Figura 11). El peso molecular de los flavonoides es bajo (Wang *et al.*, 2013).

Debido a que la estructura básica de los flavonoides puede sufrir modificaciones y adición de grupos funcionales, estos pueden clasificarse en varias subcategorías como flavonas, isoflavonas, flavonoides, flavonoles, flavanonas, antocianinas, y antocianidinas (Crozier *et al.*, 2009).

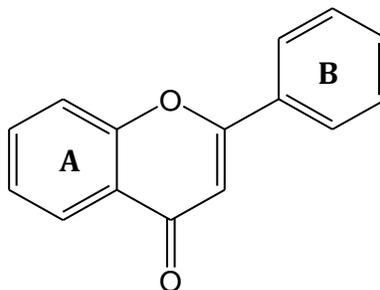


Figura 11. Estructura básica de los flavonoides.



- **Antocianinas**

Las antocininas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides (Garzón, 2008). Una de las estructuras simples de la antocianina es la antocianidina que consiste en un anillo aromático que está conectado a un anillo heterocíclico. Además, el anillo heterocíclico está conectado al tercer anillo aromático a través de un enlace de carbono (Figura 12) (Konczak & Zhang, 2004).

Estos pigmentos se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y flores, ofreciendo atractivos colores, como anaranjado, rojo y azul (Tonon *et al.*, 2010). El interés por los pigmentos antocianinos en investigaciones científicas se han incrementado en los últimos años, debido no sólo al color que confiere sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, efectos antiinflamatorios, mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo; estos efectos preventivos y terapéuticos, están principalmente asociados con sus propiedades antioxidantes (Longo & Vasapollo, 2004; Garzón, 2008).

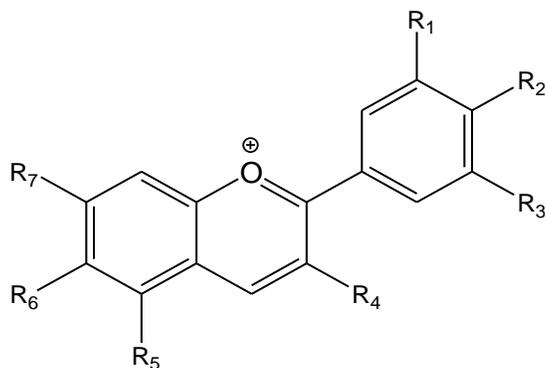


Figura 12. Estructura general de las antocianinas.

- **Taninos**

Los taninos son productos naturales que están presentes en varias familias de plantas (Wang *et al.*, 2013). Son compuestos fenólicos hidrosolubles y tienen grandes cantidades de anillos fenólicos en su estructura (Figura 13).



Los taninos se clasifican en dos grupos: hidrolizables y condensados, los últimos tienen como núcleo central un alcohol polihidroxiado como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico formando los galotaninos y elagitaninos (Porras & López, 2009).

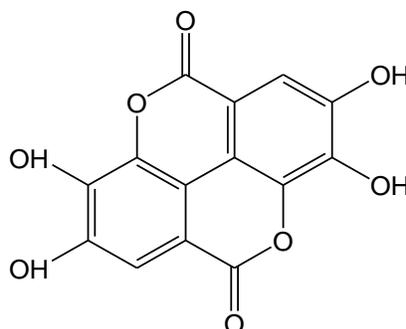


Figura 13. Estructura química de un tanino (ácido elágico).

1.3 Técnicas para la extracción de compuestos bioactivos en residuos vegetales

La extracción de compuestos bioactivos depende de varios factores, como la técnica de extracción, las materias primas y el disolvente que se utilizan (Tiwari, 2015). Las técnicas convencionales requieren el uso de disolventes orgánicos, temperatura y agitación. Ejemplos de este tipo de técnica incluyen Soxhlet y maceración. Las técnicas modernas son verdes o limpias debido al uso reducido de energía y disolventes amigables con el medio ambiente (Rodríguez *et al.*, 2015).

1.3.1 Técnicas convencionales de extracción

La extracción sólido-líquido sigue siendo un procedimiento de extracción más comúnmente utilizado. Durante muchos años, las técnicas convencionales han sido ampliamente aceptadas, principalmente por su facilidad de uso, eficiencia y amplia aplicabilidad (Qui *et al.*, 2010). Dichos procesos implican el uso de disolventes como metanol, etanol, acetona, éter dietílico y acetato de etilo, a menudo mezclados con diferentes proporciones de agua (Stalikas, 2017).



La eficacia de los métodos de extracción convencionales depende de la elección del disolvente y la polaridad del compuesto, ya que se necesitan disolventes de diferentes polaridades para la identificación y el aislamiento. Un buen disolvente proporciona baja toxicidad, un punto de ebullición bajo, transferencia de masa rápida y no degrada al extracto. El rendimiento de la extracción también depende de factores como: la temperatura y el tiempo (Silva *et al.*, 2016).

1.3.1.1 Extracción por maceración

La maceración consiste en triturar la muestra en partículas más pequeñas para aumentar el área de la superficie y obtener una buena mezcla con el disolvente. La agitación en el proceso de maceración facilita la extracción de dos maneras: aumentando la difusión y eliminando la solución concentrada de la superficie de la muestra. Este proceso se ha utilizado durante mucho tiempo para obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

1.3.1.2 Extracción asistida por Soxhlet

Soxhlet es una técnica de extracción semicontinua que implica una pequeña cantidad de muestra seca (triturada), que se coloca en el equipo (Cravotto *et al.*, 2011). El disolvente se calienta a ebullición y una vez que dentro del Soxhlet el líquido condensado llega a cierto nivel, este es sifoneado de regreso al matraz de ebullición. El proceso se realiza de forma repetida hasta que se completa el tiempo de extracción (Nielsen, 1998).

1.3.2 Técnicas modernas de extracción

Se han investigado varias técnicas novedosas de extracción que resuelven algunas deficiencias de las técnicas convencionales. Los nuevos métodos de extracción son procesos en donde el objetivo es aumentar el rendimiento de los compuestos de interés, siendo amigables con el medio ambiente (Baiano, 2014). Para ello es necesario que estas nuevas técnicas cumplan con ciertas características:



- Simples y rápidos.
- Aumentar el rendimiento de los productos de interés.
- Evitar el daño sobre los compuestos de interés.
- Ecológicos (evitando o minimizando el empleo de sustancias contaminantes).

Las posibles alternativas para extraer compuestos bioactivos que recientemente han ganado un gran interés debido a su simplicidad son: extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos y extracción asistida por ultrasonido (Solanaa *et al.*, 2015).

1.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un ejemplo de técnica de extracción alternativa. Esta técnica ofrece muchas ventajas con respecto a los procedimientos de extracción convencionales, tales como: selectividad, alta eficiencia y productividad, calidad mejorada, consumo bajo de energía, tiempo de extracción reducido y menor consumo de disolvente, riesgos químicos y físicos reducidos, ecológico, económico y alto nivel de automatización (Wong *et al.*, 2015). El ultrasonido se ha utilizado para extraer moléculas y diversos biomateriales, incluidos polisacáridos, aceites esenciales, proteínas, péptidos, colorantes, pigmentos y compuestos bioactivos (Briones *et al.*, 2015; Tiwari, 2015).

El ultrasonido es un tipo especial de onda de sonido que oscila entre 20 kHz y 100 MHz. La extracción asistida por ultrasonido produce un fenómeno conocido como cavitación, que implica la producción, el crecimiento y el colapso de las burbujas (Azmir *et al.*, 2013). Este fenómeno puede ser indirecto o directo. Cuando el ultrasonido se aplica directamente al medio sin ninguna barrera, proporciona una intensidad que es aproximadamente 100 veces mayor que la sonicación indirecta, la cual utiliza un baño de agua, en donde las ondas deben transferirse a través del agua para llegar a la muestra (Kek *et al.*, 2013).

La temperatura, presión, frecuencia y tiempo de sonicación son factores que regulan la acción del ultrasonido (Vinatoru, 2001; Rajha *et al.*, 2015; Roselló *et al.*, 2015).



1.3.2.2 Extracción asistida por microondas

Las microondas, por su naturaleza, son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, con una frecuencia que oscila entre los 0,3 y 300 GHz, correspondiente a una longitud de onda de 1 m a 1 mm, que se caracteriza por desplazarse en forma de ondas sinusoidales. Su principal efecto, cuando interactúan con un material receptivo, es de naturaleza térmica (Jain *et al.*, 2009).

La extracción asistida por microondas mediante disolvente consiste en el calentamiento de este último en contacto con la muestra. El proceso implica la perturbación de los enlaces por puente de hidrógeno, como resultado de la rotación de dipolos por la radiación en las moléculas y la migración de iones (Salomón *et al.*, 2013); con la consiguiente penetración del solvente en la matriz sólida por difusión y el soluto (compuestos de interés) se disuelve para alcanzar una concentración que está limitada por las características del sólido (Bromberger *et al.*, 2017). Aceites esenciales, antioxidantes, pigmentos, aromatizantes y otros compuestos orgánicos, pueden separarse de manera eficiente utilizando este método (Li *et al.*, 2013).

1.3.2.3 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción supercrítica se caracteriza por cambios en la temperatura y la presión, que transforma el gas en un fluido supercrítico (Figura 14) (Bromberger *et al.*, 2017). La extracción supercrítica se usa principalmente para aislar compuestos bioactivos no polares como carotenoides y lípidos, debido al hecho de que los disolventes utilizados en esta técnica son de naturaleza apolar. Sin embargo una opción para la extracción de compuestos polares, como los flavonoides, es la adición de modificadores como etanol, metanol, agua y acetona (Herrero *et al.*, 2013).

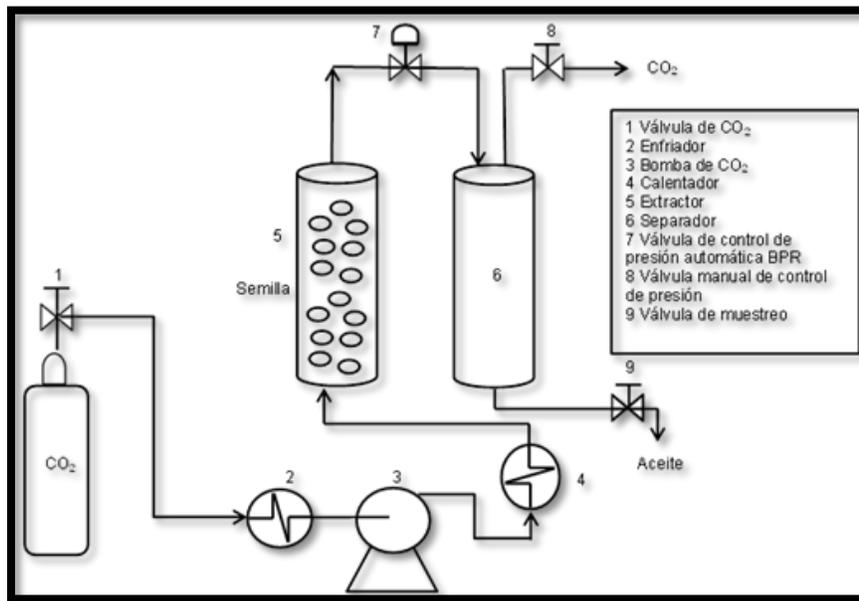


Figura 14. Sistema de fluidos supercríticos.

Los fluidos supercríticos presentan propiedades de transporte deseables como: baja viscosidad, que permiten extenderse más fácilmente dentro de la matriz sólida y baja tensión superficial lo que provoca una rápida penetración del solvente en el sólido y por consiguiente, mayor eficiencia de extracción (Pouliot *et al.*, 2014). Entre los fluidos supercríticos más utilizados se encuentran propano, agua y CO₂.

El dióxido de carbono (CO₂) se utiliza como fluido supercrítico por tres razones principales (Brunner, 2005; Silva *et al.*, 2016):

- Es inofensivo para la salud humana y el medio ambiente, ya que es una sustancia no tóxica, no inflamable y clasificada como GRAS.
- Su temperatura crítica es moderada (31.2°C), esto es importante debido a que pueden preservarse los compuestos bioactivos en los extractos.
- El extracto se aísla del aire y la luz, para evitar reacciones de oxidación.

El uso de CO₂ es una alternativa en la extracción de antioxidantes naturales a partir de hierbas vegetales, frutas, verduras entre otros (Song *et al.*, 2016). Sin embargo para ello se necesita la presencia de disolventes polares como el etanol.



1.4 Métodos para la cuantificación de polifenoles

La investigación sobre antioxidantes ha recibido un interés creciente debido a que los antioxidantes naturales están ganando importancia por sus beneficios para la salud humana en comparación con los antioxidantes sintéticos, que pueden producir efectos secundarios graves. Los polifenoles son los principales compuestos vegetales asociados con propiedades saludables debido a su actividad antioxidante y a la capacidad de eliminación de radicales libres (Wong *et al.*, 2015). A continuación se presentan los principales métodos analíticos para la caracterización de compuestos polifenólicos en matrices vegetales.

1.4.1 Métodos de cromatografía

Entre los métodos que han resultado ser muy útiles en la cuantificación de polifenoles están los cromatográficos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) son los dos métodos más utilizados para cuantificar compuestos fenólicos.

Actualmente la técnica de HPLC acoplada con espectrometría de masas (HPLC-MS y HPLC-MS/MS), proporcionan información sobre la masa molecular y las características estructurales de los compuestos. Estas se consideran más útiles que otras técnicas de separación, identificación y cuantificación del contenido fenólico. Sin embargo, una de las desventajas de esta técnica es la dificultad para analizar extractos crudos, por lo que primero se debe concentrar y purificar los polifenoles de la matriz antes de usar el equipo correspondiente (Ignat *et al.*, 2011).

La cromatografía de gases representa otra técnica altamente efectiva para la separación, identificación y cuantificación de varias especies fenólicas, como los ácidos fenólicos y los flavonoides (Brglez *et al.*, 2016). Presenta una alta sensibilidad y selectividad cuando se usa acoplada a espectrofotometría de masas, pero presenta serios inconvenientes propios de la técnica (Nacz & Shahidi, 2006).



1.4.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas consiste en la separación de especies químicas iónicas en función de su relación masa/carga (m/z) mediante un campo electromagnético. Esta técnica analítica es excepcional para identificar, cuantificar y elucidar la estructura de compuestos polifenólicos debido a su alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y buenos límites de detección. Además, combinada con técnicas de cromatografía, hace posible la separación purificación e identificación de compuestos polifenólicos siendo la técnica más utilizada para caracterizar compuestos en extractos vegetales (Barberán *et al.*, 2001).

1.4.3 Ensayo de Folín-Ciocalteu

La cuantificación de polifenoles totales se determina a través de un ensayo utilizando el reactivo de Folín-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folín-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reacciona con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. El contenido de polifenoles totales resultante de la aplicación del reactivo de Folín-Ciocalteu es regularmente expresado como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g de muestra (Singleton *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2014).

1.5 Métodos para la evaluación de actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. Una de las estrategias más aplicadas consiste en determinar la actividad antioxidantes frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. Los métodos más utilizados son DPPH, FRAP y ORAC (Kuskosk *et al.*, 2005).



1.5.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil)

El método colorimétrico del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) es un método para la evaluación de actividad antioxidante total en alimentos y extractos vegetales (Singh *et al.*, 2013). Se encuentra entre los métodos más utilizados y ofrece el primer enfoque para evaluar la actividad antioxidante.

La técnica se basa en el cambio de color del DPPH que es un radical cromógeno con una coloración violeta que se pierde progresivamente a medida que reacciona con los antioxidantes de la muestra (Figura 15), produciendo un descenso de la absorbancia a 515 nm. La actividad antioxidante mediante el método de eliminación de DPPH a menudo se informa como IC₅₀ que se define como la concentración efectiva del antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Shahidi & Zhong, 2015).

Los antioxidantes butilhidroxianisol (BHA), butilhidritoxitolueno (BHT) y trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) se pueden utilizar como referencias en los ensayos de cuantificación (Singh *et al.*, 2013).

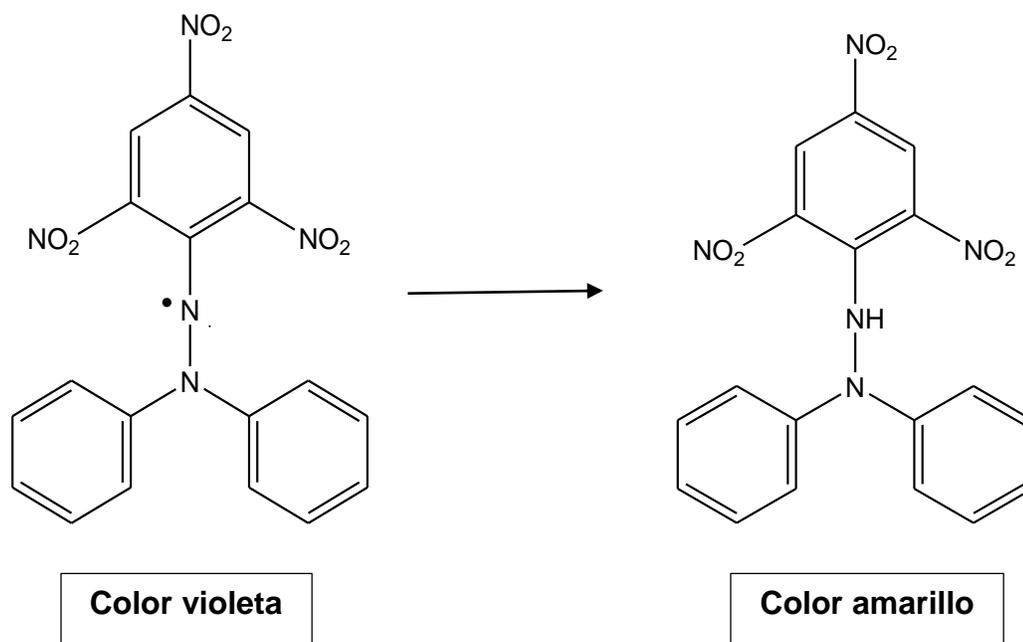


Figura 15. Estructura del radical DPPH y su forma oxidada.



1.5.2 Método ORAC

El ensayo de ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, por sus siglas en inglés) mide la capacidad de donación del átomo de hidrógeno de un antioxidante a un radical libre peróxido, formando una asociación estable de tal manera que se detiene la reacción de oxidación en cadena. Por lo tanto, es un método basado en transferencia de átomos de hidrógeno (Shahidi & Zhong, 2015; Zapata, 2014).

En este ensayo se utiliza el compuesto diazo AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro) para generar radicales peróxido que reaccionan con fluoresceína como sustrato, como resultado de tal reacción, la fluorescencia disminuye a través del tiempo, generándose un área bajo la curva. Cuando la reacción tiene lugar en presencia de antioxidantes, el área bajo la curva se incrementa en forma lineal y proporcional a la capacidad antioxidante, ya que la presencia de antioxidantes retrasa el descenso de la fluorescencia (Sotelo *et al.*, 2015).

Un antioxidante estándar que usualmente se emplea como referencia es el trolox, por lo que los valores de ORAC de los antioxidantes probados se informan como equivalentes de trolox (Shahidi & Zhong, 2015).

1.5.3 Método FRAP

El ensayo FRAP es un método típico basado en transferencia de electrones (TE) que mide la reducción del complejo de ion férrico (Fe^{3+}) ligando al complejo ferroso de color azul intenso (Fe^{2+}) mediante antioxidantes en medios ácidos. La actividad antioxidante se determina como el aumento de la absorbancia a 593 nm, y los resultados se expresan como equivalentes micromolares de Fe^{2+} o relativos a un estándar antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002). A diferencia de otros métodos basados en TE, el ensayo FRAP se lleva a cabo en condiciones de pH ácido (pH 3,6) para mantener la solubilidad del hierro (Hegerman *et al.*, 1998; Shahidi & Zhong, 2015).



1.6 Evaluación de la estabilidad oxidativa de un aceite

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos ya que estos son susceptibles a los procesos oxidativos en presencia de catalizadores como calor, luz, enzimas, metales, metaloproteínas y microorganismos, dando lugar al desarrollo de sabores desagradables en los alimentos y la pérdida de aminoácidos esenciales, vitaminas liposolubles y otras moléculas bioactivas (Shahidi & Zhong, 2005).

Los lípidos pueden oxidarse a través de procesos complejos de autooxidación, fotooxidación y oxidación térmica, la mayoría de los cuales implican radicales libres y/u otras especies reactivas como intermedios (Vercellotti *et al.*, 1992; Shahidi, 2000). La autooxidación es el proceso más común entre todos y se define como la reacción espontánea de los lípidos con el oxígeno atmosférico a través de una reacción en cadena de radicales libres que avanza a través de tres etapas: iniciación, propagación y terminación, lo que lleva a una serie de cambios químicos complejos (Shahidi & Zhong, 2010).

La estabilidad oxidativa puede determinarse midiendo en un periodo de inducción los siguientes parámetros: valor de peróxidos, dienos conjugados, cantidad de carbonilos, y compuestos volátiles. La oxidación es un proceso lento y se mantiene uniforme en el proceso de inducción. Después del periodo de inducción, la oxidación de los lípidos es rápida lo que provoca el deterioro del aceite (Bartee *et al.*, 2007). Entre los principales métodos para evaluar la calidad de un aceite se encuentran:

1.6.1 Índice de peróxidos

La oxidación lipídica involucra la producción de radicales libres, formando compuestos iniciales de peróxidos e hidroperóxidos que se transforman en productos secundarios de la oxidación, como aldehídos y cetonas, responsables del olor y sabor a rancio (Belén *et al.*, 2007). Se expresa en miliequivalentes de peróxido por kilogramo de muestra.



1.6.2 Índice de yodo

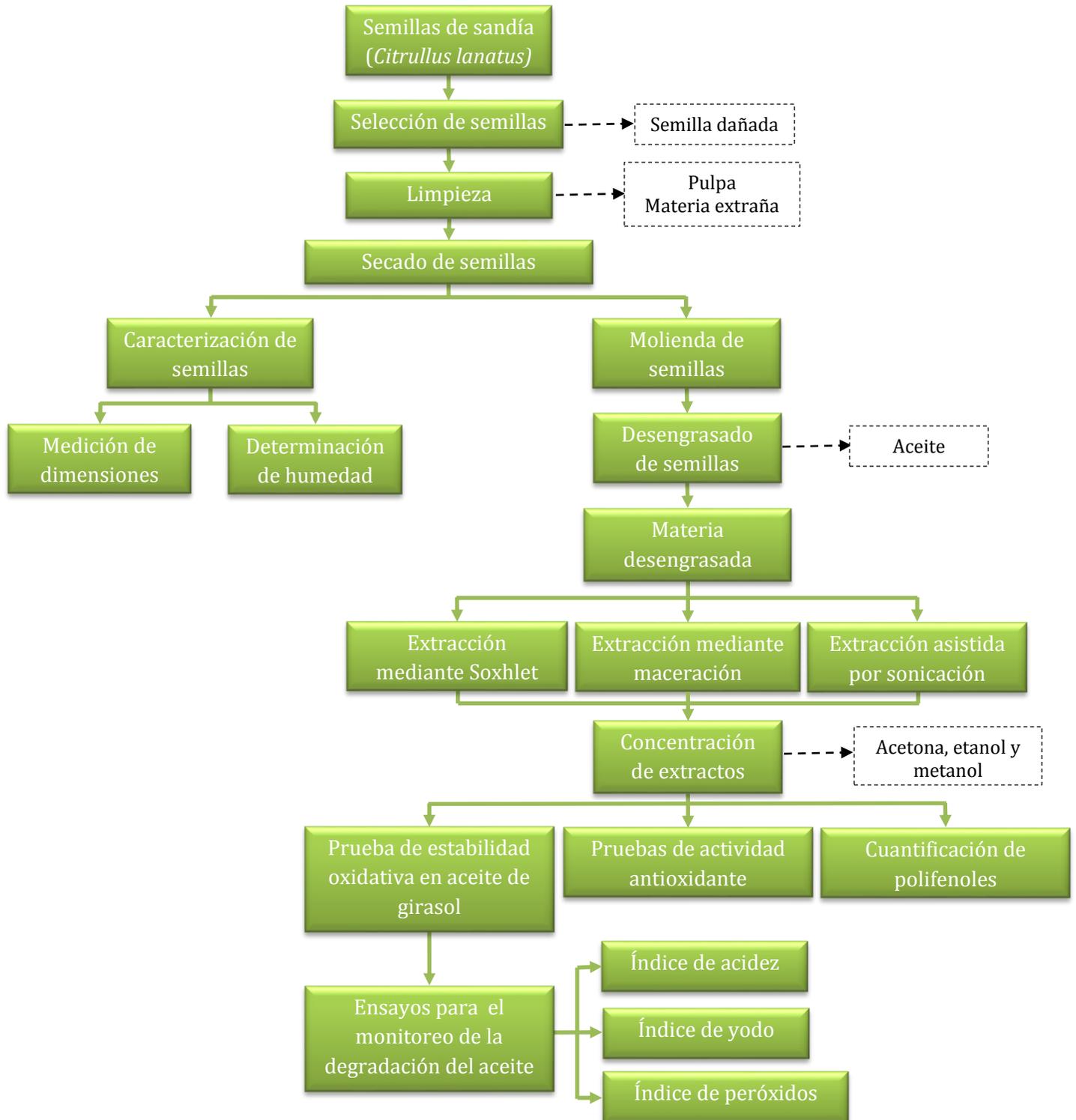
El índice de yodo permite valorar la insaturación total de un aceite o grasa, se expresa en miligramos de yodo que reaccionan por gramo de aceite (Ferrari *et al.*, 2011). El monitoreo de este parámetro permite analizar la pérdida de insaturaciones en los triacilgliceroles, dado que, en las reacciones de oxidación, la dobles ligaduras son susceptibles a ser atacadas por radicales libres para la formación de nuevos compuestos (Moreno *et al.*, 2007).

1.6.3 Índice de acidez

El índice de acidez es una medida de los ácidos grasos libres contenidos en el aceite o grasa y ácidos de degradación. Se expresa en mg de KOH necesario para neutralizar un gramo de aceite. Caracteriza el grado de envejecimiento del aceite durante el almacenamiento, ya que aumenta gradualmente debido a la degradación del aceite (Ferrari *et al.*, 2011).



CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA





2.1 Equipos, reactivos y disoluciones

Equipos:

- Balanza analítica (Scientech, modelo SAT 20)
- Equipo de Soxhlet
- Evaporador rotatorio Buchi modelo R-124
- Lector de microplacas con dispensadores automáticos (BioTek®, modelo Synergy 2)
- Licuadora (Oster®, modelo 6640-13)
- Sonicador Ultrasonic Cleaner (Sper Scientific modelo 10004, Frecuencia 42 KHz, 60 W)
- Termobalanza (Ohaus, modelo MB35)
- Vernier (Petru)

Reactivos y disoluciones:

- Acetona
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)
- Ácido acético
- Ácido gálico
- Agua destilada
- Butilhidroxitolueno (BHT)
- Diclorometano
- Disolución de carbonato de sodio al 20%
- Disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu 1/10 (v/v)
- Etanol
- Fenofaleína
- Hexano
- Hidróxido de potasio
- Metanol
- Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Reactivo de Wijs
- Solución de almidón al 1%
- Tiosulfato de sodio
- Yoduro de potasio



2.2 Materia prima

La investigación se realizó a partir de una muestra de semillas de sandía (*Citrullus lanatus*), adquiridas de residuos caseros en la Ciudad de México, aproximadamente 200 gramos.

2.3 Selección, limpieza y secado de las semillas de sandía (*Citrullus lanatus*)

Las semillas obtenidas fueron lavadas con la finalidad de retirar residuos de pulpa para después descartar aquellas con daños físicos. Posterior a su limpieza y selección, las semillas fueron colocadas en papel absorbente y se dejaron secar por un periodo de siete días a temperatura ambiente, evitando la luz solar.

2.4 Caracterización de semilla

De manera aleatoria se tomó una muestra de 30 semillas y con ayuda de un Vernier marca Petrul se tomaron las dimensiones de largo, ancho y espesor de cada una. Se pesó cada semilla en una balanza analítica marca Scientech, modelo SAT 20. Una vez obtenidos los datos, se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada dimensión.

2.5 Molienda y determinación de humedad de la semilla

Aleatoriamente se tomó una muestra de semillas de sandía la cual se sometió a un proceso de molienda, se utilizó para ello una licuadora marca Oster modelo MB-35, inmediatamente después se tamizó en una malla No.20, realizado lo anterior se colocó en una bolsa de plástico y se agitó vigorosamente para homogenizar la muestra.

La determinación de humedad se llevó a cabo colocando 1 gramo de semilla molida extendida uniformemente en todo el plato de una termobalanza marca Ohaus modelo MB35 a una temperatura de 95°C (NMX-F-428-1982, 1982).



2.6 Desengrasado de las semillas de sandia

2.6.1 Método de Soxhlet

La extracción de la materia grasa de las semillas se realizó mediante el método de extracción por Soxhlet. Se tomó una muestra de semilla molida de 25 gramos aproximadamente y se colocó en un cartucho de papel filtro, el cual se depositó dentro del equipo Soxhlet, como disolvente se emplearon 300 mL de hexano. El proceso de desengrasado se efectuó en un periodo de 6 horas para llevar a cabo una extracción exhaustiva de los lípidos (Ismail *et al.*, 2010). Transcurrido el tiempo de extracción, el extracto hexánico fue retirado del equipo Soxhlet y secado con Na_2SO_4 anhidro, el sólido fue separado mediante una filtración empleando papel Whatman No.4. Efectuado lo anterior, el extracto hexánico se dispuso en un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R-124, con la finalidad de concentrar el aceite obtenido de las semillas (Abu *et al* 2013). El extracto se pesó varias veces hasta que se obtuvo un peso constante. Finalmente se calculó el rendimiento del aceite.

2.6.2 Método de maceración

En un matraz bola con capacidad de 1 L se colocó una muestra de 40 g de semilla de sandía molida, posteriormente se adicionaron 400 mL de hexano, se agitó vigorosamente para asegurar la homogenización de la mezcla y ésta se dejó reposar durante 24 horas. Finalizado el tiempo de reposo, se separó la fase líquida de la fase sólida, mediante decantación, y posteriormente se realizó una filtración utilizando papel Whatman No.4. El extracto obtenido se sometió a evaporación a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R-124 a 60°C (Figura 16) con el fin de eliminar el disolvente. Se efectuó un total de 3 extracciones, las cuales se reunieron y se determinó el rendimiento una vez que el aceite se encontró libre de disolvente (Reyes *et al.*, 2014).



Figura 16. Evaporación del disolvente a presión reducida mediante rotaevaporador Büchi modelo R-124.

2.7 Extracción de posibles compuestos antioxidantes

2.7.1 Método de extracción mediante Soxhlet

La extracción de posibles antioxidantes se llevó a cabo de manera secuencial con tres disolventes, en orden de polaridad creciente: acetona, etanol y metanol.

Se pesaron por triplicado 25 gramos de semilla desengrasada y se colocaron en cartuchos de celulosa, que fueron depositados en el equipo Soxhlet, se adicionaron en el matraz bola 300 mL de acetona y se dejó en reflujo por 6 horas (Figura 17). Al finalizar el tiempo de extracción, la acetona se recuperó mediante evaporación a presión reducida usando para ello un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R-124. Finalmente el rendimiento del extracto acetónico se calculó (Ismail *et al.*, 2010; Porto *et al.*, 2013).



Este mismo procedimiento se efectuó empleando etanol y posteriormente metanol. Los extractos se guardaron en viales color ámbar y se conservaron en refrigeración para evitar la degradación de antioxidantes.

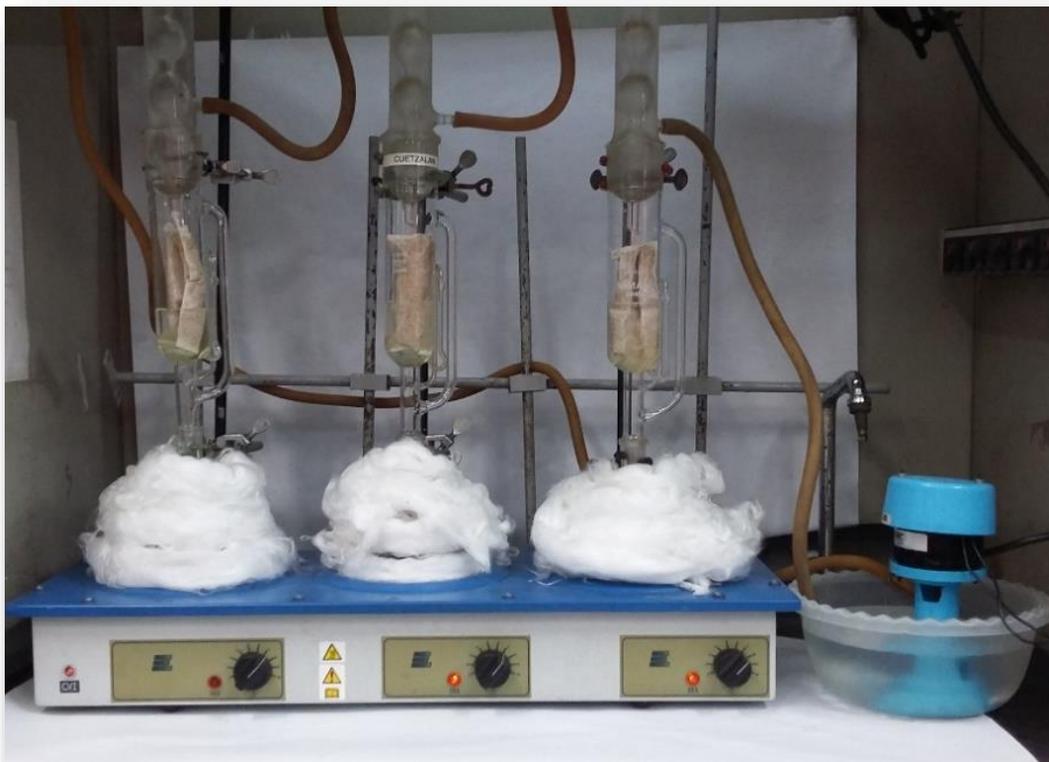


Figura 17. Extracción de posibles compuestos antioxidantes con el equipo Soxhlet.

2.7.2 Método de extracción mediante maceración

La extracción de antioxidantes por maceración también se llevó a cabo de manera secuencial con tres disolventes, en orden de polaridad creciente: acetona, etanol y metanol.

En un matraz bola con capacidad de 1 L se colocaron 40 g de semilla molida (proveniente del desengrasado por el método de maceración), posteriormente se adicionaron 400 mL de acetona, se agitó vigorosamente para asegurar la homogenización de la mezcla y se dejó reposar durante 24 horas (Figura 18).



Se separaron las fases líquida y sólida mediante una decantación y posteriormente se llevó a cabo una filtración con papel Whatman No.4. Una vez obtenida la fase líquida, esta se evaporó a presión reducida a menos de 50°C en un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R-124 (Zhang, 2011). Se realizó un total de tres extracciones que posteriormente se reunieron. Finalmente se realizó el cálculo de rendimiento.

El mismo procedimiento se efectuó empleando etanol y posteriormente metanol.



Figura 18. Extracción de posibles antioxidantes por maceración.

2.7.3 Método de extracción asistida por sonicación

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 10 gramos de semilla molida desengrasada y se adicionaron 40 mL de metanol. Las muestras se agitaron manualmente para homogenizar la mezcla y posteriormente se trataron con un Sonicador Ultrasonic Cleaner (Sper Scientific modelo 10004, Frecuencia 42 KHz, 60 W) durante 30, 45, 60 y 75 minutos respectivamente a una temperatura de 25°C (Figura 19).



Terminando el tiempo indicado, cada muestra se filtró utilizando papel Whatman No.4 para después eliminar el disolvente en un evaporador rotatorio a presión reducida. Los extractos se pesaron para después calcular el rendimiento (Iqbal *et al.*, 2010) y posteriormente se colocaron en viales color ámbar para luego ser guardados en refrigeración evitando así la degradación de los antioxidantes.



Figura 19. Extracción de posibles compuestos antioxidantes asistida por sonicación.



2.8 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

En todos los casos, los extractos obtenidos por los diferentes métodos llevaron una preparación previa a la cuantificación de polifenoles y a la evaluación de actividad antioxidante. En un vaso de precipitados de 10 mL se pesaron aproximadamente 0.1 gramos de extracto y se añadieron 5 mL de metanol al 80%, se agitó vigorosamente y una vez disuelto el extracto se adicionó a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol al 80%.

La cuantificación de posibles compuestos polifenólicos se llevó a cabo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Zhang *et al* 2006, Siddhuraju, 2007) realizando algunas modificaciones y empleando el Lector de microplacas con dispensadores automáticos (Bio Tek, modelo Synergy 2).

Inicialmente se llevaron a cabo una serie de pruebas presuntivas las cuales consistieron en adicionar 25 μ L de extracto original en un pozo de la microplaca seguido de 30 μ L de solución de carbonato de sodio al 20%, 125 μ L de agua destilada y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó la mezcla y posteriormente se dejó reposar por un espacio de 30 minutos en la oscuridad.

Después de encontrar la concentración adecuada, se realizaron diluciones de esta solución en tubos Eppendorf. Se colocaron 25 μ L de cada dilución en diferentes pozos de la microplaca y consecutivamente se adicionaron en cada pozo 30 μ L de solución de carbonato de sodio al 20%, 125 μ L de agua destilada y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego de una agitación vigorosa se dejó reposar la microplaca en la oscuridad por un periodo de 30 minutos para posteriormente ser analizada en el lector de microplacas Sinergy 2.

Se elaboró una curva patrón de ácido gálico para cuantificar los polifenoles, se adicionaron aproximadamente 0.0125 gramos de ácido gálico y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se adicionó agua destilada hasta el aforo.



Posteriormente se hicieron diluciones de esta solución en tubos Eppendorf obteniendo las siguientes concentraciones: 0.22, 0.2, 0.18, 0.16, 0.14, 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04 y 0.02 mg/mL de ácido gálico.

En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 25 μ L de cada dilución, para llevar a cabo la reacción se adicionaron 30 μ L de solución de carbonato de sodio al 20%, 125 μ L de agua destilada y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se agitó y en la oscuridad se dejó reposar por 30 minutos, terminando el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Esta prueba se desarrolló en un lector de microplacas marca BioTek, modelo Synergy 2 con dispensadores automáticos (Figura 20).

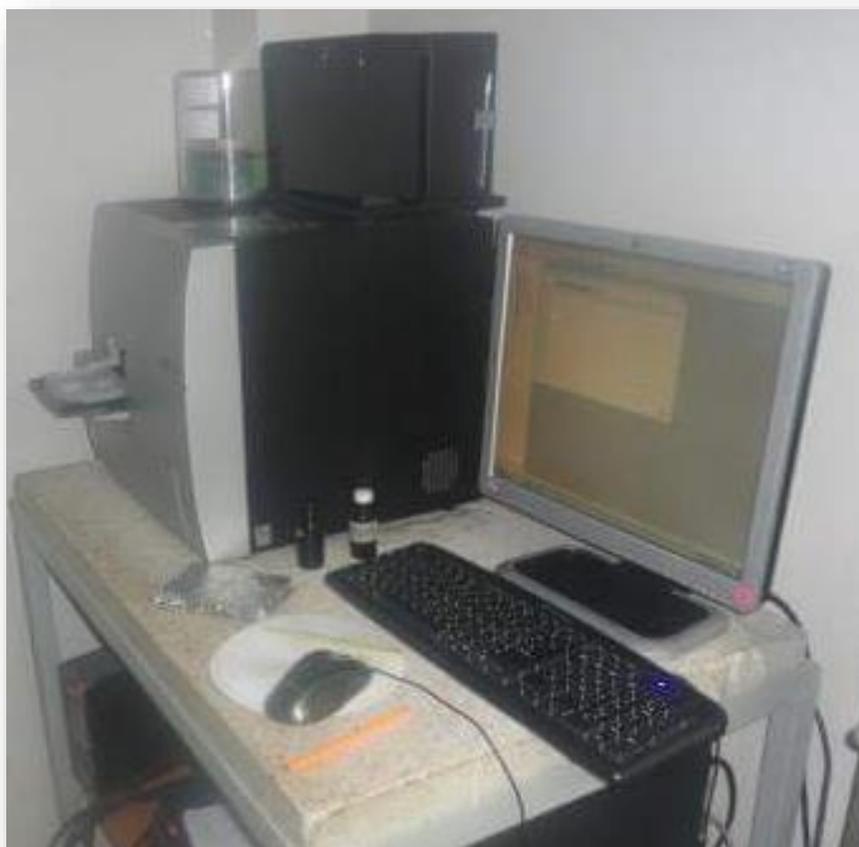


Figura 20. Lector de microplacas con dispensadores automáticos (Bio Tek, modelo Synergy 2).



2.9 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

La actividad antioxidante se evaluó llevando a cabo el ensayo de la capacidad de remoción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH por sus siglas en ingles) de acuerdo al método de Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995 y a las modificaciones de Cheng *et al.*, 2006.

Para llevar a cabo el método de DPPH, se pesaron 0.0197 gramos de DPPH y se disolvieron con 1 mL de acetona, después esta mezcla se adicionó a un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se aforó con metanol al 80% obteniendo una concentración de 0.4998 mM de DPPH.

El ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), es un compuesto hidrosoluble que se utilizó como referencia para elaborar la curva patron de esta prueba. Se partió de un stock de trolox de 1000 μM , posteriormente se realizaron diferentes diluciones para obtener las siguientes concentraciones: 49.94 μM , 99.88 μM , 149.82 μM , 199.77 μM , 299.65 μM , 399.54 μM , 499.42 μM .

En el caso de los diferentes extractos se realizaron diluciones para llegar a la concentración idónea y posteriormente de la solución tomando diferentes alícuotas las cuales fueron de 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL , 600 μL , 700 μL , 800 μL , 900 μL y 1000 μL y se aforaron a un mililitro con metanol al 80%.

En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 200 μL de cada concentración del extracto, 200 μL de disolución del reactivo de referencia (trolox), como control 200 μL de disolvente, el dispensador automático suministró 50 μL del reactivo de DPPH a cada pozo y como blanco de reactivos para desarrollar la prueba se adicionaron 250 μL de disolvente. La microplaca con muestras se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad para después medir la absorbancia a 515 nm. La prueba se realizó por cuadruplicado para cada muestra.



El cálculo de actividad antioxidante se expresó como IC₅₀ que es la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de radicales libres (DPPH) añadidos. En este método se hizo un comparativo entre las muestras contra un estándar (trolox), a través de un modelo matemático de regresión lineal (Cheng *et al.*, 2006).

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

De igual manera que en la cuantificación de polifenoles, se llevó a cabo un análisis estadístico de ANOVA y prueba de Tukey para observar si existe diferencia significativa entre el uso de diferentes disolventes para la obtención de los antioxidantes.



2.10 Evaluación de la estabilidad oxidativa en aceite de girasol adicionando el extracto de semilla de sandía residual (*Citrullus lanatus*) como posible antioxidante.

Después de analizar estadísticamente los resultados de actividad antioxidante de los extractos obtenidos, se eligió aquél que presentó el valor más alto de actividad antioxidante.

Para el estudio de estabilidad oxidativa se utilizó una muestra de aceite de girasol extra-virgen de la marca LIQUIDS® lote-701027316381. Ésta muestra se dividió en tres lotes de 120 gramos respectivamente.

En el primer lote se adicionaron 0.0181 g del extracto de semilla de sandía (*Citrullus lanatus*), el cual fue previamente disuelto en 5 mL de etanol para incorporarlo al aceite. Una vez adicionado el extracto al aceite, la mezcla se agitó por 48 horas y se dejó reposar por 2 horas.

En el segundo lote se llevó a cabo el mismo procedimiento sin embargo en esta ocasión se adicionó como antioxidante 0.018 gramos de BHT.

En ambos casos tanto la adición de extracto y BHT en el aceite, se consideró la norma NMX-F-223-SCFI-2011, 2011 para cumplir con los límites permitidos para este aditivo alimentario (200 ppm).

Al tercer lote de aceite no se adicionó ningún tipo de antioxidante, se agitó por 48 horas y se dejó en reposo por 2 horas más, ya que éste sirvió como la muestra control en el estudio.

Se emplearon tres grupos de viales color ámbar. A cada vial del primer grupo se le adicionaron 20 g del aceite sin antioxidante. En el segundo grupo se depositaron 20 g de aceite con extracto de sandía. Al tercer grupo de viales se agregaron 20 g del aceite con BHT.



Los viales fueron sometidos a condiciones de temperatura de 55°C por 35 días en incubadora y se efectuaron monitoreos cada 7 días durante 28 días, determinando el índice de acidez, índice de yodo, e índice de peróxidos (Chong *et al.*, 2015), lo anterior se realizó por triplicado para cada muestra de aceite.

2.10.1 Índice de peróxidos

Como referencia se utilizó la norma NMX-F-154-SCFI-2010, 2010. Se pesaron 3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se disolvió la muestra en 30 mL de una solución de ácido acético con diclorometano (3:2). Se adicionaron a la mezcla anterior 0.5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio, después de un minuto de reposo se adicionaron 30 mL de agua destilada, se tituló con una solución de tiosulfato de sodio 0.05674 N y se usó una solución de almidón al 1% como indicador. El resultado se expresa en meq de peróxido/kg de aceite.

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

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

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

2.10.2 Índice de yodo

En la determinación de índice de yodo, se usó como referencia la norma NMX-F-152-SCFI-2011, 2011. Se pesaron 0.05 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 mL previamente cubierto con papel aluminio (para impedir el paso de la luz), se adicionaron 5 mL de diclorometano y 5 mL de reactivo de Wijs. Se homogenizó la mezcla y se dejó reposar en un lugar oscuro por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 5 mL de una solución de yoduro de potasio al 10% y 50 mL de agua destilada. La mezcla anterior se agitó y tituló con una solución de tiosulfato



de sodio de concentración 0.05674 N, hasta obtener una coloración amarillo paja, posteriormente se adicionó 1 mL de una solución de almidón al 1% que se utilizó como indicador, se continuo la titulación hasta quedar una solución incolora. El blanco de reacción se realizó aplicando la metodología anterior pero sin adicionar muestra. El resultado se expresa como centigramos de yodo/g de aceite.

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

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

2.10.3 Índice de acidez

En esta determinación se usó como referencia la norma NMX-F-101-SCFI-2012, 2012. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se colocó 1 g de muestra con 20 mL de etanol absoluto y seis gotas de fenolftaleína. Se sometió a calentamiento de 50°C para después titularse con una solución de hidróxido de potasio 0.0075 N, la titulación se terminó al llegar a una coloración estable (con duración de 30 segundos de acuerdo a la norma) rosa pálido dentro del matraz. Para calcular el índice de acidez se aplicó la siguiente ecuación:

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

En donde V_1 es el volumen de KOH usado en 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 factor de referencia al ácido oleico, debido a que este ácido graso es el que se encuentra en mayor proporción en el aceite utilizado.



2.11 Análisis estadístico

Una vez terminadas las pruebas de estabilidad oxidativa durante el tiempo propuesto, se realizó un análisis estadístico para comparar la función como antioxidante en una matriz alimentaria entre el extracto de semilla de sandía residual (*Citrullus lanatus*) y el antioxidante sintético (BHT).

En este análisis se utilizó el programa de análisis estadístico R Project versión 3.4.0 para comparar resultados y comprobar si existe diferencia significativa entre las muestras. Se elaboró un análisis de varianza (ANOVA) con valor de significancia de 0.05 y la comparación de medias se realizó por Tukey (R Core Team, 2017).



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Características físicas de la semilla de sandía residual (*Citrullus lanatus*)

Las semillas de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*) presentaron una forma elíptica y puntiaguda en uno de sus extremos, con pericarpio de color negro y textura lisa, cuyas dimensiones de peso, largo, ancho y espesor se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Caracterización física de las semillas de sandía (*Citrullus lanatus*).

	Peso (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Espesor (cm)
Promedio	0.0561	0.89	0.6	0.18
Desviación St	0.0067	0.04	0.03	0.02
Varianza	4.497E-05	16.09E-04	11.80E-04	5.41E-04

*Los valores reportados representan el promedio de 30 semillas.

Como se puede observar en la tabla 3, las semillas de sandía mexicana tienen dimensiones ligeramente más pequeñas comparadas con las semillas de sandía cultivada en Irán (longitud = 0.913-1.006 cm, ancho = 0.641-0.677 cm, espesor = 0.218-0.222 cm) (Seyed *et al.*, 2006). La diferencia entre las dimensiones de las semillas se debe a las condiciones geográficas del lugar en donde fueron recolectadas (Solmaz & Sari, 2008).

3.2 Humedad y extracción de aceite

La humedad se determinó utilizando como referencia la norma NMX-F-428-1982, empleando la termobalanza se obtuvo el porcentaje de humedad de 6.2% que concuerda con el reportado de 6-7% (Banerjee, *et al.*, 2017). Sin embargo se debe considerar que el valor reportado se obtuvo con el método de estufa convencional.

El rendimiento en extracción de aceite mediante Soxhlet fue de 20.57% mientras que por maceración fue de 24.69%.



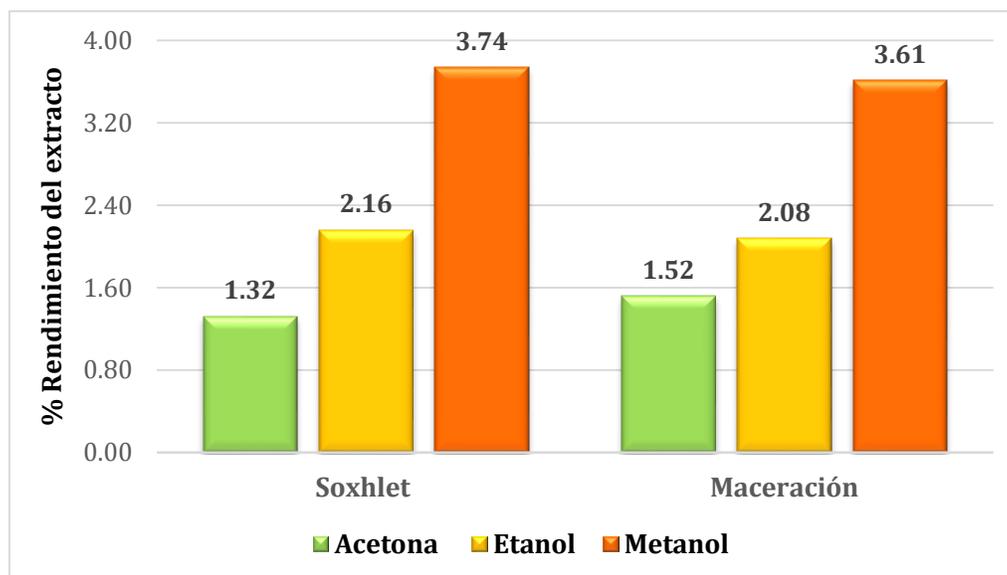
3.3 Rendimiento de los extractos obtenidos con disolventes polares

Una vez desengrasada la harina de semilla de sandía (*Citrullus lanatus*), se llevó a cabo la extracción de posibles compuestos fenólicos mediante las técnicas de Soxhlet, maceración y sonicación, usando como disolventes: acetona, etanol y metanol.

- **Extracción asistida por Soxhlet y maceración**

En cada método de extracción (Soxhlet y maceración), se emplearon tres disolventes orgánicos en orden de mayor a menor polaridad: acetona, etanol y metanol, para llevar a cabo una extracción secuencial.

El rendimiento de cada extracción se presenta en la Grafica 1, en donde se observa que la mayor cantidad de extracto se obtuvo empleando metanol como disolvente en ambas técnicas de extracción, sin embargo, la extracción por Soxhlet fue la mejor técnica utilizada, ya que, se obtuvieron los mayores rendimientos comparado con la técnica de maceración.

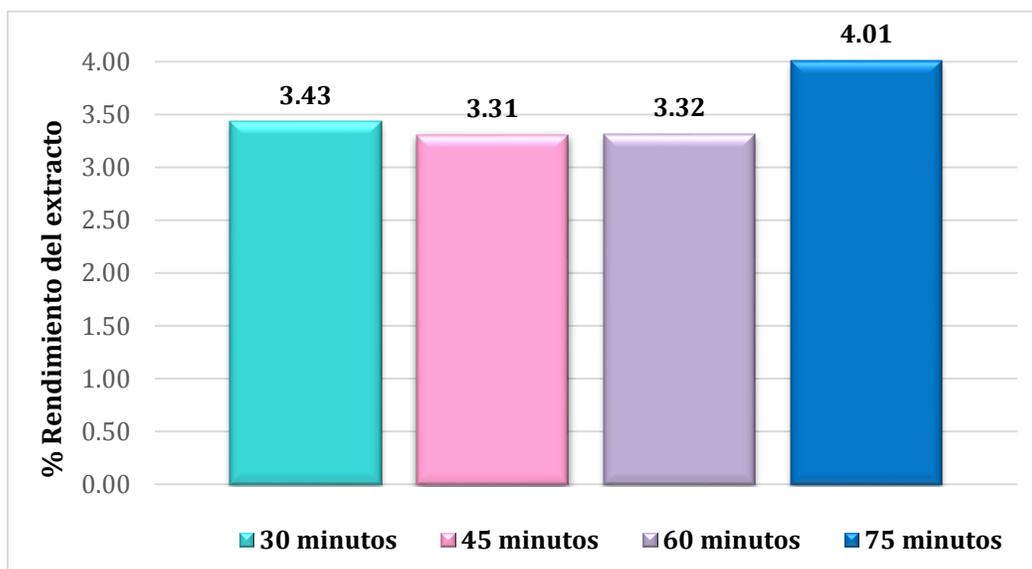


Gráfica 1. Rendimiento de los extractos de la semilla de sandía (*Citrullus lanatus*), empleando las técnicas de Soxhlet y maceración, con diferentes disolventes.



- **Extracción asistida por ultrasonido**

En la extracción asistida por ultrasonido se empleó metanol como disolvente y se llevó a cabo a diferentes tiempos (30, 45, 60 y 75 minutos). Como se observa en la Gráfica 2, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo a los 75 minutos de sonicación.



Gráfica 2. Rendimiento de los extractos de semilla de sandía (*Citrullus lanatus*) asistida por sonicación a diferentes tiempos, empleando metanol como disolvente.

Considerando los métodos de extracción utilizados (Soxhlet, maceración y sonicación), el orden de mayor a menor % de rendimiento de extracción quedaría de la siguiente manera: 4.01% sonicación metanol 75 min > 3.74% Soxhlet metanol > 3.61% maceración metanol. Concluyendo que el mejor método de extracción fue el de sonicación a los 75 minutos, esto puede explicarse debido a que este método tiene efectos de cavitación que favorecen la penetración del disolvente en la célula, provocando la liberación de los compuestos fenólicos a través de la ruptura de las paredes celulares de la matriz (Roselló *et al.*, 2015).



3.4 Cuantificación de compuestos polifenólicos por el método de Folin-Ciocalteu

Los compuestos polifenólicos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal, se ubican en toda la planta (Oroian & Escriche, 2015). Diversos estudios han encontrado que las semillas de sandía contienen importantes compuestos bioactivos, entre ellos polifenoles, los cuales tienen actividad antioxidante (Rahman *et al.*, 2013). Por lo anterior, se investigó el contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos, mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Zhang *et al* 2006, Siddhuraju, 2007).

En la tabla 4, se resumen los resultados obtenidos del contenido de polifenoles totales de los extractos de semilla de sandía, cada uno con su respectiva desviación estándar y comparación de medias.

Tabla 4. Polifenoles totales presentes en los extractos de semilla de sandía.

Técnica de extracción	Fenoles totales (mg de EAG/g de extracto)
Soxhlet acetona	34.922 ± 4.811 ^{ab}
Soxhlet etanol	59.879 ± 8.374 ^d
Soxhlet metanol	44.837 ± 6.753 ^{bc}
Maceración acetona	35.739 ± 5.379 ^{ab}
Maceración metanol	26.983 ± 2.304 ^a
Sonicación metanol 30 minutos	29.368 ± 2.338 ^a
Sonicación metanol 45 minutos	26.964 ± 0.587 ^a
Sonicación metanol 60 minutos	51.310 ± 5.734 ^{cd}
Sonicación metanol 75 minutos	51.498 ± 5.496 ^{cd}

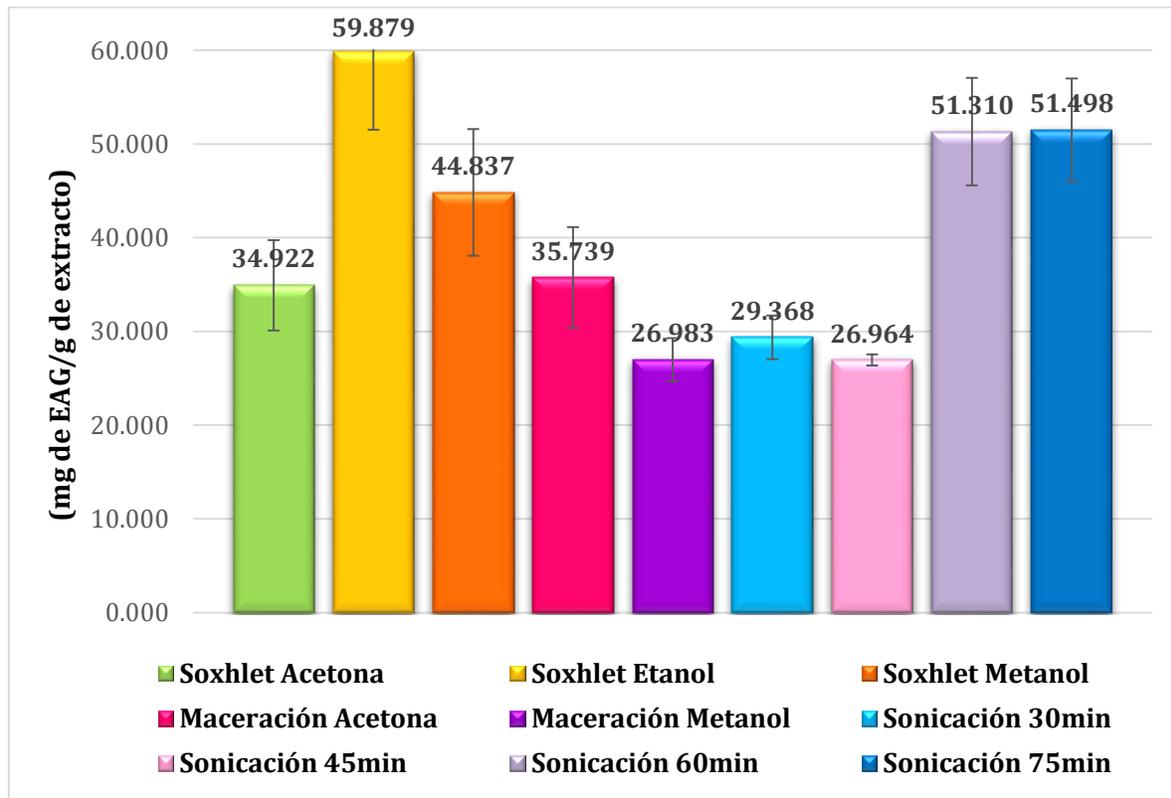
n = 3, promedio ± desviación estándar

Análisis estadístico por tipo de técnica de extracción. Superíndices ^{a-d} significan diferencia significativa ($p < 0.05$), donde el intervalo va desde **a** (menor contenido), hasta **d** (mayor contenido).



Específicamente con el método de Soxhlet se obtuvo mayor contenido de polifenoles usando etanol, obteniéndose 59.879 ± 8.374 mg de EAG/g de extracto. Por otro lado, con el método de maceración el disolvente con mayor extracción fue acetona con 35.739 ± 5.379 mg de EAG/g de extracto, cabe mencionar que al emplear etanol con ésta técnica, no fue posible obtener resultados. Finalmente con la técnica de sonicación utilizando metanol, el tiempo óptimo para extraer la mayor cantidad de polifenoles fue a los 75 minutos obteniendo 51.498 ± 5.496 mg de EAG/g de extracto y a los 60 minutos con 51.310 ± 5.734 mg de EAG/g de extracto, entre estos dos tiempos de sonicación no hubo diferencia significativa.

La cantidad de polifenoles totales de los extractos obtenidos por las técnicas de extracción: Soxhlet, maceración y sonicación con los disolventes: acetona, etanol y metanol, se muestran en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Polifenoles totales en los extractos de semilla de sandía residual (*Citrullus lanatus*), empleando diferentes métodos de extracción: Soxhlet, maceración y sonicación.



Comparando los resultados obtenidos de todos los extractos, se observa que la mayor cantidad de polifenoles totales fue a partir del extracto obtenido con Soxhlet empleando etanol (59.879 mg de EAG/g de muestra), seguido por sonicación con metanol a 75 minutos (51.498 mg de EAG/g de muestra) y sonicación con metanol 60 minutos (51.31 mg de EAG/g de muestra).

3.5 Evaluación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante mediante el método de eliminación de DPPH se informa como IC₅₀ que se define como la concentración de antioxidante efectiva necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Shahidi, 2015). Por lo anterior, a menor valor de IC₅₀ hay mayor actividad antioxidante.

En la tabla 5 se resumen los resultados de actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las semillas de sandía con su respectivo promedio y desviación estándar.

Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de semillas de sandía.

Técnica de extracción	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
Soxhlet acetona	2.020 ± 0.053 ^f
Soxhlet etanol	1.423 ± 0.016 ^e
Soxhlet metanol	0.753 ± 0.010^a
Maceración acetona	0.709 ± 0.008^a
Maceración metanol	0.839 ± 0.015 ^b
Sonicación metanol 30 minutos	1.054 ± 0.020 ^c
Sonicación metanol 45 minutos	1.199 ± 0.024 ^d
Sonicación metanol 60 minutos	1.224 ± 0.009 ^d
Sonicación metanol 75 minutos	0.994 ± 0.017^c

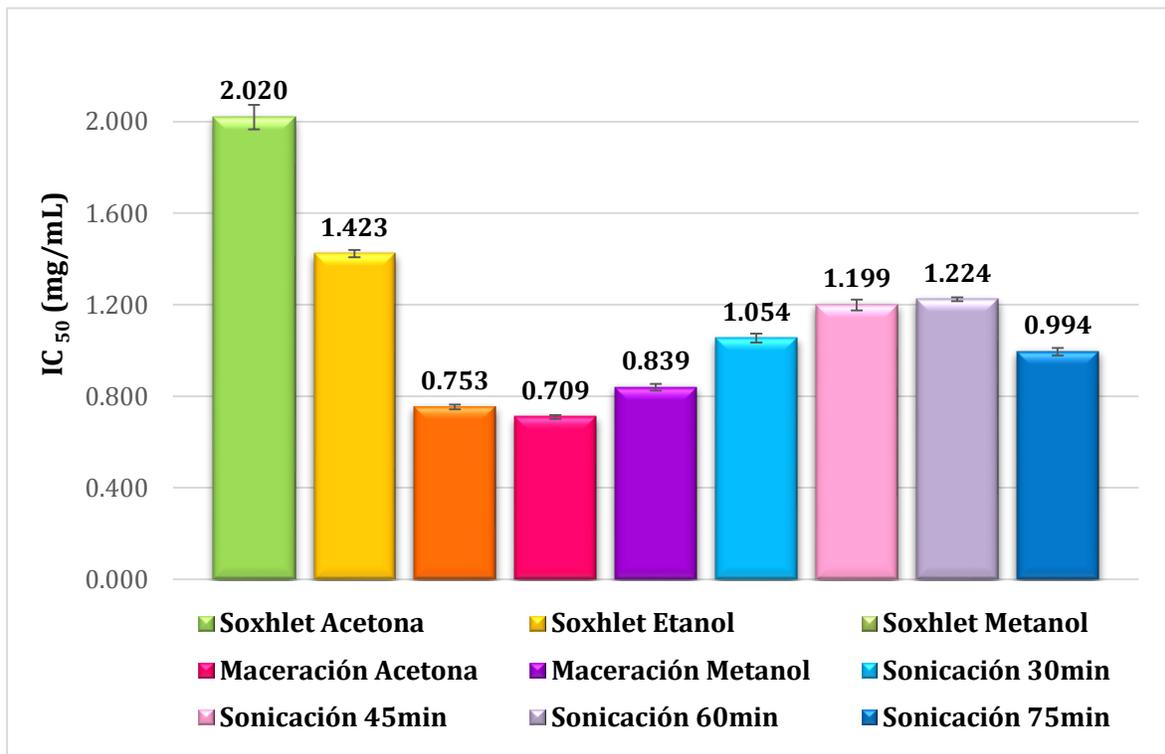
n = 4, promedio ± desviación estándar

Análisis estadístico por tipo de técnica de extracción. Superíndices ^{a-f} significan diferencia significativa (p<0.05), donde intervalo va desde **a** (mayor actividad), hasta **f** (menor actividad).



En particular, con la técnica de extracción por Soxhlet se observa que el extracto metanólico fue el que tuvo mayor actividad antioxidante, con un IC_{50} de 0.753 ± 0.010 mg/mL. En el caso de maceración, el extracto acetónico fue el que presentó mayor actividad antioxidante con un valor de IC_{50} igual a 0.709 ± 0.008 mg/mL. Mientras que con la técnica de sonicación a diferentes tiempos, se observó que el extracto con mayor actividad antioxidante fue el obtenido a los 75 minutos, obteniendo un valor de IC_{50} de 0.994 ± 0.017 mg/mL.

Los resultados que se muestran en la Gráfica 4 corresponden a los valores de IC_{50} de todos los extractos.



Gráfica 4. Actividad antioxidante presente en los extractos de semilla de sandía residual (*Citrullus lanatus*), empleando diferentes técnicas de extracción y disolventes.

Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los siguientes en orden descendiente: maceración con acetona > Soxhlet con metanol > maceración con metanol > sonicación con metanol 75 minutos.



Cabe mencionar que en este experimento no hay una relación directa entre la concentración de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos, por ejemplo como se muestra en la Tabla 4, el extracto obtenido a partir de Soxhlet con etanol presenta la mayor concentración de polifenoles totales (59.879 ± 8.374 mg de EAG/g de extracto), sin embargo no resultó tener la mayor actividad antioxidante (1.423 ± 0.016 mg/mL).

3.6 Estabilidad oxidativa del aceite de girasol

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos. Los lípidos son susceptibles a los procesos oxidativos en presencia de catalizadores como calor, generando hidroperóxidos y dienos conjugados como productos de oxidación primarios que posteriormente se degradan a productos secundarios como alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y epoxi compuestos, entre otros (Shahidi & Zhong, 2015).

El estudio de la estabilidad oxidativa se llevó a cabo con tres muestras: control (aceite de girasol extra-virgen), aceite de girasol adicionado con BHT y aceite de girasol adicionado con extracto de sandía. Las muestras se almacenaron en condiciones aceleradas a 55° C por un periodo de 28 días (Chong *et al.*, 2015), que equivale a 16 meses de almacenamiento a temperatura ambiente de acuerdo a Matthaéus, 2010.

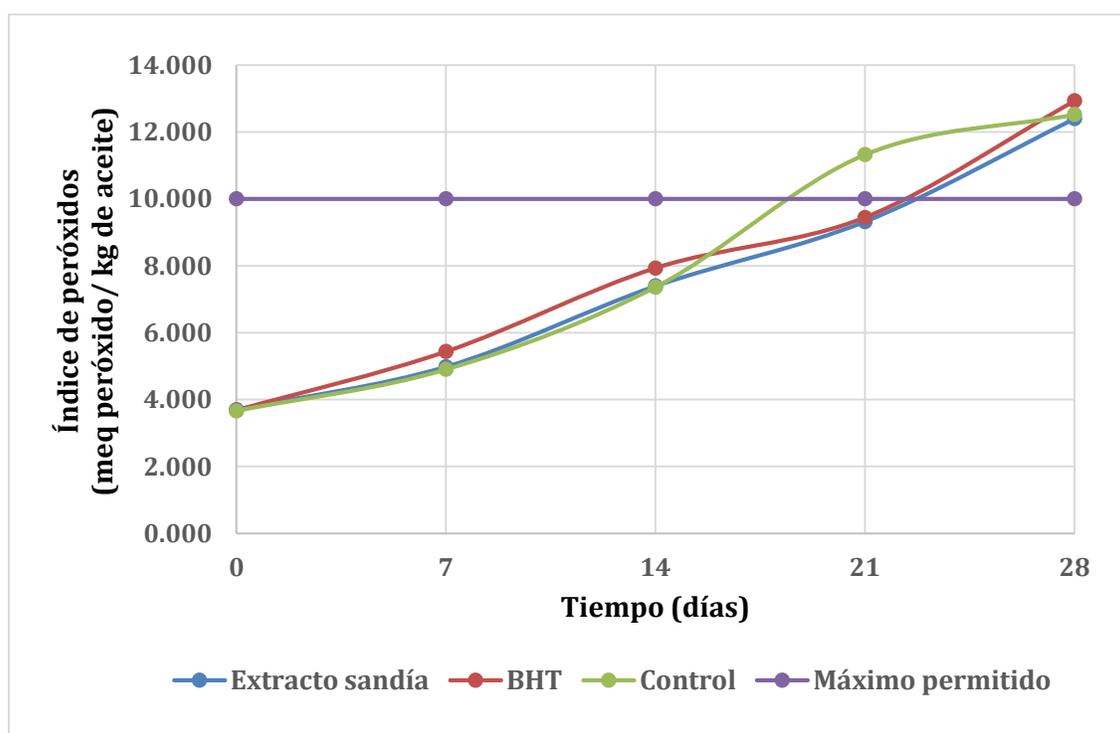
El extracto de sandía utilizado fue el obtenido con la técnica de sonicación a los 75 minutos empleando metanol. Los cambios oxidativos de las muestras almacenadas fueron monitoreados cada 7 días durante 28 días, determinando el índice de peróxidos, índice de yodo e índice de acidez.



3.6.1 Índice de peróxidos

En general, la oxidación de lípidos produce peróxidos como productos de primera generación que son inestables y se degradan a una amplia gama de productos secundarios incluidos compuestos volátiles y no volátiles (Shahidi & Zhong, 2015).

El índice de peróxidos (IP) es una de las pruebas más utilizadas en la determinación de la calidad de los aceites (O'Keefe & Pike, 2010).



Gráfica 5. Índice de peróxidos de las muestras a través del tiempo usando aceite de girasol como control, aceite de girasol adicionado con 150ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150ppm de BHT a 55°C por 28 días.

En la Gráfica 5 se puede observar que inicialmente las muestras de extracto de sandía, BHT y control, inician con un índice de peróxidos similar, el cual se incrementa de manera constante hasta el día 14, donde la muestra control presenta un mayor aumento en su IP, mientras que los valores de IP de las muestras de extracto de sandía y BHT aumentan, pero lo hacen de manera más lenta.



De acuerdo al Codex Alimentarius el valor máximo permitido de índice de peróxidos es de 10 meq peróxido/kg de aceite (**CODEX STAN 19-1981, 2015**), la muestra control alcanza este valor en el día 19 mientras que las muestras con extracto de sandía y BHT lo hacen en el día 23, por lo que la eficiencia del extracto y el BHT son iguales cualitativamente. En el día 28 los valores de IP de las tres muestras vuelven a ser similares.

En la tabla 6, se resumen los valores estadísticos del índice de peróxidos con su respectivo promedio y desviación estándar.

Tabla 6. Índice de peróxidos en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Índice de peróxidos (meq peróxidos/kg muestra)					
	0	7	14	21	28
Extracto	3.72±0.07 ^a	4.98±1.09 ^a	7.39±0.04 ^b	9.32±0.05 ^c	12.40±0.96 ^d
BHT	3.68±0.03 ^a	5.43±0.10 ^a	7.93±1.05 ^{bc}	9.45±0.02 ^c	12.93±0.27 ^d
Control	3.66±0.10 ^a	4.90±0.99 ^a	7.36±0.13 ^b	11.32±0.04 ^d	12.53±1.02 ^d

n=3, promedio ± desviación estándar

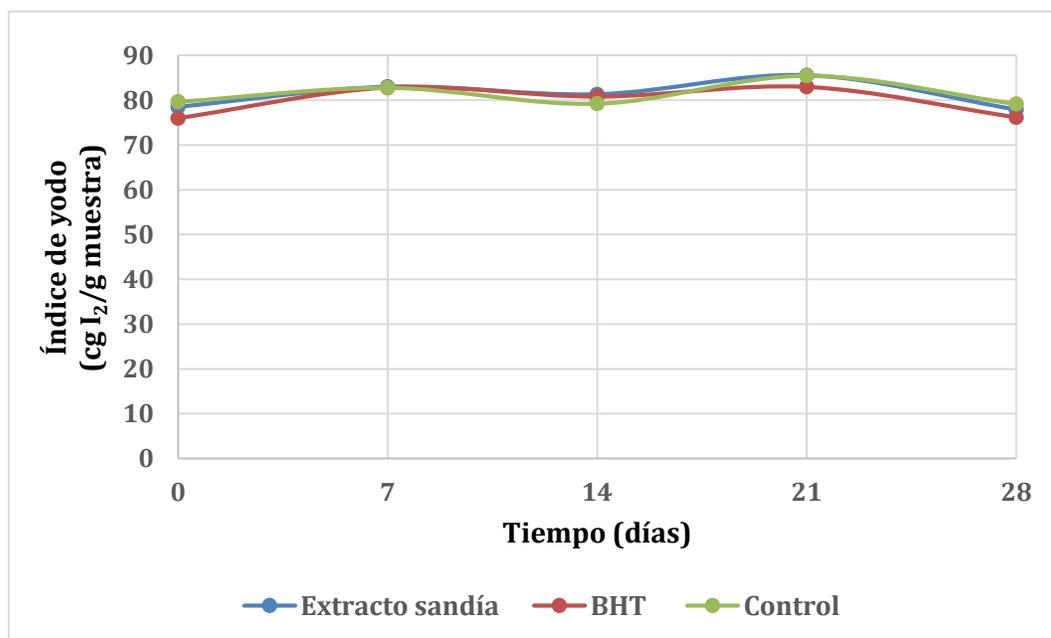
Análisis estadístico para índice de peróxidos. Subíndices ^{a-d} significan diferencia significativa ($p < 0.05$), donde el intervalo va desde **a** (menor índice), hasta **d** (mayor índice).

Puede observarse en la Tabla 6 que en el día 21 si existe diferencia significativa entre la muestra con extracto de sandía y el control, sin embargo, en el día 28 el valor de índice de peróxidos del control es significativamente igual que en los otros dos extractos. Por lo anterior se puede decir que la adición de extracto de sandía o BHT al aceite de girasol no afectó la estabilidad oxidativa del aceite en lo que a índice de peróxidos se refiere.



3.6.2 Índice de Yodo

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación, es decir, el número de dobles enlaces carbono-carbono en relación con la cantidad de aceite. Cuanto mayor es la cantidad de insaturación, más yodo se absorbe y mayor es el índice de yodo (O'Keefe & Pike, 2010).



Gráfica 6. Índice de yodo de las muestras a través del tiempo usando aceite de girasol como control, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.

En la Gráfica 6 se observa que en el día cero el índice de yodo para la muestra con BHT es ligeramente menor comparado con las muestras de control y con extracto de semilla de sandía, sin embargo, en los siguientes días, los valores de índice de yodo son muy similares y relativamente constantes hasta el día 28 en las tres muestras.

En la tabla 7, se resumen los valores estadísticos del índice de yodo con su respectivo promedio y desviación estándar.



Tabla 7. Índice de yodo en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Índice de yodo (centigramos de I ₂ /g muestra)					
	0	7	14	21	28
Extracto	78.50±1.51 ^{ac}	82.97±1.80 ^{ac}	80.86±0.80 ^{ac}	86.41±1.63 ^c	77.25±1.17 ^{ab}
BHT	75.95±3.83 ^a	82.80±2.16 ^{ac}	80.73±0.46 ^{ac}	84.19±2.55 ^{bc}	77.12±1.77 ^{ab}
Control	79.63±7.94 ^{ac}	82.76±1.18 ^{ac}	79.19±0.02 ^{ac}	86.44±2.08 ^c	79.76±1.10 ^{ac}

n=3, promedio ± desviación estándar

Análisis estadístico para índice de yodo. Subíndices ^{a-c} significan diferencia significativa (p<0.05), donde el intervalo va desde **a** (menor índice), hasta **c** (mayor índice).

En la tabla anterior se observa que no existe diferencia significativa entre los valores de índice de yodo, tanto entre muestras como entre días del monitoreo.

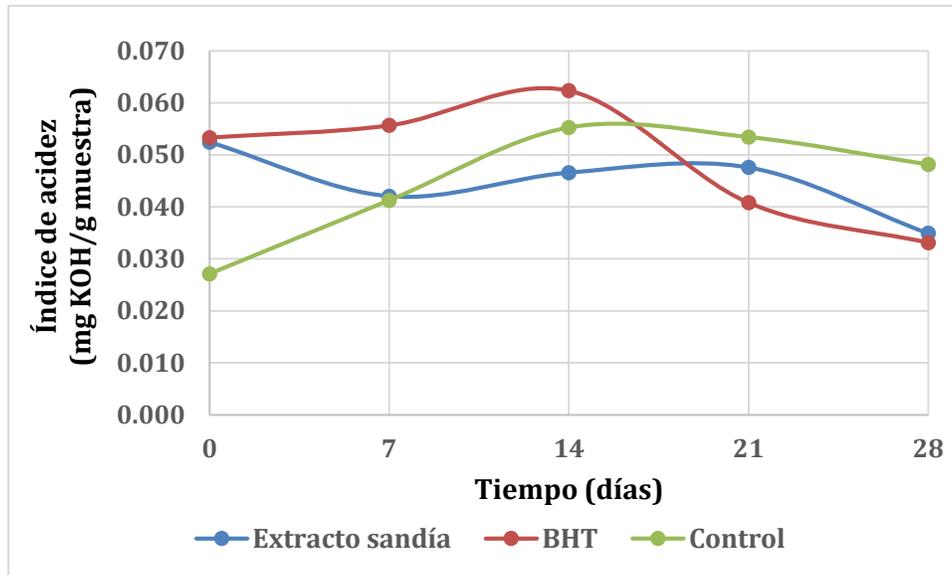
Es importante mencionar que de acuerdo a la norma NMX-F-265-SCFI-2005 el valor de índice de yodo para aceite puro de girasol debe ser de entre 118-145 cg I₂/g muestra, sin embargo al observar el valor obtenido para la muestra control en el día cero es de 79.63±7.94 cg I₂/g muestra por lo que desde un inicio el aceite no cumplía con la norma.

En esta prueba no se logró observar algún indicio de cambio en la estabilidad oxidativa del aceite de girasol por lo que es necesario realizar otros ensayos para corroborar los resultados obtenidos



3.6.3 Índice de acidez

El índice de acidez (IA) normalmente refleja la cantidad de ácidos grasos hidrolizados presentes en una muestra de aceite, se usa a menudo como un indicador de la calidad de un aceite (O'Keefe & Pike, 2010).



Gráfica 7. Índice de acidez de las muestras a través del tiempo usando aceite de girasol como control, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de sandía y aceite de girasol adicionado con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.

En la Gráfica 7 se observa que el índice de acidez del control aumenta del día 0 al día 14 y posteriormente disminuye hasta el día 28. La muestra con BHT presenta un aumento en el valor de índice de acidez del día 0 al 14 para posteriormente disminuir hasta un valor menor comparado con el control. Para la muestra con extracto se tiene que el valor de IA disminuye del día 0 al 7 para después aumentar hasta el día 21, posteriormente el IA disminuye teniendo un valor muy parecido al de la muestra de BHT.

En la tabla 8, se resumen los valores estadísticos del índice de acidez con su respectivo promedio y desviación estándar.



Tabla 8. Índice de acidez en aceite de girasol con extracto de sandía, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Índice de acidez (mg KOH/g muestra)					
	0	7	14	21	28
Extracto	0.052±0.011 ^a	0.042±0.001 ^a	0.047±0.011 ^a	0.048±0.012 ^a	0.035±0.012 ^a
BHT	0.053±0.011 ^a	0.056±0.012 ^a	0.062±0.021 ^a	0.041±0.021 ^a	0.033±0.011 ^a
Control	0.027±0.012 ^a	0.041±0.020 ^a	0.055±0.012 ^a	0.053±0.013 ^a	0.048±0.012 ^a

n=3, promedio ± desviación estándar

Análisis estadístico para índice de acidez. Subíndices ^a significa diferencia significativa (p<0.05), donde **a** es menor índice.

En la tabla anterior se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos por lo que también se puede decir que la adición de extracto de semilla de sandía o BHT al aceite de girasol no afecta en su estabilidad oxidativa.



CONCLUSIONES

- Se analizaron los extractos obtenidos con disolventes polares de la semilla de sandía mexicana residual (*Citrullus lanatus*).
- El método de extracción con el que se obtuvo mayor rendimiento fue el método de sonicación a los 75 minutos empleando metanol como disolvente, se obtuvo el 4.01%.
- El extracto con mayor concentración de polifenoles totales fue el obtenido mediante el método Soxhlet empleando etanol como disolvente (59.879 mg de EAG/g de muestra).
- El extracto con mayor actividad antioxidante fue el obtenido por maceración empleando acetona con un IC_{50} igual a 0.709 ± 0.008 mg/mL.
- En el estudio de estabilidad oxidativa no se observó diferencia significativa entre las muestras de control, aceite adicionado con BHT y aceite adicionado con extracto de sandía. Por lo anterior se concluye que el extracto de sandía no demostró ser capaz de actuar como antioxidante bajo las condiciones empleadas en este experimento.



BIBLIOGRAFÍA

- Abu, I., Arráez, R., Segura, A. & Fernández, A. (2013) Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI–QTOF–MS). *Food Research International*, 354 - 362.
- Al-Sayed, M., & Ahmed, R. (2013). Utilization of watermelon rinds and sharlyn melon peels as a natural source of dietary fiber and antioxidants in cake. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1), 83 - 95.
- Antolovich M., Prenzler, P., Patsalides, E., MacDonald, S. & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The analyst*, 127, 183 - 198.
- Attard, M., Watterson, B., Budarin, L., Clark, H., & Hunt, J. (2014). Microwave assisted extraction as an important technology for valorising orange waste. *New Journal of Chemistry*, 38(6), 2278 - 2283.
- Azmir, J., Zaidul, M., Rahman, M., Sharif, M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426 - 436.
- Badui, S., 2006. Química de los alimentos. En Ciudad de México: Pearson, 259-260, 262 - 266.
- Baiano, A., (2014). Recovery of biomolecules from food waste a review. *Molecules*, 14821 - 14842.
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A., Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Journal Food Chemistry*, 10 - 22.
- Barberán, T., Gil, M., Cremin, P., Waterhouse, A., Hess-Pierce, B. & Kader, A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4748 - 4760.
- Bartee, S., Jung, H. & Min, D. (2007). Effects of antioxidants on the oxidative stability of oil containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal American Oil Chemistry Society*. 84, 363 - 368.



- Belén, D., Román, J., García, D., Moreno, M. & Medina, C. (2007). Efecto del secado solar en los contenidos de humedad, carbohidratos, carotenoides totales e índice de peróxidos del mesocarpio de la palma coroba (*Attalea* spp.). *Grasas y aceites*, 32, 257 - 261.
- Benitez, D., (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 25 (2), 1 - 8.
- Brglez, E., Knez, M., Skerget, M., Knez, Z., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Review Molecules*. 1 - 38.
- Briones, V., Plaza, M., Giovagnoli, C., & Jamett, F. (2015). High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 525 - 534.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (2004). Carotenoids. Berlín, Alemania. Natural functions. Vol. 4.
- Bromberger, M., Marsillac, L. & Peixoto, C. (2017). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. 400 - 412.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21 - 33.
- Cam, M., Icyer, C., & Erdogan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 117 - 123.
- Chao, J., Yuan, M., Chen, P. & Chien, S. (2002). Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (13), 653 - 663.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (54), 7429 -7436.



- Chong, Y., Chang, S., Mei, W., & Yim, H. (2015). Antioxidant efficacy of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. *Food Bioscience*, (12), 18 - 25.
- Collins, J., Wu, G., Perkins-Veazie, P., Spears, K., Claypool, P., Baker, R. & Clevidence, B. (2007). Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutrition* (23), 261 - 266.
- Cravotto, G., Bicchi, C., Mantegna, S., Binello, A., Tomao, V., & Chemat, F. (2011). Extraction of kiwi seed oil: Soxhlet versus four different non-conventional techniques. *Natural Product Research*, 25(10), 974 - 981.
- Crozier, A., Jaganath, I., & Clifford, M. (2009). Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, 26, 1001 - 10043.
- Djilas, S. & Cétkovic, G. (2002). Antioxidants in food. *Chem. Ind.* 3 (56), 105 - 112.
- Emaga, H., Ronkart, N., Robert, C., Wathelet, B., & Paquot, M. (2008). Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*, 108(2), 463 - 471.
- Ferrari, R., Turtelli, A., & Park, K. (2011). Biodiesel production and quality. *Biofuel's Engineering Process Technology*, 221 - 240.
- Fiedor, J. & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients review*, 6, 466 - 488.
- Fraser, P. & Bramley, P. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 43 (3), 228 - 265.
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food waste: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Food Science and Technology*, 68 - 87.
- García, M., Quintero, R. & López-Munguía, A. (2004). *Biología alimentaria*. Distrito Federal: Limusa.



- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Review. *Acta Biológica Colombiana* 13 (3): 27 - 36.
- Gatica, K. (2017). Tesis. Efecto de las vitaminas antioxidantes C y E sobre la hipertrofia renal en ratas diabéticas. Estado de México. 19 - 21.
- Guo, S., Zhang, J., Sun, H., Salse, J., Lucas, W., et al. (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions, *Nature genetics*, 45, 51 – 58.
- Hegerman, A., Riedl, K., Jones, G., Sovik, K., Rechard, N., Hartzfeld, P. & Reichel, T. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tanins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887 - 1892.
- Herrero, M., Castro, M., Mendiola, A., & Ibáñez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 67 - 83.
- Huchin, V., Estrada, I., Estrada, R., Cuevas, L., & Sauri, E. (2013). Chemical composition of crude oil from the seeds of pumpkin (*Cucurbita spp.*) and mamey sapota (*Pouteria sapota Jacq.*) grown in Yucatán, México. *CyTA – Journal of Food*, 11(4), 324 - 327.
- Ignat, I., Volf, I. & Ppopa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 1821 - 1835.
- Iqbal, H., Wei, K., & Adam, A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119, 643 - 647.
- Ismail, M., Mariod, A., & Bagalkotkar, G. (2010). Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. *Grasas y aceites*, 1(37 - 44), 61.
- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., & Shukla, S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents - An overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2(1),19 -25.



- Jaramillo, G. & Zapata, L. (2008) Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia. Universidad de Antioquia. Especialización en gestión ambiental. 25 - 45.
- Jeong, S. H., Kim, B. Y., Kang, H. G., et al, (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*. 208 (1), 49 - 62.
- Kek, P., Chin, L., & Yusof, A. (2013). Direct and indirect power ultrasound assisted pre-osmotic treatments in convective drying of guava slices. *Food and Bioproducts Processing*. 91(4), 495 - 506.
- Ki Lin, C. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemical, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy and environmental science*, 6, 426 - 464.
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins More than Nature's Colours (2004). *Journal Biomed Biotechnol* 239 - 240.
- Kothari, V., & Seshadri, S. (2010). In vitro antibacterial activity in seed extracts of Manilkara zapota, Anona squamosa, and Tamarindus indica. *Biological Research*. 43(2), 165 - 168.
- Kuskosk, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 25 (4): 726 - 732.
- Landines, M., & Zambrano, J. (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2(1), 13 - 22.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 47, 1 - 11.
- LGPGIR. (22 de mayo de 2003). Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Diario Oficial de la Federación. 6.
- Longo, L. & Vasapollo, G. (2004). Extraction and identification of anthocyanins from Smilax aspera L. berries. *Food Chemistry*. 94: 226 - 231.



- LRSDF. (22 de abril de 2003). Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal.
- Matthaéus, B. (2010). Oxidation of edible oils, editorial: Woodhead Publishing Limited, Capítulo 6, 183 - 238.
- Milner, A., & Romagnolo, F. (2010). Bioactive compounds and cancer. Nutrition and health. Humana Press. USA. 25 - 43.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal Of Cleaner Production*. 65, 28 - 41.
- Monahan, F. (2012). Oxidación de los lípidos de la carne y los productos cárnicos: implicaciones y prevención. *Eurocarne*. 89 - 96, 109.
- Moreno, M., Ysabel, C., Belén, D., García, D., & Medina, C. (2007). Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de cáscaras y semillas. *Grasas y aceites*. 58, 351 - 358.
- Müller, L., Caris-Veyrat, C., Lowe, G. & Böhm, V. (2015). Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1868 - 1879.
- Naczk, M. & Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, Issue 41*, 1523-1542.
- Nielsen, S. (1998) Food analysis second edition. Maryland: An aspen publication.
- NMX-F-101-SCFI-2012 (2012). Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales- Determinación de ácidos grasos libres, s. I.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-152-SCFI-2011 (2011). Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de yodo por el método ciclohexano. Método de prueba, s. I.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-154-SCFI-2010 (2010). Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del valor de peróxido. Método de prueba, s. I.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.



- NMX-F-223-SCFI-2011 (2011). Alimentos. Aceite vegetal comestible. Especificaciones, s. l.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-265-SCFI-2005 (2005). Alimentos. Aceite comestible puro de girasol. Especificaciones, s. l.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-428-1982, 1982 (1982). Alimentos. Determinación de humedad (método rápido de la termobalanza). Foods. Determination of moisture (thermobalance rapid method), s.l.: Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- O'Keefe, S. F. & Pike, O. A. (2010). Food Analysis (Cuarta ed.). Nueva York, USA: Springer Science & Business Media.
- Oroian, M. & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International. 74, 10-36.
- 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. Chapter 11, 209 – 232.
- Padilla, F., Rincón, A. & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. 58 (3), 303 – 308.
- Pfaltzgraff, L., De bruyn, M., Cooper, E., Budarin, V., & J., C. (2013). Food waste biomass: a resource for high-value. Green Chemistry (15), 307 - 314.
- Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. 3 (1), 121 -134.
- Porto, C., Porretto, E. & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinífera L.*) sedes. Ultrasonic Sonochemistry. 20, 1076 - 1080.
- Pouliot, Y., Conway, V., & Leclerc, L. (2014). Separation and concentration technologies In Food processing: principles and applications. 2, 33 - 60.
- Prakash, J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K. & Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*. 101, 786 - 791.



- Qui, Y., Liu, Q., & Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry*. 121, 140 -147.
- Rahman, H., Manjula, K., Anoosha, T., Nagaveni, K, Eswaraiah, C. M. & Bardalai, D. (2013). In-vitro antioxidant activity of *Citrullus lanatus* seed extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 152 - 157.
- Rajha, N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, G., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*. 146, 243 - 251.
- 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*. (20), 1669 - 1677.
- R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado 20 de Enero de 2018 de <http://www.R-project.org/>
- Reyes, B., Guerra, D., & Zuleta, H. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising nonedible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crops and Products*. 52, 400 - 404.
- Rodríguez, C., Quirantes, R., Fernández, A., & Segura, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleífera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*. 66, 246 - 254.
- Roselló, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, P., Saraiva, A., Boussetta, N., Barba, J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Nonconventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*. 45(2), 296 - 310.
- SAGARPA, (2017). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Atlas agroalimentario 2017, México siembra éxito. 144- 145. Recuperado el 20 de octubre de 2017 en: <http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/#p=144>



- Salomón, S., Bermello, A., Márquez, T., López, O., González, M., & Llópiz, J. (2013). Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (Calabaza). 18 (1), 17 - 26.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Biotecnología*. 16(2), 14 – 46.
- SEMARNAT^a, (2017). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado el 14 de agosto de 2017 en:
<http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/tema/cap7.html#tema1>
- SEMARNAT^b, (2017). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado el 15 de agosto de 2017 en:
<https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/residuos-solidos-urbanos-rsu>
- Sener, S., Saridogan, E., Staub, S., Aziz, N. S., Nor, M. A., Manaf, S. F. (2015). World conference on technology, innovation and entrepreneurship suitability of biochar produced from biomass waste as soil amendment. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*. 195, 2457 - 2465.
- Seyed, A., Razavi & Milani, E. (2006). Some physical properties of the watermelon seeds. *African Journal of Agricultural Research*. 1 (3). 65 - 69.
- Shahidi, F., (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Die Nahrung*, 44 (3), 158 - 163.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2005). Lipid oxidation: Measurement methods. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products*. 1, 491 - 512.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*. 39, 4067- 4079.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. (2005). Measurement of antioxidant activity. *Journal Functional Foods*. 18 (B), 757 - 781.
- Shetty, A., Rana, R., Buckseth, T. & Preetham, S. P. (2012). Waste utilization in Cucurbits: A review. *Waste Biomass Valor*. 3, 363 - 368.



- SIAP. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de: <https://www.gob.mx/siap/articulos/sandia-producto-destacado-donde-sonora-es-lider>
- Siddhuraju, P. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated Tamarindus seed coat. *Food science and technology*. (40), 982 - 990.
- Silva, F., Rocha, P., & Duarte, C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40 - 51.
- Singh, V., Gupta, A., & Verma, A. (2013). Review on natural compounds used for antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*. 4(2), 936 -949.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. (14) 299, 152 - 178.
- Solanaa, M., Boschiero, I., Dall'Acquab, S., & Bertucco, A. (2015) A comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods for obtaining phenolic compounds from *Asparagus Officinalis* L. *J. Supercrit. Fluids*. 100, 201 -208.
- Solmaz, I. & Sari, N. (2008). Characterization of watermelon (*Citrullus lanatus*) accessions collected from Turkey for morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56, 173-188.
- Song, M., Ham, M., Ko, J., Ko, Y., Oh, J., Kim, S., & Yoon, J. (2016). Anti-inflammatory activities of the products of supercritical fluid extraction from *Litsea japonica* fruit in RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, 22, 44–51.
- Sotelo, L., Alvis, A., & Arrázola, G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 9 (1), 124 -134.
- Stalikas, D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci*. 30, 3268 - 3295.



- Tamburini, E., Costa, S., Rugiero, I., Pedrini, P. & Marchetti, M. (2017) Carotene, and Total Soluble Solids in Intact Red-Fresh Watermelon (*Citrullus lanatus*) Using On-Line Near-Infrared Spectroscopy. *Sensors*. 17 (4) 746 - 758.
- Tarazona, M., Viegas, J., Moldao, M. & Aguayo, E. (2011). Bioactive compounds from fresh and by-product of fresh- cut watermelon cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91, 805 - 812.
- Tarek, A., & Khaled, M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*. 47- 54.
- Tiwari, B. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 71, 100 - 109.
- Tonon, R., Brabet, C., & Hubinger, M. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*. 43 (3), 907 - 914.
- Traber, M. & Stevens, J. (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*. 51 (1), 1000 - 1013.
- Vercellotti, J., St. Angelo, A. & Spanier, A. (1992). Lipid oxidation in foods: An overview. *American Chemical Society, Washington*. 1 - 11.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8(3), 303 - 313.
- Wani, A., Kaur, D., Ahmed, I., & Sogi, D. (2007). Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. 41:1514 - 1520.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X. & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from Apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 693 - 700.
- Wang, W., Won, S., Bhunia, A., Yamaguchi, M., Li, Y., Schffner, D., Crandall, P., Baianu, I., et al. (2013). Determination of antioxidant activity in different kinds of plants in vivo and in vitro by using diverse technical methods. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 3, 1 - 9.



-
- Wong, J., Muñiz, D., Martínez, G., Belmares, R., & Aguilar, C. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 474 - 481.
 - Yu, J., Dandekar, V., Toledo, T., Singh, K., & Patil, S. (2007). Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food Chemistry*. 105(3), 1026 - 1031.
 - Zapata, S., Piedrahita, A., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Laboratorio de Ciencia de Aliento*. 16, 25 - 36.
 - Zhang, Y., Yang, L., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidant during accelerated storage. *Food Chemistry*. 118, 656 - 662.