



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil para su aplicación como antioxidante en aceite de pepita de calabaza.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERIA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

LAURA BEATRIZ MENDOZA PÉREZ

Asesores:

Dra. María Andrea Trejo Márquez
M. en C. Selene Pascual Bustamante

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARIA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Extracción de compuestos bioactivos de la flor de compasúchil para su aplicación como antioxidante en aceite de pepita de calabaza.

Que presenta la pasante: **Laura Beatriz Mendoza Pérez**
Con número de cuenta: **413017512** para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo fue financiado por el proyecto:



*Desarrollo tecnológico para el
aprovechamiento integral de frutas
y hortalizas (PAPIIT IT 201216) de
la Dirección General de Asuntos del
Personal Académico de la UNAM.*

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITÚ”

Esta tesis se la dedico a:

Quienes sin importar el sacrificio, esfuerzo y circunstancias
siguen estando día a día a mi lado, a mis padres
principalmente: *Ana María Perez Torres* y *Juan Javier
Mendoza Martínez*, a mis queridos hermanos *Antonio, Eduar*
y *Ari* y por supuesto a mi lindo amor *Jhon...* ❤️



Agradecimientos . . .

Agradezco a Dios por este día, por la oportunidad de permitirme cumplir un logro más, y aún más por permitirme compartirlo con mi familia y personas queridas...

*** Sin duda a mi mamá Ana María Perez Torres y a mi papá Juan Javier Mendoza Martínez que sin escatimar esfuerzo alguno, siempre están ahí para escucharme y apoyarme cuando más los necesito, que sin importar la situación jamás desfallecen, a mis hermanos Antonio, Eduardo y Ariana por todos los momentos agradables de risas y también de enojos y por todos los que nos esperan...

Y al final del día, no hay nada mejor que volver a casa y disfrutar este pedacito de cielo. . . ¡Los quiero mucho papas y hermanos!

*** A mi compañero, mi amigo, mi aliado, mi confidente, y mi novio

Jhonattan Castillo Casas***

Si te quiero es por qué sos mi amor, mi cómplice, y mi TODO. Gracias por escucharme y estar conmigo en las buenas y en las malas... Te amo!

*** A mis abuelos Antonio, Isabel y Eugenio, a mis tíos, tías que siento su cariño y me animan a seguir adelante...

***A mis amigos y compañeros queridos que me acompañaron en este camino...

Liz, Brenn, Lucero, Andrea, Nath, Fanny, Brayan, Augusto,
Mike, Juan Manuel y a mi incondicional y Gran amigo *Gustavo Rojas*
por apoyarme durante la carrera... y a todos aquellos que recorrieron este camino... **un**
cálido abrazo a todos!

***A mis maestros que formaron parte de mi desarrollo profesional y que sin

duda dejaron huella con sus conocimientos y consejos: *Laura Gris, Narmin*
Catalán, Verónica Zenteno, Saturnino Maya, Jose Luis,
Archavaleta, Miriam Edith, ... Javier Cruz Maranto...

***Y por supuesto a la *Dra. Ma. Andrea Trejo Márquez* por el apoyo

y cariño durante la dirección del proyecto en coordinación con *Selene Pascual*
Bustamante por sus regaños y consejos... a *David López Soto* por sus excelentes
aportaciones para el buen desarrollo del proyecto, a mis *sinodales S.B.Q.*
Saturnino, Dra. Caro, Dra. Dolores y la Dra. Adela quien con sus
apreciables sugerencias ayudaron a la culminación de este trabajo...

Y con orgullo a la **UNAM** por permitirme conocer una pequeña milésima
parte de este mundo del saber...

¡Gracias!

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
Abreviaturas y símbolos	iv
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. Generalidades de la flor de compasúchil	
2.1.1. Origen y distribución	4
2.1.2. Agroecología, descripción botánica y taxonomía	4
2.1.3. Importancia cultural y económica en México	5
2.1.3.1. Principales estados productores a nivel nacional	6
2.1.4. Empleo en diferentes sectores	7
2.1.5. Principales compuestos químicos	8
2.2. Compuestos polifenólicos	
2.2.1. Generalidades de los compuestos polifenólicos	10
2.2.2. Métodos de extracción	13
2.2.3. Aplicación de compuestos fenólicos como antioxidantes	15
2.3. Aceite de semilla de pepita verde de calabaza (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	
2.3.1. Generalidades del aceite de semilla de pepita verde de calabaza	17
2.3.2. Proceso de obtención	18
2.3.3. Principales cambios químicos durante el almacenamiento de los aceite	
2.3.3.1. Oxidación lipídica	19
2.3.3.2. Tipos de oxidación	19
2.3.3.3. Mecanismo de auto-oxidación	22
2.3.3.4. Factores que inciden en la auto-oxidación lipídica	24
2.3.4. Antioxidantes	26
2.3.4.1. Mecanismo de Acción	25

ÍNDICE

2.3.4.2. Tipos de compuestos antioxidantes	26
2.3.4.2.1. Sintéticos	26
2.3.4.2.2. Naturales	27
3. Objetivos	
3.1. Objetivo General	30
3.2. Objetivos Particulares	30
4. Materiales y Métodos	
4.1. Cuadro Metodológico	31
4.2. Material de estudio	32
4.2.1. Acondicionamiento de la flor de cempasúchil	32
4.3. Obtención de extractos etanólicos	34
4.4. Evaluación de la oxidación lípida en aceite de pepita de calabaza	
4.4.1. Extracción de aceite de pepita verde de calabaza	35
4.4.2. Evaluación del efecto antioxidante de los extractos de cempasúchil aplicado en el aceite de semilla de calabaza	37
4.5. Técnicas analíticas	37
4.6. Tratamiento estadístico	39
5. Resultados y Discusión	
5.1. Caracterización del color de la flor de cempasúchil	40
5.2. Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en la flor fresca de cempasúchil	42
5.3. Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por el método de maceración	43
5.3.1. Cuantificación de fenoles totales	43
5.3.2. Cuantificación de flavonoides	45
5.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante	46
5.4. Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por el método de extracción asistida por ultrasonido	49
5.4.1. Cuantificación de fenoles totales	49
5.4.2. Cuantificación de flavonoides	50
5.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante	52
5.5. Parámetros de calidad en el aceite de semilla de pepita verde de calabaza en condiciones aceleradas	54

ÍNDICE

5.5.1. Índice de acidez	55
5.5.2. Índice de peróxidos	56
5.5.3. Índice de Kreis	58
6. Conclusiones	61
7. Recomendaciones	62
8. Referencias	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flor de cempasúchil	4
Figura 2. Morfología de la flor de cempasúchil	4
Figura 3. Principales Estados productores de flor de cempasúchil	6
Figura 4. Fenoles encontrados en la flor de cempasúchil	9
Figura 5. Compuestos flavonoides identificados en el extracto de la flor de cempasúchil	9
Figura 6. Clasificación de los compuestos polifenólicos en la dieta	10
Figura 7. Estructuras principales de los flavonoides	11
Figura 8. Fenómeno de cavitación en la extracción asistida por ultrasonido (UAE)	14
Figura 9. Métodos de extracción para la obtención de aceite vegetal	18
Figura 10a. Estructura general de un ácido graso	20
Figura 10b. Estructura de un ácido graso poli-insaturado	20
Figura 10c. Clasificación de ácidos grasos de acuerdo al grado de insaturaciones	21
Figura 11. Mecanismo de auto-oxidación lipídica.	22
Figura 12. Mecanismo de acción del ácido gálico sobre el radical libre del ácido oleico	25
Figura 13. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia	26
Figura 14. Diagrama de bloques para el acondicionamiento de la flor de cempasúchil	32
Figura 15. Flor de cempasúchil adquirida en forma de manojó	33
Figura 16. Colorímetro Minolta CR300	33
Figura 17. Selección de la parte aérea de la flor de cempasúchil	34
Figura 18. Procedimiento de acondicionamiento de la flor de cempasúchil	34
Figura 19. Molienda de la semilla verde de calabaza	35
Figura 20. Extracción del aceite de semilla de calabaza por el método de UAE	36
Figura 21. Centrifugación del aceite de la semilla verde de calabaza	36
Figura 22. Rotavapor DLAB RE100-Pro	36
Figura 23. Selección y clasificación de la flor de cempasúchil	40
Figura 24. Tonalidad de la flor de cempasúchil	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 25. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración	44
Figura 26. Cuantificación de flavonoides presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración	45
Figura 27. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración	47
Figura 28. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE	50
Figura 29. Cuantificación de flavonoides presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE	51
Figura 30. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE	52
Figura 31. Evaluación del índice de acidez en el aceite de semilla de calabaza tratado con el extracto de la flor de cempasúchil como antioxidante en condiciones aceleradas	55
Figura 32. Evaluación del índice de peróxido en el aceite de semilla de calabaza tratado con el extracto de la flor de cempasúchil como antioxidante en condiciones aceleradas	57
Figura 33. Evaluación del índice de Kreis en el aceite de semilla de calabaza tratado con el extracto de la flor de cempasúchil como antioxidante en condiciones aceleradas	58
Figura 34. Efecto del tiempo sobre la degradación del color en el aceite de semilla de calabaza en los diferentes tratamientos	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Taxonomía de la flor de cempasúchil	5
Tabla 2. Tipos de Maceración con respecto a la temperatura	14
Tabla 3. Efecto de la adición de poli fenoles en la oxidación de diferentes aceites	16
Tabla 4. Condiciones de proceso para la extracción de compuestos fenólicos	35
Tabla 5. Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante en la flor de cempasúchil	43

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
ppm	partes por millón	BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno	TBQH	Tert-butil-hidroquinona
mg/100g	miligramos/100 gramos	E310	Galato de propilo
OH	Grupo hidroxilo	ABTS+	Radical
mM	MiliMolar	rpm	revoluciones por minuto
UAE	Extracción asistida por ultrasonido	Nm	Nanómetros
PUFA	ácido graso poli-insaturado	mM Trolox	miliMol de Trolox
MUFA	ácido graso mono-insaturado	KOH	Hidróxido de potasio
meq O₂/g	miliequivalentes de oxígeno /gramo	N	Normalidad
mV	Milivoltios	KI	Yoduro de Potasio
•	Radical	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
O₂	Molécula de oxígeno	FP	Factor de protección
EQ	Etoxiquina		

RESUMEN

La flor de cempasúchil es originaria de México, es uno de los elementos más tradicionales dentro de las festividades mexicanas del Día de Muertos, sin embargo son sus propiedades la que la hacen aún más valiosa, pues la concentración de diferentes compuestos bioactivos como los ácidos fenólicos y flavonoides, han demostrado actividad antioxidante, por lo que el objetivo del proyecto fue extraer compuestos bioactivos a partir de la flor de cempasúchil, mediante diferentes métodos de extracción evaluando los compuestos polifenólicos, y su capacidad antioxidante, para emplear los extractos como antioxidantes y de esta manera evitar la oxidación lipídica en un aceite de semilla de pepita verde de calabaza. Para la obtención de los compuestos antioxidantes de la flor de cempasúchil se emplearon dos métodos de extracción con diferentes condiciones como fue maceración a 10, 25 y 70°C por 1, 3 y 6 h y la extracción asistida por ultrasonido a 25 y 70°C por 30, 60 y 90 min. Una vez obtenidos los extractos se procedió a evaluar el contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante, para poder seleccionar las mejores condiciones con mayor concentración. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que el método que ofrece mejores rendimientos hasta el 30.3% fue la extracción asistida por ultrasonido reduciendo el tiempo de forma considerable, a una 1h y 70°C comparada con la extracción por maceración que resultó similar pero con tiempos de proceso de 3h a la misma temperatura. Posteriormente, ya seleccionadas las condiciones para la obtención de los extractos de flor de cempasúchil se procedió a evaluar el efecto como antioxidante aplicado en aceite vegetal de semilla verde de calabaza, en concentraciones de 0.1, 0.3, y 0.5%, comparado con el antioxidante sintético BHT a una concentración de 200 ppm. Los aceites con los antioxidantes fueron sometidos a temperaturas de 250°C por tiempos de 2 y 4h, para obtener una cinética de degradación en condiciones aceleradas, con el objetivo de provocar la oxidación lipídica en el aceite y con ello evaluar el efecto antioxidante de los extractos, y se observó que a medida que se aumentaba la concentración de extracto de flor de cempasúchil a 0.5%, se favoreció la reducción en los índices de calidad (índice de peróxidos, acidez y de Kreis) mostrando ser eficientes. Los resultados obtenidos se compararon de acuerdo a lo que establece la normatividad Codex Alimentarius (2001), encontrando que podría ser una posible alternativa en el control de la oxidación lipídica en los aceites vegetales.



1. INTRODUCCIÓN

*Podrán cortar todas las flores,
Pero jama detener la primavera...*

Pablo Neruda

1. INTRODUCCIÓN

La flor de cempasúchil es una flor típica de México perteneciente a la familia de las Asteráceas, característica por su color y aroma, el principal uso que se le da a nivel nacional es ornamental, puesto que es el adorno más popular en las tumbas y ofrendas de Día de Muertos, celebrados durante los días 1 y 2 de noviembre, por lo que la producción asciende a 17 mil 163 toneladas de flor con un valor comercial superior a los 89.7 millones de pesos anuales (SAGARPA, 2015); una vez pasada las festividades, la flor es desechada sin importar las propiedades fitoquímicas que contiene, sin embargo, diversos estudios han demostrado que es una flor rica y pura en xantófilas (Tsao *et al.*, 2004; Sowbhagya *et al.*, 2013). El carotenoide principal encontrado en los pétalos es trans luteína (C₄₀ H₅₆ O₂) (Gómez *et al.*, 1978) utilizado principalmente como pigmento para la piel de aves y huevos (Del Villar *et al.*, 2010), en cuanto a la presencia de flavonoides se encuentran la Quercitina, Mirecitina, Apigenina, Kaempferol (Faizi y Naz, 2004) en mayor proporción, así mismo, los ácidos fenólicos detectados en el extracto etanólico, fueron los ácidos sinápico, cúmarico, clorogénico, principalmente, aunque se han detectado 7 compuestos más, si bien en menor proporción (Kaisoon *et al.*, 2012). Muchos de estos compuestos tienen la capacidad de donar electrones, retrasando mecanismos como lo es la auto-oxidación en lípidos, mediante la inhibición de la formación de radicales libres o mediante la interrupción de la propagación del radical en uno (o más) de varios mecanismos (Nawar, 1996).

Debido a que la oxidación lipídica es uno de los procesos más relevantes en el deterioro de diversos alimentos, como lo son los aceites de origen vegetal, pues por ser ricos en ácidos grasos poli insaturados son susceptibles a sufrir un daño severo, su importancia radica en los beneficios que ofrecen, como la protección contra enfermedades cardiovasculares, prevención de artritis, cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, entre otros (Gogus y Smith, 2010), de acuerdo a diversos estudios, se ha encontrado que el aceite de semilla verde de calabaza presenta una composición rica en ácidos grasos insaturados, destacándose el linoleico (43-56 %) y el oleico (24-38 %), tocoferoles beta y gamma (vitamina E) y carotenoides (Younis *et al.*, 2000), no obstante al sufrir oxidación lipídica da lugar a la generación de compuestos altamente tóxicos, provoca sabores y aromas desagradables, causando una disminución del tiempo de vida útil, y por supuesto la pérdida

1. INTRODUCCIÓN

de la calidad nutricional del alimento provocando daños nocivos en la salud (Navas, 2010). Ante dicha necesidad la Industria alimentaria ha implementado la adición de antioxidantes a fin de extender la vida comercial de los mismos (Guiotto *et al.*, 2014; Bodoroina *et al.*, 2017) principalmente se basa en el uso de antioxidantes sintéticos, pues son relativamente económicos y bastante eficientes. Sin embargo, dichos compuestos sintéticos han sido juzgados en cuanto a sus efectos nocivos sobre la salud.

Debido a la exigencia que presenta el reemplazar productos químicos por productos naturales, y del mismo modo el aprovechamiento de residuos orgánicos, nace la importancia del estudio y la evaluación de los mismos; principalmente de los extractos naturales, siendo una mezcla compleja en cuanto a los diferentes compuestos bioactivos (antioxidantes en su mayoría) que presenta, haciéndolos valiosos aún más para el mercado, sin embargo, existen factores como su contenido y calidad para presentar efectividad adecuada, comparada con los antioxidantes químicos (Guiotto *et al.*, 2014).

Con base en lo anterior se propone entonces, extraer compuestos bioactivos a partir de la flor de cempasúchil, mediante diferentes métodos de extracción evaluando el contenido de fenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante, empleando los extractos como antioxidantes para evitar de esta manera la oxidación lipídica en el aceite de semilla de pepita verde de calabaza.



2. ANTECEDENTES

*La mariposa recordara por siempre,
Que fue gusano...*

Mario Benedetti

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la flor de cempasúchil

2.1.1. Origen y distribución

Conocida como clávelo, copetuda, tlapayola, flor azteca, clavel de la india, entre otros, el nombre científico para la flor de cempasúchil es *Tagetes erecta*; en México, mejor conocida como la flor de los muertos o cempaxúchitl, proveniente del náhuatl que significa “flor de veinte pétalos”. Es nativa de Centro América-México y Guatemala. En México se encuentra en estado silvestre en los estados de San Luis Potosí, Chiapas, México, Puebla, Sinaloa, Tlaxcala y Veracruz principalmente. Es cultivada para fines mercantiles (colorantes) en América Latina, África en menor escala, Zambia y Sudáfrica, en los trópicos y subtropicales es ampliamente cultivada para fines ornamentales (Tim, 2012).

2.1.2. Agroecología, descripción botánica y taxonomía

- Agroecología

Se encuentra en estado silvestre en zona boscosa de pino-roble de México en climas cálidos y de baja humedad. En los trópicos, crece bien hasta 2.000 m de altitud como en los Andes. Se desarrolla mejor en lugares soleados, en suelos arcillosos y arcillosos bien drenados de pH variable (Tim, 2012).

- Botánica

Planta herbácea anual, erecta, ramificada, y muy aromática; de 3 a 180 cm de alto, sus tallos son gruesos y glabros de raíz angulosa a redondeados. Presenta hojas pinnadas profundamente pigmentadas con 6-17 segmentos lineales-lanceolados, cada segmento de 1-4 cm × 0,5-2 cm, glandular, agudo en ambos extremos y dentados al margen (Figura 1).



Figura 1. Flor de cempasúchil
Fuente: Hernández (2017)



Figura 2. Morfología de la flor de cempasúchil
Fuente: Hernández (2017)

2. ANTECEDENTES

Inflorescencia: Presenta un capítulo terminal solitario sobre el pedúnculo (3-12 cm de largo) provistos de brácteas; flores liguladas generalmente presentes (200 hasta 400 pétalos), sus corolas en tipos silvestres, presentan coloración amarillo, amarillo limón, naranja a rojo marrón oscuro, (Figura 1 y 2) (Tim, 2012).

- Taxonomía

A continuación en la Tabla 1 se muestra la clasificación Taxonómica de la flor de cempasúchil.

Tabla 1. Taxonomía de la flor de cempasúchil

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Tribu	<i>Tageteae</i>
Genero	<i>Tagetes</i>
Especie	<i>Erecta</i>
Nombre científico	<i>Tagetes erecta L.</i>

Fuente: Rzedowski (2001)

2.1.3. Importancia cultural y económica en México

Originaria de México, la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) es junto al pan de muerto y las calaveritas de azúcar uno de los elementos más tradicionales dentro de la festividad mexicana del Día de Muertos, en la cual se utiliza para adornar los altares dedicados a los fieles difuntos. Dicha costumbre se origina en el México prehispánico con el culto a los difuntos y más específicamente con los rituales mortuorios destinados a encaminar el "alma" del occiso hacia el espacio-tiempo de la muerte que le correspondía, a asumir culturalmente la degradación orgánica del cadáver, y a disminuir catárticamente el dolor de los vivos. La relación siembra/cosecha remite quizás a la relación fecundación/muerte, con una muerte previa del grano en la tierra que antecede el nacimiento de la flor (Giunte,

2. ANTECEDENTES

1979). Convirtiéndose desde entonces en una tradición mexicana y reconocida a nivel internacional.

2.1.3.1. Principales estados productores a nivel nacional

De acuerdo con estadísticas revisadas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, se producen alrededor de 17 mil 163 toneladas de flor anuales, 415 mil 462 de manojos y más de dos millones de plantas, en una superficie de 1,450 hectáreas, alrededor del país. Lo anterior, con un valor comercial superior a los 89.7 millones de pesos, en beneficio de la floricultura mexicana; de esta suma, 32 millones de pesos correspondientes a las toneladas producidas. Si la distribución no es abundante, el precio puede llegar hasta los 60 pesos por manojos, en tanto que si la oferta es grande la cotización puede caer hasta los 25 pesos. Por tratarse de un cultivo con fines industriales y de ornato, éste se divide en producción por planta y manojos (para ornato) y en toneladas para fines industriales, principalmente. Las principales entidades productoras se muestran en la Figura 3 (SAGARPA, 2015).

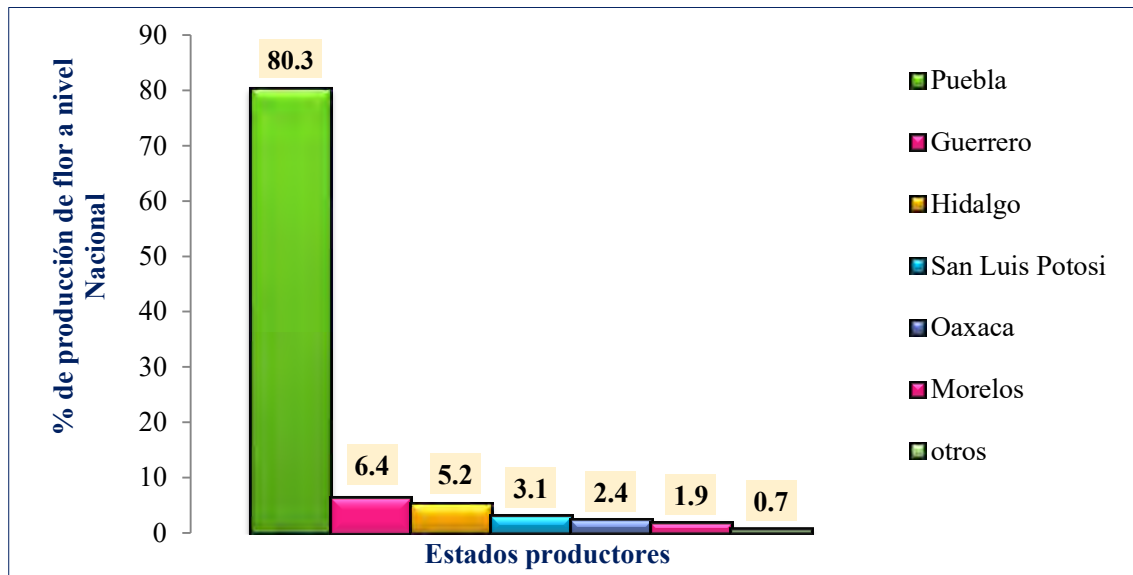


Figura 3. Principales Estados productores de flor de cempasúchil

Fuente: SAGARPA (2015)

Dentro de las flores de ornato, el Cempasúchil ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada, le antecede la gladiola, el crisantemo y la palma a nivel nacional. Generalmente

2. ANTECEDENTES

se cultiva a cielo abierto y en macetas de plástico, se les riega con agua de los canales por medio de motobombas, su cultivo se realiza solo una vez en el año y se vende principalmente para esta celebración (SAGARPA, 2015).

2.1.4. Empleo en diferentes sectores

En México, el principal uso que se le da a la flor de cempasúchil es ornamental, puesto que es el adorno más popular en las tumbas y ofrendas de Día de Muertos. Sin embargo, y de acuerdo con la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, la flor de cempasúchil ha sido empleada en padecimientos digestivos (como el dolor de estómago, empacho, diarrea, cólicos e indigestión y para eliminar parásitos intestinales); para afecciones respiratorias (como el catarro, la gripa y el mormado); en afecciones de la piel (como salpullidos, llagas y verrugas); en problemas ginecobstétricos (inflamación del vientre, cólicos menstruales); en alteraciones nerviosas (como el insomnio, nervios, la epilepsia) y en enfermedades culturales (como el espanto, el mal aire y el susto). En el ámbito agrícola, la flor de cempasúchil se reconoce como una planta antagonista, debido a sus propiedades, ya que al rotar e incorporar residuos de cempasúchil o al asociarlo con cultivos de chile y jitomate, se reducen especies de nematodos y fitoparásitos (SA, 2009).

A nivel industrial, se destaca por la obtención de colorantes, a partir de los carotenos presentes en las flores, se utiliza principalmente como pigmento para la piel de aves y huevos (Del Villar *et al.*, 2010).

En productos horneados y mezclas de hornear (cereales y barras energéticas, galletas y panes crujientes), bebidas y bases de bebidas (agua embotellada, bebidas carbonatadas), goma de mascar, análogos de productos lácteos (leches de imitación, leche de soja), ovoproductos (líquidos, congelados o secos), grasas y aceites (pastas alimenticias de margarina, mantequilla, queso, aderezos para ensaladas), postres y mezclas de lácteos congelados (yogur congelado), productos lácteos (leche seca, bebidas fermentadas, leche aromatizada y bebidas lácteas, reemplazos a base de leche, yogur), frutas procesadas y jugos de frutas (bebidas isotónicas, jugos de frutas, néctares, jugo de verduras), dulces blandos (caramelos masticables y de turrón) (Green 1995; Cantrill 2004).

2. ANTECEDENTES

En el mundo de la gastronomía, se emplea para hacer guisos como crema de flor de cempasúchil, pollo en salsa de cempasúchil y hasta postres, como helado de cempasúchil (Cantrill, 2004).

2.1.5. Principales compuestos químicos

La flor de cempasúchil es una planta rica en compuestos fitoquímicos entre ellos se encuentran:

- Ácidos grasos

Los ácidos grasos dominantes presentes en flor es el ácido linoleico (> 26,41%), el ácido palmítico (> 24,22%) y el ácido oleico (> 20,12%). Los ésteres de luteína, α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol son compuestos antioxidantes dominantes en los extractos de flores (Gong *et al.*, 2011).

- Pigmentos

La flor de cempasúchil es una de las fuentes más ricas y puras en xantofilas (Tsao *et al.*, 2004, Sowbhagya *et al.*, 2013). El carotenoide principal encontrado en pétalos de *Tagetes erecta* es trans luteína (C₄₀ H₅₆ O₂), que se produce en forma libre o esterificado a uno o dos ácidos grasos (Gómez *et al.*, 1978). Se informó que el 95% de la luteína presente en los flujos esta en forma de ésteres de palmitato de luteína como pigmento principal (Gau *et al.*, 1983). Los carotenoides totales en flor fresca es de 1.304 mg/kg con 619 mg/kg de carotenos y 685 mg/kg de xantofilas, mientras que en las flores secas es de 4.397mg/kg con 1.954 mg/kg de carotenos y 2.443 mg/kg de xantofilas (Tinoi *et al.*, 2006).

- Aceite esencial

En Venezuela, en 2009, fueron identificados veinticinco compuestos en el aceite esencial de *T. erecta*, de los cuales se encontraron el linalol (22,5%), 2-hexil-1-decanol (18,3%), piperitona (13,4%), terpinil acetato (7,8%) y cariofileno (6,6%) como componentes principales (Martínez *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

- Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos detectados en el extracto etanólico de la flor de cempasúchil en mg/100g, se observan en la Figura 4 resultando un total de 942.25mg/g.

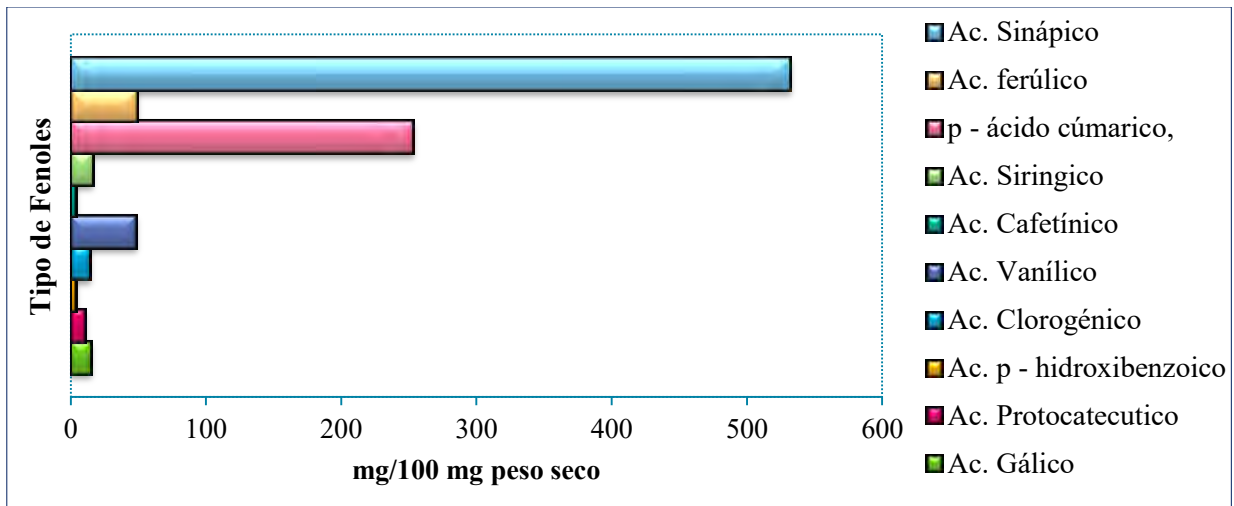


Figura 4. Fenoles encontrados en la flor de cempasúchil

Fuente: Kaisoon (2012)

- Flavonoides

Los compuestos flavonoides que se encuentran en los extractos de las flores (mg/100g peso seco) se muestran en la Figura 5, reportando un total de 165.3 mg.

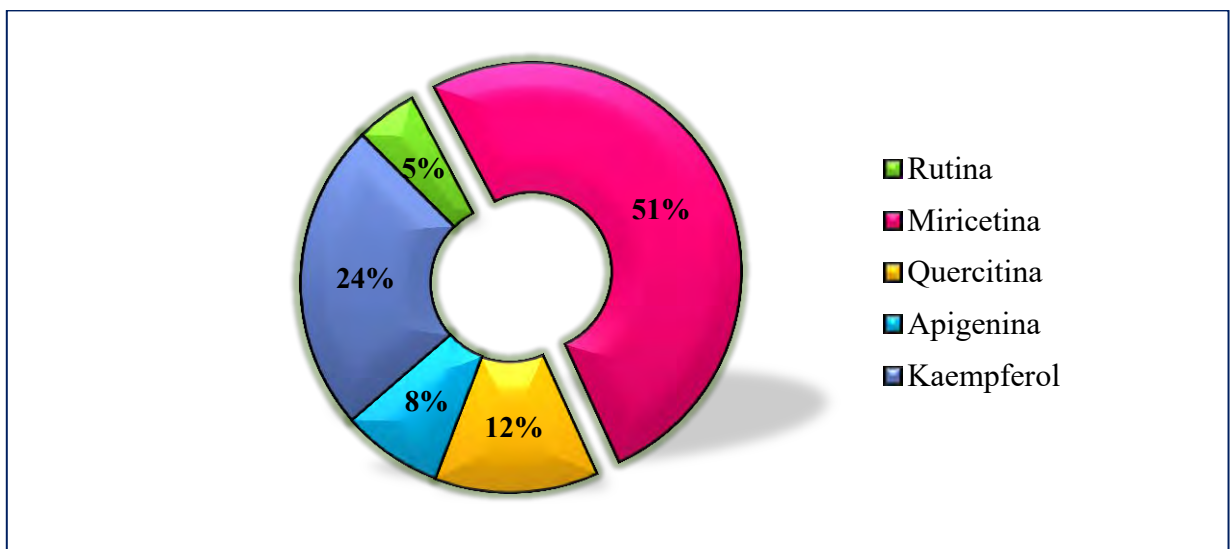


Figura 5. Compuestos flavonoides identificados en el extracto de la flor de cempasúchil

Fuente: Faizi y Naz (2004)

2. ANTECEDENTES

2.2. Compuestos fenólicos

2.2.1. Generalidades de los polifenoles

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal, se encuentran principalmente en las plantas, incluyendo frutas, verduras y cereales, así como bebidas derivadas (Valdés *et al.*, 2015). Estos compuestos además de ser esenciales para el crecimiento y la reproducción, constituyen un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas, encontrándose más de 8000 compuestos fenólicos ya identificados (Nazk y Shahidi 2004).

Los polifenoles se clasifican por las clases y subclases que existen, químicamente se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos, originando una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina (López, 2008). Los principales grupos de polifenoles se muestran a continuación en la Figura 6.

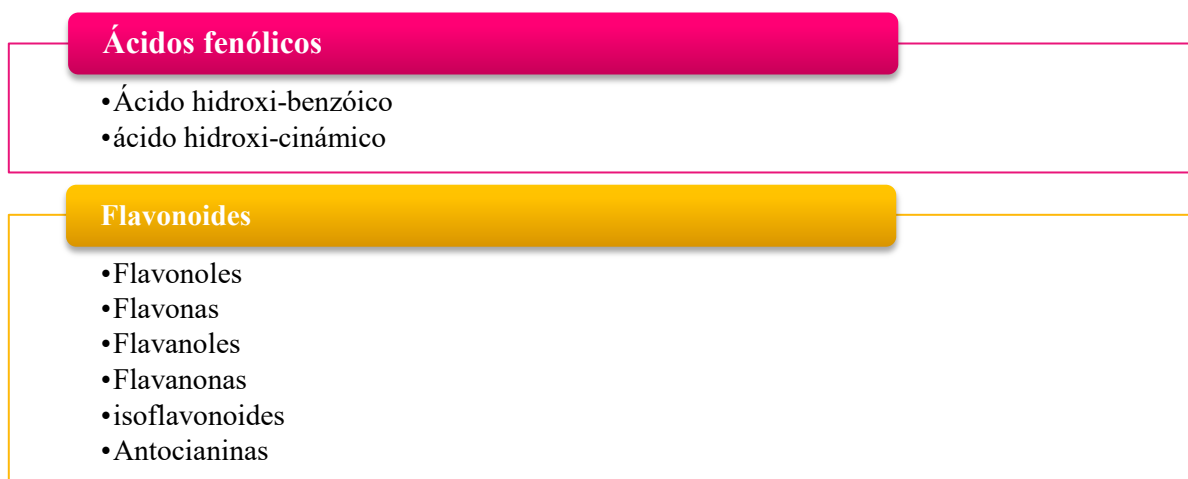


Figura 6. Clasificación de los compuestos polifenólicos en la dieta

Fuente: López (2008)

De forma general los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos que a su vez son derivados del ácido hidroxibenzóico, entre ellos se encuentran el ácido parahidroxibenzóico, ácido protocatético, ácido vanílico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido hidroxicinámico, ác. ferrílico, ác. cumárico, ác. sinápico y caféico considerados como

2. ANTECEDENTES

antioxidantes primarios, pues al contener hidrógenos fenólicos hacen que tengan carácter ácido, lo que los hace que sean aceptores de radicales libres, y de acuerdo al pH en que se encuentran pueden actuar como agentes quelantes de metales ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos, se basan en las propiedades redox, absorción y neutralización de radicales, debido a la capacidad para donar sus átomos de hidrógeno transformando al radical libre en un radical debil no tóxico (Posada *et al.*, 2003). Los ácidos cinámicos, son más activos que los benzoicos respectivos; debido al grupo C=C, puesto que aumenta la conjugación del radical fenoxilo (Pokorny, 2006; y Marinova, 2008). Aunque la presencia de más de 3 grupos hidroxilos sobre un núcleo aromático, no garantiza ni mejora la eficiencia antioxidante, puesto que siguen siendo inestables con respecto a otros compuestos como lo son los flavonoides (Cuvelier *et al.*, 2002).

Por su parte los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal, son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6 -C3 -C6’), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico como se muestra en la Figura 7A (Hassing, 2008).

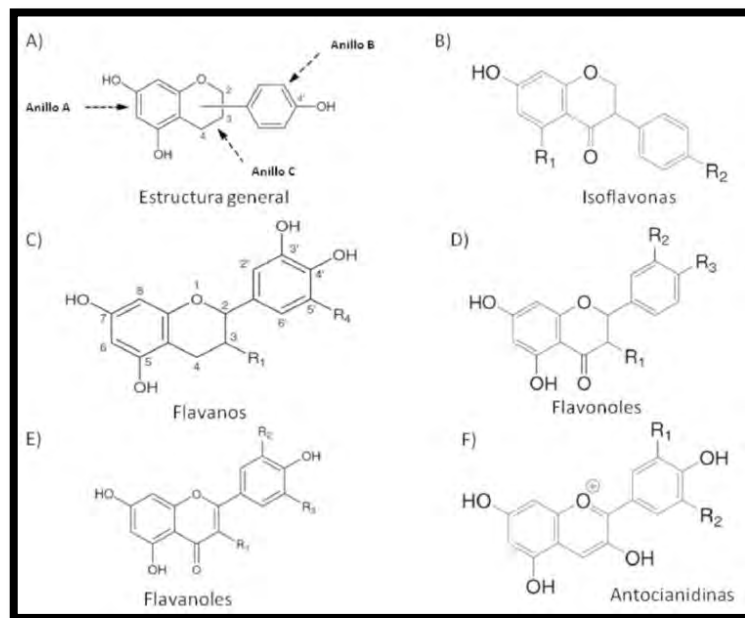


Figura 7. Estructuras principales de los flavonoides

Fuente: Hassing (2008)

2. ANTECEDENTES

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en cinco principales grupos, la diferencia entre ellos radica principalmente en el grupo -OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C como se mostró en la Figura 7.

1. Las isoflavonas, representados por la Genisteina que tiene dos grupos -OH unidos en la posición 1 y 3 del anillo C. Ver Figura 7B
2. Los flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C. Ver Figura 7C
3. Los flavanoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C. Ver Figura 7D
4. Las flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3. Ver Figura 7E
5. Las antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Ver Figura 7F (Hassing, 2008).

De acuerdo a la estructura química que presentan los flavonoides hacen que tengan un amplio rango de efectos biológicos y antioxidantes, incluido el antibacterial, antiviral, antiinflamatorio, antialérgico, etc. (Heim *et al.*, 2002), este efecto está determinado por la estructura que presentan pues contienen un número variable de grupos hidro-fenólicos, que son quelantes del hierro y otros metales de transición e incluso presentan una gran capacidad antioxidante que depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la acción inhibitoria de radicales hidroxilo y superóxido, altamente reactivos como lo son en la cadena de peroxidación lipídica (Formica y Regelson, 1995).

Tres son las características estructurales importantes para su función: **(1)** La presencia de grupos hidroxilo en posición o-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones, **(2)** la presencia de un doble enlace en la posición 2,3 en el anillo C y **(3)** la presencia de un grupo 4-carbonilo en el anillo C, posición 3,5; que son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante

2. ANTECEDENTES

(Heim *et al.*, 2002; Bors *et al.*, 1990), también dependerá de la interacción que exista entre ellos, por lo que puede provocar sinergismo o bien antagonismo (Bocco *et al.*, 1998).

La quercetina y la catequina son los flavonoides que presentan una mayor actividad antioxidante, debido a sus propiedades estructurales, sin embargo el flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues su actividad medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C (Merck, 2000), seguido por el kaempferol y la mirecitina (Charalambous y Bruckner, 2002). Dicha estructura hace que ejerzan una acción inhibitoria contra los radicales hidróxilo y superóxido, que son los principales inductores de la peroxidación de lípidos (Formica y Regelson, 1995).

Lo anterior ha generado el interés de estudiar y cuantificar los compuestos polifenólicos, por lo que la extracción por diferentes métodos que permitan la mayor productividad ha cobrado gran importancia en diferentes sectores de la industria tales como la alimenticia (Palma y Barroso, 2001).

2.2.2. Métodos de extracción

La extracción de compuestos polifenólicos a partir de diferentes fuentes naturales es una operación común en la industria alimenticia, llevada a cabo por diferentes métodos tales como: la extracción con solventes, destilación a vapor, maceración, por microondas, ultrasonido, etc., siendo estos principalmente los más utilizados. Dependiendo del método a emplear, serán los rendimientos a obtener (Rodríguez-Riera, 2014).

- **Maceración**

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. Dicho proceso genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto (Fernoli, 1975).

Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura en la que se lleva a cabo como se muestra a continuación en la Tabla 2.

2. ANTECEDENTES

Tabla 2. Tipos de maceración con respecto a la temperatura

Maceración con calor	Maceración en frío
Consiste en el contacto entre las fases el producto a macerar y el solvente; con la diferencia de las variaciones en la temperatura que va desde 30 a 70°C. El tiempo que se desea macerar varía con respecto a la maceración con frío ya que al elevar la temperatura se acelera el proceso de extracción. Sin embargo presenta desventajas tales puesto que algunos compuestos son termolábiles y son afectados significativamente por condiciones bruscas de temperaturas.	Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con suficiente solvente para cubrir totalmente el material a una temperatura menor a los 10°C. Esto se lleva a cabo por lapsos largos de tiempo dependiendo del material a macerar, presentando como ventaja principal la reducción en los requerimientos mínimos de energía, sin embargo el tiempo es prologando con respecto al de maceración con calor.

Fuente: Fernoli (2015)

- Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonido de alta frecuencias, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente como se observa en la Figura 8 (Gao y Liu, 2005). De acuerdo a algunos autores esta técnica es más económica y tienen los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas (Rostagno *et al.*, 2003).

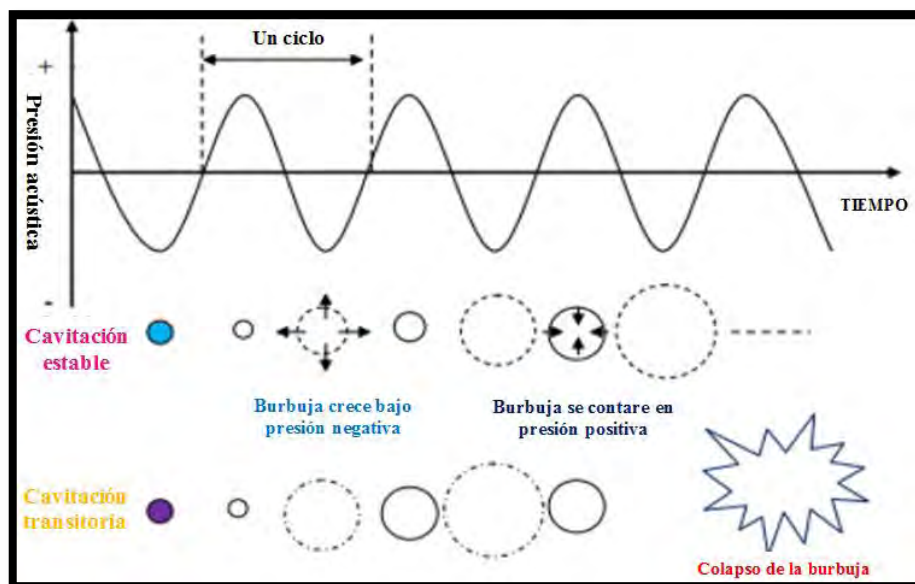


Figura 8. Fenómeno de cavitación en la extracción asistida por ultrasonido (UAE)

Fuente: Xinfeng Cheng (2015)

2. ANTECEDENTES

La UAE a diferencia de la extracción por maceración, acelera la transferencia de calor y masa haciendo que haya una reducción en el tiempo considerable, debido al fenómeno de cavitación que está presente en el método y junto con la alta presión y la temperatura que se genera, destruye las paredes celulares de la planta matriz y el contenido es puesto en libertad en el medio, lo que favorece que el tiempo se reduzca de forma considerable, dichas ondas de ultrasonido después de la interacción con el material alteran las propiedades físicas y químicas de este, así mismo el efecto cavitacional facilita la liberación de compuestos extraíbles deseables, y de esta manera mejora el transporte de masa mediante la ruptura de las paredes celulares (Chemat *et al.*, 2011).

2.2.3. Aplicación de compuestos fenólicos como antioxidantes

En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Schroeter *et al.*, 2006), además de retardar el proceso de oxidación lipídica en alimentos ricos en grasas extendiendo el período de auto-oxidación; y por lo tanto, su vida útil, debido a las características que presentan (Perez-Vizcaino *et al.*, 2009).

Dentro de los alimentos funcionales, un sector importante corresponde a los que utilizan compuestos fenólicos, como aditivos con función antioxidante (European Commission, 2010). Es decir, compuestos capaces de prevenir o retardar la oxidación de otra u otras moléculas, usualmente de sustratos de origen biológico como los ácidos nucleídos o lípidos (OMCE, 2011).

Existen varios estudios que han demostrado el efecto antioxidante de los flavonoides en diferentes materias grasas, tales como: aceite de palma (Pereira y Das, 1990), aceite de canola (Su *et al.*, 2004; Wanasundara y Shahidi, 1994), aceite de linaza (Russin *et al.*, 2006), aceite de algodón (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2007), aceite de maíz (Naz *et al.*, 2008), grasas animales (Antoshina *et al.*, 2005) y aceites marinos (Huber *et al.*, 2009), entre otros. Los estudios se resumen en la Tabla 3, encontrando una actividad antioxidante alta, moderada y baja para un mismo flavonoide. En la mayoría de los estudios, los flavonoides se incorporaron directamente en el aceite, algunos factores como la estructura

2. ANTECEDENTES

y concentración del flavonoide, insaturación de los ácidos grasos de la matriz lipídica, temperatura y el método para determinar la oxidación de la materia grasa influyen sobre los resultados obtenidos además de que la capacidad antioxidante de un alimento dependerá de la naturaleza y concentración de los compuestos antioxidantes (Echevarría, 2009).

Tabla 3. Efecto de la adición de poli fenoles en la oxidación de diferentes aceites

Tipo de Matriz	Compuesto polifenólico	Efecto antioxidante	Referencia
Aceite de pescado	<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina (Q) • Quercetina-3-O-glicósido (Q-G) 0.1, 0.5 y 1 mM 	Alto Q-G > Q	Huber <i>et al.</i> , (2009)
Aceite de maíz	<ul style="list-style-type: none"> • Pelargonidina (P) • Cianidina (C) • Quercetina (Q) • Miricetina (M) • Ácido gálico (GC). 	Alto GA>Q>M>C >P	Naz <i>et al.</i> , (2008)
Aceite de girasol	(10 ⁻³ M) Apigenina, Luteolina, Kempferol, Miricetina y Quercetina	Pro-oxidante	Skerget <i>et al.</i> , (2005)
Aceite de canola	(0,5 mM) Catequina, epicatequina y Teaflavinas	Alta Moderada	Su <i>et al.</i> , (2004)
Aceite de algodón	Quercetina, fisetina Catequina luteolina, taxifolina, eriodictiol	Alto Moderado	Tsimogiannis y Oreopoulou, (2007)
Aceite de palma	(30 μm) Miricetina>morina>kaempferol> quercetina Morina>kaempferol>miricetina> quercetina	Alta	Pereira y Das, (1990)

Los aceites vegetales constituyen un componente básico en algunos alimentos ya que son fuente de energía y ácidos grasos altamente insaturados (PUFA) además de ofrecer diversos beneficios a favor de la salud (Gogus y Smith, 2010), un ejemplo de aceite de origen vegetal es el de semilla verde de calabaza el alto nivel de insaturaciones que presentan los ácidos grasos que conforman su composición, lo hacen particularmente susceptible a la oxidación, dando cambios significativos a la calidad y por ende a la

2. ANTECEDENTES

reducción de la nutrición del alimento, de acuerdo a ello en los últimos años se ha dedicado una atención especial al implemento de antioxidantes naturales de estos compuestos fenólicos que permitan un control más efectivo en el proceso de oxidación (Navas, 2010).

2.3. Aceite de semilla de pepita verde de calabaza (*Cucurbita pepo L.*)

De acuerdo a la norma del CODEX para aceites vegetales especificados (CODEX STAN 210-1999) los aceites vegetales comestibles son productos alimenticios constituidos principalmente por glicéridos de ácidos grasos obtenidos únicamente de fuentes vegetales. Podrán contener pequeñas cantidades de otros lípidos, tales como fosfátidos, de constituyentes insaponificables y de ácidos grasos libres naturalmente presentes en la grasa o el aceite.

2.3.1. Generalidades del aceite de pepita verde de semilla de calabaza

Desde la antigüedad, los aceites de origen vegetal son consumidos por los seres humanos con fines muy diversos, que van desde la cosmetología hasta la alimentación, actualmente los aceites vegetales han cobrado gran importancia, debido a los requerimientos alimentarios con respecto a la nutrición, de acuerdo a diferentes estudios la semilla de calabaza ayudan a mantener niveles óptimos de triacilglicéridos y colesterol manteniendo un mejor balance en la salud (Juárez *et al.*, 2016), debido a que es un alimento rico en nutrientes principalmente proteínas y ácidos grasos poliinsaturados del 35 al 54%, fundamentalmente compuestos por ácido linoleico (43-56%), oleico (24-38%), esteárico y palmítico, fitosteroles, además de contener tocoferoles beta y gamma (vitamina E) y carotenoides: luteolina y beta-caroteno (Younis *et al.*, 2000), por lo que ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata (HPB) por sus propiedades antiandrogénicas, antiinflamatorias y diuréticas reportadas (Menéndez, 2006).

En investigaciones recientes Juárez *et al.*, (2016) encontraron que los principales ácidos grasos contenidos en el aceite de semilla verde de calabaza extraída por UAE fueron los siguientes: mirístico (17.13%), palmítico (24.1%), esteárico (34.84%) y el ácido oleico (23.89%); a su vez son similares al trabajo reportado por El-Adaway y Taha (2001) que fue de ácido palmítico (4 a 14%), esteárico (5 a 6%), oleico (21 a 47%) y linoleico (35 a

2. ANTECEDENTES

59%), la diferencia entre las concentraciones es atribuida a diversos factores tales como: la variedad, suelo, clima, origen, entre otros. En cuanto a la estabilidad oxidativa, se han reportado valores de aceites extraídos por UAE se encuentran dentro del intervalo permitido con un valor de 20 meq O₂/g, Hernández (2007) indica el índice de peróxidos del aceite de calabaza siendo de 2.76 meq O₂/g de aceite, cantidad similar que indicó la muestra de 2.58±0.03. meq O₂/g. El porcentaje de ácidos grasos libres de los aceites fueron similares comparados con lo reportado por Hernández (2007) donde indicó que contiene 2.55% de ácido oleico mientras que la muestra resultó ser de 2.74-2.92% (Juárez *et al.*, 2016).

2.3.2. Proceso de obtención

La extracción de aceite puede realizarse por diferentes métodos prensado y extracción con solventes son los más usuales (Peredo, 2009). A continuación en la Figura 9 se puede observar los métodos más usuales en la industria alimenticia.

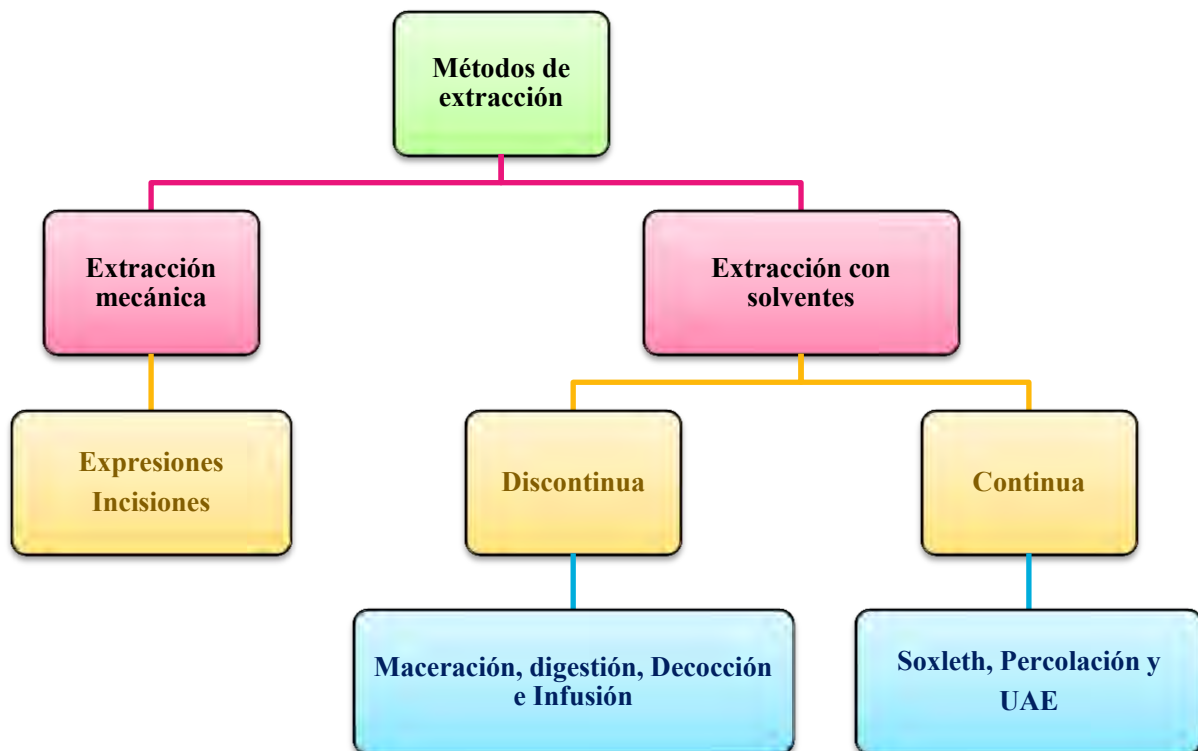


Figura 9. Métodos de extracción para la obtención de aceite vegetal

Fuente: Peredo (2009)

2. ANTECEDENTES

2.3.3. Principales cambios químicos durante el almacenamiento de los aceites.

2.3.3.1. Oxidación lipídica

Las grasas y los aceites pueden sufrir transformaciones químicas que reducen el valor nutritivo del alimento, produciendo compuestos volátiles que le imparten olores y sabores desagradables. Este fenómeno se debe a que el enlace éster de los triacilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química y enzimática, y que los ácidos grasos insaturados son sensibles a las reacciones de oxidación (Navas, 2010).

2.3.3.2. Tipos de oxidación

El término rancidez es empleado para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos, pudiéndose identificar dos tipos:

- Lipólisis o rancidez hidrolítica

Se debe básicamente a la acción de lipasas que liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos.

- Autoxidación o rancidez oxidativa.

Hace referencia a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos. Es una de las transformaciones más habituales en los alimentos que contienen sustancias insaturadas; consiste esencialmente en la oxidación de los ácidos grasos con dobles ligaduras. Recibe el nombre de autoxidación porque es un mecanismo que genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción. Entre los productos sintetizados se encuentran algunos de bajo peso molecular, que le confieren el olor característico a las sustancias oxidadas, y otros cuya toxicidad es cuestionada por diversos autores (Pezzuto y Park, 2002; Siddhuraju y Becker, 2003).

La autoxidación se favorece a medida que se incrementa la concentración de ácidos grasos insaturados, pues estos son de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, conformado por un grupo carboxilo, por medio de un enlace covalente sencillo o doble (Figura 10a) (FAO, 2010).

2. ANTECEDENTES

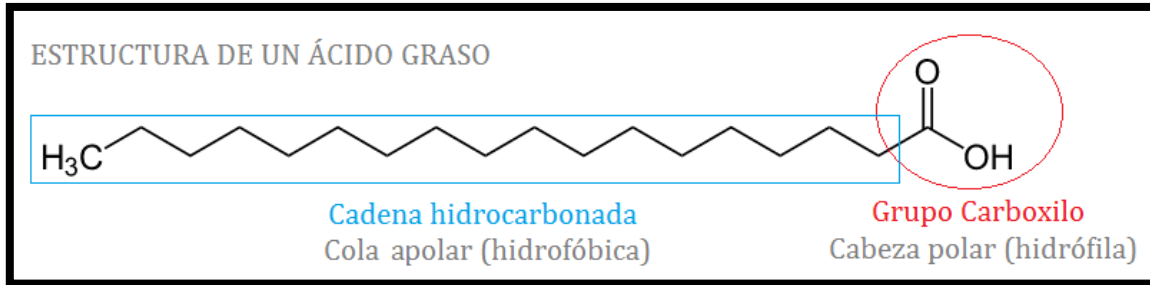


Figura 10a. Estructura general de un ácido graso

Fuente: (Gogus y Smith, 2010)

Por su parte los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs) como lo es el ácido α -linolénico que pertenece a la familia ω -3 de ácidos grasos esenciales, son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos (Figura 10b) que ofrecen importantes beneficios para la salud y nutrición, como la protección contra enfermedades cardiovasculares, prevención de artritis, cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, entre otros (Gogus y Smith, 2010). Sin embargo difieren según el grado de insaturación (Figura 10c).

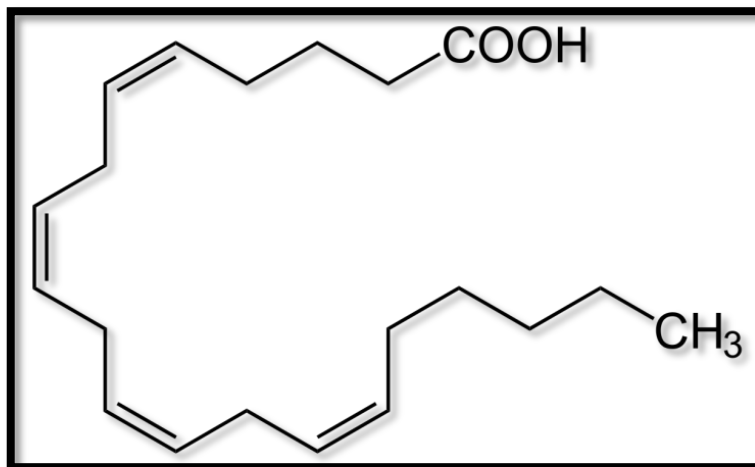


Figura 10b. Estructura de un ácido graso poli-insaturado

Fuente: (Gogus y Smith, 2010)

Sin embargo la presencia de PUFAs en los alimentos determina en gran medida la estabilidad oxidativa del aceite. Debido a que son más susceptibles a la peroxidación debido a que sus hidrógenos bis-alílicos son fácilmente “extraíbles” ($E^\circ = +600$ mV) comparados con los hidrógenos alifáticos ($E^\circ \approx +1900$ mV). De esta manera, cualquier

2. ANTECEDENTES

especie oxidante cuyo potencial de reducción se encuentra por encima del de los PUFA-H puede dar inicio a la oxidación (Gogus y Smith, 2010).

Una vez iniciado el proceso, éste prosigue como una reacción en cadena, involucrando las etapas de propagación, ramificación y terminación (Gutteridge, 1995)

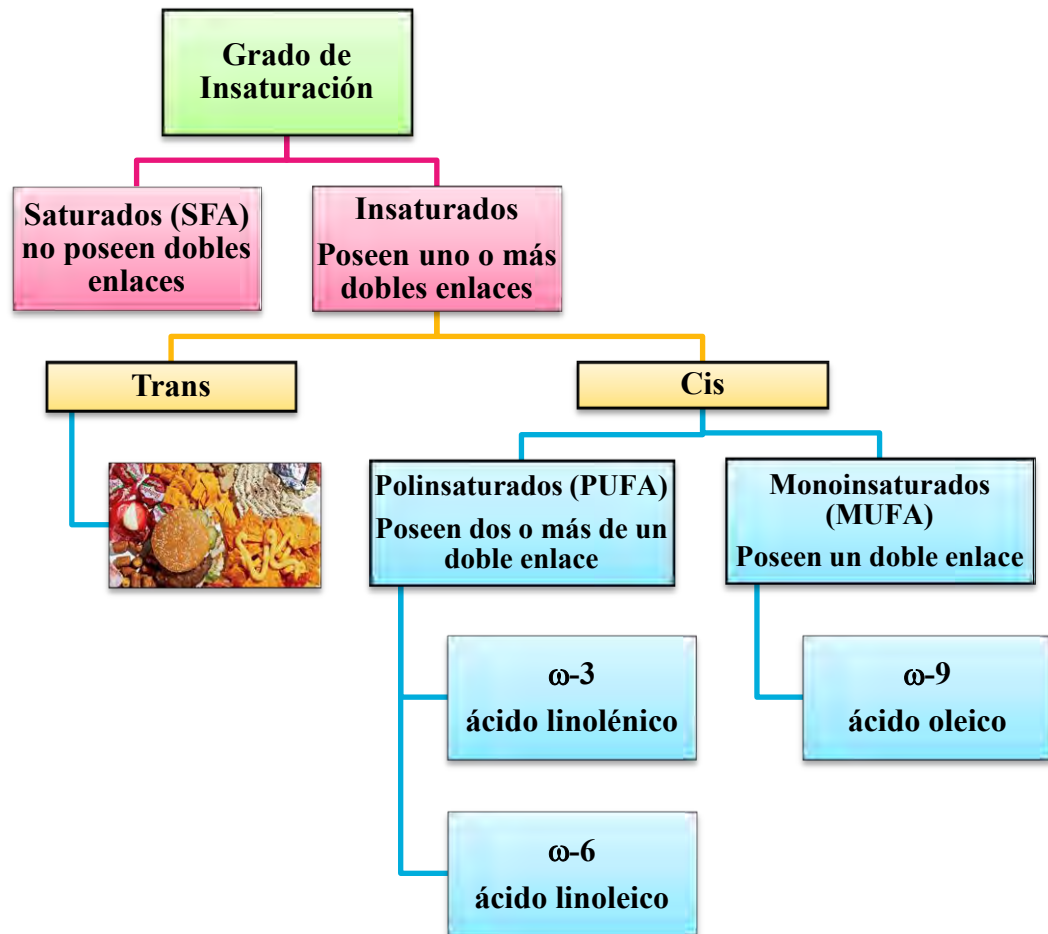


Figura 10c. Clasificación de ácidos grasos de acuerdo al grado de insaturaciones

Fuente: FAO (2010)

2.3.3.3. Mecanismo de auto-oxidación

El mecanismo se ocasiona por la producción de radicales libres (\bullet) los cuales son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, son generalmente más reactivos que los no-radicales debido a este electrón. La molécula de oxígeno (O_2) califica como un radical libre porque contiene dos electrones desapareados, pero no es particularmente reactiva debido a una distribución electrónica especial (Berbel, 2010). El

2. ANTECEDENTES

mecanismo de auto-oxidación se identifica por tres etapas: iniciación, propagación y terminación como se muestra en la Figura 11.

En el inicio, un átomo de hidrógeno ($H\bullet$) es abstraído de un ácido graso insaturado ($R: H$) formando un radical alquilo ($R\bullet$).

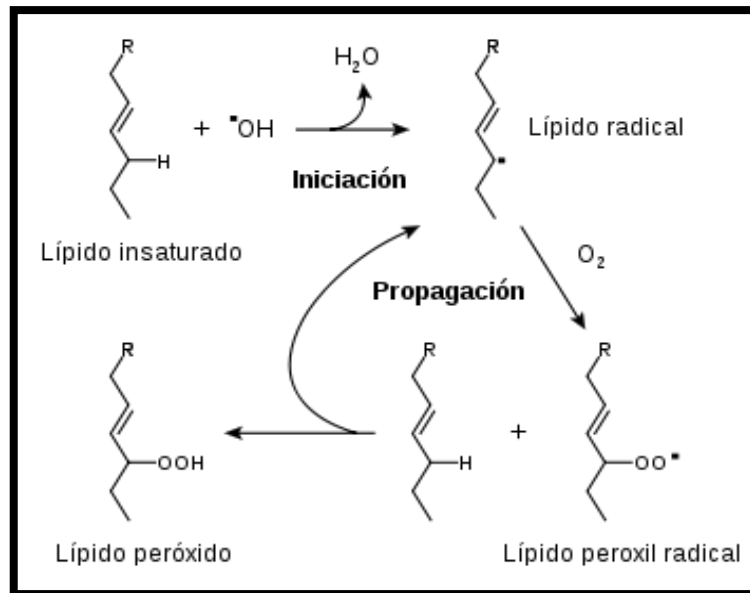
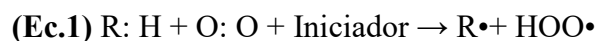


Figura 11. Mecanismo de auto-oxidación lipídica
Fuente: Berbel (2010)

La generación de este radical lipídico es termodinámicamente desfavorable y se inicia por la presencia de un iniciador como los radicales libres, el oxígeno singlete (1O_2) o pigmentos que actúan como foto sensibilizadores (Ec. 1).

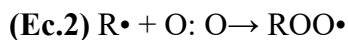
Con el fin de estabilizar, el radical alquilo ($R\bullet$), por lo general se somete a un cambio en la posición del doble enlace (cis a trans) y la producción de un sistema diseño conjugado.



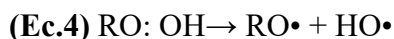
El $R\bullet$ puede reaccionar con O_2 para formar el radical peroxilo ($ROO\bullet$) de gran energía, el que puede entonces abstraer un ($H\bullet$) de otro ácido graso insaturado para formar un

2. ANTECEDENTES

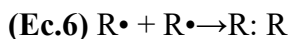
hidroperóxido (ROOH) y un nuevo radical ($R\bullet$) (Ec. 2 y 3). Este proceso se propaga entonces a otro ácido graso (Srinivasan *et al.*, 2008).



El hidroperóxido forma los radicales alcoxi ($RO\bullet$) e hidroxilo ($HO\bullet$) que pueden abstraer $H\bullet$ de los ácidos grasos insaturados o reaccionar con sistemas conjugados continuando la reacción en cadena descrito en la ecuación 4 y 5 (Decker, 2002; Srinivasan *et al.*, 2008).



Finalmente, las reacciones 6, 7 y 8 indican la terminación de la reacción, cuando 2 especies de radicales se combinan para formar una especie no radical (ROOR).



Durante la etapa de propagación de la oxidación se generan hidroperóxidos, que por ser muy reactivos, propician otras transformaciones, como su ruptura y la consecuente producción de nuevos radicales, que alimentan la reacción. Estos mecanismos forman compuestos como hexanal, heptanal, octanal, nonanal, undecanal, 2-nonenal, 2-decenal, 2-undecenal, 3-hexenal, 4-decenal, 2,3-nonadienal, 2,4-decadienal, 1-buten-3-ona, y muchos otros que son los responsables de los olores típicos de las grasas que han sufrido la reacción de auto-oxidación (Mercedes *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.3.3.4. Factores que inciden en la autoxidación

- Temperatura:

Cuando se superan los 60 °C. La velocidad de autoxidación se duplica por cada 15 °C de aumento. Se debe aclarar que la refrigeración y aun la congelación no necesariamente inhiben la autoxidación, ya que la presencia de catalizadores y la disponibilidad de los reactivos pueden provocar que se lleve a cabo, incluso en estas condiciones.

- Metales:

El cobre y el hierro promueven el inicio de la autoxidación aun cuando se encuentren en concentraciones menores que 1 ppm, por lo que es muy importante evitar todo contacto con recipientes o equipo elaborado con estos metales. El cobre tiene más especificidad para catalizar la oxidación de las grasas lácteas, mientras que el segundo favorece la oxidación de los aceites vegetales. Los ácidos grasos libres solubilizan estos iones y facilitan su acción catalizadora pues, provocan un mayor contacto con el lípido.

- Luz:

La energía radiante de longitud de onda en el ultravioleta es un importante agente que favorece el mecanismo de autoxidación.

- Actividad acuosa:

Se considera que con valores de actividad acuosa cercanos a 0,4 se forma una capa monomolecular que actúa como filtro y no deja pasar oxígeno hacia las partes internas donde están los lípidos; si la actividad acuosa es menor, se pierde dicha capa protectora y la oxidación se acelera; cuando la actividad acuosa se encuentra entre 0.4 y 0.8 se favorece la reacción debido a que se incrementa la movilidad de los reactivos, se solubilizan los metales catalizadores y se exponen nuevas superficies del producto por el aumento de volumen causado por la hidratación. A valores mayores de 0.8 la oxidación se inhibe por efecto de la hidratación y dilución de los metales o bien, por la precipitación como hidróxidos (Mercedes *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.3.4.2 Tipos de compuestos antioxidantes

Los antioxidantes empleados en la preservación de alimentos pueden ser clasificados, según su origen, en dos tipos: naturales y sintéticos.

2.3.4.2.1. Sintéticos

Entre los antioxidantes sintéticos más empleados por la industria de alimentos destacan: butil-hidroxitolueno (BHT; E 321), butil-hidroxianisol (BHA; E 320), tert-butil-hidroquinona (TBHQ), etoxiquina (EQ), galato de propilo (E 310) y quelantes de metales como EDTA y ácido cítricos, sus estructuras están representadas en la Figura 13 (Shahidi y Wanasundara, 1992).

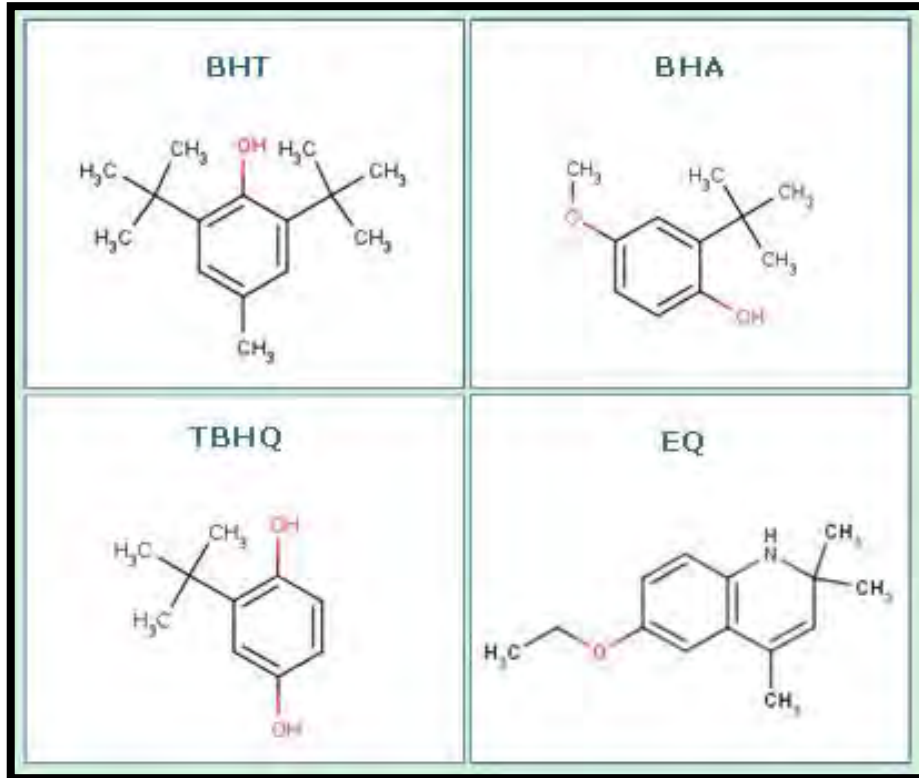


Figura 13. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia

Fuente: Shahidi y Wanasundara (1992)

El BHT y BHA son los antioxidantes fenólicos monovalentes más comunes de origen sintético, fuertemente solubles en grasas e insolubles en agua, el BHA se encuentra en el comercio como copos de cera blanca y el BHT como compuesto cristalino de color blanco (Shahidi y Wanasundara, 1992). Son efectivos para la estabilización de aceites vegetales a

2. ANTECEDENTES

la concentración máxima permitida de 200 ppm; en alimentos y aceites (Codex alimentarius, 2001).

2.3.4.2.2. Naturales

Entre los antioxidantes naturales que más se emplean como preservantes se encuentran: el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y diversos derivados del ácido rosmarínico. Tales compuestos pueden ser obtenidos: mediante extracción directa desde sus fuentes naturales (donde existen en abundancia), o bien, mediante síntesis química. Una ventaja de los antioxidantes naturales sobre los sintéticos es que sus límites máximos permitidos son superiores al de los sintéticos, por ejemplo, la dosis normal de tocoferoles en aceites que contienen elevados PUFAs son de hasta 2000 ppm (Lampi *et al.*, 2002).

Existen diversos antioxidantes de origen natural que han sido estudiados para incrementar la estabilidad oxidativa del aceite de chía en rancimat, entre ellos el extracto de romero a concentración de 250 ppm ejerce un FP de 1.60 y a 5000 ppm su factor de protección se incrementa a 3.40; el té verde a las mismas concentraciones ejerce un FP de 1.2 y 2 respectivamente, también los tocoferoles a 250 ppm tienen un FP de 1.2 y a 1500 ppm su FP de 2.1. Finalmente el palmitato de ascorbilo a 250 ppm tiene un FP de 1.1 y a 5000 ppm un FP de 4.3; por lo tanto, la adición de antioxidantes naturales aumenta el tiempo de estabilidad, dependiendo de su tipo y concentración (Ixtaina *et al.*, 2012).



3. OBJETIVOS

*Si buscas resultados distintos
No hagas siempre lo mismo...*

Albert Einstein

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Extraer compuestos bioactivos a partir de la flor de cempasúchil, mediante diferentes métodos de extracción evaluando el contenido de fenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante, empleando los extractos como antioxidantes para evitar la oxidación lipídica en un aceite de semilla de pepita verde de calabaza.

3.2. Objetivos particulares

Objetivo particular 1

Caracterización de la flor de cempasúchil a partir de sus propiedades físicas (color) y fitoquímicas (fenoles, flavonoides, y capacidad antioxidante) para evaluar su potencial como aprovechamiento tecnológico como antioxidante.

Objetivo particular 2

Obtener el extracto etanólico a partir de la flor de cempasúchil mediante el método de maceración a tres diferentes temperaturas (10, 25 y 70°C) con tres tiempos de reposo (1, 3 y 6 h); empleando como solvente mezclas de etanol-agua (70-30%) que permita seleccionar las condiciones que proporcione el mejor rendimiento en cuanto a la concentración de fenoles y flavonoides; así como mayor actividad antioxidante.

Objetivo particular 3

Obtener el extracto etanólico a partir de la flor de cempasúchil mediante el método de extracción asistida por ultrasonido a dos temperaturas (25 y 70°C) con tres tiempos de residencia (30, 60 y 90 min) empleando como solvente mezclas de etanol-agua (70-30%) que permita determinar las condiciones que generen mayor rendimiento en la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y mayor actividad antioxidante.

Objetivo particular 4

Evaluar el efecto de la aplicación de extracto natural de la flor de cempasúchil (0.1, 0.3 y 0.5%), y un antioxidante sintético (200 ppm de BHT) en el control de la oxidación lipídica en aceite de semilla de pepita verde de calabaza, evaluando los parámetros de calidad (índice de acidez, índice de Kreis e índice de peróxido) para determinar la efectividad de los extractos como antioxidantes.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con orden y tiempo

Se encuentra el secreto de hacerlo todo

Y de hacerlo bien. . . .

4. MATERIALES Y MÉTODOS

OBJETIVO GENERAL

Extraer compuestos bioactivos a partir de la flor de cempasúchil, mediante diferentes métodos de extracción evaluando el contenido de fenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante, empleando los extractos como antioxidantes para evitar la oxidación lipídica en un aceite de semilla de pepita verde de calabaza

Objetivo particular 1

Caracterización de la flor de cempasúchil a partir de sus propiedades físicas (color) y fitoquímicas (fenoles, flavonoides, y capacidad antioxidante) para evaluar su potencial como aprovechamiento tecnológico como antioxidante.

Objetivo particular 2

Obtener el extracto etanólico a partir de la flor de cempasúchil mediante el método de maceración a tres diferentes temperaturas (10, 25 y 70°C) con tres tiempos de reposo (1, 3 y 6 h); empleando como solvente mezclas de etanol-agua (70-30%) que permita seleccionar las condiciones que muestren el mejor rendimiento en cuanto a la concentración de fenoles y flavonoides; así como mayor actividad antioxidante.

Objetivo particular 3

Obtener el extracto etanólico a partir de la flor de cempasúchil mediante el método de extracción asistida por ultrasonido a dos temperaturas (25 y 70°C) con tres tiempos de residencia (30, 60 y 90 min) empleando como solvente mezclas de etanol-agua (70-30%) que permitan determinar las condiciones que generen mayor rendimiento en la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y mayor actividad antioxidante.

Objetivo particular 4

Evaluar el efecto de la aplicación de extracto natural de la flor de cempasúchil (0.1, 0.3 y 0.5%), y un antioxidante sintético (200 ppm de BHT) en el control de la oxidación lipídica en aceite de semilla de pepita verde de calabaza, evaluando los parámetros de calidad (índice de acidez, índice de Kreis e índice de peróxido) para determinar la efectividad de los extractos como antioxidantes.

Actividades

- 1) Acondicionamiento de la flor de cempasúchil
- 2) Obtención del extracto por diferente método.
 - Maceración T: 10, 25 y 70 °C; t: 1, 3 y 6 h, EUA
 - T: 25 y 70 °C; t: 30, 60 y 90 min
- 3) Evaluación de fenoles (Folin Cilcateu), flavonoides y capacidad antioxidante (Por ABTS*)

Actividades

- 1) Acondicionamiento de la pepita verde de calabaza.
- 2) Extracción del aceite de pepita verde de calabaza por UAE.
- 3) Evaluación de parámetros de calidad en el aceite partir de la adición de extracto natural de cempasúchil así como del sintético BHT.

Resultados

Análisis estadístico

Análisis y discusión

Conclusiones

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2. Material de estudio

La flor de cempasúchil que se empleó es originaria del estado de Puebla y Estado de México, la cual fue transportada al laboratorio de Pos-cosecha del Centro de Asimilación Tecnológica de la FESC-UNAM. Una vez obtenida se procedió a realizar su acondicionamiento.

4.2.1. Acondicionamiento de la flor de cempasúchil

Fue necesario un tratamiento previo, para poder llevar a cabo la extracción etanólica. Por lo que se realizó el procedimiento que se observa en la Figura 14.

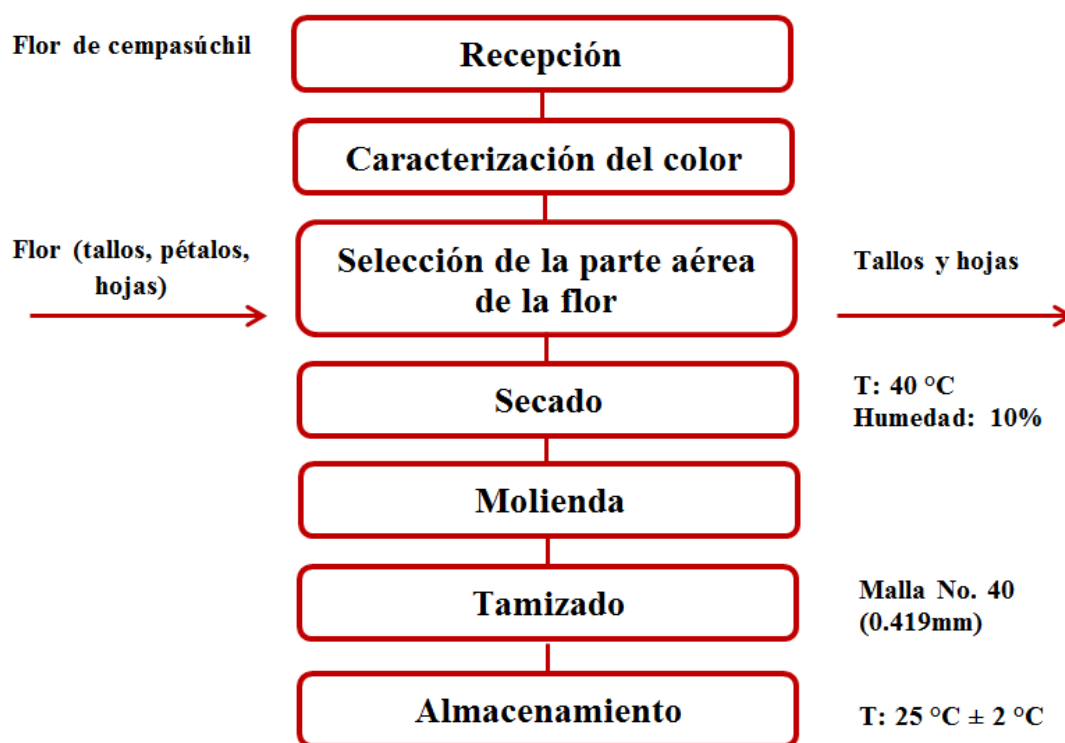


Figura 14. Diagrama de bloques para el acondicionamiento de la flor de cempasúchil

El procedimiento se detalla a continuación:

1) Recepción:

La flor de cempasúchil se adquirió en forma de manojos en los mercados locales de Cuautitlán Izcalli, como se observa en la Figura 15. Ésta fue separada y clasificada de

4. MATERIALES Y MÉTODOS

acuerdo al color que presentó. Este procedimiento se realizó de forma subjetiva, para después caracterizar el color por medio de la instrumentación adecuada.

Figura 15. Flor de cempasúchil adquirida en forma de manojo



2) Caracterización de color:

Para obtener un rango en la tonalidad de la flor y evitar diferencias entre las mismas, se procedió a caracterizar el color, haciendo uso del colorímetro, (MINOLTA modelo CR300) utilizando el sistema Hunter Lab, y analizando los resultados por medio de un análisis ANOVA, y pruebas Tukey y Duncan ($p \leq 0.05$), de esta manera se seleccionó el rango en la tonalidad con la que se trabajó (Figura 16).



Figura 16. Colorímetro Minolta CR300

3) Selección de la parte aérea de la flor de cempasúchil:

La flor de cempasúchil se deshojó de forma manual, para trabajar únicamente con los pétalos de la flor, y el resto fue desechado, (Figura 17). A los pétalos se les midió la humedad inicial, mediante termo balanza, así como las propiedades fitoquímicas (fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante) por medio de las técnicas analíticas que se encuentran en el apartado 4.5.

4. MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 17. Selección de la parte aérea de la flor de cempasúchil

4) Secado por estufa, molienda, tamizado y almacenamiento:

Los pétalos fueron pesados y colocados en charolas de forma uniforme, para someterse a un secado por estufa durante 28h a 40°C, alcanzando una humedad final del 10±2%, se procedió a una molienda para disminuir el tamaño de partícula haciéndolo pasar por una malla No. 40 obteniendo así un tamaño de partícula de 0.419 mm, para después ser envasado y almacenado en un lugar seco a una temperatura de 25 ± 2°C para su posterior uso (Figura 18).



Figura 18. Procedimiento de acondicionamiento de la flor de cempasúchil

4.3. Obtención de extractos etanólicos

Una vez secos y molidos los pétalos de la flor de cempasúchil se procedió a la obtención de los compuestos bioactivos, para ello se aplicaron 2 métodos diferentes: maceración y extracción asistida por ultrasonido (UAE). En ambos métodos se empleó una relación 1:10 muestra: solvente, utilizando como solvente una mezcla de etanol-agua (70:30). Las condiciones propuestas se presentan en la Tabla 4.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4. Condiciones de proceso para la extracción de compuestos fenólicos

Método de extracción	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Maceración	70, 25 y 10	1,3 y 6
Extracción asistida por ultrasonido.(UAE)	25 y 10	0.5, 1, 1.5

A los extractos obtenidos se evaluó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, se determinaron flavonoides siguiendo la metodología de Cornejo (2012) y la capacidad antioxidante por ABTS⁺. Las técnicas empleadas se detallan en el apartado 4.5.

4.4. Evaluación de la oxidación lipídica en aceite de pepita de calabaza

4.4.1. Extracción de aceite de pepita verde de calabaza

El aceite de semilla de pepita verde de calabaza fue extraído por el método de extracción asistida por ultrasonido. El proceso se detalla a continuación:

- 1) Antes de extraer el aceite, la semilla verde de calabaza se sometió a una molienda (Figura 19).



Figura 19. Molienda de la semilla verde de calabaza

- 2) Para la obtención del aceite de semilla de calabaza se llevó a cabo un baño ultrasónico, donde se empleó una relación de soluto-solvente de 2:3, empleando como solvente hexano, el proceso se llevó a cabo durante 60 min (Figura 20).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 20. Extracción del aceite de semilla de pepita verde de calabaza por el método de UAE



- 3) Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación por 5 min a 3000 rpm con el objetivo de retirar las partículas sólidas, y recuperar el sobrenadante (Figura 21).



Figura 21. Centrifugación del aceite de la semilla verde de calabaza

- 4) Una vez recuperado el sobrenadante se evaporó el hexano con ayuda de un rotavapor DLAB RE100-Pro (Figura 22), se almacenó en un frasco ámbar a temperatura de $4 \pm 0,5$ °C, para su posterior uso.

Figura 22. Rotavapor DLAB RE100-Pro



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.2. Evaluación del efecto antioxidante de los extractos de cempasúchil aplicado en el aceite de semilla de calabaza.

Para evaluar el efecto del extracto de flor de cempasúchil en el control de la oxidación lipídica del aceite de semilla verde de calabaza, se evaluaron diferentes parámetros de calidad (índice de acidez, índice de peróxidos, e índice de Kreis; ver apartado 4.5) en el aceite de pepita verde de calabaza bajo condiciones de deterioro, es decir induciendo la oxidación por medio de la elevación de temperatura a 250°C durante 120 y 240 min, comparando la muestra control, una muestra con la adición del antioxidante natural a partir de la flor de cempasúchil a concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.05% y otra muestra con antioxidante sintético (BHT) a una concentración máxima de 200 ppm.

4.5. Técnicas analíticas

- Fenoles totales

Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfotungstomolibdico, dando una coloración azul, esto se debe a la reducción del ácido, por compuestos fenólicos en solución alcalina. Estos son detectados por espectrofotometría a una longitud de onda de 765nm (Fogliano *et al.*, 1999). Los resultados se expresan en mg de ácido gálico/g de muestra.

- Determinación de Flavonoides

La quercitina, es un citroflavonoide que confiere una coloración amarillo-verdoso, dentro de este grupo se encuentran el Kaempferol y mirecitina. En este método el contenido total de flavonoides (CFT) de los extractos es establecido por este método espectrofotométrico. (Cornejo-García, 2012). Los resultados se expresan en mg de Quercitina/g de muestra.

- Capacidad Antioxidante

Este método se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical cationico de color verde azulado $ABTS^+$ se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio, por lo que se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical a 734 nm, como

4. MATERIALES Y MÉTODOS

porcentaje de inhibición del radical catión ABTS⁺ (Re *et al.*, 1999). Se usa Trolox como estándar y los resultados se expresan en mM Trolox.

- Índice de acidez

Es una disolución de la muestra en una mezcla de disolventes y valoración de los ácidos grasos libres mediante una disolución etanólica de hidróxido de potásico.

El procedimiento se efectuó por triplicado, consistió en pesar 1 g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125mL, se añadió 15mL de alcohol neutralizado (empleando tiras de indicador de pH) a 60°C, para después titular con KOH 0.0025N, se agitó después de cada adición de álcali. El índice de acidez se calculó como mg de KOH por g de muestra y el índice de acidez como % ácido oleico (AOAC, 1980 y Kira, 1991).

- Índice de peróxido

Indica los miliequivalentes de peróxido por kg de muestra, que oxidan al yoduro de potasio, el yodo liberado se valora con solución de tiosulfato sódico bajo condiciones establecidas, determinando todas las sustancias, en términos de peróxidos, existentes en la solución de la muestra.

Para llevar a cabo la determinación se pesó 1g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125mL y se agregó 10mL de solución de ácido acético glacial y cloroformo 3:2, y 0.16mL de una solución saturada de KI, una vez transcurrido 1min se le añadió 10mL de agua destilada y como indicador se le añadieron 0.16mL de almidón al 1%, se procedió a titular con una solución de tiosulfato sódico al 0.1 N (Kira, 1991). Los resultados se expresan en miliequivalentes de peróxido por Kg de muestra.

- Índice de Kreis

Determina la rancidez, el grado de descomposición común de las grasas, el cual se debe al ataque del oxígeno a los centros no saturados, se basa en la producción de color rojo debido a la reacción extremadamente sensible entre la floroglucina y un compuesto presente en las grasas o aceites rancios: el aldehído epidrínico (Kira, 1991).

Empleado tubos de ensaye, se añadió 0.5 g de muestra, a estos se le agregaron 1mL de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 0.25 mL de disolución de

4. MATERIALES Y MÉTODOS

floroglucina, se agitó la mezcla burbujeando aire entre 2 a 3 segundos, posteriormente se calentó a baño María a 45°C por 15 min. Se midió la absorbancia de la muestra a 545nm frente a un blanco de reactivos. El índice de Kreis se calculó como la absorbancia a 545nm/g de grasa.

4.6. Tratamiento estadístico.

Los resultados se analizaron con un paquete estadístico IBM SPSS STATICS versión 20, donde se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias, mediante pruebas de rango múltiple (Tukey y Duncan) aplicando un nivel de significancia del $p \leq 0.05$, para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Nunca rompas el silencio,
Si no es para mejorarlo...*

Ludwig van Beethoven

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del color de la flor de cempasúchil

Para la extracción de compuestos antioxidantes procedentes de la flor de cempasúchil, fue necesario realizar una caracterización de la misma, debido a que las flores obtenidas presentaban diferentes características, para ello se evaluó el color de los pétalos y con ello se pudieron formar 14 grupos, los cuales se presentan en la Figura 23, en donde se muestra la selección y clasificación que se llevó a cabo de forma subjetiva de la flor, con el objetivo de trabajar con aquella flor que presentara tonos anaranjados, puesto que las flores con estos tonos tienen una mayor concentración de carotenoides (xantófilas) y luteína que pueden tener beneficios importantes para la salud debido a sus efectos antioxidantes (Urango, 2009) y por tanto, se atribuyó en que un tono más anaranjado, mayor será el contenido en compuestos bioactivos presentes en la flor.

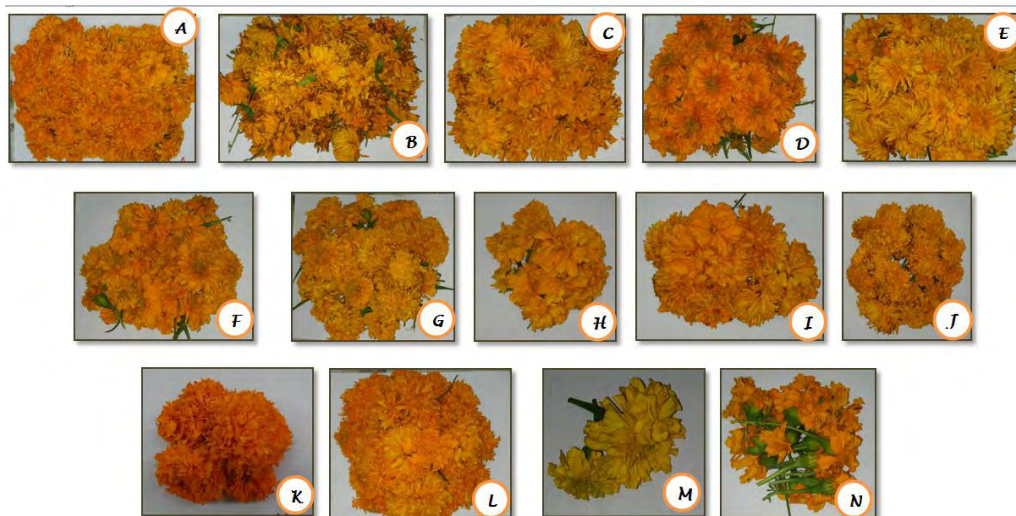


Figura 23. Selección y clasificación de la flor de cempasúchil

Una vez clasificadas las flores en estos 14 grupos se procedió a evaluar el color de los pétalos por medio del colorímetro minolta CR300, dicho parámetro representa la apariencia del color de acuerdo al modelo CIECAM02, definiéndolo como "el grado en que un estímulo puede describirse como similar o diferente de los estímulos primarios dando como resultado final el color o tono de cierta materia (por sus siglas en inglés °HUE). Posterior se llevó a cabo un análisis ANOVA, así como pruebas de Tukey y Duncan ($p \leq 0.05$). En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos con respecto al tono de la flor de cempasúchil que presentó de acuerdo a cada grupo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

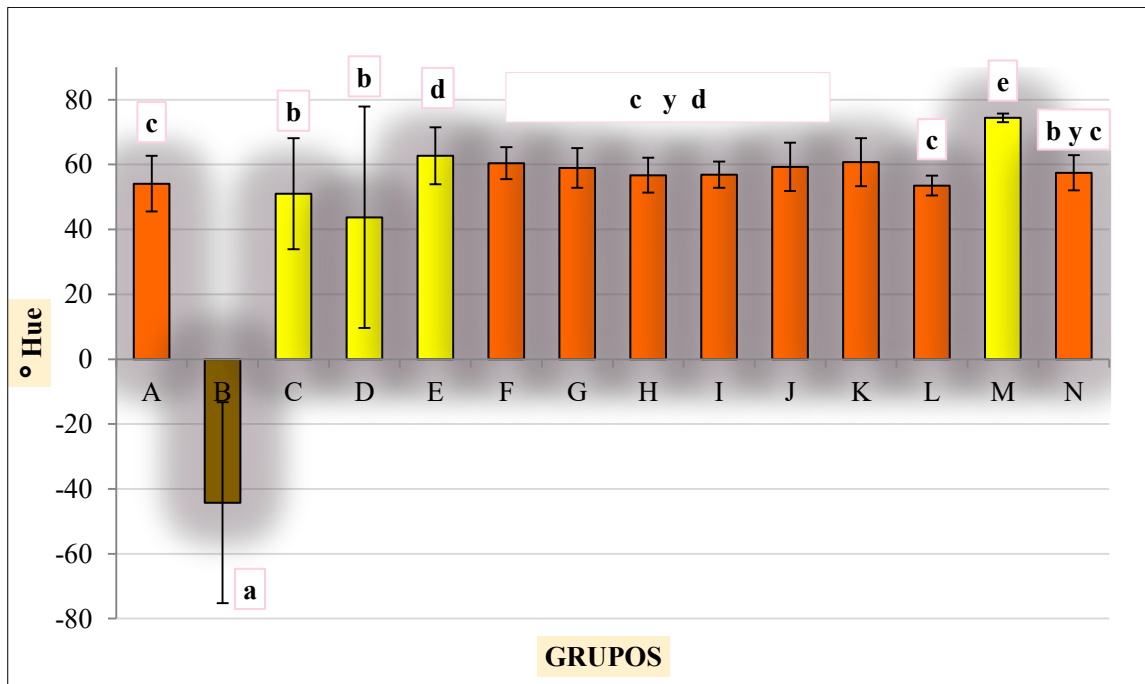


Figura 24. Tonalidad de la Flor de Cempasúchil

A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y N: Representan los catorce grupos seleccionados de forma subjetiva
Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$ (a, b, c, d, e)

Como se puede observar en la Figura 24 de los grupos “F” a grupo “K” no presentan diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en el tono, mientras que el resto de los grupos seleccionados presentaron diferencia significativa entre ellos ($p \leq 0.05$). De acuerdo a la clasificación con respecto al $^{\circ}\text{Hue}$ se clasifican en tonos amarillos cuando el ángulo corresponde a 90° , siendo el grupo “M” que exhibe un resultado cercano a éste, y por lo tanto concuerda con lo que se observa en la Figura 23 mostrando pétalos amarillos en la flor, para los grupos “C” y “D” el ángulo obtenido fue menor a 90° , lo que indica mayor tendencia a colores como naranja siendo análogo de la misma forma al color que se observó de forma subjetiva en los pétalos de las flores, y por último cuando el $^{\circ}\text{Hue}$ presentó un resultado mayor a 270° de acuerdo a la misma clasificación, éste tiende a presentar colores azules a rojos, por lo que el resultado obtenido en el grupo “B”, también es semejante al que se observó en los pétalos de la flor presentando un color oscuro, no característico de la flor, debido a que se encontraba en mal estado, manifestando marchitamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de color tuvo la finalidad de seleccionar el rango de la tonalidad con el cual se iba a trabajar durante el proyecto, sin embargo el rendimiento que se obtiene después de un secado de las flores de cempasúchil fue relativamente bajo, puesto que la humedad inicial que presentó la flor fue de 85.76% aproximadamente y se requería llegar un porcentaje de humedad del $10\pm 2\%$, por lo que existe una reducción de peso considerable, cerca del 77.26%. Sin embargo el proceso de secado de las flores es necesario para la conservación de las mismas, además de que si se controlan de forma adecuada el proceso de secado (temperatura y tiempo) favorecerá concentración de compuestos bioactivos, y a su vez protegiendo algunos pigmentos (Badui, 2006).

Obteniendo finalmente un rendimiento de 227.4 g de flor seca por cada kilogramo de flor fresca, de acuerdo a esto se tomó la decisión de trabajar con todas las tonalidades de flor que presentaron tonos naranjas excluyendo flores marchitas o flores amarillas.

5.2 Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en la flor fresca de cempasúchil.

Los fenoles químicamente son sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales, estos a su vez se dividen en flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles, sustancias que son esenciales para el desarrollo y la reproducción de las plantas. Debido a que los compuestos fenólicos se presentan distribuidos ampliamente en las frutas y vegetales, originan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas (López, 2008), por lo que la flor de cempasúchil al pertenecer a este reino, es evidente que los compuestos fenólicos serán un constituyente principal en su composición, en la Tabla 5 se muestra los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles totales, así como la capacidad antioxidante en la flor de cempasúchil.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante en flor de cempasúchil.

Contenido de Fenoles totales	Contenido de Flavonoides	Capacidad Antioxidante
54.30 ± 2.78 mg de ácido gálico/g de flor fresca	20.99 ± 0.71 mg de Quercetina/g de flor fresca	124.94 ± 4.97 TE $\mu\text{mol/g}$ flor fresca

Como se puede observar en la Tabla 5, el contenido de fenoles totales fue 61.34% mayor al de flavonoides, lo que indicaría que dentro de la flor de cempasúchil encontramos diversos compuestos de este tipo, presentando una elevada capacidad antioxidante, lo que la hace una valiosa fuente, si se compara con algunas plantas comestibles como los son berros por su contenido en compuestos polifenólicos, resulta que la flor de cempasúchil contiene 23.14% más compuestos fenólicos totales que éstos, pues contienen cerca de 41.732 ± 0.312 (Gracia, 2007), lo cual da pauta para el aprovechamiento de la flor. Es importante mencionar que la concentración de dichos compuestos en las plantas es compleja, pues los fenoles se asocian con procesos de maduración de plantas y tejidos, mecanismos de defensa, y características importantes de productos alimenticios derivados de plantas, de acuerdo a lo anterior, su concentración dependerá del genotipo que presente (Niemenak, 2006); de esta forma también la acción antioxidante de cada fenol dependerá de la cantidad de grupos hidroxilos que presente en su estructura (Rastija y Medic, 2009).

5.3. Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por el método de maceración.

5.3. 1. Cuantificación de fenoles totales

Una vez caracterizada la flor de cempasúchil, se procedió analizar los extractos de los mismos en diferentes condiciones de tiempo y temperatura, en primer lugar se realizó la extracción por el método de maceración. En la Figura 25 se presentan los resultados correspondientes al rendimiento de compuestos fenólicos en el extracto de flor de cempasúchil obtenido por el método de maceración.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

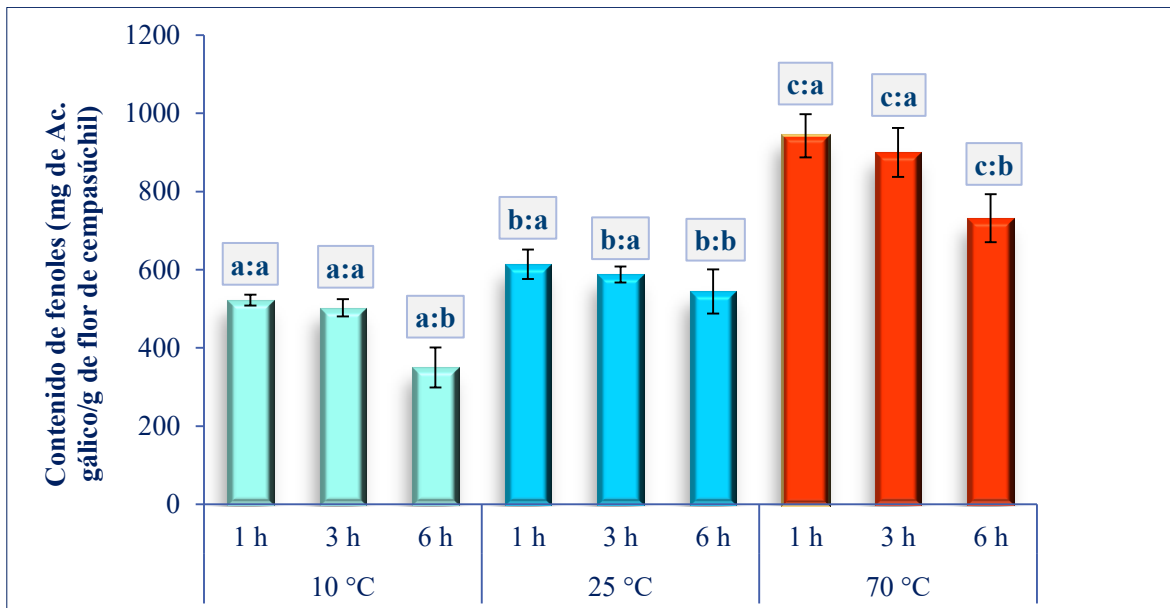


Figura 25. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

En la Figura 25 se observa que los extractos obtenidos a una temperatura de 70°C durante 1h, presentaron el mayor contenido de fenoles: 935.74 mg de ácido gálico/g de flor de cempasúchil, presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al contenido de fenoles en los extractos obtenidos en las otras dos temperaturas (10 y 25°C), en donde la primera condición (10°C) presentó un contenido de alrededor de 350.12 mg de ácido gálico/g de flor de cempasúchil, siendo estos extractos los que presentaron 50% menor concentración en contenido de fenoles, por lo que se deduce que al incrementar la temperatura durante la extracción la obtención de compuestos fenólicos resulta ser más eficiente con el 62,58%, por su parte si se comparan temperaturas de 10 y 25 °C entre sí, no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$) los resultados obtenidos pueden ser explicados de investigaciones anteriores, donde se ha establecido que el incremento de temperatura favorece las reacciones de división y el rompimiento de la pared celular, debido a que la energía térmica aumenta la vibración molecular y por tanto la división y separación de los compuestos, lo que favorece la ruptura de fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces (Duque, 2005), dando como resultado mayor contenido de fenoles en el extracto. Mientras que el factor tiempo afectó de forma inversa la extracción de los compuestos fenólicos, observándose que al aumentar el tiempo de residencia de extracción, disminuye la concentración de compuestos fenólicos. Por lo que exponer a los extractos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

durante 6h en maceración presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) cuando se reduce el tiempo durante 1 y 3h, habiendo una reducción del contenido de fenoles por lo menos de un 10% en cada condición. Esto corresponde a lo que reportan Naczk y Shahidi (2004) que a largos periodos de extracción que varían de 1 min a 24 h, incrementan la oportunidad de oxidación de los compuestos y que a medida que pasa el tiempo hay posibilidad de una degradación.

5.3.2. Cuantificación de flavonoides

Los flavonoides son un grupo que están presentes en muchos vegetales y son los más comunes; pues están ampliamente distribuidos en las plantas, dando lugar a pigmentos principalmente amarillos, estos a diferencia de los fenoles poseen en su estructura mayor grupos hidroxilo (Zheng y Wang, 2001), otorgando mayor estabilidad durante los procesos de extracción y oxidación.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de flavonoides en los extractos de flor de compasúchil a partir del método de maceración.

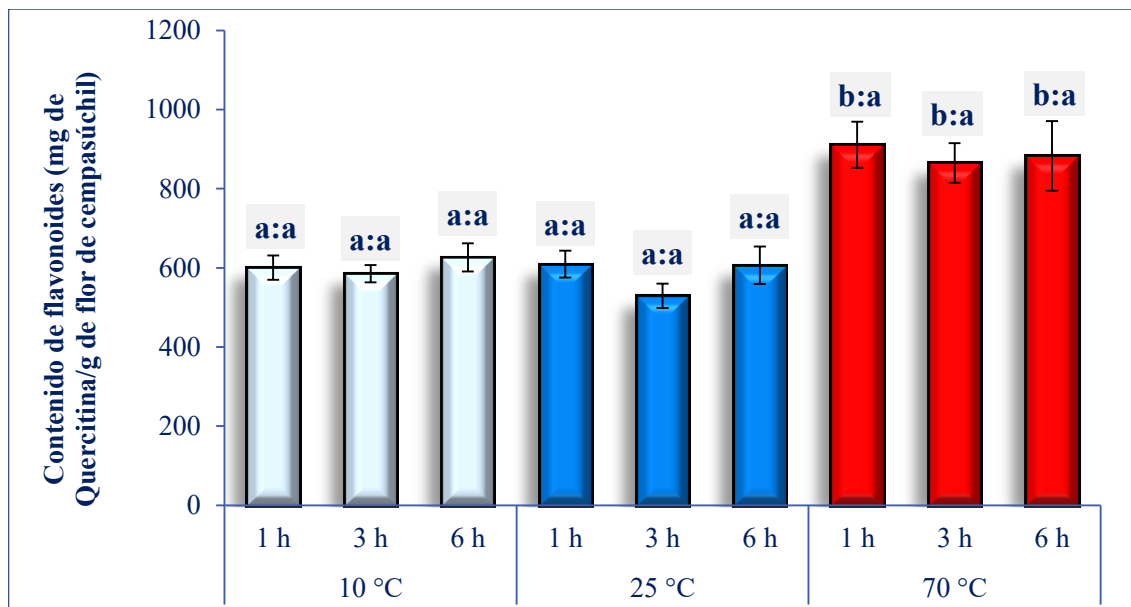


Figura 26. Cuantificación de flavonoides presentes en los extractos de la flor de compasúchil obtenidos por el método de maceración. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del contenido de flavonoides, se observa una tendencia similar a lo obtenido en el contenido de fenoles totales, en donde la mayor concentración de estos compuestos se observa en los extractos obtenidos a una temperatura de 70°C, debido al aumento de la temperatura favoreciendo la ruptura de la pared celular del material, logrando mayor extracción de compuestos, resultando ser diferentes significativamente ($p \leq 0.05$) en la concentración de compuestos en el extracto cuando se somete a una temperatura de 10°C y 25°C, presentando una concentración de flavonoides del 37.18% mayor.

Mientras que el factor tiempo no afectó dicha concentración de los flavonoides en los extractos.

De acuerdo a Badui (2006) la resonancia que le confieren los anillos bencénicos presentados en la estructura de los flavonoides; hace que la estabilidad molecular sea mayor, soportando tanto bajas y altas temperaturas, hasta de 300°C, a su vez pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos sin perder sus propiedades estructurales, además de ser muy estables al calor, pues se observa que conforme transcurre el tiempo, dichos compuestos parecen tener mayor estabilidad, si se comparan con los fenoles, puesto que no existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre estas condiciones, de la misma forma Badui (2006) argumenta que los flavonoides también son compuestos que son estables a las reacciones de oxidación, resistiendo la mayoría de los diferentes tratamientos que se puedan llegar a emplear en la manufactura de alimentos, por lo que emplear cortos o largos periodos no alteran la estabilidad de los compuestos.

5.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante.

Es necesario mencionar que compuestos fenólicos tales como flavonoides y derivados del ácido cinámico (ác. ferrílico, ác. cumárico, ác. sinápico y caféico), son considerados antioxidantes primarios, pues al contener hidrógenos fenólicos hacen que tengan carácter ácido, lo que los hace que sean aceptores de radicales libres, y de acuerdo al pH en que se encuentran pueden actuar como agentes quelantes de metales; ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos (Decker 1997), pues estos se basan en las propiedades redox, absorción y neutralización de radicales, debido a la capacidad

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

para donar estos átomos de hidrógeno y de esta forma transformar al radical libre en un radical debil no tóxico (Posada *et al.*, 2003).

En la Figura 27 se presentan los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de los extractos de flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración.

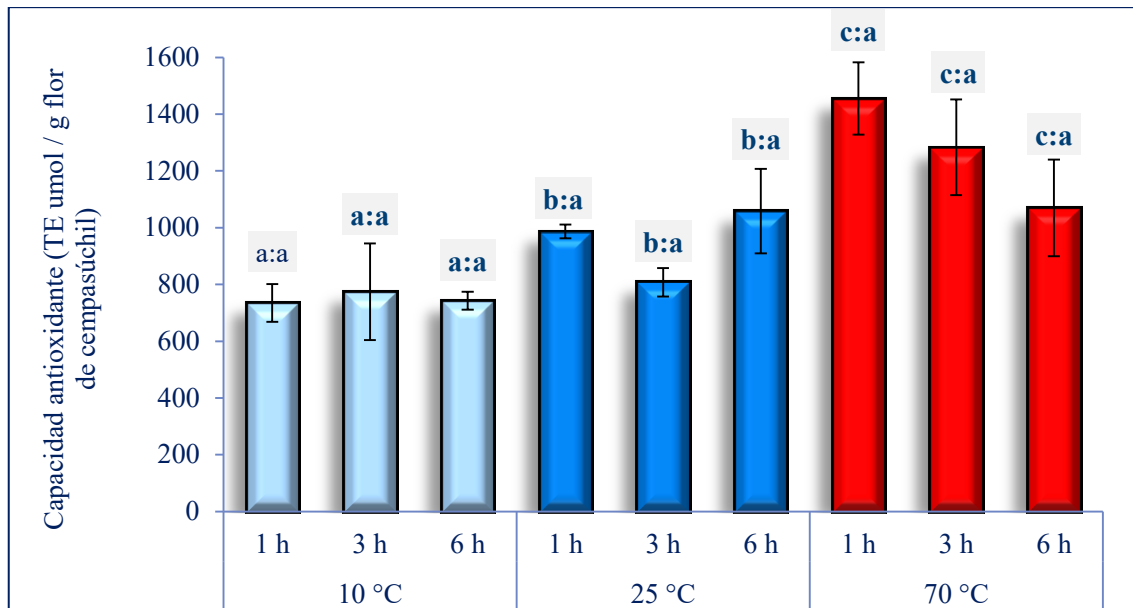


Figura 27. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

En la Figura 27 se observa una relación proporcional en la capacidad antioxidante con respecto al aumento de temperatura durante el proceso de extracción, mostrando el efecto que tiene la temperatura sobre la respuesta de la actividad antioxidante, lo cual se relaciona con la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, de esta forma el extracto que presenta la mejor capacidad antioxidante es cuando es sometido a una temperatura de 70°C durante 1h, dando como resultado $1455.20 \pm 127,30$ TE $\mu\text{mol/g}$ de flor de cempasúchil, si se compara con los resultados que se obtuvieron con temperaturas de 10 y 25°C, muestran diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre estas, donde al llevar a cabo la extracción a 10°C presentó un contenido en torno a los $1069.50 \pm 127,30$ TE $\mu\text{mol/g}$ de flor de cempasúchil representado el 20% menos a lo que se obtiene cuando se aumenta la temperatura, de esta

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

forma existe una relación proporcional con los resultados anteriores puesto que a menor contenido de compuestos fenólicos menor será la capacidad antioxidante y viceversa.

Del mismo modo que sucedió en el contenido de flavonoides, el tiempo de extracción no fue un factor importante que interviniera en la capacidad antioxidante, por lo que no mostraron diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en esta condición.

De acuerdo a los resultados obtenidos las mejores condiciones que se emplearon para obtener la mejor respuesta en la capacidad antioxidante, fueron durante 1h y 70°C, se observó que el incrementar la temperatura durante la extracción por maceración aumenta la cantidad de compuestos bioactivos tales como los flavonoides, que exhiben un amplio rango de efectos biológicos y antioxidantes, incluido antibacterial, antiviral, antiinflamatorio, antialérgico, etc. (Heim *et al.*, 2002), este efecto es debido a la propiedad antioxidante de algunos flavonoides y está determinada principalmente por la estructura que presentan. La presencia de grupos hidroxilo en posición o-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones, (2) la presencia de un doble enlace en la posición 2,3 en el anillo C, (3) la presencia de un grupo 4-carbonilo en el anillo C, posición 3,5; que son necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Heim *et al.*, 2002; Bors *et al.*, 1990).

También dependerá de la interacción que exista entre ellos, por lo que puede provocar sinergismo o bien antagonismo (Bocco *et al.*, 1998). Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante, pues su actividad medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C (Merck, 2000), seguido por el kaempferol y la mirecitina (Charalambous, y Bruckner, 2002). De este modo se encuentra que dentro de la composición fitoquímica de la flor de cempasúchil, la quercitina ocupa el 3er lugar total en contenido, el kaempferol en 2do y la mirecitina en 1ero (Faizi y Naz 2004), por lo que la actividad antioxidante podría atribuirse mayormente a los flavonoides.

Por su parte y en general el grupo de los ácidos fenólicos se encuentra que los grupos sustituyentes dadores de electrones mejoran la actividad antioxidante. Los ácidos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cinámicos, son más activos que los benzoicos respectivos; porque el grupo C=C, aumenta la conjugación del radical fenoxilo (Pokorny, 2006; y Marinova, 2008) de acuerdo a Kaisoon *et al.*, (2012) reportan que el contenido en la flor de cempasúchil de estos ácidos en comparación con los ácidos benzoicos corresponden más del 50%, por lo que se esperaría que la capacidad antioxidante estuviera dada por los ácidos fenólicos, sin embargo Cuvelier *et al.*, (2002) reportan que la presencia de más de 3 grupos hidroxilos sobre un núcleo aromático, no garantiza ni mejora la eficiencia antioxidante, puesto que siguen siendo inestables con respecto a los flavonoides, esto explica que aunque el contenido de fenoles sea similar con el contenido de flavonoides el comportamiento en la actividad antioxidante no corresponde totalmente a estos, aunque también existe influencia si bien en menor proporción.

5.4. Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por el método de extracción asistida por ultrasonido

5.4.1. Cuantificación de fenoles totales

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) a diferencia de la extracción por maceración, acelera la transferencia de calor y masa haciendo que haya una reducción en el tiempo considerable, pues las ondas de ultrasonido después de la interacción con el material alteran las propiedades físicas y químicas, así mismo el efecto cavitacional facilita la liberación de compuestos extraíbles deseables, y de esta manera mejora el transporte de masa mediante la ruptura de las paredes celulares (Chemat *et al.*, 2011).

En la Figura 28 se presentan los resultados obtenidos en cuanto al contenido de fenoles totales de los extractos de flor de cempasúchil obtenidos por el método de ultrasonido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

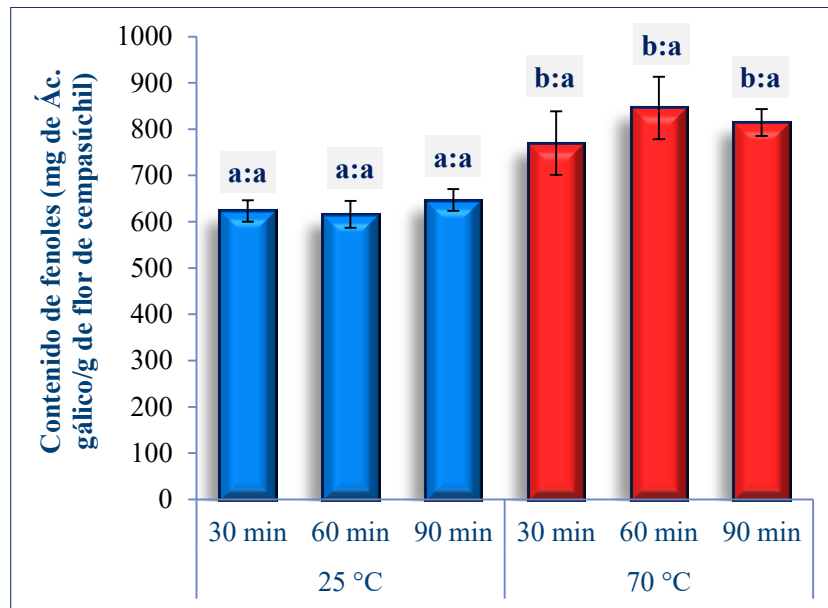


Figura 28. Cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

Como se observa en la figura 28, el contenido de fenoles fue 27% mayor en los extractos obtenidos a 70°C durante 1h, alrededor de 845.80 mg de ácido gálico/g de flor de cempasúchil habiendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles si se contrasta cuando se emplea una temperatura de 25°C, misma tendencia que se observó en el método de maceración, por su parte el método de EAU resultó ser efectivo, pues mostró una reducción en el tiempo de extracción, pues a medida que transcurre el tiempo, el contenido de fenoles no muestra diferencia significativa ($p \geq 0.05$), al reducir el tiempo no se favorece la degradación de los compuestos fenólicos, por lo que exponer a estos compuestos relativamente a periodos cortos no hay oxidación y acelera la obtención (Naczki y Shahidi, 2004).

5.4.2. Cuantificación de flavonoides

En la Figura 29 se presentan los resultados obtenidos en cuanto al contenido de flavonoides totales de los extractos de flor de cempasúchil obtenidos por el método de ultrasonido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

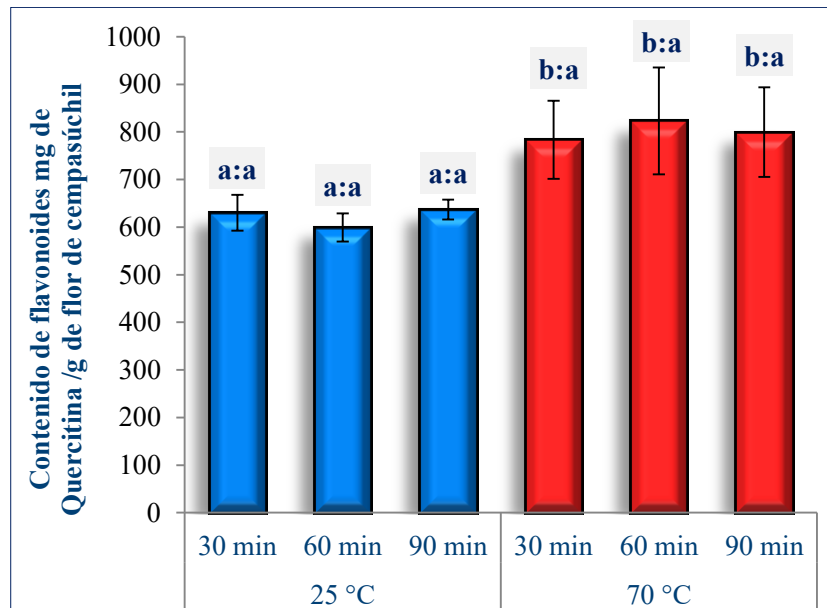


Figura 29. Cuantificación de flavonoides presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

Como se observa en la figura 29 al igual que en el caso de fenoles totales se encontró mayor concentración de flavonoides en un 28% en los extractos obtenidos por el método de ultrasonido a una temperatura de 70°C siendo de 823.10 mg de quercitina/g de flor de cempasúchil, comparado con los extractos obtenidos a 25°C en el cual se obtuvo una concentración aproximada de 585.10 mg de quercitina/g de flor de cempasúchil, mostrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$), cabe destacar que cuando se modificó el tiempo, no mostró efecto sobre la concentración de los flavonoides dentro del extracto, no presentando diferencia significativa ($p \geq 0.05$), esto se le atribuye a la reducción del tiempo en la que se sometió la extracción, por lo que no se favorece la degradación de los mismos (Nazk y Shahidi, 2004) además de ser compuestos estables debido a la estructura que presentan, como ya se discutió anteriormente.

Por lo que el mayor contenido de compuestos tanto en fenoles como en flavonoides se tiene a temperaturas de 70°C correspondientes a lo que se obtuvo por el método de maceración; sin embargo, la extracción asistida por ultrasonido otorga rendimientos del 89.76% cuando se somete a 70°C durante 1h mientras que el método de maceración da rendimientos mayores del 91.93% sin embargo este debe ser sometido durante 3h, lo que implica aumento en el tiempo y en el costo energético, esto sucede debido a que el

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fenómeno de cavitación que está presente en el método de UAE, y la alta presión junto con la temperatura que se genera, destruye las paredes celulares de la planta matriz y el contenido es puesto en libertad en el medio, lo que favorece que el tiempo se reduzca de forma considerable (Chemat *et al.*, 2011).

5.4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

Anteriormente se discutió que la actividad antioxidante está dada principalmente por los flavonoides y que existe también influencia de los compuestos fenólicos y de éstos, los cinámicos, dicha respuesta está dada por la estructura que poseen (Rastija y Medic, 2009), además que tienen diferente capacidad unos de otros (Bocco *et al.*, 1998).

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante presente en los extractos de flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE.

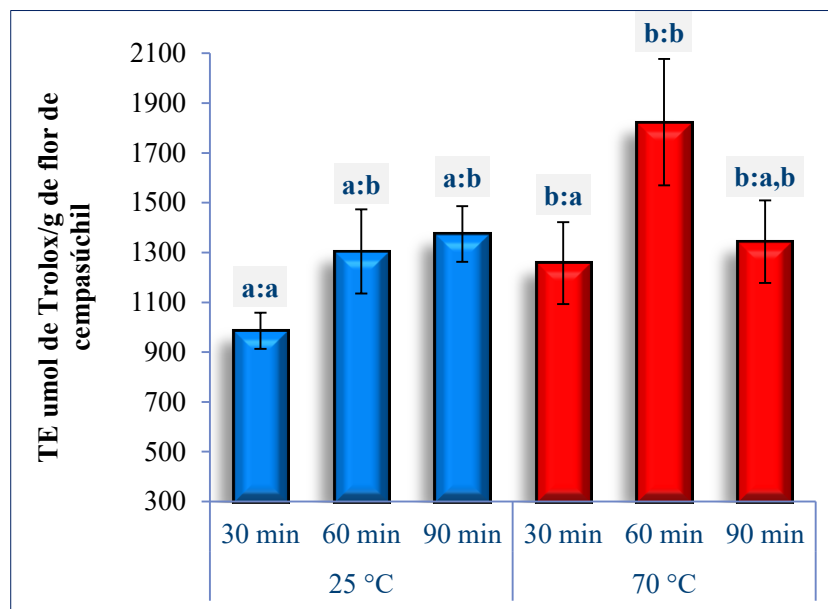


Figura 30. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE. 1ª letra indica: Temperatura y la 2ª letra indica: Tiempo. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

Los resultados que se obtuvieron se muestran similares a los presentados por los extractos de flor de cempasúchil obtenidos por el método de maceración, en donde se observa que al incrementar la temperatura durante la extracción se favorece la extracción y por ende se obtiene mayor el contenido de compuestos y a su vez dan como respuesta mayor capacidad

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

antioxidante, obteniendo para los extractos a 70°C una capacidad antioxidante de 1823.20 ± 254,10 TE μmol/g de flor de cempasúchil, mientras que los extractos obtenidos a 25°C presentaron una capacidad de 985.22 ± 72.60 TE μmol/g de flor de cempasúchil aproximadamente, si se habla del tiempo, presenta diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en la capacidad antioxidante los extractos obtenidos con un proceso de 1 h a 70°C comparado con los extractos obtenidos con tiempos de 30 y 90 min. Cabe destacar que en comparación con los resultados obtenidos de los extractos de flor de cempasúchil tratados con el método de maceración, fue más eficiente la extracción con el método de EAU siendo 30.03% mayor en la capacidad antioxidante, pues el fenómeno de cavitación mejora el efecto de penetración del solvente en el tejido vegetal y capilar haciendo más eficiente su extracción (Da Porto *et al.*, 2013), de esta forma dicho método podría ser una posible alternativa para la obtención de compuestos bioactivos pues ofrece ventajas como: bajo costo, reproducible, simple y eficiente con respecto al método de maceración, aunque la maceración ha demostrado ser eficiente, implica la exposición de tiempos relativamente largos lo que conlleva pérdidas de algunos compuestos, viéndose comprometida la propiedad antioxidante y a su vez el alto consumo de energía, pues se estima que más del 70% resulta perdida durante el proceso total.

Aunque el método de extracción de ultrasonido resultó ser el mejor comparado con el método de maceración, existen factores que están involucrados en el proceso de extracción y que los hace de alguna forma eficientes, puesto que si se observa el contenido en la tabla 5, la cantidad de fenoles y flavonoides y la respuesta a la actividad antioxidante que presenta la flor de cempasúchil sin someterse a algún método de extracción, se ve favorecida en cuanto al rendimiento cuando se emplean ambos métodos, uno de esos factores es el tamaño en la dimensión de la partícula, pues al haber una reducción en la superficie, genera una mayor área de transferencia de masa, pues las paredes celulares constituyen una resistencia adicional a la difusión haciendo más efectiva la extracción (Casazza *et al.*, 2010), otro factor involucrado es el solvente que se empleó, en este caso diversos autores (Winkel-Shirley *et al.*, 2001) estudiaron el solvente como una mezcla de etanol-agua, evaluaron diferentes relaciones, encontrando que la relación 70:30 es más eficiente en la extracción, debido a que al ser el vehículo principal de extracción en el

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proceso, debe ser muy selectivo el soluto, es decir, su efectividad se ve reflejada en la extracción de compuestos y estos a su vez por presentar en su estructura grupos hidroxilo, permiten mayor solubilidad en solventes orgánicos debido a la polaridad que presentan, tales como el etanol por ser próticos, tienen la capacidad de ceder electrones así como la capacidad de formar puentes de hidrógeno permitiendo de esta forma aún más la extracción de dichos compuestos (Da Porto *et al.*, 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos y por medio del análisis estadístico se tomó la decisión de emplear condiciones de 70°C durante 1h por medio del método de extracción asistido por ultrasonido, debido a que el extracto mostró ser más eficiente en dar respuesta a la actividad antioxidante aproximadamente de un 30.02% más, si se compara cuando se hizo la extracción por maceración, la finalidad de escoger un extracto que tuviera mayor capacidad antioxidante, fue precisamente a la propiedad que exhiben pues se espera que una vez que se aplique en la matriz lipídica contribuya al control de la auto-oxidación del aceite, y de esta forma preservar su calidad.

5.5. Parámetros de calidad en el aceite de semilla de pepita verde de calabaza en condiciones aceleradas

Los lípidos son uno de los principales componentes de los alimentos y son importantes en la dieta porque son fuente de energía y de nutrientes esenciales. Sin embargo, un consumo elevado de ciertos componentes lipídicos puede ocasionar daños en la salud. La reacción de oxidación de lípidos es quizá el proceso más importante que se lleva a cabo en los alimentos, y ha sido objeto de un amplio número de investigaciones. La importancia que tiene esta reacción es que ocasiona la pérdida de valor nutrimental de los alimentos y favorece la formación de otras moléculas que pueden llegar a ser dañinas (Scrimgeour, 2005).

Los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que generan compuestos volátiles que producen olores y sabores característicos desagradables, y a su vez reducen el valor nutritivo de forma importante, por lo que es necesario el uso de antioxidantes para evitar su deterioro (Navas, 2010).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los diferentes parámetros que permitieron medir la calidad del aceite de semilla verde de calabaza, como lo fue el índice de acidez, índice de peróxidos así como el índice de Kreis.

5.5.1. Índice de acidez

El índice de acidez indica los grasos libres que están presentes en un aceite, siendo una de las características químicas que mejor definen la calidad de éstos, pues indica la alteración de los ácidos grasos debida a una hidrólisis química o enzimática (Gogus y Smith, 2010).

A continuación en la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados al aceite de semilla de calabaza en respuesta al índice de acidez.

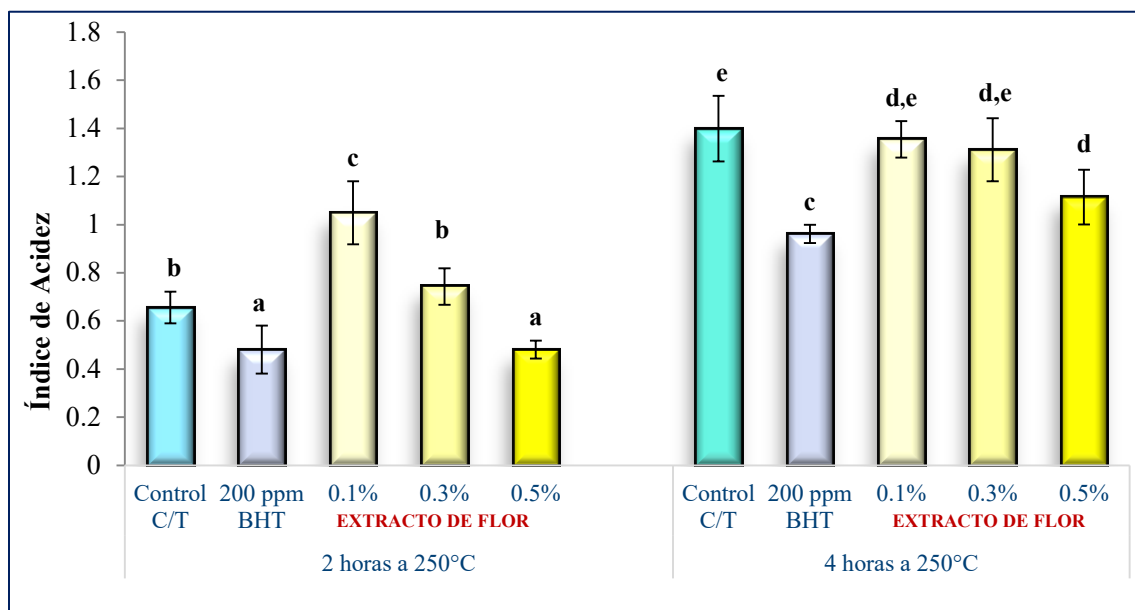


Figura 31. Evaluación del índice de acidez en el aceite de semilla de calabaza tratado con flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

En la figura 31 se observa que conforme aumenta la concentración de extracto de flor de cempasúchil a 0.5% se obtiene mayor efecto inhibitorio en el proceso de la liberación de ácidos grasos dentro del aceite de semilla de calabaza, si se compara con las demás concentraciones (0.1y 0.3%), estos presentaron diferencia significativa entre sí ($p \leq 0.05$) en el índice de acidez, siendo esta máxima concentración, la que presentó los mejores resultados aproximadamente de 0.48% de acidez, cuando es sometido durante 2h, si se

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

compara con el tratamiento donde se empleó el antioxidante sintético BHT (terbutil hidroxitolueno) los resultados no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$), por lo que emplear el extracto de cempasúchil fue competitivo evitando la degradación de los ácidos libres presentes en el aceite vegetal debido a que la composición se encuentra rica en compuestos polifenólicos que se le atribuyen propiedades antioxidantes, puesto que son capaces de donar un átomo de hidrógeno ($H\bullet$) a los radicales libres formando un compuesto peroxi-antioxidante (ROOA) que es estable e inocuo (Brewer, 2011), logrando de esta forma retrasar la auto-oxidación mediante la inhibición de la formación de radicales libres o mediante la interrupción de la propagación del radical en uno (o más) de varios mecanismos (Nawar, 1996).

Ahora bien si observamos los resultados que se obtuvieron cuando se sometieron los tratamientos durante 4h se observa que no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$), entre las concentraciones 0.1 y 0.3% de extracto de flor de cempasúchil, comparándolo con el tratamiento control, aun cuando la concentración máxima de 0.5% muestra un mejor efecto inhibitorio que éstos, el antioxidante sintético (BHT) resultó presentar mejores resultados antioxidantes alrededor del 13.5%, esto puede explicarse debido a que la concentración que se empleó en el estudio de este tratamiento fue aquella concentración máxima que permite el Codex Alimentarius (2001) de 200 ppm siendo más eficaz en su función.

5.5.2. Índice de peróxidos

El índice de peróxidos indica el estado de oxidación inicial del aceite en miliequivalentes de oxígeno activo por kilo de grasa, permitiendo detectar la oxidación de los aceites y grasas. De acuerdo a las normas establecidas por el Codex Alimentario (2001), se debe considerar un valor máximo de peróxido en aceites refinados de 5 meq O_2 a 20 meq O_2 , valores superiores a estos, se debe considerar al aceite de mala calidad.

A continuación en la figura 32 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados al aceite de semilla de calabaza en respuesta al índice de peróxidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

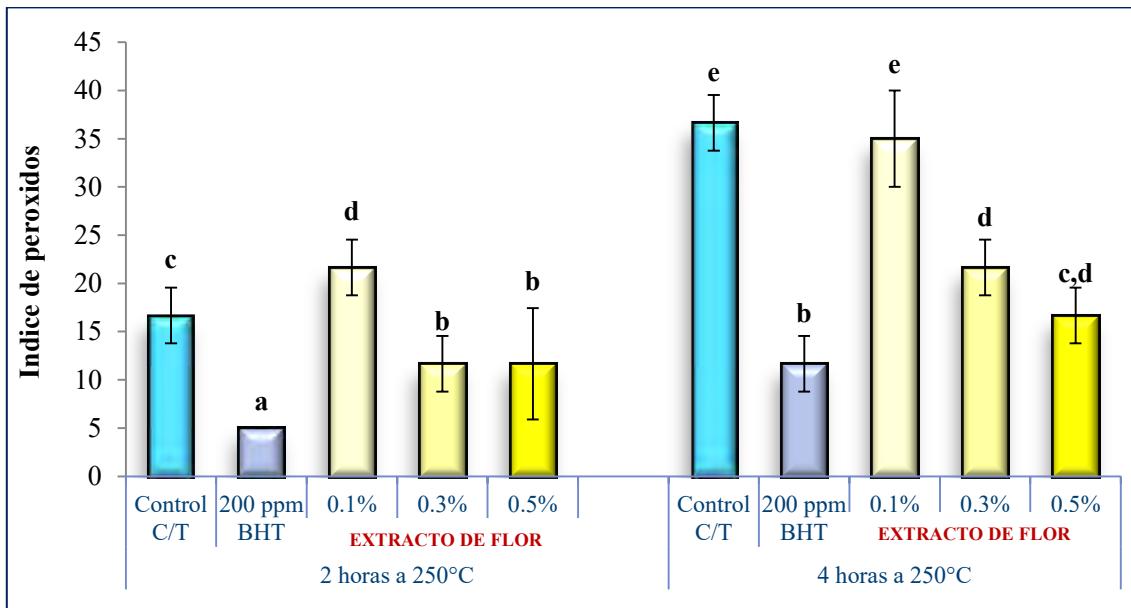


Figura 32. Evaluación del índice de peróxido en el aceite de semilla de calabaza tratado con flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas. Letras diferentes significan diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la Figura 32 se observa que al aumentar la concentración de extracto de flor de cempasúchil aplicado al aceite de semilla de calabaza repercute en el resultado del contenido de peróxidos, existiendo una disminución si se compara con el tratamiento control, este comportamiento se observa en ambos casos cuando el factor tiempo se ve modificado se observa que el extracto natural en concentraciones de 0.1 y 0.3% no muestran diferencias significativas ($p \geq 0.05$) resultando reducir la concentración hasta un 30% cuando el tratamiento es sometido durante 2h y cerca del 48% cuando lo es a 4h, cabe destacar que al igual que en el caso del índice de acidez se observa que el tratamiento más efectivo fue el de BHT en donde se ve que el índice de peróxidos es menor aproximadamente de 5 a 11.6 meq O_2 /Kg de grasa respectivamente de acuerdo al tiempo en el que fue tratado, presentando diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos ($p \leq 0.05$), sin embargo esto no descarta la sustitución del antioxidante sintético, acorde a los resultados obtenidos, si se observó un efecto inhibitorio con la aplicación de los extractos de flor de cempasúchil disminuyendo el índice de calidad estando dentro de los valores conforme a lo que ya está establecido en la normatividad, lo que podría ofrecer una alternativa natural.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.3. Índice de Kreis

El índice de Kreis indica el estado de oxidación en el aceite, puesto que hace evidente la formación de diferentes compuestos tales como el aldehído epidrónico, derivado de la oxidación del ácido linoleico, por lo que valores altos demuestran oxidación en la muestra, los resultados son obtenidos por medio de espectrofotómetro, pues se basa en la producción de color rojo debido a la reacción extremadamente sensible entre la floroglucina y un compuesto presente en los aceites rancios (Kira, 1991).

A continuación en la figura 33 se muestra el efecto del tiempo-temperatura con respecto a la degradación del aceite de semilla de calabaza en los diferentes tratamientos empleados donde se observó que después de someterlos a condiciones de cinética acelerada se hace aún más evidente el deterioro así como la inhibición de la oxidación lipídica del aceite de semilla de calabaza.

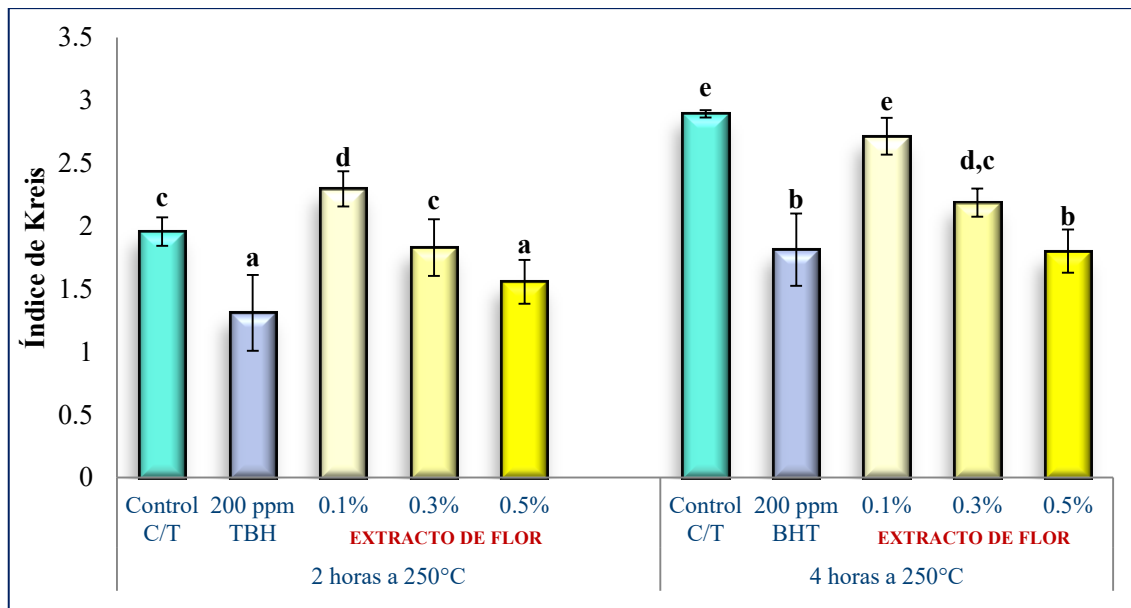


Figura 33. Evaluación del índice de Kreis en el aceite de semilla de calabaza tratado con flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas. Letras diferentes significan diferencias significativas $p \leq 0.05$

Se observa en la figura 33 que cuando se adiciona el antioxidante natural a su máxima concentración se observa mayor inhibición de la formación de compuestos derivados de la oxidación lipídica, no presentando diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en el índice de Kreis, cuando la concentración de extracto es de 0.5% y el antioxidante sintético BHT a 200ppm, de la misma forma emplear concentraciones bajas de extracto de flor de cempasúchil no

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

evita la oxidación no habiendo diferencia significativa ($p \geq 0.05$), debido a que el color es una propiedad organoléptica que indica de cierta manera el estado en el que se encuentra un aceite, es importante no descartarla, pues la variación de esta propiedad es debida a productos de descomposición, polimerización e hidrólisis que se forman durante la exposición del tiempo-temperatura, dependiendo de compuestos minoritarios como los pigmentos del aceite, por lo que esta diferencia de coloración es un indicativo de la degradación sufrida por los aceites, asociada a la formación de aldehídos, cetonas y alcoholes, productos de la oxidación de los triglicéridos (Rivera., *et al.* 2014), por lo que un aumento en la concentración de dichos compuestos se verá involucrada esta propiedad dando como resultado un cambio importante en la coloración del aceite.

A continuación en la figura 34 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados al aceite de semilla de calabaza en respuesta al índice de kreis. De acuerdo a los resultados que se observaron en la figura 33, si se comparan con los resultados que se obtuvieron en la figura 34 se observa una relación entre ellos, además de ser similares a los resultados que se presentaron en el índice de acidez y de peróxidos

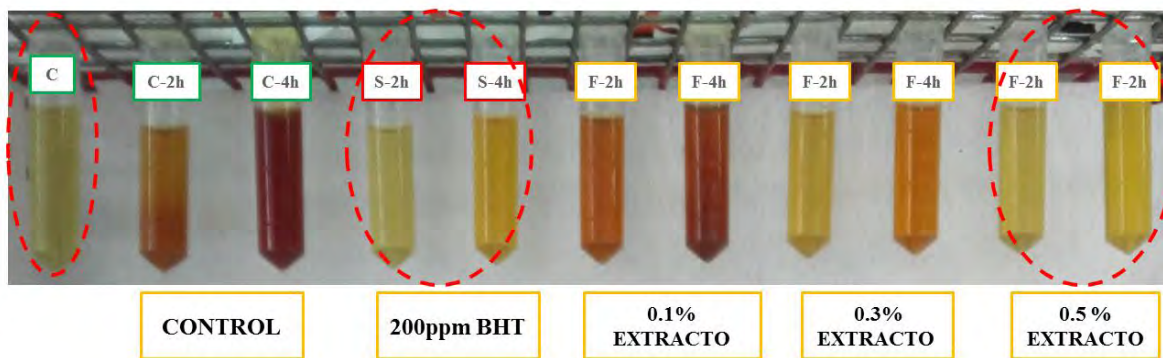


Figura 34. Efecto del tiempo sobre la degradación del color en el aceite de semilla de calabaza en los diferentes tratamientos

Se observa que al emplear una concentración de 200ppm de BHT y concentraciones de extracto de flor de cempasúchil a 0.5% muestran un color similar en ambos casos, y si esto se compara con el aceite sin aplicar tratamiento estos resultan ser análogos entre sí, concentraciones menores tales como el 0.1% de extracto de flor, no muestran de ninguna manera una inhibición de la oxidación en el aceite siendo muy semejante el color que presentó comparado con el tratamiento control, de acuerdo a los resultados que se

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

obtuvieron, pueden ser soportados de forma objetiva, con los resultados que se obtuvieron cuantitativamente por espectrofotómetro. Si bien el antioxidante sintético BHT actuó en todos los casos de forma eficaz, demostrando ser mejor en todos los parámetros analizados, pues su finalidad es extender la vida comercial además de ser relativamente económicos lo hace bastante eficaz, sin embargo, esa eficacia ha sido juzgada en cuanto a sus efectos nocivos sobre la salud (Guiotto *et al.*, 2014; Bodoroina *et al.*, 2017), según el estudio del Dr. Nicolás Olea, Catedrático de Medicina Interna de la Universidad de Granada, el BHT es un estrógeno ambiental, es decir, es un contaminante hormonal que, al tener estructura química semejante a los estrógenos naturales, mimetiza la acción de estas hormonas, alterando el funcionamiento del sistema endocrino, evidenciado efectos como pérdida de fertilidad, cambios en el desarrollo, daños a la tiroides o mutaciones, además de ser un aditivo sospechoso en la causa de cáncer, de acuerdo a esto no se debe descartar la posibilidad de reemplazar el uso de un antioxidante sintético por uno natural, como lo es el extracto de la flor de cempasúchil, pues demostró ser competitivo y no mostrar diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en los parámetros: índice de peróxidos, así como el índice de kreis.



6. CONCLUSIONES

*El pasado muere,
el presente vive,
el recuerdo queda,
Y la vida sigue...*

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

1. La caracterización del color de la flor de cempasúchil presentó diferentes tonalidades entre sí, debido al estado de maduración de la flor, así mismo las propiedades fitoquímicas permite considerar a la flor de cempasúchil como aprovechamiento tecnológico antioxidante.
2. El extracto etanólico obtenido a partir del método de maceración variando el tiempo y temperatura, resultó ser mejor cuando se somete a una temperatura de 70°C durante periodos cortos como lo fue a 1h, se observó que decrece la extracción de compuestos bioactivos cuando se prolonga el tiempo durante 6h y la temperatura se ve modificada a los 10 y 25°C.
3. El método de extracción asistido por ultrasonido mostró mejor eficiencia del 30.03% en respuesta a la actividad antioxidante, aunque las condiciones de 1h y 70°C fueron las mismas que se mostraron en maceración, este método asegura la obtención de los compuestos polifenólicos ofreciendo la ventaja de cuidar su estructura y de esta formar asegurar la calidad de dichos compuestos, dando como resultado una mejor capacidad antioxidante, que bien podría ser una alternativa frente a otros métodos.
4. El extracto de la flor de cempasúchil a una concentración máxima de 0.5% resultó ser eficiente demostrando la preservación de la calidad en el aceite de semilla de pepita verde de calabaza, garantizando la calidad del aceite mediante los índices estudiados (índice de acidez, índice de Kreis e índice de peróxidos). De acuerdo a lo estudiado la flor de cempasúchil resultó ser una flor con compuestos fitoquímicos valiosos que deberían ser aprovechados por diferentes sectores industriales, debido a la respuesta antioxidante y la estabilidad que mostraron tanto fenoles como flavonoides y la inhibición en la oxidación lipídica que presentó en el aceite de semilla verde de calabaza, por lo que podría ser una alternativa como sustituto del antioxidante sintético tal es el caso del BHT.



7. RECOMENDACIONES

*El que sigue la justicia y la lealtad
Hallará vida, justicia y honor...*

Proverbios 21:21

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Identificar los compuestos presentes en la flor de cempasúchil, por medio de HPLC, sería útil para atribuir la capacidad antioxidante con mayor confiabilidad.
- ✓ Estudiar y evaluar otras concentraciones de BHT y algunos otros antioxidantes sintéticos, en comparación de antioxidantes naturales que estén en el mercado.
- ✓ El estudio de otras plantas endémicas de México.
- ✓ Estudiar y evaluar diferentes tipos de aceites que sean susceptibles a la oxidación lipídica debido a su composición.
- ✓ Estudiar vida de anaquel del aceite una vez adicionado el extracto natural de flor de cempasúchil.



8. REFERENCIAS

*Todo tiene su momento oportuno,
hay un tiempo para todo
lo que se hace bajo el cielo...*

Eclesiastés 3:1

8. REFERENCIAS

1. Antoshina, S., Selishcheva, A., Sorokoumova, G.M., Utkina, E.A., Degtyarev, N.S., Shvets, V. I. (2005). Effects of flavonoides of various structures on peroxidation of neutral lipids of animal origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41,18-23.
2. AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Horwitz, W. Washinton.
3. Badui D. S. (2006). Química de los alimentos. 4ª ed. México, Pearson.
4. Berbel, R. L. (2010). Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible, Tesis para optar por el grado de Ingeniero Químico, Universidad Politécnica de Catalunya: Catalunya.
5. Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. y Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
6. Bodoroina, R. M., Penci, C. M., Ribotta, P. D. y Martinez, L. M. (2017). Chia (Salvia hispánica L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 107-113.
7. Bors, W., Heller, W. y Christa, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186, 343-355.
8. Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential 851 Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221–247.
9. Cantrill, R. (2004). Lutein assessment. Paper prepared for the 63rd JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) report – Evaluation of certain food additives.
10. Casazza, A. A., Aliakbarian B. Perego, P. y Sannita E. (2010). High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins,1365-2621.
11. Charalambous, G. y Bruckner, K. J. (2002). Analysis of metallicions in brewing materials, wort, beer and wine by inductively coupled argon plasma-atomic emission spectroscopy. *Technical Quartely*, 14, 197-208.
12. Chemat, F., Zill-e-Huma, Kamram, K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.
13. Codex Alimentarius. (2001). Fats, oils and related products (2nd.). Rome, Italy:

8. REFERENCIAS

- FAO/WHO Food Standards Programme.
14. CODEX STAN 210-1999. Recuperado el 16 de febrero de 2018 de: https://www.fao.org/input/download/standards/336/CXS_210s_2015.pdf
 15. Cornejo-García FR, (2012). Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinifera*) por microondas y métodos convencionales. Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
 16. Cuvelier, M., Richard, H. y Berset, C. (2002). Comparison of the Antioxidative of some acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biotechnology Biochemistry*, 56(2), 324-325.
 17. Decker, E.A. (2002). Antioxidant mechanisms. In: Akoh, D.; Min, D.B. Editors. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2 ed. New York. USA: Marcel Dekker, Inc. pp. 530–556.
 18. Del Villar, A. A., Vanegas, P. E. y Paredes, L. (2010). Marigold regeneration and molecular analysis of carotenogenic genes. *Methods Mol Biology*, (589), 213–221.
 19. Duque, M. A. (2005). El Aroma frutal de Colombia. Editorial Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia, p:345.
 20. Echevarría, B., Franco, A., Martínez., A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macro algas del Caribe Colombiano. *Vitae*, 16(1), 126-131.
 21. El-Adawy, T. A. y Taha, K. M. (2001). Características y composición de sandía, calabaza y semillas de pimentón aceites y harinas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1253-12.
 22. European Commission. 2010. Functional Foods. [Consultado: 27 de enero de 2018]. Disponible en: ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods_en.pdf
 23. Faizi, S. y Naz, A. (2004). Palmitoleate (=9 Z)-Hexadeca-9-enoate) esters of oleanane triterpenoids from the golden flowers of *Tagetes erecta*: isolation and autoxidation products. *Helvetica Chimica Acta*, (87), 46–56.
 24. FAO. (2010). Recuperado el 29 de septiembre de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>
 25. Fernoli, G. (1975). *Handbook of flavor ingredients*. New York: CRC PRESS.

8. REFERENCIAS

26. Fogliano, V., V. Verde, G. Randazzo y A. Ritieni (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (47), 1035-1040
27. Formica, J.V. y Regelson, W. (1995). *Food. Chem. Toxicol.* 33, 1061-1080.
28. Gao, M. y Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa Maxim.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21,1461-1463.
29. Gau, W., Plosche, H. J. y Wunsche, C. (1983). Mass spectrometric identification of xanthophylls fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography. *Journal Chromatography*, 262, 277–284.
30. Giunte, B. (1979). Códice Florentino (Testimonios de los informantes de Sahagún). Facsímile elaborado por el Gobierno de la República Mexicana, México.
31. Gogus, U. y Smith, C. (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Journal of Food Science and Technology*. 45, 417–436.
32. Gómez, R., Goñi, F. M. y Macarulla, J. M. (1978). Carotenoids from marigold (*Tagetes erecta*) petals and their esterified fatty acids. *Esp Fisiol*, 34(3), 253–256.
33. Gong, Y., Plander, S., Xu, H., Simandi, B. y Gao, Y. (2011). Supercritical CO₂ extraction of oleoresin from marigold (*Tagetes erecta L.*) flowers and determination of its antioxidant components with online HPLC- ABTS(+) assay. *Journal of Food Science and Technology*, 91(15), 2875–2881.
34. Green C. L. (1995). Natural colourants and dyestuffs. Non- wood forest products 4. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Recuperado el 12 de Octubre de 2017, de: <https://www.fao.org/docrep/V8879E/V8879e00.htm>
35. Gracia, N. M. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. México
36. Guiotto, E. N., Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M. y Tomás, M.C.M. (2014). Effect of Storage Conditions and Antioxidants on the Oxidative Stability of Sunflower– Chia Oil Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 767-776.
37. Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. 41,1819-1828.

8. REFERENCIAS

38. Hassing, A., Liang, W. X., Schwabl, H. y Stampfli, K. (2008). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses*, 52, 479-81.
39. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. y Bobliya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
40. Hernández, S. B. (2007). Caracterización físico-química del aceite de semilla de calabaza modificado. Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Oaxaca. México.
41. Huber, G., Vasantha, H., Shahidi, F. (2009). Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acid and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry*, 17, 290-295.
42. Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M. y Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica L.*) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 1077–1090.
43. Juárez, R. M., Hernández, S. B., Rodríguez, M. Herman, E., y Torruco, U. G. (2016). Efecto del método de extracción sobre la calidad del aceite de semilla de calabaza (*Cucurbita pepo L.*). Biotecnología y Recursos Naturales. Guatemala. Recuperado el 16 de febrero de 2018 de [https://www.researchgate.net/publication/303786312_Efecto_del_metodo_de_extracci on_sobre_la_calidad_del aceite_de_semilla_de_calabaza_Cucurbita_pepo](https://www.researchgate.net/publication/303786312_Efecto_del_metodo_de_extracci_on_sobre_la_calidad_del aceite_de_semilla_de_calabaza_Cucurbita_pepo)
44. Kaisoon, O., Konczak, I. y Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible fl owers from Thailand. *Food Research International*, 46(2). 563–571.
45. Kira, R. S. (1991). *Pearson's composition and Analysis of Food*. Ed. Longman Scientific and Technical. USA. 420-445.
46. Lampi, A. M., Kamal, E. A. y Piironen, V. (2002). Tocopherols and Tocotrienols from Oil and 1020 Cereal Grains. In: *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*. Vol. 2 (Eds. J. Shi, G. 1021 Mazza, M. Le Maguer). CRC Press, Boca Raton, 1-38.
47. López, J. (2008). Los alimentos funcionales: Importancia y Aplicaciones. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Chile. *Fat science technology*, 11, 428-432.

8. REFERENCIAS

48. Martínez, R., Díaz, B., Vásquez, L., Compagnone, R. S., Tillett, S., Canelón, D. J., Torrico, F. y Suárez, A. I. (2009). Chemical composition of essential oils and toxicological evaluation of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* from Venezuela. *J Essent Oil Bear Plant*, 12(4), 476–481.
49. Menéndez, C. R., Enríquez, R. L. y Chalala, M. (2006). Caracterización fitoquímica preliminar de *Cucurbita pepo* L. cultivada en Cuba. *Rev Cubana Plant Med*. Recuperado el 19 de febrero de 2018 en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000300009&lng=es&nrm=iso ISSN 1028-4796
50. Mercedes, M., Boué, P., Costamagna, D., Rodríguez, P., y Coppo, G. (2009). Autoxidación de aceites vegetales comerciales. *Rumbos Tecnológicos*, 750(1870), 53–63.
51. Merck, S.A. (2000). Industrias Químicas: Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a Profesionales. Chile.
52. Da porto, Modena y Valluzi. (2016). Innovations and Challenges. Ed. Taylor and Frnacis Group, London.
53. Nazk, M., y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal. Chromatography. A*, 1054, 95-111.
54. Navas, H. (2010). Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Doctoral. Univ. de Castilla La Mancha, Facultad de Ciencias Químicas. España.
55. Nawar, W.F. (1996). Lipids. In: Fennema O, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 225–320.
56. Naz, S., Siddiqi, R., Sayeed, S. (2008). Effect of flavonoids on the oxidative stability of corn oil during deep frying. *International Journal of Food Science and Technology*, 43,1850-1854
57. Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D.O. y Lieberei R. (2006).
58. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocianins contents. *Journal of Food Composition Analysis*, 19, 612-9.
59. Organización Médica Colegial de España (OMCE). (2011). Guía de buena práctica

8. REFERENCIAS

- clínica en alimentos funcionales, Madrid, España. 2011. Recuperado el 25 de febrero de 2018 en: https://www.cgcom.es/sites/default/files/gbpc_alimentos_funcionales.pdf
60. Palma, M. y Barroso, C. G. (2001). Ultrasound-assisted extraction and termination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica*, 458, 119-130.
61. Peredo, H. A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Temas selectos de Ingenieria de alimentos*, 3(1), 24-32.
62. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep*, 61, 67-75.
63. Pereira, T. A. y Das, N. P. (1990). The effects of flavonoids on the thermal autoxidation of palm oil and other vegetable oils determined by differential scanning calorimetry. *Thermochimica*, 165, 129-137.
64. Pezzuto, J. M. y Park, E. J. (2002). "Autoxidation and antioxidants". *Encyclopedia of Pharmaceuticals Technology*, 97-113.
65. Pokorny, J. (2006). Autoxidation of unsaturated Lipids, Ed. Academic Press, London, U.K. 141-206.
66. Posada, J. M., Pineda, S. V. y Agudelo, O. G. (2003). Los antioxidantes y su relación con las enfermedades crónicas. Recuperado el 14 de noviembre de 2017 de: http://chocolatecorona.com.co/docs/libro_antioxid.antes.pdf
67. Rastija, V. y Medic S. M. (2009). QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(1), 400-408.
68. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med*, (26), 1231-1237.
69. Rivera, Y., Gutiérrez, C., Gómez, R., Matute, María., Izaguirre, C. (2014). Cuantificación del deterioro de aceites vegetales usados en procesos de frituras en establecimientos ubicados en el Municipio Libertador del Estado Mérida. Universidad de los Andes Mérida, Venezuela Ciencia e Ingeniería, 35 (3), 1157-164
70. Rodríguez-Riera, Z. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *CENIC Ciencias Químicas*, (45), 139-147.

8. REFERENCIAS

71. Rostagno, M., Palma, M., y Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119-128.
72. Russin, T. A., Boye, J. I., Pham, H. M., Arcand, Y. (2006). Antioxidant properties of genistein in a model edible oil system. *Journal of Food Science*, 71, 395-399.
73. Rzedowski, G. C. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. (2ª Ed.), Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
74. SA. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM. México. Recuperado el 27 de Septiembre de 2017, de <https://medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tagetes%20erecta&id=7343>
75. Scrimgeour, C. (2005). *Chemistry of Fatty Acids. Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. In F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fats Products, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects* 6th ed. New York. 1-39
76. SAGARPA. (2015). SIAP . Recuperado el 21 de Septiembre de 2017, de <https://sagarpa.gob.mx/>
77. Shahidi, F. y Wanasundara, P.K. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nut*, 32, 67-103.
78. Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K, Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H. y Kelm, M. (2006). Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 1024-1029.
79. Siddhuraju, P. y Becker, K. (2003). Antioxidants properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three diferente agroclimatic origins of Drum stick tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 214-2155.
80. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner, A., Simonic, M., Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
81. Sowbhagya, H.B., Sushma, S.B., Rastogi, N.K. y Naidu, M. M. (2013). Effect of pretreatments on extraction of pigment from marigold flower. *Food Science and Technology*, 50, 122-128.
82. Srinivasan, O., Parkin, K. L. y Fennema, O. (4th.). (2008). *Fennema's food chemistry*.

8. REFERENCIAS

- Madison, New York: CRC Press.
83. Su, Y., Xu, J., Ng, Ch., Leung, L., Huang, Y., Chen, Z. (2004). Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81, 269-274.
84. Tim, T. K. (2012). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. 4(7), 1–1022.
85. Tinoi, J., Rakariyatham, N. y Deming, R. L. (2006). Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected glowering plants in north Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*, 33(2), 327–334.
86. Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., Zhu, H. y Manolis, T. (2004). Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1045, 65–70.
87. Tsimogiannis, D., y Oreopoulou, V. (2007). Defining the role of flavonoid structure on cottonseed oil stabilization: study of A-and C-ring substitution. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84, 129-136.
88. Urango, M. L., Montoya, P. G., Cuadros, Q. M., Henao, D. C., Zapata, P. A. y López, M. L., (2009). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas Nutritiva Humana*, (11), 27-38.
89. Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Mdiedo, P., Gueimonde, M., González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food and Function*, 6(8), 2424-2439.
90. Wanasundara, U., y Shahidi, F. (1994). Stabilization of canola oil with flavonoids. *Food Chemistry*, 50, 393-396.
91. Winkel, S. B. Flavonoid Biosynthesis. (2001). A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485-493.
92. Younis, Y.M., Ghirmay, S. y Shihry, S.S. (2000) African Cucurbita pepo L. properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*, 54(1), 71-5.
93. Zheng, W. y Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-517.