



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**“Evaluación de la capacidad antioxidante de  
extractos obtenidos de semilla residual de  
Chincuya (*Annona purpurea*)”**

---

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**AXEL FRANCISCO FLORES DEHESA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.2022**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Lino Joel Reyes Trejo

**VOCAL:** Bertha Julieta Sandoval Guillén

**SECRETARIO:** Reina García Sánchez

**1<sup>ER</sup> SUPLENTE:** Ma. Rosa González Tepale

**2<sup>DO</sup> SUPLENTE:** Ricardo Alfredo Gutiérrez Márquez

---

## **SITIOS DONDE SE REALIZÓ EL TEMA**

LABORATORIO 208, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, ÁREA DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRÍCOLA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO.

---

ASESOR DEL TEMA: DR. LINO JOEL REYES TREJO

---

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. BENITO REYES TREJO

---

SUSTENTANTE: AXEL FRANCISCO FLORES DEHESA

# CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>2</b>
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Residuos .....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Residuos Sólidos .....	4
3.1.1.1 Residuos de Minería .....	4
3.1.1.2 Residuos Sólidos Industriales .....	4
3.1.1.3 Residuos Agrícolas .....	4
3.1.1.4 Residuos Sólidos Municipales (RSM) .....	5
3.1.2 Residuos Sólidos Orgánicos (RSO).....	5
3.1.2.1 Residuos de Alimentos .....	6
3.1.2.2 Valorización de Residuos de Alimentos .....	7
<b>3.2 Antioxidantes .....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Antioxidantes Sintéticos.....	11
3.2.2 Antioxidantes Naturales .....	12

3.2.2.1 Carotenoides .....	13
3.2.2.2 Vitaminas.....	14
3.2.2.3 Polifenoles .....	15
<b>3.3 Técnicas de Extracción de Antioxidantes.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Métodos de Cuantificación de Compuestos Fenólicos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Métodos de Evaluación de Actividad Antioxidante .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Estabilidad Oxidativa de Compuestos Lipídicos .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Antioxidantes presentes en especies de <i>Annonaceae</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8 Chincuya (<i>Annona purpurea</i>) como fuente de antioxidantes .....</b>	<b>31</b>
3.8.1 Descripción y Clasificación Botánica .....	31
3.8.2 Usos y Propiedades Asociadas de la Chincuya.....	33
3.8.3. Metabolitos Secundarios y Compuestos Bioactivos .....	34
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>36</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Clasificación de residuos de acuerdo con sus características. ....	3
<i>Figura 2.</i> Valorización de residuos de alimentos vegetales aplicada a diversas industrias .....	7
<i>Figura 3.</i> Antioxidantes sintéticos artificiales más utilizados en la industria alimentaria .....	11
<i>Figura 4.</i> Clasificación de antioxidantes naturales .....	13
<i>Figura 5.</i> Estructura química de un carotenoide hidrocarbonado (a. $\alpha$ -caroteno) y un carotenoide oxigenado (b. Zeaxantina) .....	14
<i>Figura 6.</i> Estructura química del ácido ascórbico (Vitamina C) .....	15
<i>Figura 7.</i> Estructura química del $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) .....	15
<i>Figura 8.</i> Estructuras del ácido benzoico, cinámico y ejemplos de ácidos fenólicos derivados .....	16
<i>Figura 9.</i> Estructuras básicas de diferentes clases de flavonoides .....	17
<i>Figura 10.</i> Estructuras químicas de un tanino condensado y un galotanino .....	18
<i>Figura 11.</i> Ejemplos de estilbenos (Resveratrol) y lignanos (Sesamina) .....	19
<i>Figura 12.</i> Disposición experimental para diferentes métodos de extracción de moléculas de alto valor agregado .....	22
<i>Figura 13.</i> Proceso de extracción de antioxidantes por fluidos supercríticos .....	23
<i>Figura 14.</i> Reacción entre el radical DPPH y una molécula antioxidante .....	25
<i>Figura 15.</i> Clasificación botánica de la Chincuya .....	31
<i>Figura 16.</i> Distintas partes de la especie <i>Annona purpurea</i> Moc.& Sessé ex. Dunal .....	32

<i>Figura 17.</i> Usos y propiedades asociadas a la chincuya en la medicina tradicional .....	34
<i>Figura 18.</i> Esquema de obtención y evaluación de extractos de semilla de <i>Annona purpurea</i> .....	36
<i>Figura 19.</i> Termobalanza Ohaus MB35 utilizada para la determinación de humedad de pericarpio y almendra de semillas de chincuya .....	37
<i>Figura 20.</i> Molienda de pericarpio de semilla en molino manual marca Estrella ...	38
<i>Figura 21.</i> Extracción de polifenoles mediante maceración en disolventes orgánicos .....	39
<i>Figura 22.</i> Lector de microplacas BioTek, modelo Synergy 2 .....	40
<i>Figura 23.</i> Microplaca de 96 pozos con prueba de Fenoles Totales para extracto hidroetanólico de pericarpio de semilla de chincuya .....	41
<i>Figura 24.</i> Microplaca de 96 pozos con ensayo de DPPH para extracto metanólico de pericarpio de semilla de chincuya.....	43
<i>Figura 25.</i> Pericarpio y almendra de semilla de <i>Annona purpurea</i> .....	47

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.* Rendimiento de extracción a partir de almendra y pericarpio de semilla de chincuya por maceración con diferentes disolventes .....48
- Gráfica 2.* Contenido de Fenoles Totales (mg de EAG / g) en extractos de almendra de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes..50
- Gráfica 3.* Contenido de Fenoles Totales (mg de EAG / g) en extractos de pericarpio de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes..51
- Gráfica 4.* Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> en µg/mL) de extractos de almendra de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.....53
- Gráfica 5.* Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> en µg/mL) de extractos de pericarpio de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.....54
- Gráfica 6.* Índice de acidez a través del tiempo, en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya .....57
- Gráfica 7.* Índice de yodo a través del tiempo, en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya .....58
- Gráfica 8.* Índice de peróxidos a través del tiempo, en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya .....60



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Ejemplos de compuestos de interés obtenidos de residuos vegetales y su funcionalidad .....	8
<i>Tabla 2.</i> Ejemplos de compuestos fenólicos identificados en extractos de diferentes partes de cuatro especies de <i>Annona</i> .....	30
<i>Tabla 3.</i> Análisis bromatológico de Chincuya con base en peso seco .....	33
<i>Tabla 4.</i> Ejemplos de metabolitos secundarios y su bioactividad, encontrados en la especie <i>Annona purpurea</i> .....	35
<i>Tabla 5.</i> Índices de polaridad de los disolventes empleados para la extracción de compuestos antioxidantes .....	39
<i>Tabla 6.</i> Caracterización de semillas y las almendras correspondientes de <i>Annona purpurea</i> . .....	47
<i>Tabla 7.</i> Rendimientos de extracciones por maceración secuencial .....	73
<i>Tabla 8.</i> Cuantificación de compuestos fenólicos totales en extractos de almendra y pericarpio de semillas de <i>A. purpurea</i> .....	73
<i>Tabla 9.</i> Actividad antioxidante de los extractos de almendra y pericarpio de semilla de <i>Annona purpurea</i> .....	74
<i>Tabla 10.</i> Índice de acidez en aceite de oliva control y aceite adicionado con BHT, extracto de almendra de semilla con Etanol:Agua 1:1 acidificado al 0.1 % y extracto de pericarpio de semilla con Etanol al 95 %, almacenados a 55 °C por 28 días.....	74
<i>Tabla 11.</i> Índice de yodo en aceite de oliva control y aceite adicionado con BHT, extracto de almendra de semilla con Etanol:Agua 1:1 acidificado al 0.1 % y extracto de pericarpio de semilla con Etanol al 95 %, almacenados a 55 °C por 28 días.....	75
<i>Tabla 12.</i> Índice de peróxidos en aceite de oliva control y aceite adicionado con BHT, extracto de almendra de semilla con Etanol:Agua 1:1 acidificado al 0.1 % y extracto de pericarpio de semilla con Etanol al 95 %, almacenados a 55 °C por 28 días.....	75

## 1. INTRODUCCIÓN

La constante generación de residuos de alimentos y su insuficiente gestión ha incrementado el interés en la obtención de subproductos y recursos alternativos a partir de estos desechos, desde la alimentación de ganado y el compostaje como medio de mejoramiento de suelos, hasta la obtención de energía y de compuestos de interés para diferentes industrias. La valorización de los residuos vegetales, principalmente de especias, hortalizas, frutas y sus semillas ha mostrado la posibilidad de aprovechar los compuestos contenidos en las células a través de diferentes procesos.

Por otro lado, la gran mayoría de los alimentos son susceptibles a la rancidez, es decir, a la degradación de sus compuestos lipídicos. Dentro de los diferentes tipos de rancidez, aquella provocada por las reacciones de oxidación, puede ser disminuida con ayuda de compuestos antioxidantes. Los antioxidantes más utilizados como aditivos en alimentos son los compuestos sintéticos BHA, BHT y TBHQ; no obstante, desde hace varios años los consumidores han mostrado preocupación sobre sus efectos en la salud, así mismo, existe una creciente tendencia en la industria de alimentos de incluir ingredientes naturales.

La especie *Annona purpurea*, endémica del sur de México y América central conocida comúnmente como Chincuya, Soncoya, Cabeza de negro, etc., se utiliza en la medicina tradicional e incluso se han descubierto y aislado compuestos como alcaloides y acetogeninas en tallos, raíces, frutos y semillas. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la presencia de compuestos antioxidantes en las semillas, las cuales son descartadas para su consumo y escasamente aprovechadas.

El presente trabajo tiene como propósito extraer y cuantificar los polifenoles contenidos en el pericarpio y la almendra de las semillas residuales de chincuya, así como evaluar su actividad antioxidante y comparar su eficiencia en la estabilidad oxidativa de un aceite comercial. De esta manera poder evaluar su aplicación como aditivo alimentario antioxidante.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **2.1 Objetivo General**

Extraer, cuantificar los compuestos fenólicos y evaluar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos tanto de la almendra como del pericarpio de semillas de Chincuya (*Annona purpurea*), a fin de implementar su uso como aditivo antioxidante natural.

### **2.2 Objetivos Particulares**

- ♦ Identificar el disolvente con el cual se obtenga el mayor rendimiento de extracción mediante maceración.
- ♦ Determinar los extractos, a partir de almendra y pericarpio de semillas de chincuya, con la mayor concentración de compuestos fenólicos por medio del método de Folin-Ciocalteu, así como la mayor capacidad antioxidante mediante el método de DPPH.
- ♦ Evaluar la eficiencia del extracto de mayor actividad antioxidante de cada fracción de semilla en la estabilidad oxidativa de una muestra de aceite comestible comercial comparándolo con el antioxidante sintético BHT, midiendo los cambios en los parámetros de calidad del aceite

### **2.3 Hipótesis**

Un extracto obtenido a partir de pericarpio y/o almendra de las semillas residuales de *Annona purpurea* podrá representar una alternativa a los antioxidantes sintéticos si presenta los compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes que logren retrasar significativamente la oxidación de lípidos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Residuos

Los residuos son usualmente considerados como aquellas sustancias o materias que, después de un consumo o actividad productiva, ya no son objeto de interés o utilidad y es entonces que deben disponerse. Por su parte, la legislación mexicana, define dicho término como material o producto que el poseedor o propietario desecha y se encuentra en estado sólido, semisólido o es un líquido o un gas contenido en recipientes o depósitos; puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final de acuerdo con la Ley General de Prevención y Gestión Integral de Residuos (Diario Oficial de la Federación, LGPGIR Art 5).

Se hace notar que existe diferencia entre los términos residuo y basura, ya que el primero es aquél que puede ser reutilizado o reciclado, dependiendo del tipo de demanda que genera cada sociedad y cada época, mientras que el segundo es considerado como aquél que no se le encuentran usos potenciales (Dimarco, 2013). De acuerdo con la ley antes mencionada, los residuos son clasificados según sus características (Figura 1).

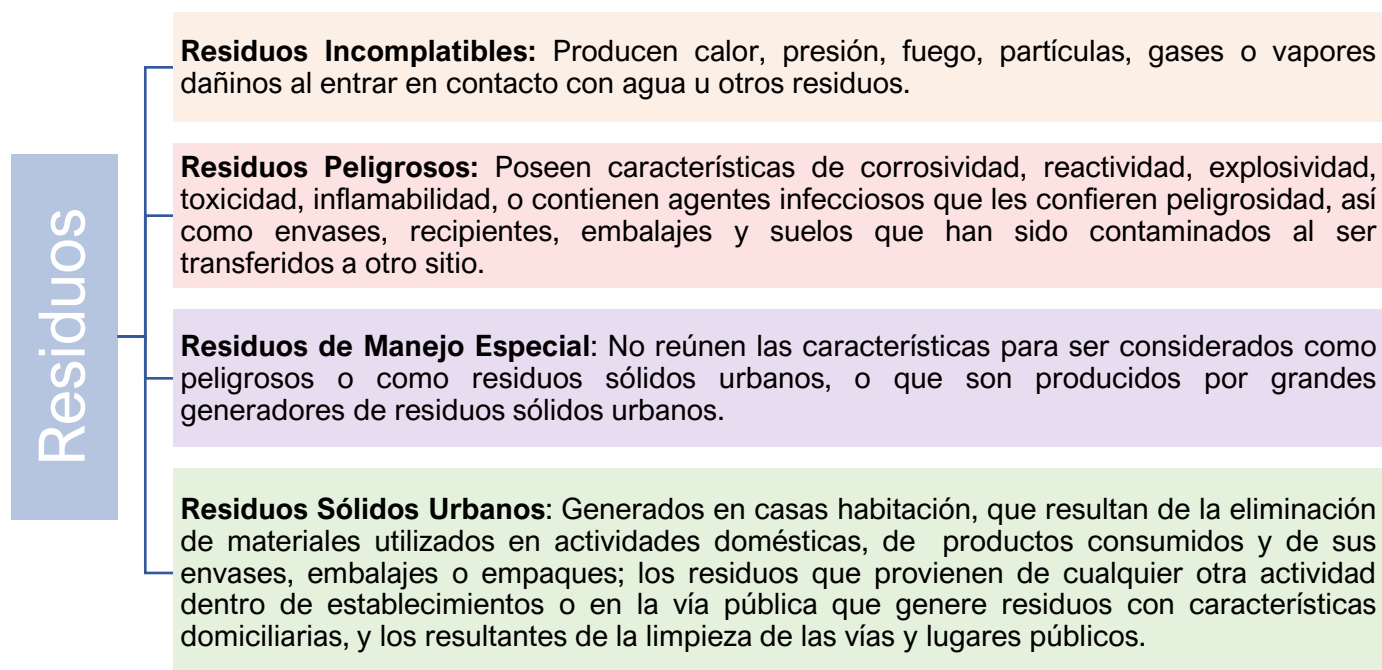


Figura 1: Clasificación de residuos de acuerdo con sus características.

### **3.1.1 Residuos Sólidos**

Particularmente, dependiendo de la normatividad de cada país, dentro de los residuos en estado sólido se encuentran también diferentes categorías que a continuación se describen de acuerdo con el sector económico en el que se generan. (Enger & Smith, 2010).

#### **3.1.1.1 Residuos de Minería**

Son generados mediante tres vías principales, en la primera vía es necesario remover grandes cantidades de rocas y suelo, quedando el material de desecho en la superficie de la mina; en la segunda vía se utilizan diversas tecnologías para la extracción de los materiales más valiosos de los minerales que incluyen desde simples moliendas y separaciones hasta procesos químicos sofisticados de separación. En la tercera vía, una vez recuperado el material de interés y la separación de los residuos restantes conocidos como relaves, los residuos sólidos generalmente son arrojados en las zonas cercanas a la mina, mientras que los residuos líquidos son almacenados en estanques. Al dejarse expuestos estos residuos a la lluvia, el agua que drena de las pilas de las rocas y relaves acarrear materiales peligrosos como asbestos, arsénico, plomo, materiales radioactivos, entre otros, que deben ser tratados o contenidos; sin embargo, frecuentemente no es así. (Enger & Smith, 2010).

#### **3.1.1.2 Residuos Sólidos Industriales**

Incluyen una gran variedad de materiales provenientes de la demolición, arenas de fundición, restos de procesos de manufactura, lodos, cenizas, entre otros. Estos materiales son probados para determinar su peligrosidad y en caso de ser clasificados como peligrosos, requerirán ser colocados en vertederos especiales. (Enger & Smith, 2010).

#### **3.1.1.3 Residuos Agrícolas**

Son los residuos más comunes, provenientes de la crianza de animales, la cosecha y procesamiento de árboles y otros cultivos vegetales como son: pelado, remoción de semillas, tallos, paja, lodos, etc. Debido a que estos residuos son orgánicos, aproximadamente el 90 % puede ser usado como fertilizante para otras actividades para

el mejoramiento de suelos y los materiales restantes quemados como fuente de energía, por lo tanto, una cantidad reducida de estos desechos llegarían a los vertederos. Sin embargo, cuando la generación de residuos es demasiada las tierras de cultivo no son suficientes para aceptarlos sin causar contaminación de aguas y sus problemas asociados debido a escapes e infiltraciones al subsuelo. (Enger & Smith, 2010).

#### **3.1.1.4 Residuos Sólidos Municipales (RSM)**

También son llamados Residuos Sólidos Urbanos (RSU). Incluyen los residuos domésticos originados de las casas habitación y sus actividades, así como los similares provenientes de las actividades comerciales pequeñas, edificios de oficinas, instituciones tales como edificios escolares, de gobierno y pequeños negocios que disponen de sus desechos con las mismas facilidades que ofrecen las municipalidades para su recolección (OECD, 2015).

#### **3.1.2 Residuos Sólidos Orgánicos (RSO)**

Los residuos sólidos orgánicos pueden definirse como aquellos sólidos generados naturalmente como consecuencia de funciones fisiológicas y/o de mantenimiento; o producto de la explotación de los recursos naturales, que tienen su origen en seres vivos, ya sea animales o vegetales. Así también se encuentra el término “biorresiduo” como un sinónimo utilizado en diversas legislaciones y que se refiere al material proveniente de los residuos biodegradables de jardines y parques, residuos de alimentos procedentes de hogares, restaurantes, expendios y plantas procesadoras de alimentos. (Oviedo-Ocaña, 2012; Rodrigo-Illarri, 2014).

Una fracción importante de los RSM es constituida por los residuos orgánicos. Por ejemplo, en el año 2012 a nivel mundial estos desechos representaban el 46 % de los residuos sólidos, mientras que en México la cifra ascendía al 52.4 %. Tales porcentajes se relacionan directamente con las condiciones de cada región y el acceso a los recursos; México se encuentra entre los países de ingreso medio donde, teniendo acceso a productos tanto procesados y empacados como naturales, el sector agrícola toma parte importante en la actividad económica. (Hoornweg & Bada-Tata, 2012; Oviedo-Ocaña, 2012; SEMARNAT, 2016; Porras, 2016).

A nivel nacional, la disposición final de los residuos se dirige predominantemente hacia los rellenos sanitarios. Si bien la LGPGIR establece que estos establecimientos deben contar con obras de ingeniería y métodos que permitan el control de fugas de lixiviados y manejo adecuado de biogases generados, la gestión insuficiente de tales métodos ocasiona el desaprovechamiento de los residuos que son susceptibles a reincorporarse al sistema productivo y así disminuir la explotación de nuevos recursos. (SEMARNAT, 2016).

### **3.1.2.1 Residuos de Alimentos**

Dentro de los residuos orgánicos, los más relevantes son los provenientes de los alimentos. Estos son generados a lo largo de la cadena de suministro como pérdidas o como desperdicios, donde los primeros se refieren a la reducción en la disponibilidad de los alimentos para consumo humano provocada por la ineficiencia de la cadena de suministro, mientras que los segundos corresponden a las partes deliberadamente descartadas de los productos comestibles (Steinvorth, 2014).

Al tratarse de materia biodegradable, los residuos de alimentos generan gases de efecto invernadero, dióxido de carbono y metano cuando se descomponen en los rellenos sanitarios, contribuyendo a la contaminación del aire y por ende a cambios climáticos y problemas de salud pública; son entonces de gran interés otras opciones de disposición que reduzcan estos inconvenientes. Los procesos más utilizados como alternativa son el compostaje y la digestión anaerobia ya que contribuyen a conservar el espacio destinado a los rellenos sanitarios y aportan beneficios económicos y ambientales. (Mirabella, 2013; CCA, 2017)

El compostaje es un método en el que microorganismos, en su mayoría aeróbicos, producen humus, material de aspecto similar a la tierra, que se utiliza como acondicionador de suelos ya que mejora su composición, fertilidad y el crecimiento de las plantas, ayudando también a la sostenibilidad de la producción agrícola. Por su parte, la digestión anaerobia es el proceso en el cual microorganismos en ausencia de oxígeno degradan la materia orgánica y producen biogás y un residuo conocido como “digestato”. Otra forma más novedosa de este proceso se conoce como codigestión, donde los

residuos de alimentos se combinan con residuos agrícolas y residuos orgánicos ricos en contenido energético (generalmente lípidos) en digestores de estiércol o de aguas residuales. (Oviedo-Ocaña, 2012; CCA, 2017).

### 3.1.2.2 Valorización de Residuos de Alimentos

Los residuos de alimentos vegetales presentan la ventaja de ser más valorizables que los residuos orgánicos generales, ya que poseen componentes aprovechables tales como nutrientes para suelos, compuestos fermentables y aquellos que pueden adquirir valor agregado. (Ros, 2012; Mirabella, 2013). De esta manera, se considera la valorización como el conjunto de actividades cuyo objetivo es recuperar el valor remanente de los materiales que componen los residuos, mediante su reincorporación en procesos productivos donde se sustituya a otros materiales, bajo criterios de responsabilidad compartida, manejo integral y eficiencia ambiental, tecnológica y económica. (LGPGIR, 2003).

Existen diferentes vías, además del compostaje, aplicables a los residuos de alimentos y dirigidos a la generación de productos en distintas industrias que representan beneficios económicos y medioambientales (Figura 2). Sin embargo, estos procesos no contemplan la utilización de las aguas residuales del procesamiento de los alimentos vegetales y que se caracterizan por poseer alto contenido de materia orgánica y sólidos en suspensión, valores variables de pH y conductividad eléctrica dependiendo de la actividad y materia prima de las que provienen. (Ros, 2012).

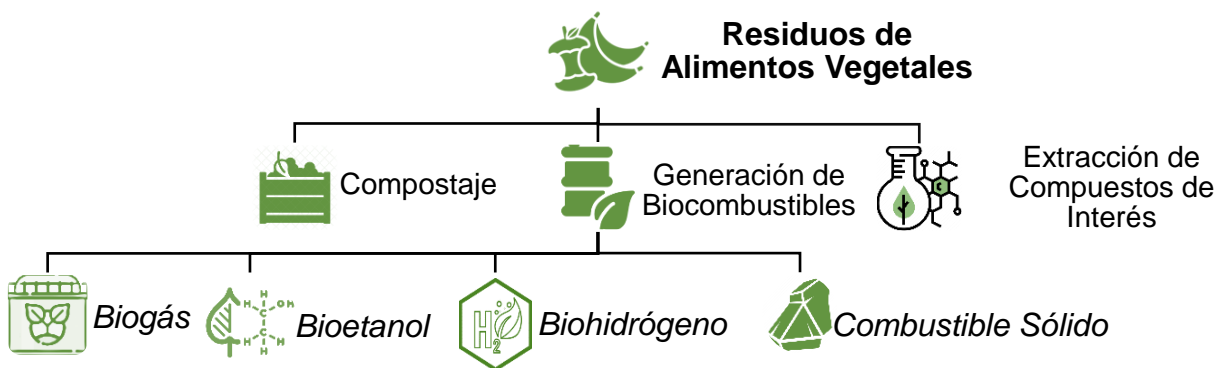


Figura 2: Valorización de residuos de alimentos vegetales aplicada a diversas industrias (Ros, 2012).



Por otro lado, a partir de los residuos de alimentos es posible la obtención de energía, por ejemplo, la mezcla de metano y dióxido de carbono, también conocido como biogás, obtenido mediante la digestión mediada por microorganismos anaerobios en cuatro pasos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Por su parte, el combustible sólido se forma durante la carbonización hidrotermal que es un proceso en medio acuoso que transforma la biomasa en carbón y en fertilizante acuoso. Por último, el bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares y almidones de la materia orgánica, mientras que el biohidrógeno es generado por fermentación anaerobia. (Ros, 2012).

*Tabla 1:* Ejemplos de compuestos de interés obtenidos de residuos vegetales y su funcionalidad.

<b>Compuesto de interés</b>	<b>Residuo vegetal como fuente</b>	<b>Funcionalidad</b>
<i>Pectina</i>	Cáscaras de naranja <sup>a</sup> y maracuyá <sup>e</sup>	Agente espesante, estabilizante y gelificante en mermeladas, gelatinas, salsas, aderezos, etc.
<i>Cutina</i>	Tomate <sup>a</sup>	Obtención de biolacas y envases.
<i>Cinarina, cinaropicrina, flavonoides e inulina</i>	Alcachofa <sup>b</sup>	Principios activos de formulaciones para tratamiento de anorexia, hepatitis, hipercolesterolemia, hipertensión, etc.
<i>Enzimas Peroxidasas</i>	Cebolla <sup>c</sup> y coliflor <sup>d</sup>	Biocatalizadores en la producción de resinas, adhesivos, protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios; como componentes bioactivos de detergentes <sup>(a)</sup> y agentes de tratamiento de aguas residuales. <sup>(c, d)</sup>
<i>Polifenoles y carotenoides</i>	Cáscara y semilla de mango <sup>e</sup>	Actividad antioxidante y antimicrobiana con potencial para aplicarse en diversos productos alimenticios.

a. Ros, 2012; b. Hammouda, 1993; c. Barakat, 2009; d. Deva, 2014; e. Mirabella, 2013

Los residuos de alimentos vegetales se utilizan principalmente para la extracción u obtención de elementos aprovechables en diferentes industrias como la farmacéutica, cosmética, química, agrícola y alimentaria; rescatando así compuestos con capacidad

antimicrobiana, acidulante, gelificante, vitamínica, catalizadora y componentes bioactivos. Algunos ejemplos se enlistan en la Tabla 1. Un número limitado de estos ejemplos de aprovechamiento son llevados a cabo en la actualidad teniendo dichos componentes suficientemente caracterizados. No obstante, muchos otros aún no han sido identificados ni explotados para la elaboración de nuevos y competitivos productos. (Ros, 2012). Cabe resaltar que, para poder adaptarse a la producción industrial, los residuos de alimentos requieren una amplia investigación sobre su disponibilidad, en términos de cantidad y ubicación geográfica de los proveedores; así como un procesamiento previo a su aprovechamiento. (Mirabella, 2014).

Resultan de especial interés los residuos agroindustriales de frutas y hortalizas para la obtención de biomoléculas con actividad antioxidante, principalmente compuestos fenólicos, ya que representan una fuente rica en dichos componentes. Ya sea por su capacidad antioxidante o por los beneficios a la salud, se ha buscado su aplicación tanto a nivel farmacéutico como a nivel alimentario durante el procesamiento de alimentos, utilizándolos como aditivos que extiendan la vida útil del producto, o para la elaboración de alimentos funcionales y nutraceuticos. (Ignat, 2011; Kumar, 2017).

### **3.2 Antioxidantes**

Los compuestos antioxidantes son aquellos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas cuando se presentan en bajas concentraciones, en comparación con las de los sustratos oxidables, al limitar ya sea la iniciación o la propagación de la cadena de reacciones de oxidación y en su lugar frecuentemente resultan oxidados. Los antioxidantes ahora convertidos en radicales libres no propagan la cadena de oxidación ya que tienen la capacidad de soportar la diferencia de electrones debido a su estructura resonante y posteriormente son neutralizados con otros radicales para formar productos más estables o regenerados por otra molécula antioxidante. (Pereira, 2012, Atta, 2017). De manera general, los antioxidantes actúan a través de las siguientes rutas (Kumar, 2011):

- ♦ Rompiendo la cadena de reacciones de oxidación.
- ♦ Reduciendo la concentración de las especies reactivas de oxígeno.

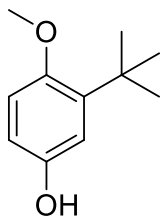
- ♦ Secuestrando los radicales iniciales.
- ♦ Quelando metales de transición catalíticos, evitando así su efecto prooxidante.

La primera categorización, basada en el mecanismo de acción, contempla a los antioxidantes como primarios, secundarios y sinérgicos. (Rajalakshmi & Narasimhan, 1996). Los primarios finalizan la cadena de reacción de los radicales libres al donar electrones o un hidrógeno a los radicales, convirtiéndolos en compuestos más estables. Además, pueden retardar la etapa de iniciación reaccionando con un radical de ácido graso o inhibir la etapa de propagación al reaccionar con radicales alcoxilo (RO<sup>•</sup>) o peroxilo (ROO<sup>•</sup>). (Rajalakshmi & Narasimhan, 1996). Los antioxidantes secundarios retardan las reacciones de oxidación inhabilitando a los prooxidantes como iones metálicos, oxígeno singulete, enzimas y otros; convirtiendo las especies radicales en compuestos no reactivos o absorbiendo radiación UV. Por último, los sinérgicos actúan bajo diversos mecanismos ya que pueden regenerar a los antioxidantes primarios donando un hidrógeno, proveyendo un medio ácido que mejora la estabilidad de estos; reaccionando con oxígeno libre o formando complejos estables con prooxidantes. (Shahidi & Zhong, 2015)

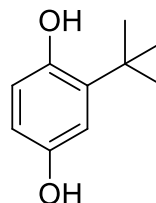
A nivel molecular, los antioxidantes pueden intervenir previniendo, reparando o interceptando. Los de tipo preventivo procuran detener la formación de especies reactivas de oxígeno; aquellos implicados en la reconstitución son principalmente enzimas de reparación, mientras que los involucrados en interceptar a los radicales libres son los compuestos de mayor estudio como son la vitamina C, vitamina E, carotenoides, flavonoides y polifenoles relacionados, etc. (Devasagayam, 2005). Por otro lado, la capacidad de los antioxidantes se divide frecuentemente en dos vertientes: la primera vertiente es el potencial antioxidante, determinado por la naturaleza de su composición y aplicado a la química de alimentos; la segunda vertiente se refiere a los efectos biológicos a modo de defensa contra el estrés oxidativo de las células, que dependen principalmente de la biodisponibilidad de los antioxidantes. De igual manera, la clasificación más común para los antioxidantes es sobre su origen sintético o natural. (Kancheva, 2013; Oroian, 2015).

### 3.2.1 Antioxidantes Sintéticos

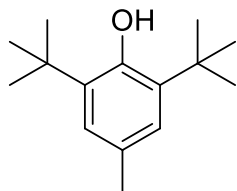
Los antioxidantes sintéticos son moléculas generalmente de tipo fenólico con sustituciones alquílicas que facilitan su solubilidad en grasas y aceites; de esta manera, la diferencia en estructura química influye sobre sus propiedades físicas y actividad antioxidante. A diferencia de los antioxidantes sintéticos idénticos al natural, los antioxidantes sintéticos artificiales no son encontrados en la naturaleza y han sido desarrollados para tener una medición estándar de actividad antioxidante debido a la inherente inestabilidad de los antioxidantes naturales. Antes de poder utilizarse como aditivos alimentarios que prolonguen la vida de almacén, estos compuestos sintéticos deben cumplir con ser altamente activos a bajas concentraciones (0.01-0.02 %), concentrarse en la superficie de la fase lipídica, no ser tóxicos y ser estables bajo las condiciones normales de procesamiento de alimentos. (Yanishlieva, 2001; Belitz, 2009; Caroch, 2013; Atta, 2017; Admassu, 2019).



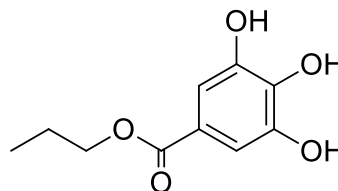
a. 2-*tert*-butil-4-metoxifenol (BHA)



b. 2-*tert*-butilbenceno-1,4-diol (TBHQ)



c. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT)



d. 3,4,5-trihidroxi-benzoato de propilo (PG)

*Figura 3:* Antioxidantes sintéticos artificiales más utilizados en la industria alimentaria.

Los ejemplos más utilizados en la actualidad son: butilhidroxianisol o BHA (Figura 3a), *tert*-butilhidroxiquinona o TBHQ (Figura 3b), butilhidroxitolueno o BHT (Figura 3c) y ésteres de ácido gálico como galato de propilo o GP (Figura 3d), octilgalato (OG) y dodecilgalato (DG). Muchas veces son incorporados a los alimentos en combinación para

generar un efecto sinérgico, por ejemplo, añadiendo BHA y BHT o BHA con GP. A diferencia de la mayoría de los antioxidantes fenólicos naturales que son *o*-sustituidos, los antioxidantes sintéticos, con excepción de los galatos, son *p*-sustituidos con el fin de disminuir su toxicidad, mientras que los *m*-sustituidos son prácticamente inactivos. (Yanishlieva, 2001; Pokorny, 2007; Atta, 2017).

A pesar de que estas sustancias se han empleado en alimentos para humanos desde 1954, los estrictos análisis toxicológicos a los que se han sometido exigen tomar mayores precauciones sobre su uso. Los resultados toxicológicos no son concluyentes y muchas veces son contradictorios, principalmente acerca del potencial efecto carcinogénico, provocando cambios en los valores de ingesta diaria admisible (IDA) y discrepancias en la tolerancia entre legislaciones. (Thorat, 2013; Atta, 2017).

### **3.2.2 Antioxidantes Naturales**

Son aquellos encontrados en fuentes naturales tales como: hongos, algas, tejido animal y principalmente plantas; se han desarrollado dentro de las células de estos organismos como respuesta a las condiciones adversas de su entorno. (Brewer, 2011; Kebede, 2019). Así mismo, son parcialmente responsables de los efectos benéficos asociados a los alimentos ya que, además de la capacidad antioxidante, estos compuestos exhiben propiedades adicionales, haciéndolos más relevantes para ser añadidos a los alimentos y obtener alimentos funcionales. (Thorat, 2013; Carocho, 2014).

Este grupo de compuestos se divide primeramente en enzimáticos y no enzimáticos (Figura 4). Los primeros corresponden a las enzimas primarias, que previenen la formación o neutralizan directamente a los radicales libres, y enzimas secundarias que contribuyen a la actividad de otros antioxidantes endógenos; los últimos incluyen antioxidantes de acción directa tales como compuestos organosulfurados, nitrogenados no proteínicos, vitaminas, carotenoides y polifenoles, así como de acción indirecta como cofactores y minerales cuya acción está estrechamente relacionada con la actividad de las enzimas antioxidantes. (Carocho, 2013; Atta, 2017; Kebede, 2019).

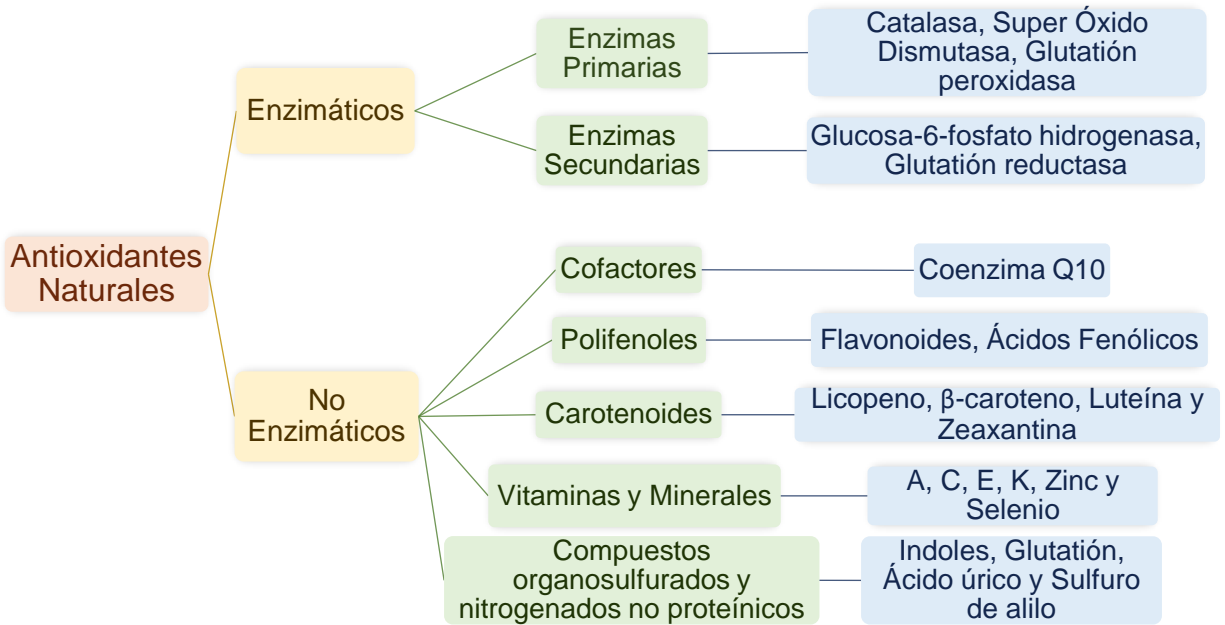


Figura 4: Clasificación de antioxidantes naturales. (Carocho, 2013).

### 3.2.2.1 Carotenoides

Son un grupo de pigmentos con tonalidades desde el rojo al amarillo que se han aprovechado principalmente como colorantes naturales ya que son sintetizados en el metabolismo secundario de plantas, bacterias, hongos y algas. Pueden dividirse en dos grupos: carotenoides hidrocarbonados, carotenos con grupos terminales específicos como el licopeno,  $\alpha$ -caroteno (Figura 5a) y  $\beta$ -caroteno; y carotenoides oxigenados, generalmente conocidos como xantofilas, por ejemplo, la luteína y la zeaxantina (Figura 5b). (Carocho, 2013; Atta, 2017).

La función de los carotenoides como antioxidantes se debe a la reducción del oxígeno singulete sin degradarse, siendo efectivo para prevenir la formación de hidroperóxidos, donde el carotenoide excitado disipa la energía adquirida por medio de la deslocalización de electrones desapareados a través de su estructura. Esto ocurre debido a la presencia de enlaces dobles conjugados; se ha visto que mayor número de enlaces dobles se incrementa la capacidad reductora de radicales. (Rajalakshmi & Narasimhan, 1996; Belitz, 2009; Pereira, 2012).

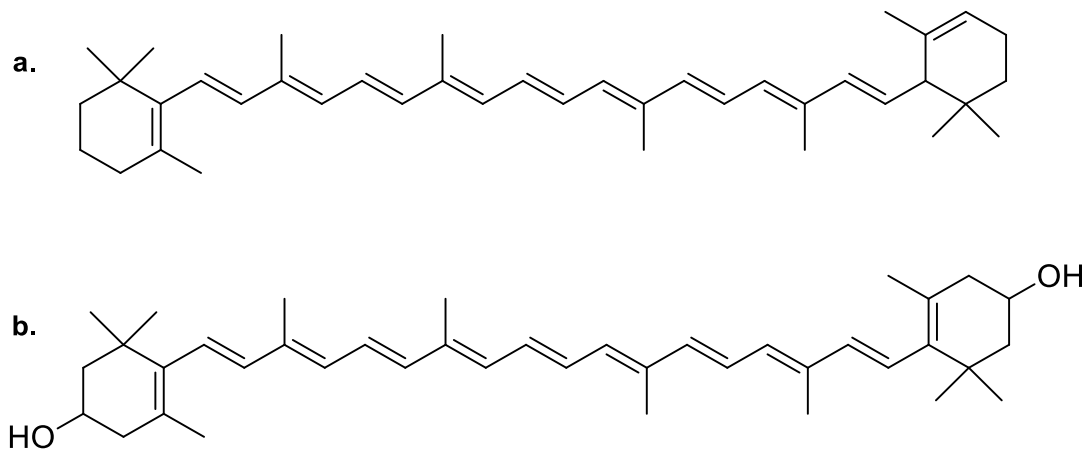


Figura 5: Estructura química de un carotenoide hidrocarbonado (a.  $\alpha$ -caroteno) y un carotenoide oxigenado (b. Zeaxantina).

### 3.2.2.2 Vitaminas

Son compuestos sintetizados en su mayoría por plantas, reconocidos por sus beneficios a la salud al estar relacionados con reacciones de óxido-reducción y por ser cofactores para ciertas enzimas. Además de la vitamina K y el retinol (vitamina A), cuya estructura química corresponde a un carotenoide que se produce como resultado de la ruptura del  $\beta$ -caroteno, las vitaminas que presentan potencial antioxidante relevante son las vitaminas C y E . (Shetty, 2013; Atta, 2017).

#### ◆ Vitamina C

Se conoce como una lactona de seis carbonos sintetizada a partir de glucosa (Figura 6). Bajo condiciones fisiológicas, el ácido ascórbico se encuentra principalmente en su forma reducida como ascorbato, el cual reacciona con varios radicales para formar el radical ascorbilo relativamente estable al formar enlaces dobles en los sitios en los que se ha perdido un hidrógeno y posteriormente puede ser reducido enzimáticamente. La capacidad donadora de electrones, por ser soluble en agua, convierte al ácido ascórbico en el principal agente contra radicales en fase acuosa, protegiendo a las membranas contra la peroxidación al eliminar directamente los radicales peroxilo o al interactuar con el radical tocoferoxilo, regenerando así al  $\alpha$ -tocoferol. Por el contrario, la combinación con iones ferrosos genera radicales hidroxilo que inducen a la peroxidación lipídica. (Wojcik, 2010; Pereira, 2012; Atta, 2017).

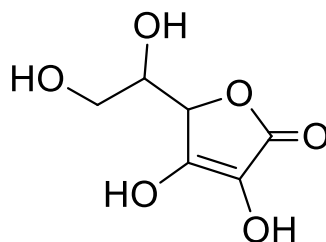


Figura 6: Estructura química del ácido ascórbico (Vitamina C).

#### ◆ Vitamina E

Se trata de un grupo de ocho especies de tocoferoles y tocotrienoles de carácter liposoluble, derivados del isoprenoide y que constan de un anillo complejo y una larga cadena lateral. Esta cadena es saturada en los tocoferoles, mientras que en los tocotrienoles es insaturada con tres enlaces dobles en los carbonos 3,7, y 11; de la misma forma los anillos difieren en la posición de los grupos metilo, designados como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . El succinato de  $\alpha$ -tocoferol es la forma más común y la más activa en el organismo (Figura 7). Su función antioxidante se encuentra en la interrupción en la etapa de propagación en las reacciones de autoxidación mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo, formando un hidroperóxido y el radical ariloxilo que se estabiliza por resonancia de la estructura fenólica. Finalmente, los radicales formados pueden reaccionar con otros radicales peroxilo o ariloxilo para generar múltiples productos no reactivos. (Sayago, 2007).

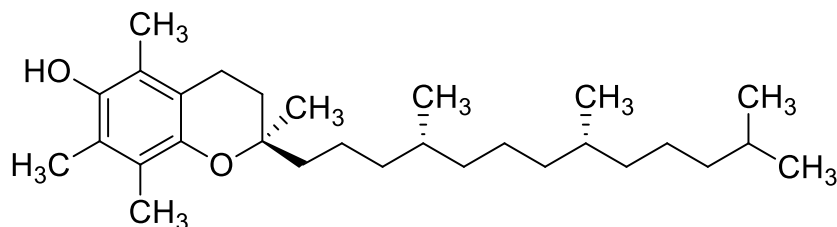


Figura 7: Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E).

#### 3.2.2.3 Polifenoles

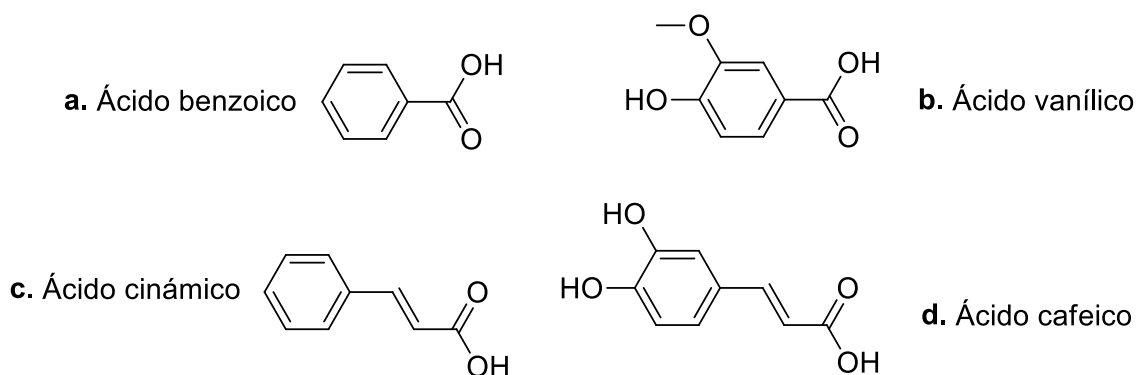
Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la invasión de patógenos, contribuyendo también a propiedades como astringencia, amargor, olor, sabor, color y estabilidad



oxidativa de los alimentos que los contienen. Estos compuestos pueden ser clasificados en función del número de anillos de fenol que contienen y con base en los elementos estructurales que mantienen unidos dichos anillos. Las clases principales de polifenoles incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos. Estos compuestos poseen actividad antioxidante debido a la presencia de grupos hidroxilo que son capaces de donar un protón y a la estructura aromática que mantiene estable el radical resultante. (Villano, 2007; Pandey, 2009).

◆ **Ácidos Fenólicos**

Los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxílico unido al fenol ya sea sustituyendo al grupo alcohol, en el caso de los derivados del ácido benzoico, o mediante una cadena alifática como aquellos derivados del ácido cinámico. Estos compuestos son ubicuos en materiales vegetales y en ocasiones presentes como ésteres o glucósidos. Aquellos derivados del ácido benzoico (Figura 8a) incluyen al ácido *p*-hidroxi benzoico, ácido siríngico, ácido gálico y ácido vanílico (Figura 8b); mientras que los derivados del ácido cinámico (Figura 8c) incluyen al ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido cafeico (Figura 8d), entre otros. Generalmente actúan como antioxidantes capturando radicales libres, en especial a radicales peroxilo, hidroxilo, aniones superóxido y peroxinitritos. (Carocho, 2013; Kancheva, 2013; Oroian, 2015).



*Figura 8:* Estructuras del ácido benzoico, cinámico y ejemplos de ácidos fenólicos derivados.

### ◆ Flavonoides

Son pigmentos hidrosolubles encontrados en las vacuolas de las células vegetales donde realizan funciones como: la coloración de pétalos de flores, filtración de luz UV y fijación de nitrógeno. También pueden fungir como mensajeros químicos, reguladores fisiológicos e inhibidores de ciclos celulares. (Kabera, 2014)

Estructuralmente, se conocen como difenilpropanoides ciclados, basados en un sistema de tres anillos: un anillo central de pirano (anillo C), por un lado fusionado a un anillo aromático (anillo A) y por el otro unido a un segundo anillo aromático (anillo B) unido por un enlace sencillo (Figura 9a). Debido a las diferencias alrededor del anillo heterocíclico, al número y posición de los grupos hidroxilo y al grado de alquilación o glicosilación, pueden ser agrupados como flavonoles, flavanoles o catequinas, flavanonas, flavonas, isoflavonoides, antocianinas y antocianidinas (Figura 9b-g). (Kancheva, 2013; Oroian, 2015; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

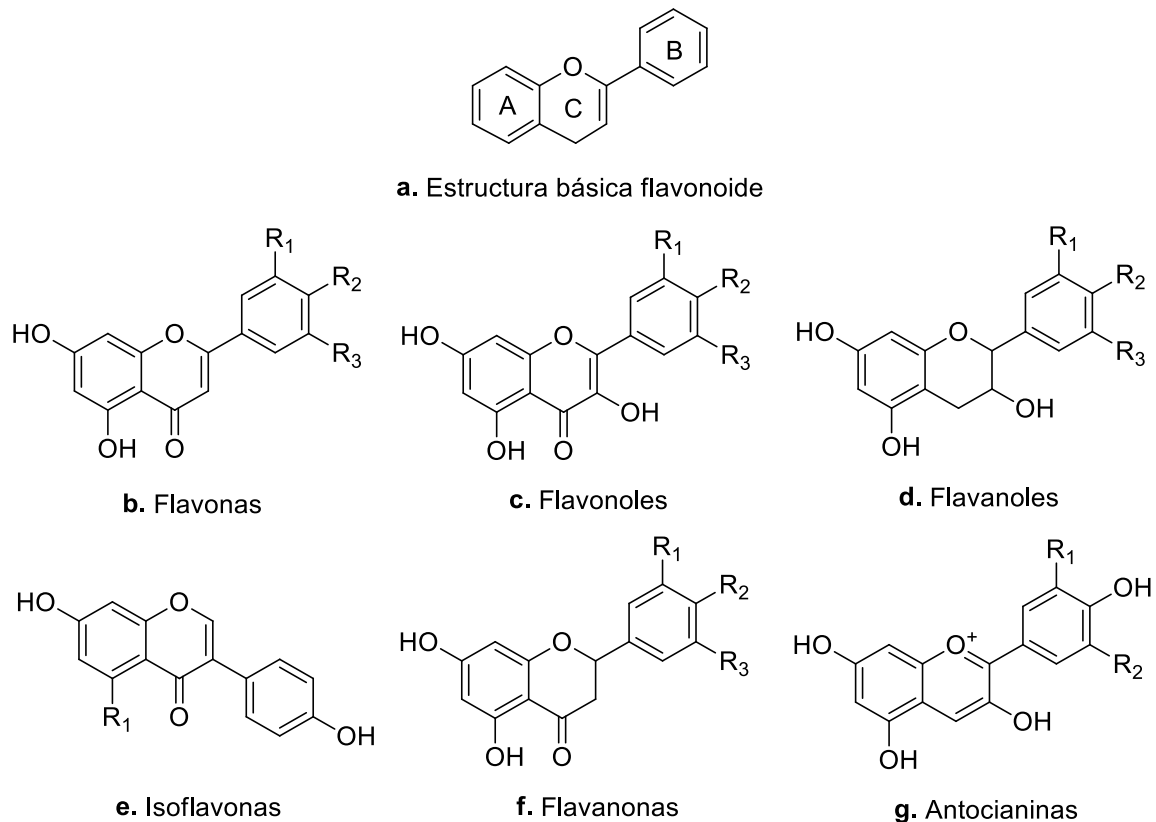
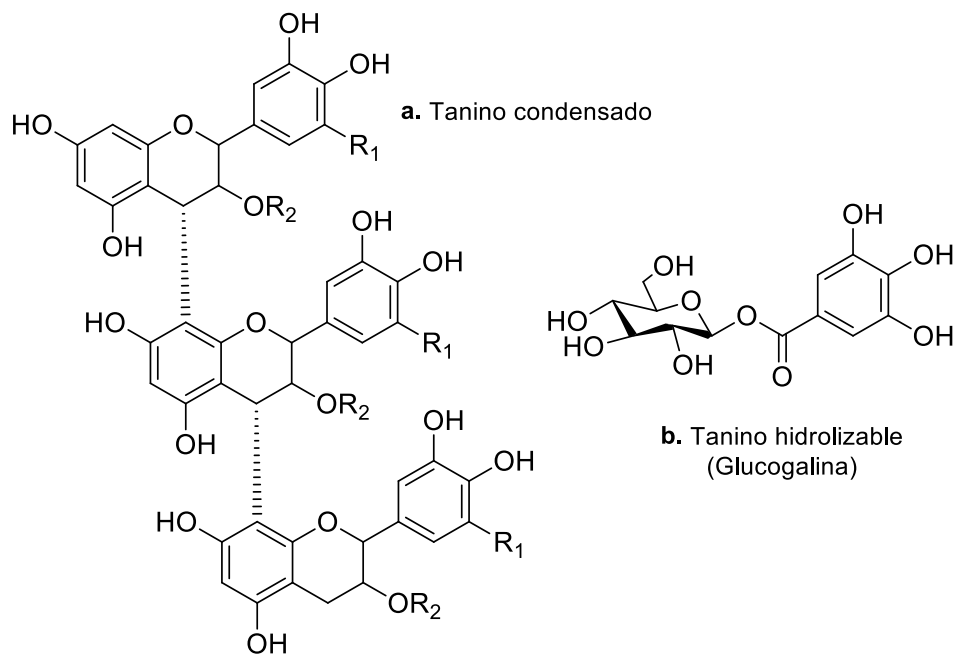


Figura 9: Estructuras básicas de diferentes clases de flavonoides.  
(Adaptado de Pandev, 2009).

Funcionan como antioxidantes primarios donando átomos de hidrógeno, como agentes reductores, quelantes y supresores de aniones superóxido. Así mismo, pueden activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas, reducir radicales tocoferoxilo y aumentar niveles de ácido úrico. (Pereira, 2012; Caroch, 2013)

◆ **Taninos**

Compuestos constituidos por un grupo diverso de oligómeros y polímeros; son hidrosolubles, a excepción de algunos con peso molecular elevado. Pueden estar presentes en hojas, cortezas y frutos como medida de protección contra herbívoros e infecciones. Además de efectuar reacciones fenólicas típicas presentan propiedades especiales como la capacidad de precipitar alcaloides y proteínas, actuando como principios activos de plantas medicinales con efectos astringentes, antidiarreicos, antiinflamatorios y antitumorales. (Kancheva, 2013; Kabera, 2014).



*Figura 10:* Estructuras químicas de un tanino condensado (10a) y un galotanino (10b). (Kancheva, 2013).

Comúnmente son divididos como taninos condensados y taninos hidrolizables. Los primeros, conocidos también como proantocianidinas, son oligómeros y polímeros de flavonoides (Figura 10a), mientras que los taninos hidrolizables se forman por la

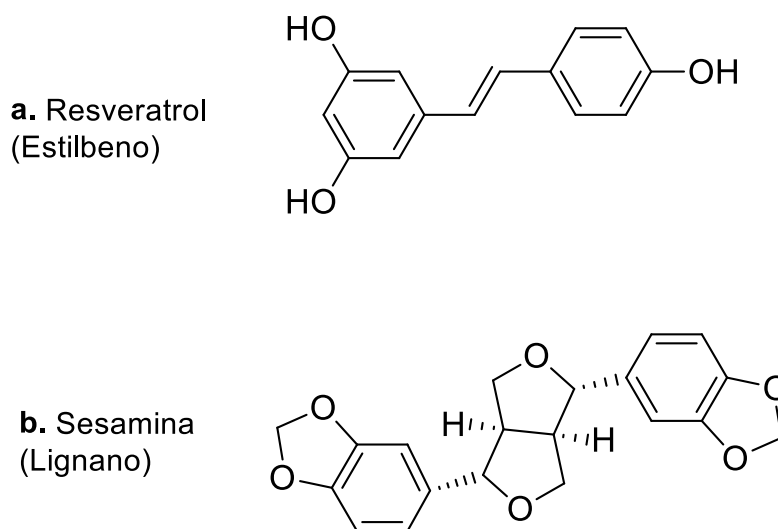
glicosilación del ácido gálico e incluyen a los galotaninos (Figura 10b), elagitaninos y taninos complejos. Son conocidos por inhibir a las lipoxigenasas y por eliminar radicales peroxilo, hidroxilo y superóxido. (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

◆ **Estilbenos**

Los estilbenos contienen dos fracciones fenólicas conectadas por un puente de metilenos. Se presentan como monómeros o como oligómeros y muchos de ellos actúan como fitoalexinas antifúngicas, solamente sintetizados como respuesta a lesiones o infecciones. Uno de los estilbenos más estudiados es el resveratrol (Figura 11a), encontrado principalmente en uvas y vino rojos, así como moderadamente en cacahuates y frutos rojos. (Pandey, 2009; Wojcik, 2010).

◆ **Lignan**

Son compuestos bifenólicos que contienen una estructura de 2,3-dibencilbutano formada por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico. Se encuentran especialmente en semillas de sésamo, en forma de sesamina (Figura 11b) y sesamolina; semillas de lino, y en diversas partes de plantas vasculares, actuando como detergentes inactivos. (Pandey, 2009; Kancheva, 2013).



*Figura 11:* Ejemplos de estilbenos (Resveratrol) y de lignanos (Sesamina).

### **3.3 Técnicas de Extracción de Antioxidantes**

La extracción es uno de los procedimientos más importantes para la obtención, estudio y utilización de analitos. Aunque no hay un único método estandarizado para ello, se encuentran diversas técnicas que buscan un mayor rendimiento de extracción y la mínima alteración de los analitos. (Ignat, 2011).

Para la extracción de compuestos de interés analítico existen métodos clásicos y no convencionales; los primeros se basan en el poder de extracción de los disolventes y en la aplicación de calor o agitación. Por otro lado, los métodos no convencionales o emergentes se consideran más amigables con el medio ambiente ya que reducen el uso de disolventes, reducen el tiempo de operación y mejoran el rendimiento y la calidad del extracto. Los factores más comunes que afectan a los procesos de extracción son: la naturaleza de la materia prima, el disolvente utilizado, la temperatura, tiempo, presión y el procedimiento de extracción. (Azmir, 2013)

#### **3.3.1 Extracción mediante Maceración**

La extracción de compuestos antioxidantes a partir de materia vegetal mediante disolventes orgánicos se basa en el equilibrio químico del componente de interés entre el sólido y el disolvente, y está influenciada principalmente por las condiciones a las que se encuentre la interacción sólido-líquido. Debido a que cada materia vegetal presenta estructuras y composición únicas, el comportamiento del sistema materia-disolvente es impredecible. En la extracción de algunos compuestos fenólicos como flavonoides, cateoles y taninos, los disolventes más comúnmente eficientes son los más polares como etanol y metanol, así como sus mezclas acuosas, sin embargo, estos disolventes no son altamente selectivos para fenoles. Por otro lado, la acidificación del medio aumenta la eficiencia de extracción ya que el ácido rompe las membranas celulares permitiendo la liberación de los compuestos fenólicos, no obstante, este puede ser un tratamiento agresivo que lleve a la degradación de los compuestos de interés, por lo que es preferible la acidificación con ácidos orgánicos como ácido fórmico o acético a bajas concentraciones, generalmente menores al 5 % dependiendo de la naturaleza de la matriz vegetal. (Naczka & Shahidi, 2006; Castañeda-Ovando, 2009; Oroian, 2015).

### **3.3.2 Extracción mediante Soxhlet**

Se trata de un método donde la muestra es colocada en un soporte o cámara para cartuchos que es llenado gradualmente con disolvente desde un matraz de destilación y cuando el líquido alcanza el nivel de desbordamiento, un sifón aspira el líquido de la cámara descargándolo de regreso al matraz de ebullición y llevando consigo los analitos extraídos. Se considera como una técnica de extracción por lotes ya que el disolvente actúa de manera progresiva, sin embargo, operacionalmente resulta ser una técnica continua al recircular el disolvente a través del material vegetal. Por otra parte, las desventajas que presenta este método son: un largo periodo requerido para la extracción, grandes cantidades de disolvente gastado que pueden hacer al proceso costoso y una fuente de problemas ambientales; la falta de agitación durante la extracción en la cámara y principalmente que los extractos se mantienen a la temperatura de ebullición del disolvente, lo que puede provocar la descomposición de compuestos termolábiles. (De Castro, 2010).

### **3.3.3 Extracción asistida por Ultrasonido**

Es la técnica cuyo poder de extracción se atribuye a la cavitación acústica, generando fuerzas cortantes o transversales y ondas de choque a bajas frecuencias (20 – 100 kHz). La cavitación crea en la interfase entre el disolvente de extracción y la matriz sólida, puntos con altas temperaturas y presiones (Figura 12B), provocando la ruptura de las paredes celulares y la desintegración de los materiales sólidos, lo que incrementa la solubilidad, difusividad, la penetración del líquido y la transferencia de masa. (Sabater, 2019).

### **3.3.4 Extracción asistida por Microondas**

Es la técnica que utiliza la energía de microondas para facilitar la partición de los analitos desde la matriz de la muestra hacia el disolvente. La radiación de las microondas interactúa con los dipolos de los materiales polares o polarizables (Figura 12C), causando un aumento de temperatura cerca de la superficie de la muestra y el calor generado se transfiere por conducción. La rotación del dipolo de las moléculas rompe los puentes de hidrógeno, permitiendo la penetración del disolvente y la migración de los compuestos

disueltos. Cuando se utilizan disolventes no polares, se genera poco calor ya que éste es transferido solamente por absorción dieléctrica. Por lo anterior, el método es considerado como selectivo ya que favorece a moléculas y disolventes polares con constantes dieléctricas altas. (Azwanida, 2015).

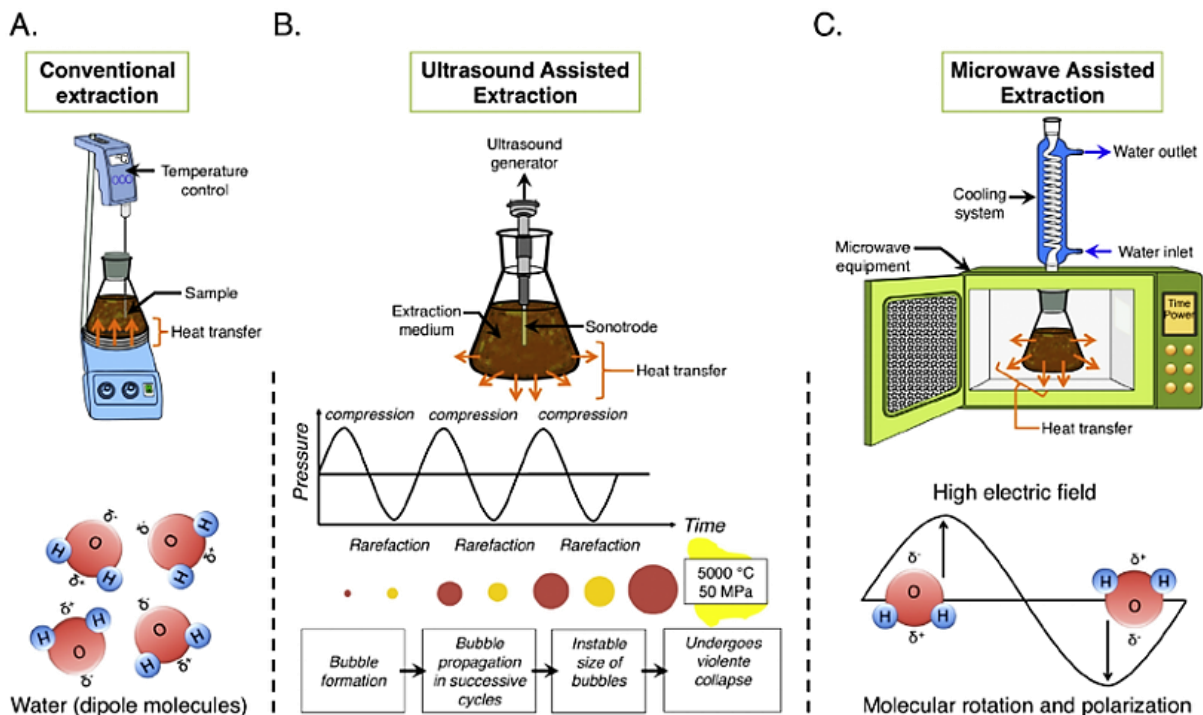
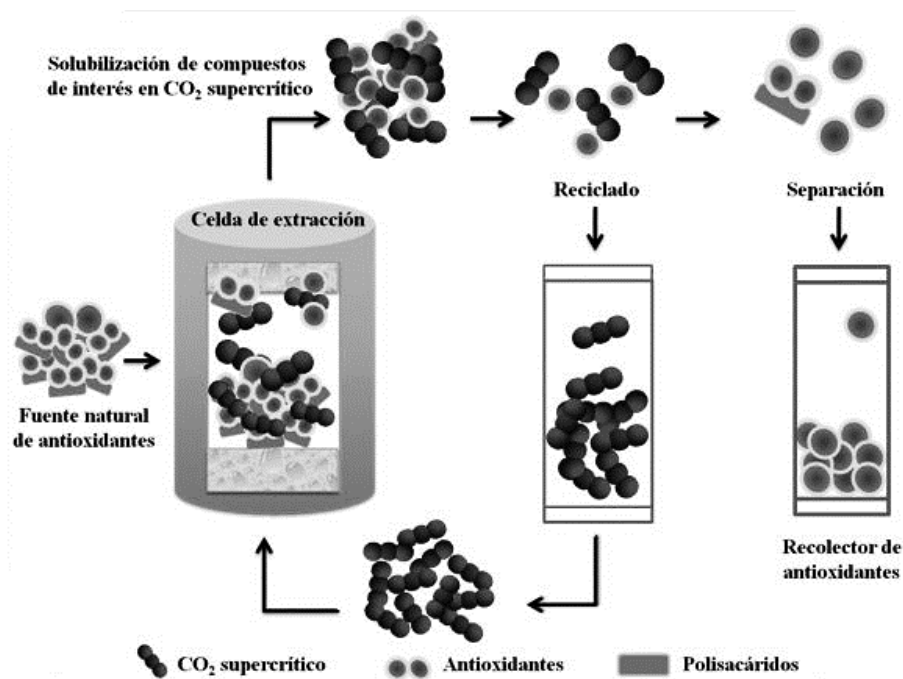


Figura 12: Disposición experimental para diferentes métodos de extracción de moléculas de alto valor agregado. A. Métodos convencionales. B. Extracción asistida por Ultrasonido. C. Extracción asistida por Microondas. (Roohinejad *et al.*, 2017)

### 3.3.5 Extracción asistida por Fluidos Supercríticos

Un fluido supercrítico, también llamado gas denso, es una sustancia que comparte propiedades físicas tanto de un gas como de un líquido cuando factores determinantes como temperatura y presión llevan a dicha sustancia hasta su región crítica. Estos fluidos se comportan más como un gas, no obstante, presentan propiedades solvatantes de un líquido. El compuesto más utilizado es el dióxido de carbono, el cual se convierte en fluido supercrítico por encima de los 31.1°C y 7380 kPa y resulta de interés al ser un excelente disolvente para analitos no polares, siendo solamente necesario añadir pequeñas cantidades de etanol o metanol para la extracción de compuestos polares, así como por

su bajo costo y toxicidad. (Azwanida, 2015). El esquema presentado en la Figura 13 ejemplifica la extracción de antioxidantes mediante fluidos supercríticos.



*Figura 13:* Proceso de extracción de antioxidantes por fluidos supercríticos. (Gil-Chávez, 2012).

### 3.3.6 Extracción asistida por Enzimas

Este método se basa en la capacidad inherente de las enzimas para catalizar reacciones con alta especificidad, regioselectividad y la capacidad de funcionar en condiciones moderadas de procesamiento en medio acuoso. De esta manera, las enzimas son capaces de degradar o romper las paredes y membranas celulares, permitiendo una mejor liberación y, en consecuencia, mejor extracción de los analitos. El empleo de las diferentes clases de enzimas disponibles depende de la naturaleza de la matriz de la cual se pretende extraer compuestos de interés. (Puri, 2012)

### 3.4 Métodos de Cuantificación de Compuestos Fenólicos

Existe una gran demanda de métodos analíticos cada vez más selectivos y sensibles para la determinación de polifenoles; sin embargo, la cuantificación de compuestos fenólicos sigue siendo compleja, especialmente en la determinación simultánea de



diferentes grupos de ellos. Se han desarrollado métodos espectrofotométricos, que proveen información cualitativa y cuantitativa muy útil mediante procedimientos sencillos y de bajo costo. (Ignat, 2011).

Entre los métodos espectrofotométricos más utilizados para la cuantificación de compuestos fenólicos totales se encuentra el método de Folin-Ciocalteu, el cual es un método colorimétrico que se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, una mezcla de ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), en óxidos de molibdeno y tungsteno ( $Mo_8O_{23}$  y  $W_8O_{23}$ ) en medio alcalino (Bancuta, 2016). Los productos de reducción del óxido del metal presentan una coloración azul que tiene un máximo de absorción a 760-765 nm, donde la intensidad de la coloración azul es proporcional a la concentración de fenoles. Este método posee la ventaja de tener una respuesta equivalente entre diferentes tipos de fenoles, sin embargo, también muestra respuesta al dióxido de azufre, a azúcares y a proteínas que presentan aminoácidos con grupo funcional hidroxilo. (Waterhouse, 2002).

La principal desventaja de los métodos espectrofotométricos es que solamente pueden dar una estimación del contenido total de compuestos fenólicos y no una medida cuantitativa de los compuestos individuales. Para una determinación más selectiva y sensible se emplean métodos cromatográficos tales como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC), (Ignat, 2011). La técnica más utilizada es HPLC acoplada a espectrometría de masas (MS) que también permite la identificación y elucidación estructural de los compuestos fenólicos de diferentes fuentes. La cromatografía de gases, en comparación con la técnica de HPLC, necesita la preparación de las muestras que incluye la remoción de lípidos del extracto, la liberación de los compuestos fenólicos y su derivatización mediante metilación o acetilación. (Ajila, 2010).

### **3.5 Métodos de Evaluación de Actividad Antioxidante**

Para el análisis *in vitro* de la actividad de los compuestos antioxidantes se encuentran diversas metodologías que buscan evaluar principalmente la habilidad de proteger moléculas expuestas a fuentes de radicales libres, la capacidad de reducir iones

metálicos o la eliminación de radicales libres estables. La técnica más empleada que evalúa la capacidad de inhibir el consumo de una molécula objetivo es el ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) que se basa en el cambio en la absorción de luz UV-visible o en la intensidad de fluorescencia de una molécula objetivo al ser incubada con radicales peroxilo, tratándose en este caso del AAPH o dihidrocloruro de 2,2-Azobis (2-metilpropionamidina) como fuente productora de radicales a una tasa conocida en medio acuoso. (López-Alarcón, 2013).

Por otra parte, se encuentran los métodos que evalúan la capacidad de una muestra para reducir los iones cúprico o férrico en medio acuoso, de los cuales el ensayo FRAP (poder antioxidante reductor de hierro) utiliza la reacción de reducción del complejo férrico tripiridil triazina (Fe<sup>III</sup>-TPTZ) en medio ácido. El complejo reducido presenta absorción visible con un máximo de intensidad a 593 nm. (López-Alarcón, 2013).

En la evaluación de la eliminación de radicales libres, el ensayo de DPPH se basa en la reducción del radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidracilo al sustraer un protón del compuesto antioxidante presente (Figura 14). Esta capacidad es representada por el índice IC<sub>50</sub> que se define como la concentración necesaria de antioxidante para reducir el 50 % del radical. El DPPH en su forma radical presenta un máximo de absorción a 515 nm en metanol y a 517 nm en etanol; a medida que se lleva a cabo la reducción del radical, la absorción disminuye, siendo esta disminución proporcional a la concentración y actividad antioxidante del compuesto analizado. Este método sirve de indicador del potencial antioxidante de un alimento o algún compuesto contenido en él. (Brand-Williams, 1995; Villaño, 2007).

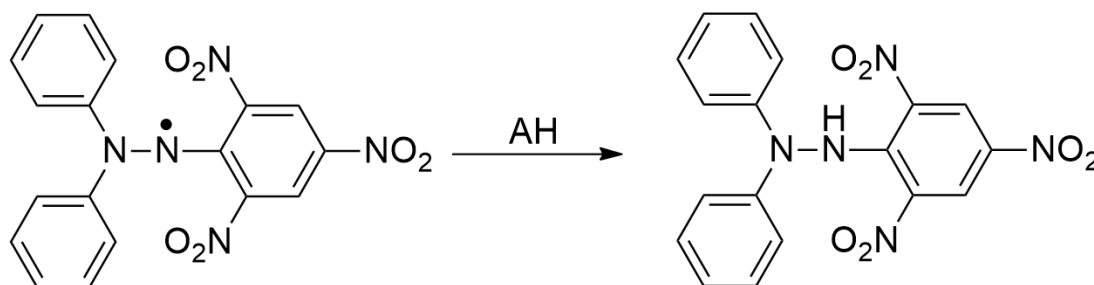


Figura 14: Reacción entre el radical DPPH y una molécula antioxidante.

### **3.6 Estabilidad Oxidativa de Compuestos Lipídicos**

La principal reacción de deterioro que ocurre durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos corresponde a la oxidación lipídica, la cual limita la vida de anaquel de muchos alimentos debido a la destrucción de vitaminas contenidas en ellos y a la generación de subproductos indeseables. (Johnson & Decker, 2015; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Por definición, la estabilidad oxidativa de un aceite es una medida del tiempo de inducción, es decir, el tiempo requerido para iniciar su deterioro oxidativo; éste ocurre cuando el calor, iones metálicos u otros catalizadores causan la conversión de moléculas de aceite insaturado a radicales libres, los cuales más tarde son oxidados en hidroperóxidos, aldehídos, cetonas y ácidos que confieren sabores y olores indeseables a grasas y aceites. Existen dos vías por las cuales sucede la oxidación de lípidos, ya sea por autooxidación o por catálisis mediada por lipoxigenasas; en la autooxidación se lleva a cabo un grupo complejo de reacciones que resultan en la incorporación de oxígeno en la estructura lipídica y cuya velocidad aumenta después del periodo de inducción. (Aluyor, 2008).

El oxígeno atmosférico causante del deterioro de lípidos se encuentra en dos formas que interactúan con los ácidos grasos insaturados. La especie de oxígeno más reactiva es el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), que puede promover rápidamente la oxidación en alimentos que contienen fotosensibilizadores, mientras que la especie más común es el oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ), que es el responsable de la reacción en cadena de radicales libres. (Johnson & Decker, 2015).

Debido a que la oxidación de lípidos constituye un proceso complejo que produce cambios físicos y químicos en productos alimenticios que influyen de manera importante en su aceptabilidad y calidad nutritiva, se han desarrollado diversas técnicas para evaluar el nivel de deterioro de aceites y grasas. Cada ensayo puede medir solamente unos cuantos cambios bajo condiciones y sistemas específicos, por lo cual se suele emplear una combinación de varias pruebas como índice de acidez, de yodo, de peróxidos y de *p*-anisidina. (Nawar, 2000).

### **3.6.1 Índice de Acidez**

La liberación de ácidos grasos en aceites vegetales se debe principalmente a la hidrólisis enzimática de triacilgliceroles, que generalmente ocurre antes de la recolección de semillas. La concentración de ácidos grasos libres aumenta con la edad de las semillas y con el almacenamiento del aceite crudo, por lo cual muchos aceites vegetales son sometidos a neutralización con álcalis y posterior remoción de los jabones precipitados. (Nawar, 2000; Chen, 2011).

Los ácidos grasos libres se oxidan a velocidades ligeramente superiores que al ser parte de los acilgliceroles. Pequeñas cantidades de ácidos grasos libres no provocan grandes cambios en la estabilidad de un aceite o grasa, sin embargo, en cantidades relativamente grandes facilitan la incorporación de trazas de metales que provienen del procesamiento. (Nawar, 2000). Además, una concentración inicial de ácidos grasos libres provoca la hidrólisis de los triacilgliceroles, aumentando el contenido con el transcurso del tiempo y estos producen sabores indeseables, espuma durante el calentamiento o agitación y ejercen un efecto prooxidante en los aceites vegetales. (Aluyor, 2008; Chen, 2011).

El índice de acidez es definido como los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos contenidos en un gramo de grasa o aceite, por lo que refleja la concentración de ácidos grasos hidrolizados y es representado por el porcentaje en peso de un ácido graso específico. (Nielsen, 2010).

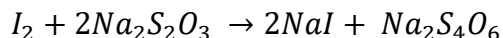
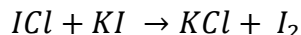
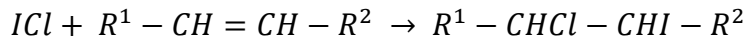
### **3.6.2 Índice de Yodo**

El índice de yodo se relaciona directamente con el nivel de insaturaciones de los ácidos grasos, lo que significa que a mayor índice de yodo, mayor nivel de insaturación; de igual manera, un decremento en el valor puede atribuirse a la destrucción de los enlaces dobles por la oxidación y polimerización. (Abdulkarim, 2007; Adekunle, 2015).

La prueba se define como los gramos de yodo absorbidos por 100 g de muestra. En el método de Wijs, una cantidad pesada de aceite se mezcla con disolvente y se hace reaccionar con un exceso medido de monocloruro de yodo, en una mezcla de ácido acético y disolvente, interactuando con los enlaces dobles carbono-carbono. Posteriormente, una solución de yoduro de potasio es añadida para reducir el exceso de

ICl a yodo libre; esta liberación es titulada con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) y almidón como indicador. (Nawar, 2000; Nielsen, 2010).

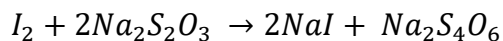
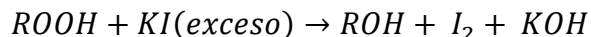
Las reacciones implicadas en la determinación son:



### **3.6.3 Índice de Peróxidos**

Los principales productos de la etapa inicial de oxidación son los peróxidos e hidroperóxidos y estos pueden evaluarse por medio de métodos que se basan en la capacidad de liberar yodo a partir de yoduro. El índice de peróxidos se representa en términos de miliequivalentes de peróxido por kg de grasa o aceite. (Nawar, 2000). Se determina a una cantidad conocida de muestra de grasa o aceite con un exceso de yoduro de potasio en una mezcla de ácido acético y disolvente. El yodo liberado durante la reacción es titulado con tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) estandarizado y almidón como indicador, hasta el punto de vire. Se deben tomar precauciones para evitar la luz ultravioleta promueva la oxidación fotoquímica. (Hasenhuettl & Hartel, 2008).

Las reacciones comprendidas en el ensayo son:



### **3.7 Antioxidantes presentes en especies de *Annonaceae***

Actualmente existe una correlación entre el contenido de diferentes metabolitos secundarios de origen vegetal y la actividad antioxidante (Kothari, 2010); tal es el caso de varias especies de anonáceas, una familia que comprende cerca de 120 géneros y más de 2000 especies, las cuales figuran entre las familias menos estudiadas tanto química como farmacológicamente. No obstante, dado el hecho de que varias especies son utilizadas en medicina tradicional, se ha estudiado y observado que éstas son fuentes potenciales de fitoquímicos bioactivos de interés farmacológico, entre los cuales se hallan alcaloides, acetogeninas, flavonoides, carotenos, entre otros (Biba, 2014). De igual manera, se han encontrado particularmente compuestos con actividad antioxidante en diferentes partes de las plantas del género *Annona* como son: hojas, corteza, flores, pulpa, pericarpio y semillas de frutos (Baskar, 2006; Roesler, 2007; Womeni, 2016).

Las propiedades antioxidantes atribuidas a las anonáceas pueden ser asignadas a la presencia de compuestos tales como carotenos ( $\beta$ -caroteno, luteína y  $\beta$ -criptoxantina) y ácidos: cítrico, ascórbico, quínico y clorogénico, los cuales son conocidos antioxidantes. (Albuquerque, 2014, Baskaran, 2016; Nam, 2017). No obstante, una gran contribución a la actividad antioxidante está dada por los polifenoles encontrados en diversas especies del género *Annona*. (Benites, 2013). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de estos compuestos aislados en algunas de las especies más estudiadas.

Los alcaloides y principalmente las acetogeninas son moléculas características del género *Annona* que, dentro de las propiedades bioquímicas y farmacológicas que presentan, muestran también capacidad antioxidante (Baskar, 2006; Gupta-Elera et al., 2011; Egydio-Brandão et al., 2017). Tal es el caso de cinco alcaloides encontrados y aislados de extractos metanólicos de la corteza de *Annona salzmannii*, los cuales son identificados como: liriodenina, anonaina, asimilobina, reticulina y cleistofolina. De entre estos compuestos, la asimilobina es el alcaloide más activo con 2.09 equivalentes relativos de Trolox, evaluado mediante el ensayo ORAC-FL. (Costa, 2013).

Tabla 2: Ejemplos de compuestos fenólicos identificados en extractos de diferentes partes de cuatro especies de *Annona*.

Especie	Compuestos fenólicos	Partes	Referencia
<i>A. cherimola</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos fenólicos: hidroxibenzoico, vanílico y siríngico</li> <li>• Flavanol: epicatequina</li> <li>• Flavonol: rutina</li> <li>• Flavanona: hesperidina</li> <li>• Taninos: procianidinas</li> </ul>	Cáscara, pulpa y semillas	Barreca, 2011 García-Salas, 2015
<i>A. crassiflora</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos fenólicos: ferúlico, cafeico y cafeoiltartárico</li> <li>• Flavonoles: rutina y quercetina</li> </ul>	Cáscara, pulpa y semillas	Roesler, 2007
<i>A. muricata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos fenólicos: vanílico, ferúlico, cafeico, clorogénico y <i>p</i>-cumárico</li> <li>• Flavonoles: rutina y quercetina</li> <li>• Flavanoles: catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina</li> <li>• Flavanona: naringina</li> <li>• Tanino: ácido elágico</li> </ul>	Flores, hojas, ramas y raíces	Womeni, 2016; Nam, 2017
<i>A. squamosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenoles simples: catecol y vainillina</li> <li>• Ácidos fenólicos: cafeico, gálico, sinápico, protocatéquico, <i>p</i>-cumárico y ferúlico</li> <li>• Flavanoles: catequina, epicatequina y epigalocatequina</li> <li>• Taninos: procianidinas</li> </ul>	Pulpa	Jagtap & Bapat, 2012 Baskaran, 2016

### 3.8 Chincuya (*Annona purpurea*) como fuente de antioxidantes

#### 3.8.1 Descripción y Clasificación Botánica

La Chincuya (*Annona purpúrea* Mociño & Sessé ex Dunal), pertenece a la familia *Annonaceae* con 2500 especies que se distribuyen principalmente en regiones tropicales y subtropicales (González-Esquinca, 2005); dicha especie también forma parte del género *Annona* L. que incluye a la guanábana (*A. muricata*), chirimoya (*A. cherimola*), ilama (*A. diversifolia*), entre otras. Esta especie es clasificada taxonómicamente por la base de datos del Jardín Botánico de Missouri Tropicos.org (2019), como se muestra en la Figura 15.

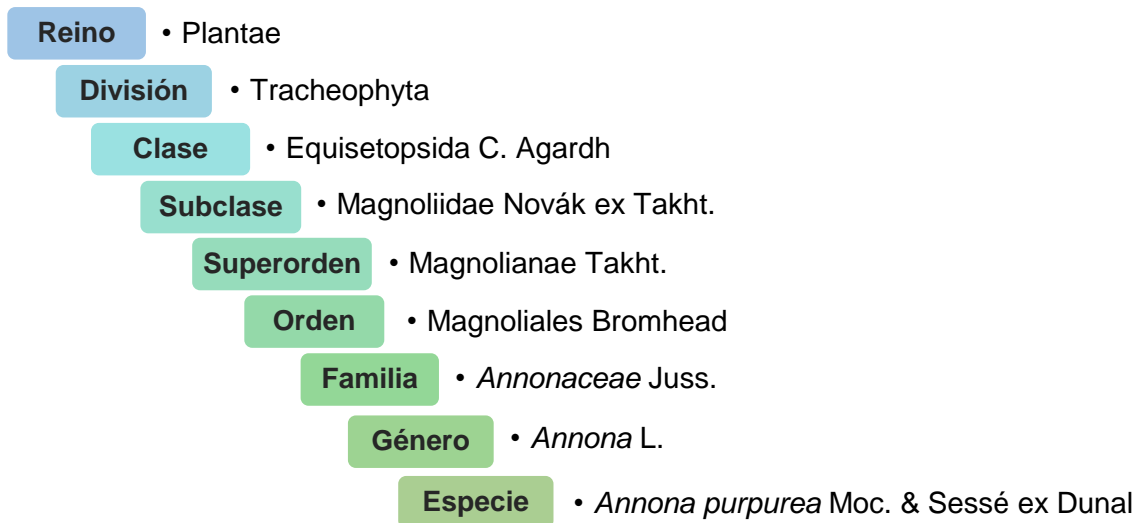
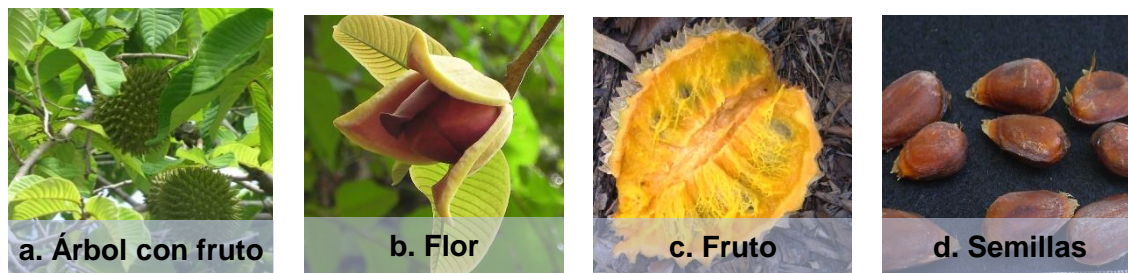


Figura 15: Clasificación botánica de la Chincuya.

Esta especie se describe como un árbol de hasta 10 m de altura con hojas simples, alternas, ampliamente obovadas, pubescentes en el envés y cortamente pecioladas (Figura 16a). Flores solitarias ferrugíneo-tormentosas con pétalos rojo-morados de alrededor de 5.8 cm de largo y sépalos ovados de 1.2 cm de largo aproximadamente (Figura 16b). Los frutos (Figura 16c) son esféricos de 12 a 20 cm de diámetro, con crestas cónicas en la superficie exterior, verdes, tornándose amarillos al madurar y con muchas semillas (Figura 16d) cubiertas por una pulpa fibrosa, amarilla o naranja y fragante. (Chízmar, 2009).





*Figura 16:* Distintas partes de la especie *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex. Dunal

Habita en la selva alta perennifolia, media subperennifolia, mediana subcaducifolia, baja caducifolia y en la vegetación derivada de éstas; crece en suelos desde secos hasta húmedos y a partir del nivel del mar hasta 1200 m. Su distribución se limita del sur de México hasta el norte de Sudamérica, por lo que llega a tener cerca de 66 nombres regionales, siendo los más utilizados: Chincuya, Sincuya, Soncoyo, Cabeza de Negro y Toreta (Luna-Cazáres, 2015). En México la chincuya se distribuye en los estados de Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Jalisco, Veracruz, Campeche, Guerrero, Tabasco y Yucatán (Luna-Cazáres, 2015), donde se cultiva principalmente como árbol de sombra por su abundante follaje y para el consumo de sus frutos frescos.

El sabor de la pulpa del fruto se puede describir como una combinación de sabores semejantes al mango, plátano, maracuyá y papaya. Esta fracción del fruto se destaca por aportar principalmente carbohidratos, fósforo, ácido ascórbico y calcio, a diferencia de la cáscara con alto contenido en fibra y las semillas ricas en lípidos (Tabla 3). (Vidal-Lezama, 2019).

Tabla 3: Análisis bromatológico de chincuya con base en peso seco (Vidal-Lezama, 2019).

Variable	Cáscara <sup>z</sup>	Pulpa <sup>y</sup>	Semilla <sup>x</sup>
Cenizas (%)	6.329±0.14	6.512±1.09	2.562±0.01
Materia orgánica (%)	93.670±0.14	93.487±1.09	97.437±0.01
Proteína cruda (%)	10.756±1.61	7.317±1.00	13.965±0.14
Extracto etéreo (%)	0.984±0.80	0.667±0.19	44.000±0.03
Fibra cruda (%)	42.751±0.84	11.914±4.14	20.004±0.05
Extracto libre de nitrógeno (%)	39.177±2.15	73.587±3.41	19.470±0.00

<sup>z</sup> Media de 6 observaciones; <sup>y</sup> Media de 8 observaciones;

<sup>x</sup> Media de dos observaciones

### 3.8.2 Usos y Propiedades Asociadas de la Chincuya

Además del consumo en fresco del fruto, la planta de chincuya tiene diversos usos como madera en la producción de pulpa para papel, cordones, como combustible y en la fabricación de implementos para agricultura como cajas, cajones y postes para cercas. Se siembra como árbol ornamental rompevientos y como cerca viva en fincas. El tinte obtenido de sus hojas se emplea para teñir pieles, mientras que las hojas y principalmente las semillas son trituradas y utilizadas como insecticida contra piojos, chinches, polillas, pulgas y cucarachas. Así también, presenta gran potencial para ser empleada como porta injerto de *Annona muricata* L. debido a su excelente compatibilidad (Chízar, 2009; Vidal-Lezama, 2019).

Por otro lado, los usos medicinales se conocen desde la época prehispánica, donde la medicina tradicional de México y Panamá utiliza esta especie para tratar infecciones de la piel, enfermedades respiratorias, disminuir la fiebre y dolor de cuerpo, resfriados, tos, contra la malaria y parásitos, dolor de cabeza y como cardiotónico. Más específicamente los usos medicinales para cada parte de la planta se resumen en la Figura 17 (Chízar, 2009; Luna Cazáres, 2015).



Figura 17: Usos y propiedades asociadas a la chincuya en la medicina tradicional.

### 3.8.3 Metabolitos Secundarios y Compuestos Bioactivos

Las propiedades medicinales y plaguicidas antes mencionadas tienen su origen en la fitoquímica de esta especie. A partir de diferentes partes de la planta, se han logrado aislar diversos metabolitos secundarios (Tabla 4), de los cuales, los más destacables son los alcaloides de origen bencilisoquinolínicos y acetogeninas, compuestos ampliamente encontrados en la familia *Annonaceae* (Luna-Cazáres, 2015).

Los alcaloides son un grupo de compuestos encontrados en microorganismos, plantas y animales; responsables tanto de los efectos benéficos de la medicina tradicional como de la toxicidad de los venenos naturales. El papel de estos compuestos en los organismos está más relacionado a la autoconservación, inhibición de competidores y la comunicación. Sin embargo, dentro de su gran diversidad estructural, la presencia de un átomo de nitrógeno básico es la única característica en común y éste puede presentarse como amina primaria, secundaria o terciaria, también puede estar contenido en el heterociclo (en alcaloides típicos) o en una cadena lateral (en alcaloides atípicos). La presencia de este átomo de nitrógeno que puede aceptar un protón, aunado a la presencia frecuente de grupos funcionales que tanto aceptan como donan protones, tales como los grupos fenol, hidroxilo y fracciones policíclicas, ayudan a explicar la bioactividad excepcional de los alcaloides. (Cushnie, 2014)

Por su parte, las acetogeninas son compuestos con 35 a 37 átomos de carbono, caracterizados por presentar una cadena larga alifática con un anillo y lactona  $\alpha$ ,  $\beta$

insaturado, con ninguno o hasta tres anillos de tetrahidrofurano y varias fracciones oxigenadas a lo largo de la cadena hidrocarbonada. Estos compuestos son de interés debido a sus actividades citotóxicas, antiparasitarias, antitumorales, insecticidas, antifúngicas e inmunosupresoras. (González-Esquinca, 2014; Vidal-Lezama, 2019)

*Tabla 4:* Ejemplos de metabolitos secundarios y su bioactividad, encontrados en la especie *Annona purpurea*.

Metabolito secundario	Clasificación	Bioactividad	Referencia
<i>Purpureacina-1</i>	Acetogenina	Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> y antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i> .	Cepleanu et al., 1993
<i>Purpureacina-2</i>		Actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	
<i>Annopurpuricinas A-D</i>		Actividad citotóxica sobre las líneas celulares MSTO-211H, HeLa y HepG2	Hernández-Fuentes, 2019
<i>Oxopurpureina</i>	Alcaloide	Actividad antitumoral contra la línea celular 9-KB	Sonnet, 1971
<i>O-metil-laterolina</i>		Potente citotoxicidad contra líneas celulares KB	
<i>Liriodenina</i>		Modesta actividad citotóxica sobre la línea celular tumoral 9-KB	
<i>S-Glaziovina (N-metil-crotsparina)</i>			Rejón-Orantes, 2011
<i>Annomontina</i>		Efecto ansiolítico	

Así también, se han encontrado aceites esenciales como cuminaldehído, terpineol, geraniol y acetato de geraniol; flavonoides como el 3-O de quercetina, ramnósido-3-O-campferol, ramnósido-3-O-osoramnetina y el ramnósido-3-O-tanarixetina; dos esteroides ( $\beta$ -sitosterol y  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucósido); adenina y escuamolona, una lactoamida. (Luna-Cazáres, 2015) Finalmente, recientemente se ha logrado aislar, a partir de las semillas, un nuevo ciclooctapéptido denominado ciclopururacina. (González-Tepale, 2018).

## 4. METODOLOGÍA

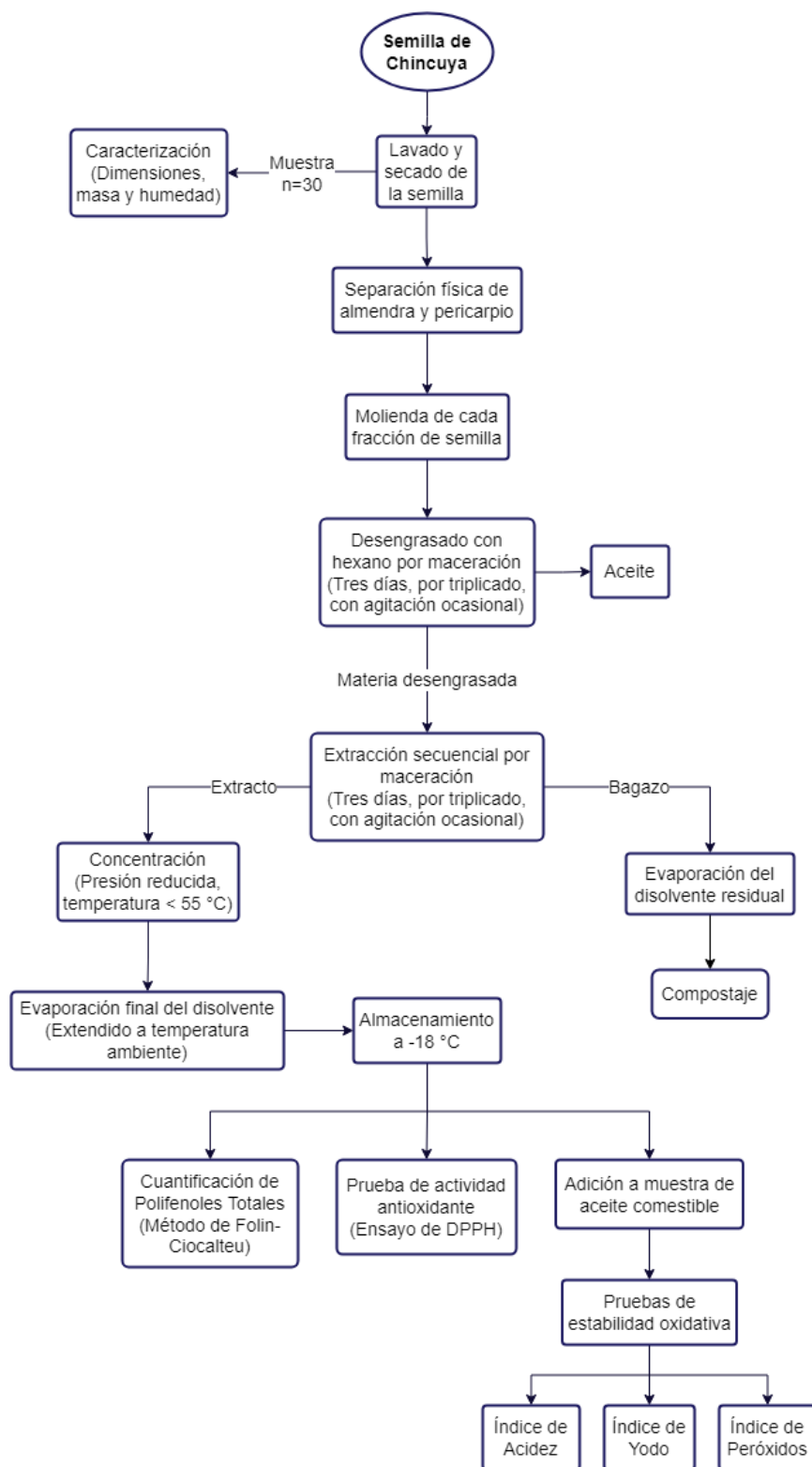


Figura 18: Esquema de obtención y evaluación de extractos de semilla de *Annona purpurea*.

#### **4.1 Materia Prima**

En la Figura 18 se muestra el proceso general de trabajo para la obtención de extractos, su posterior evaluación de la capacidad antioxidante y su aplicación como aditivo antioxidante en aceite vegetal comestible. Un total de 2.60 kg de semillas de *Annona purpurea* se obtuvieron de la recolección de frutos maduros de Chincuya en la comunidad de Las Salinas, Chicomuselo, Chiapas, México en octubre de 2016 y autenticada por la profesora Ernestina Cedillo Portugal, perteneciente a la Unidad de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo. Una muestra con número 1-2016 fue depositada en el Herbario “Efraím Hernández X” en la Universidad Autónoma de Chapingo, México. Las semillas fueron colectadas, lavadas con agua, secadas y almacenadas a temperatura ambiente aisladas de la luz (González, 2018) hasta ser utilizadas en 2018.

#### **4.2 Caracterización de las semillas.**

A una muestra representativa de 30 semillas se le determinó el peso, largo, ancho y grosor de manera individual. Así mismo, se realizaron dichas determinaciones a la almendra una vez separada del pericarpio de manera manual. Por otro lado, se determinó la humedad del pericarpio y la almendra de semilla, empleando 1 g de cada fracción de semilla en una termobalanza marca Ohaus MB35 90°C (Figura 19).



*Figura 19:* Termobalanza Ohaus MB35 utilizada para la determinación de humedad de pericarpio y almendra de semillas de chincuya.

#### **4.4 Separación física de almendra y pericarpio y molienda.**

Con ayuda de una pinza mecánica se extrajo la almendra de la semilla, se colectó el pericarpio resultante y se descartaron las piezas dañadas; a continuación, cada porción fue triturada. Para el caso de la almendra, la molienda se llevó a cabo en una licuadora convencional, mientras que para la molienda del pericarpio se empleó primeramente un molino manual (Figura 20) y posteriormente se redujo el tamaño de partícula con ayuda de una licuadora convencional.



*Figura 20:* Molienda de pericarpio de semilla en molino manual marca Estrella.

#### **4.5 Desengrasado y extracción de compuestos fenólicos por maceración.**

Un total de 1.5 kg de harina de almendra y 0.9 kg de pericarpio molido fueron inmersos por separado en hexano para la remoción de aceite y posteriormente en seis disolventes diferentes de acuerdo con una secuencia creciente en polaridad. Cada extracción se realizó tomando en cuenta una relación aproximada de sólido/disolvente de 1/2 para la almendra y de 1/3 para el pericarpio. (González, 2019). Ambas fracciones se maceraron por tres días, repitiendo dos veces más con disolvente nuevo (Figura 21). La extracción secuencial se realizó tomando en cuenta el índice de polaridad relativo (Tabla 5), el contenido de lípidos en la almendra de la semilla y la consecuente naturaleza de los diferentes compuestos antioxidantes presentes (Hemwimon, 2007; Indrajit, 2013; Abarca-Vargas, 2016). De acuerdo con la polaridad de cada disolvente, el orden de la secuencia de extracciones fue: Diclorometano < Acetato de etilo < Acetona < Etanol (95%) < Metanol < Mezcla Etanol-Agua al 50 %, acidificado con 0.1 % de ácido acético glacial.



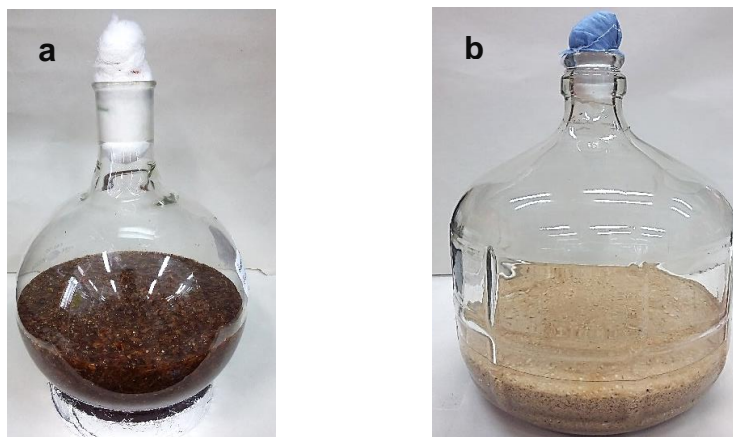
**Tabla 5:** índices de polaridad de los disolventes utilizados en la extracción de compuestos antioxidantes.

<b>Disolvente</b>	<b>Índice de Polaridad</b>
Agua	9.0 <sup>a</sup>
Etanol-Agua 50 %	7.1 <sup>b</sup>
Metanol	6.6 <sup>a</sup>
Etanol-Agua 95 %	5.4 <sup>b</sup>
Acetona	5.1 <sup>a</sup>
Acetato de etilo	4.4 <sup>a</sup>
Diclorometano	3.7 <sup>a</sup>
n-Hexano	0.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Abarca-Vargas, 2016

<sup>b</sup> Hemwimon, 2007

Después de cada periodo de tres días de maceración, el disolvente correspondiente fue renovado hasta completar nueve días de maceración. Por otro lado, cada extracto resultante fue filtrado, secado con sulfato de sodio anhidro, con excepción de los extractos con etanol-agua y etanol debido al alto contenido de agua, y concentrado mediante evaporación reducida en un evaporador rotatorio a temperaturas menores a 55 °C, dependiendo de la temperatura de ebullición del disolvente correspondiente, para evitar la degradación de los compuestos de interés. Los extractos finales fueron almacenados en frascos sellados en congelación (-18 °C) hasta su uso.



**Figura 21:** Extracción de polifenoles mediante maceración en disolventes orgánicos.  
a. Pericarpio molido. b. Harina de almendra.



Cada uno de los extractos obtenidos con los diferentes disolventes fueron preparados previamente a su análisis para la cuantificación de polifenoles y la evaluación de actividad antioxidante. En un vaso de precipitados de 10 mL se pesaron de 0.07 a 1.00 g de extracto (dependiendo de la polaridad del disolvente de extracción) y se disolvieron en 5 mL de metanol al 80 %, para después transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico y llevarlo a volumen final de 25.0 mL.

#### **4.6 Cuantificación de polifenoles totales.**

La determinación colorimétrica para la cuantificación de compuestos fenólicos se efectuó para cada extracto obtenido mediante el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002; Bancuta, 2016), con ligeras modificaciones, y empleando un lector de microplacas con dispensadores automáticos, marca BioTek modelo Synergy 2 (Figura 20).



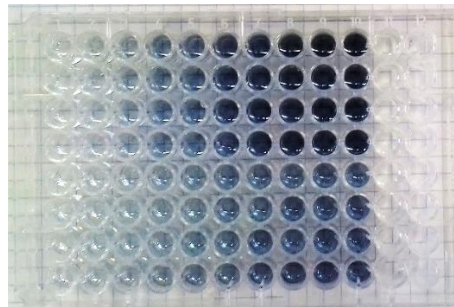
*Figura 22:* Lector de microplacas BioTek, modelo Synergy 2.

Primeramente, se realizaron pruebas presuntivas, adicionando en diferentes pozos de una microplaca 125  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 20  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.1 N, 30  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y 25  $\mu\text{L}$  del extracto crudo o la correspondiente dilución consecutiva. La mezcla permaneció en oscuridad y reposo por 15 min hasta verificar que la coloración fuera azul claro ya que una tonalidad muy intensa representa una concentración elevada de polifenoles que dificulta la

## Metodología

cuantificación y la ausencia de coloración significa un contenido muy bajo de polifenoles que no podrá ser cuantificado.

Una vez hallada la dilución apropiada, a partir de ésta se realizó una nueva serie de diluciones tomando como alícuotas 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000  $\mu\text{L}$  y llevando a volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  con metanol al 80 % en tubos Eppendorf con agitación vigorosa. De la misma forma, como referencia, se elaboró una curva patrón de ácido gálico, preparada a partir de una disolución stock de 0.50 mg/mL, con la que se prepararon diluciones a las siguientes concentraciones: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.10 mg/mL.



*Figura 23:* Microplaca de 96 pozos con prueba de Fenoles Totales para extracto hidroetanólico de pericarpio de semilla de chincuya.

En una misma microplaca de 96 pozos (Figura 21) se hicieron reaccionar, por una parte 25  $\mu\text{L}$  de cada dilución de extracto y por otra 25  $\mu\text{L}$  de las diluciones correspondientes a la curva de calibración de ácido gálico con 125  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 30  $\mu\text{L}$  de disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % y 20  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu por 30 min en oscuridad hasta medir la absorbancia en el equipo a 760 nm, utilizando como blanco 125  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 %. Ambos grupos se analizaron por cuadruplicado y la inyección tanto de agua destilada como de reactivo de Folin-Ciocalteu se realizó por medio de los inyectores del equipo. El contenido de polifenoles totales fue calculado mediante un modelo de regresión lineal y los valores se reportaron como miligramos de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto (mg de EAG / g de extracto).

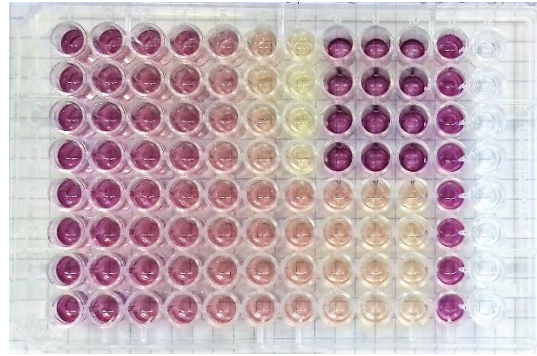
#### **4.7 Determinación de actividad antioxidante.**

La evaluación de actividad antioxidante para cada extracto obtenido se realizó mediante el ensayo de DPPH (Brand-Williams, 1995. Sharma, 2009) con algunas modificaciones. Para ello, se preparó una disolución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) 0.499 mM pesando 0.0197 g y disolviendo en 1 mL de acetona y metanol al 80 % hasta un volumen final de 100 mL.

Una vez más, se realizaron pruebas presuntivas en diferentes pozos de una microplaca, adicionando 200  $\mu$ L del extracto crudo o la correspondiente dilución consecutiva y 50  $\mu$ L de disolución de DPPH 0.499mM. La mezcla permaneció en oscuridad y reposo por 15 min hasta verificar que la coloración fuera rosa pálido ya que una coloración púrpura representa escasa actividad antioxidante y una coloración amarilla significa demasiada actividad que requiere realizar más diluciones.

Después de encontrar la dilución de extracto apropiada, a partir de ésta se realizó una nueva serie de diluciones tomando como alícuotas 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000  $\mu$ L y llevando a volumen final de 1000  $\mu$ L con metanol al 80 % en tubos Eppendorf. De igual manera, como referencia, se elaboró una curva patrón de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), preparada a partir de una disolución madre de 0.998 mM, con la que se prepararon diluciones a las siguientes concentraciones: 4.99, 9.99, 14.98, 19.98, 29.96, 39.95 y 49.94  $\mu$ M.

En una misma microplaca de 96 pozos (Figura 22) se hicieron reaccionar, por una parte 200  $\mu$ L de cada dilución de extracto y por otra 200  $\mu$ L de diluciones de Trolox correspondientes a la curva patrón, con 50  $\mu$ L de DPPH 0.499 mM por 30 min en oscuridad hasta medir la absorbancia en el lector de microplacas a 515 nm, empleando como blanco 250  $\mu$ L de metanol al 80 % y como control 200  $\mu$ L de metanol al 80 % y 50  $\mu$ L de DPPH. Ambas series se efectuaron por cuadruplicado y la inyección de reactivo DPPH se realizó con ayuda de los inyectores del equipo.



*Figura 24:* Microplaca de 96 pozos con ensayo de DPPH para extracto metanólico de pericarpio de semilla de chincuya.

Para la determinación numérica de la actividad antioxidante, primero se calculó el porcentaje de radical DPPH degradado de acuerdo con la ecuación:

$$\%DPPH_{Degrado} = \left(1 - \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b}\right) \times 100$$

Donde  $A_m$ ,  $A_b$  y  $A_c$  representan las absorbancias de las concentraciones de la muestra, el blanco y el control, respectivamente, leídas después de 30 minutos de reacción con DPPH y a 515 nm. Posteriormente, el  $IC_{50}$  se calculó por medio de una regresión lineal al graficar el porcentaje de DPPH degradado en función de la concentración de la muestra. Los valores de  $IC_{50}$  se reportaron en  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.8 Evaluación comparativa de la efectividad antioxidante en aceite comercial.**

Después de la comparación del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de ambas fracciones de semilla, se seleccionó el extracto con mayor actividad antioxidante tanto de almendra como de pericarpio de semilla de chincuya para su aplicación a una muestra de aceite comercial de oliva, a una concentración menor a la máxima especificada para BHT en la norma mexicana NMX-F-223-SCFI-2011 de 200 ppm y la posterior comparación de la estabilidad oxidativa contra dicho antioxidante sintético y un control de aceite sin antioxidante.

Una muestra de aceite de oliva extra virgen, de la marca Olí y lote L.13818, se dividió en cuatro lotes de 105 g cada uno. El primer lote se empleó como control al

no adicionar ningún extracto o antioxidante. Por otro lado, el segundo lote se mezcló con BHT, al tercer lote se le adicionó extracto de almendra de semilla y al cuarto lote se le añadió extracto de pericarpio de semilla. En los últimos tres casos se añadieron 15.8 mg de BHT o extracto correspondiente, disueltos en 5 mL de metanol, para alcanzar una concentración de 150 ppm. Una vez preparados los cuatro lotes, se incubaron a 50 °C por 3 horas (Iqbal, 2008; Chong, 2015) en una incubadora marca ECOSHEL, modelo 9165, posteriormente se agitaron constantemente al vacío por 90 minutos para evaporar la mayor cantidad posible de metanol y se reposaron por 24 horas.

Cada lote fue distribuido en cinco viales transparentes con 20 g del aceite correspondiente. Dichos viales se sometieron a 55 °C por 28 días, realizando un monitoreo cada 7 días por medio de los métodos de prueba de índice de acidez, índice de yodo e índice de peróxidos, descritos en las normas mexicanas NMX-F-101-SCFI-2012, NMX-F-152-SCFI-2011 y NMX-F-154-SCFI-2010, respectivamente y las modificaciones de Chong, et al., 2015. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada lote de aceite.

#### **4.8.1 Índice de Acidez**

Se comenzó pesando 1.0 g de muestra de aceite en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, adicionando después 25 mL de etanol al 95 % y cinco gotas de fenolftaleína. La mezcla se calentó a 50 °C para después titularse con solución normalizada de KOH 0.0097 N y agitación vigorosa hasta alcanzar una tonalidad rosa pálido estable por 30 segundos. El mismo método se efectuó por triplicado y con un blanco. El volumen utilizado de solución normalizada de KOH se registró en cada caso para determinar el índice de acidez de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez } \left( \frac{\text{g ácido oleico}}{100 \text{ g de aceite}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N)(0.282 \text{ g/mEq})(100)}{\text{g de aceite}}$$

Donde V1 y V2 corresponden al volumen de solución de KOH utilizada en la muestra y en el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución de KOH y 0.282 es el miliequivalente químico del ácido oleico. Los valores de índice de

acidez se expresan como porcentaje de ácidos grasos libres, tomando como referencia en este caso al ácido oleico, por cien gramos de aceite.

#### **4.8.2 Índice de Yodo**

Se dispusieron 0.1 g de aceite en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, adicionando más tarde 5 mL de diclorometano para disolver la muestra. Se agregaron a la mezcla 5 mL de reactivo de Wijs, se cubrió y se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad con agitación ocasional. Posteriormente, después de retirar de la oscuridad, se adicionaron 4 mL de solución de yoduro de potasio al 15 por ciento y 50 mL de agua destilada previamente hervida y fría. Esta mezcla se tituló en agitación constante con solución estandarizada de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.0967 N hasta presentarse una coloración amarillo pálido, momento en el cual se agregó un mililitro de solución de almidón al uno por ciento como indicador y se continuó la titulación hasta el punto de desaparecer la coloración azul. El mismo procedimiento se realizó por triplicado y con un blanco. El volumen consumido de solución de tiosulfato de sodio se registró para poder estimar el valor de índice de yodo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de Yodo} \left( \frac{g \text{ de } I_2}{100 g \text{ de muestra}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N) \left( 126.9 \frac{g}{mol} \right)}{g \text{ de muestra}} \times 100$$

Donde  $V_1$  y  $V_2$  corresponden al volumen consumido de solución de tiosulfato de sodio para la muestra y el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución estandarizada de tiosulfato de sodio y 126.9 corresponde al peso molecular el yodo. Los valores resultantes se expresan como gramos de yodo absorbido por cien gramos de aceite o muestra.

#### **4.8.3 Índice de Peróxidos**

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 2.0 g de aceite, mismos que se disolvieron en 25 mL de una mezcla de ácido acético y diclorometano (3:2) con agitación y se adicionaron 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se cubrió de la luz y se dejó reposar por 60 segundos; en seguida se

agregaron 30 mL de agua destilada previamente hervida y fría para poder titularla con solución estandarizada de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.0967 N hasta alcanzar una coloración amarillo pálido. Se adicionó 1 mL de almidón al 1 % como indicador y se finalizó la titulación hasta desaparecer la coloración azul. La misma técnica se realizó por triplicado y con un blanco. El volumen consumido de solución de tiosulfato de sodio se registró para calcular el valor de índice de peróxidos por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de Peróxidos} \left( \frac{\text{mEq de peróxidos}}{\text{kg de muestra}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N)(1000)}{\text{g de muestra}}$$

Donde  $V_1$  y  $V_2$  corresponden al volumen consumido de solución de tiosulfato de sodio para la muestra y para el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución estandarizada de tiosulfato de sodio. Los resultados se expresan como miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de muestra o aceite.

#### **4.8.4 Análisis Estadístico**

Para poder comprobar que las diferencias fuesen significativas, tanto en la evaluación de los diferentes extractos de pericarpio y almendra de semillas como en la aplicación de los extractos seleccionados comparados con BHT y un control, se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % y una posterior comparación de medias por medio de la prueba Tukey para todos los casos. Se utilizó el programa de análisis STATISTICA versión 8.0 (StatSoft, 2007).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características físicas de las semillas residuales de chincuya (*Annona purpurea*)



Figura 25: Pericarpio y almendra de semilla de *Annona purpurea*.

Las semillas de chincuya, una vez limpias y secas, presentaron una forma elíptica con un extremo puntiagudo, de superficie fibrosa, coloración marrón oscuro en el pericarpio y marrón claro en la almendra (Figura 25). Las dimensiones y masa promedio, a partir de una muestra de 30 semillas y las almendras correspondientes seleccionadas al azar, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Caracterización de semillas y las almendras correspondientes de *Annona purpurea*.

Característica	Semilla entera	Almendra	
Ancho (cm)	1.35 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.91 ± 0.10 <sup>a</sup>
Largo (cm)	2.55 ± 0.19	1.80 ± 0.18	1.79 ± 0.27 <sup>a</sup>
Grosor (cm)	0.88 ± 0.15	0.74 ± 0.16	0.70 ± 0.08 <sup>a</sup>
Masa (g)	1.08 ± 0.17	0.70 ± 0.07	0.69 ± 0.12 <sup>a</sup>

n=30 ± desviación estándar

<sup>a</sup> Resultados obtenidos por Olvera (2013).

De acuerdo con Salazar (2001), las dimensiones de largo y ancho de las semillas de esta muestra resultan menores que el promedio reportado (2.8 a 3 cm de largo y 1.4 a 1.8 cm de ancho), sin embargo, comparando las dimensiones y masa de la almendra de semilla con los resultados obtenidos por Olvera (2013), ver Tabla 5, el

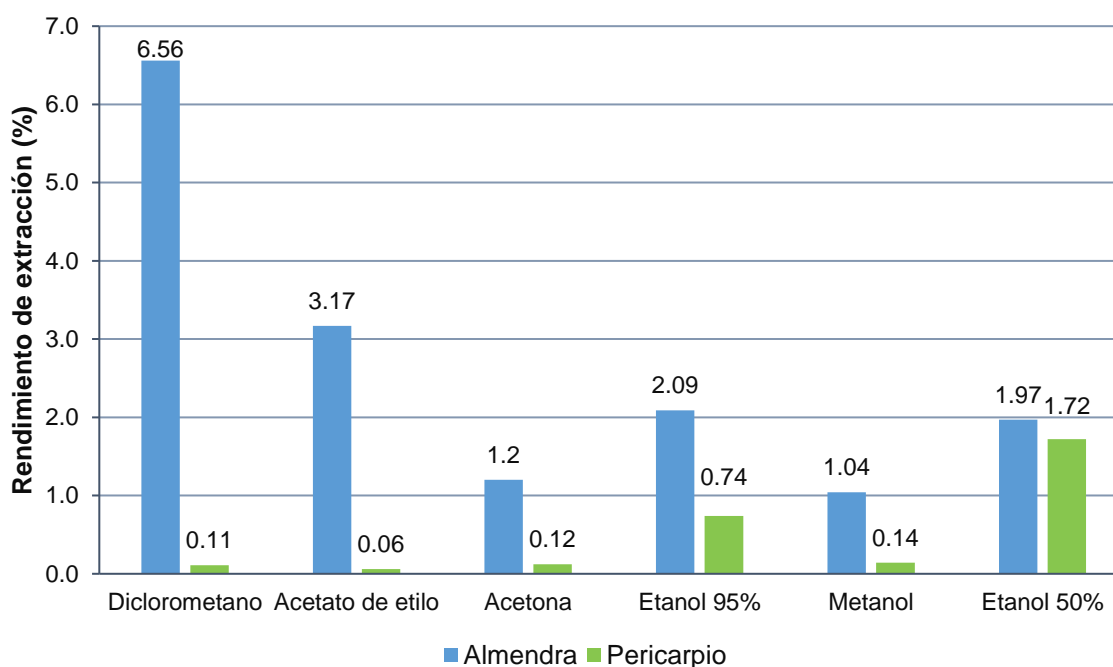


lote utilizado para este proyecto presenta valores mayores; esto indica que existe variabilidad considerable entre las cosechas de esta especie.

En el presente estudio se empleó una masa de 2.6 kg se semilla entera, de la cual el 7.7 % correspondieron piezas dañadas. Una vez realizada la separación física de la almendra y el pericarpio de las semillas, se encontró que el 57.7 % correspondieron a la almendra y el 34.6 % al pericarpio.

Los valores de humedad promedio de cada fracción de la semilla son de  $4.45 \pm 0.05\%$  para la almendra y de  $6.49 \pm 0.94\%$  para el pericarpio. Se observa que el contenido de humedad es bajo en ambas fracciones, siendo mayor en el pericarpio y con mayor variabilidad, debido a la naturaleza fibrosa del pericarpio ya que dificulta un tamaño de partícula homogéneo durante su molienda.

## 5.2 Extracciones de pericarpio y almendra de semilla de chincuya



*Gráfica 1:* Rendimiento de extracción a partir de almendra y pericarpio de semilla de chincuya por maceración con diferentes disolventes.

La Gráfica 1 muestra los rendimientos de extracción obtenidos con cada disolvente utilizado a partir de la almendra y pericarpio de semilla, una vez concentrado cada

## **Resultados y Discusión**

extracto correspondiente. De acuerdo con estos resultados, se observa que los rendimientos de extracción más altos se encuentran siempre a partir de la almendra, principalmente en la obtención de aceite (ver Tabla 6 en el anexo). El disolvente con el cual se extrae mayor cantidad de extracto es diclorometano, con un rendimiento de 6.56 %, afirmando la abundancia de compuestos no polares en la almendra, principalmente aceite y ceras (González, 2019). Por su parte, la mayor extracción a partir de pericarpio se obtiene con etanol-agua al 50 % (15.5 %), indicando una abundancia de compuestos polares. De igual manera, se puede apreciar el gran contraste entre los rendimientos de cantidad de extracto obtenidos a partir de almendra y pericarpio; por otro lado, cabe mencionar que todos los extractos de pericarpio de semilla presentaron coloración ámbar y/o rojiza intensa, mientras que los extractos de almendra presentaron coloración amarilla a ámbar claro con texturas de cera, aceite o melaza.

Se hace notar que el rendimiento del aceite obtenido en la extracción con hexano (15.62 % para la almendra y 0.13 % para el pericarpio) es bajo para ambas fracciones de semilla, si es comparado con el rendimiento de 29.97 % reportado por Olvera (2013); en este caso se puede tomar en consideración que los daños encontrados fueron, en su mayoría, semillas secas que no contenían almendra y cuyo pericarpio se pulverizaba fácilmente. Dicho defecto indica que la semilla es susceptible a un rápido deterioro durante el almacenamiento.

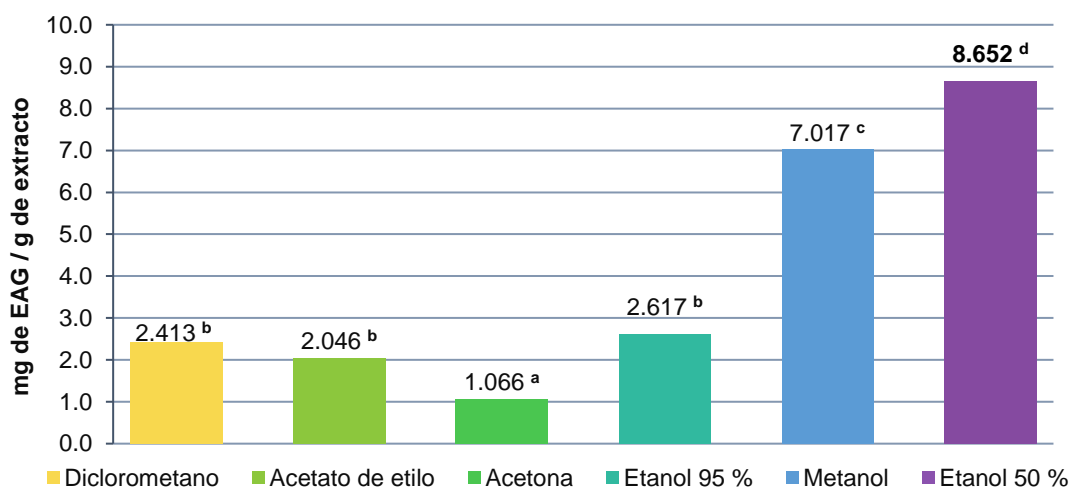
Comparando los resultados de González (2018) sobre las cantidades extraídas a partir de la almendra mediante diclorometano, acetato de etilo y metanol (86 g, 54 g y 46 g, respectivamente), se puede observar que para los dos primeros disolventes los rendimientos de extracción son similares a los obtenidos a partir de la almendra en este experimento (98.42 g y 47.61 g, respectivamente), mientras que en el caso del metanol el rendimiento resulta mucho menor (15.61 g), (ver Tabla 6 en el anexo).

Por otro lado, no se han encontrado datos aún sobre el rendimiento de los extractos de pericarpio para su comparación; sin embargo, se puede decir que el extracto de

mayor rendimiento es el obtenido con etanol-agua al 50 % (1.72 %), lo que sugiere una mayor proporción de compuestos polares en comparación con la almendra.

Tomando en cuenta aquellos compuestos encontrados en la planta de chincuya y la composición química de extractos obtenidos a partir de otras especies de anonas, se puede estimar que los compuestos con capacidad antioxidante presentes en los extractos estudiados se relacionan principalmente con polifenoles del tipo catequinas, ácidos fenólicos y flavonoles. (García-Salas, 2015; Baskaran, 2016; Nam, 2017). Del mismo modo, las acetogeninas y los alcaloides como la liriodenina encontrada en esta especie pueden contribuir a la capacidad antioxidante de los extractos de semilla de chincuya. (Gupta-Elera et al., 2011; Costa, 2013)

### 5.3 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu



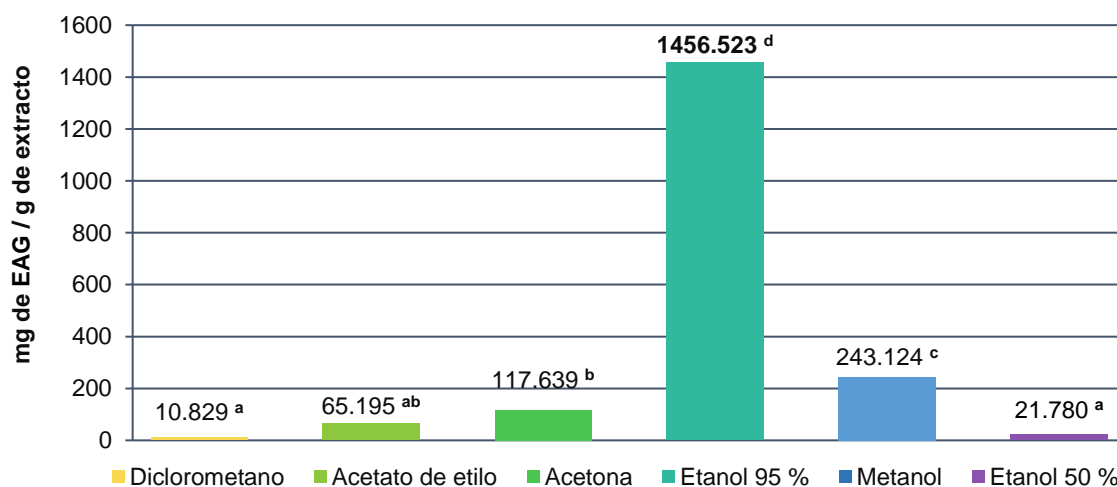
Gráfica 2: Contenido de Fenoles Totales (mg de EAG / g) en extractos de almendra de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.

Análisis estadístico realizado por columna. Los superíndices <sup>a, b, c, d</sup> representan los índices promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>d</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En la Gráfica 2 se comparan los valores obtenidos en la cuantificación de fenoles totales entre los extractos de almendra, mientras que en la Gráfica 3 se comparan los valores de los extractos de pericarpio de semilla de chincuya. Se observa que ambas fracciones de semilla presentaron compuestos fenólicos en cada extracción,

## Resultados y Discusión

sin embargo, se hace evidente la predominancia de la concentración en los extractos de pericarpio de semilla ya que los extractos de pericarpio superan a los extractos de almendra, incluyendo al extracto de almendra con etanol-agua al 50 % que presenta la mayor concentración de compuestos fenólicos en dicha fracción de semilla ( $8.652 \pm 0.386$  mg de EAG / g de extracto).



*Gráfica 3:* Contenido de Fenoles Totales (mg de EAG/ g) en extractos de pericarpio de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.

Análisis estadístico realizado por columna. Los superíndices <sup>a</sup>, <sup>ab</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup> representan los índices promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>d</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En el caso de los extractos de almendra de semilla de chincuya (Gráfica 2) se observa una tendencia de aumento en compuestos fenólicos a medida que se incrementa la polaridad del disolvente, mientras que en los extractos de pericarpio (Gráfica 3), los valores del contenido de fenoles totales se mantienen cercanos hasta el extracto con etanol donde aumenta de manera abrupta y después disminuyen considerablemente.

Debido a la presencia de electrones deslocalizados en los anillos aromáticos de compuestos fitoquímicos, estas moléculas son altamente polarizables y es dicha diferencia de polarizabilidad que hace a moléculas como los polifenoles susceptibles a interacciones con disolventes polares que presentan fuerzas de

interacción dipolo-dipolo, principalmente puentes de hidrógeno, resultando en variaciones en el rendimiento de extracción (Rahman, 2013).

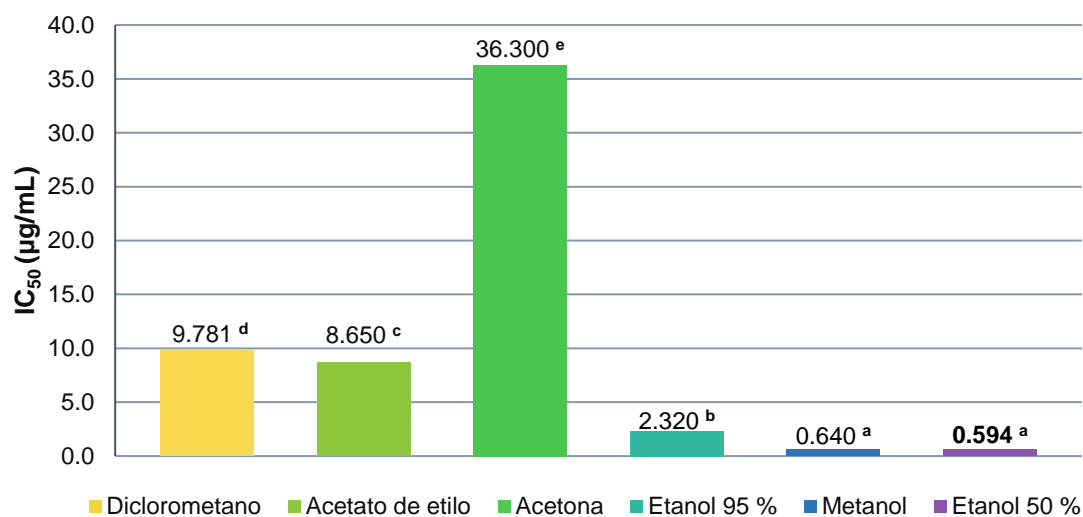
El contenido de fenoles totales de los extractos con etanol de almendra y pericarpio pueden compararse con el valor obtenido en semillas de *Annona crassiflora*, reportados por Roesler (2007), donde el extracto de semillas con etanol presenta un contenido de fenoles totales de 136.98 mg de EAG/g de extracto; dicho valor supera al obtenido en el extracto de almendra de semilla de *A. purpurea* con etanol ( $2.617 \pm 0.212$  mg de EAG / g), aunque resulta mucho menor al valor encontrado en el extracto de pericarpio con etanol ( $1456.523 \pm 111.577$  mg de EAG / g).

En contraste, comparando con el resultado de semillas de *Annona squamosa* reportados por Kothari (2010), donde la extracción fue asistida con microondas, el contenido de fenoles totales del extracto con etanol es de  $171,580 \pm 7,310$  mg de EAG/g de extracto, valor que notablemente supera a ambos extractos de *A. purpurea* con etanol ( $2.617 \pm 0.212$  mg de EAG/g de extracto de almendra y  $1456.523 \pm 111.577$  mg de EAG/g de extracto de pericarpio). Es posible que tales diferencias se deban, principalmente, a que se trata con especies distintas de anonáceas con diferentes métodos de extracción, o bien a que se trabajó con la semilla completa donde la concentración el contenido de fenoles totales corresponde tanto a la almendra como al pericarpio de la semilla de *Annona crassiflora*.

De acuerdo con el análisis estadístico (ver Gráficas 2, 3 y Tabla 8 en el anexo), se observa que, en el caso de la fracción de almendra, la mayor diferencia significativa existe entre los extractos de metanol y etanol-agua al 50 %. Por su parte, dentro de la fracción de pericarpio, las diferencias significativas principales se encuentran entre los extractos de metanol y etanol al 95 %. Tales diferencias significativas permiten seleccionar al extracto de almendra obtenido con etanol-agua al 50 % y al extracto de pericarpio obtenido con etanol al 95 % como candidatos para el análisis de efectividad antioxidante al presentar los mayores valores de contenido de fenoles

totales en cada fracción de semilla ( $8.652 \pm 0.386$  y  $1456.523 \pm 111.577$  mg de EAG/g de extracto, respectivamente).

#### 5.4 Evaluación de actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH



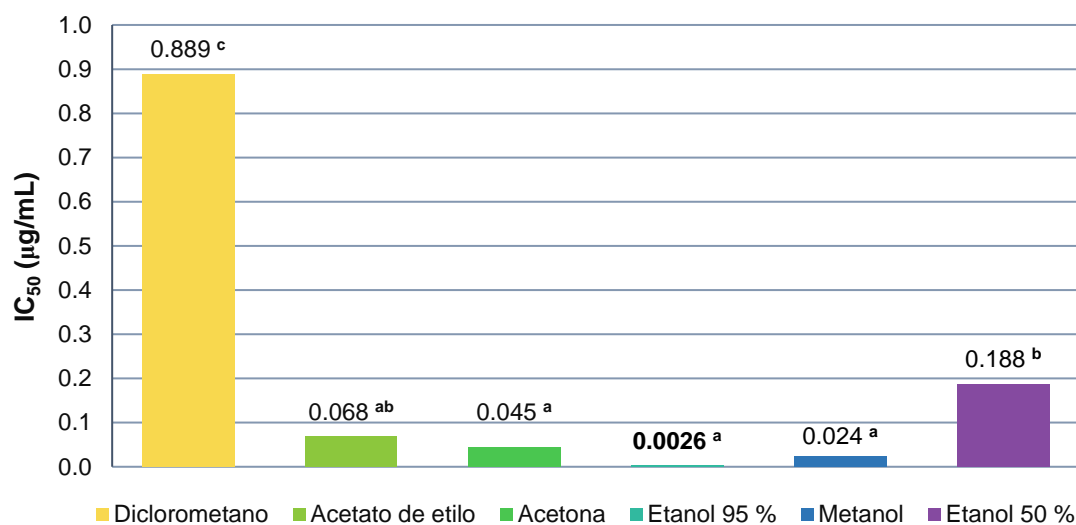
*Gráfica 4:* Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> en µg/mL) de extractos de almendra de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.

Análisis estadístico realizado por columna. Los superíndices <sup>a, b, c, d, e</sup> representan los índices promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>e</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

En las Gráficas 4 y 5 se resumen los valores de IC<sub>50</sub>, expresados en µg/mL, correspondientes a los extractos de cada fracción de semilla. Tomando en cuenta que el IC<sub>50</sub> representa la concentración de muestra a la cual se degrada el 50 % del radical DPPH y, por tanto, un valor más pequeño representa mayor actividad, se puede observar que los extractos con mayor actividad antioxidante son los extractos de almendra con etanol-agua al 50% ( $0.594 \pm 0.012$  µg/mL) y de pericarpio con etanol al 95 % ( $0.0026 \pm 0.0008$  µg/mL). Se hace notar que los extractos de almendra con metanol y etanol-agua muestran mejor resultado que el extracto de pericarpio con diclorometano, a diferencia de los valores en el contenido de fenoles totales donde el extracto de pericarpio con diclorometano presenta mayor contenido

## Resultados y Discusión

de compuestos fenólicos (10.829 mg de EAG / g de extracto) que los extractos de almendra con metanol y etanol-agua (7.017 y 8.652 mg de EAG / g de extracto, respectivamente), sugiriendo así que los compuestos antioxidantes más polares contenidos en los extractos de semilla de chincuya presentan mayor actividad que aquellos con menor polaridad, ya sea por presentar mayor número de grupos hidroxilo o porque se hayan detectado en extractos menos polares compuestos con grupos hidroxilo que no presentan actividad antioxidante.



Gráfica 5: Actividad antioxidante (IC<sub>50</sub> en µg/mL) de extractos de pericarpio de semilla obtenidos por maceración con seis diferentes disolventes.

Análisis estadístico realizado por columna. Los superíndices <sup>a, ab, b, c</sup> representan los índices promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>c</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Se observa una relación directamente proporcional entre los valores de actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales (Gráficas 2 y 3) para ambas fracciones de semilla, ya que el orden decreciente de actividad antioxidante de los extractos de almendra es: Etanol-Agua al 50 % > Metanol > Etanol al 95 % > Acetato de etilo > Diclorometano > Acetona, el cual coincide con el orden decreciente en contenido de fenoles totales para los extractos de almendra. Así mismo, el orden decreciente de actividad antioxidante para los extractos de pericarpio es: Etanol al 95 % >

## **Resultados y Discusión**

Metanol > Etanol-Agua al 50 % > Acetona > Acetato de etilo > Diclorometano, coincide con el orden decreciente en contenido de fenoles totales para los extractos de pericarpio. Por lo anterior, se puede decir que la mayor parte de la actividad antioxidante de los diferentes extractos está dada por los compuestos fenólicos contenidos en ellos.

Estadísticamente (ver Gráficas 4, 5 y Tabla 9 en el anexo), dentro de la fracción de almendra, existe diferencia significativa entre la mayoría de los extractos con excepción de aquellos obtenidos con metanol y etanol-agua; por otro lado, en la fracción de pericarpio, las mayores diferencias significativas se encuentran entre los extractos obtenidos con etanol-agua y diclorometano. Si bien, los extractos con los menores valores de IC<sub>50</sub> o con mayor actividad antioxidante de cada fracción de semilla no son significativamente diferentes de cada uno de los extractos restantes, su correlación con los valores mayores en contenido de fenoles totales favorece su selección para evaluarse como antioxidante alimentario.

Los valores de IC<sub>50</sub> de los extractos de ambas fracciones con etanol pueden ser comparados con los valores obtenidos en extractos con etanol de semillas de otras especies de anonáceas, donde el extracto de *A. crassiflora* presenta un IC<sub>50</sub> de 31.14 µg/mL (Roesler, 2007); el extracto de *A. cornifolia* registra un valor IC<sub>50</sub> de 33.9 ± 6.26 µg/mL (Santos, 2010) y el extracto de *A. cherimola*, variedad Madeira, muestra un valor de 3190 ± 80 µg/mL (Albuquerque, 2014). Se hace notar que de los valores anteriores ninguno es menor a los 2.320 ± 0.155 µg/mL obtenidos en el extracto de *A. purpurea*, lo que indica que los extractos de esta especie presentan mayor actividad antioxidante que las anonáceas antes mencionadas.

Se puede decir que la extracción con disolventes polares, como etanol, metanol y etanol-agua, produce mejores resultados en el contenido de compuestos fenólicos y en su actividad antioxidante que con disolventes poco polares aun cuando, en el caso de la almendra, presenten mayores rendimientos de extracción. Para poder conocer las especies de polifenoles presentes en cada extracto es necesario implementar una purificación donde se remuevan moléculas tales como: proteínas,



carbohidratos y otros compuestos no fenólicos, para después emplear métodos de identificación como cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

### **5.5 Estabilidad oxidativa del aceite de oliva con extractos de almendra y pericarpio de semilla de chincuya como aditivo antioxidante.**

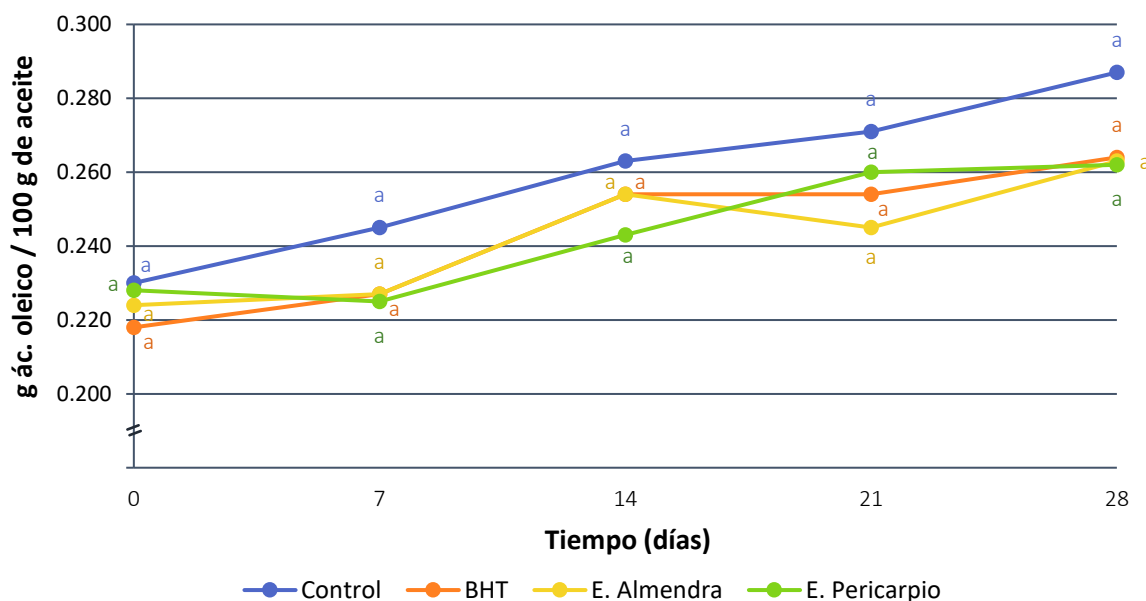
Se seleccionaron los extractos con mayor actividad antioxidante y mayor contenido de fenoles totales, correspondientes al extracto de almendra de semilla con etanol-agua al 50 % y al extracto de pericarpio de semilla con etanol al 95 %. Dichos extractos fueron aplicados a una muestra de aceite de oliva extra virgen, el cual se caracteriza por su abundancia en ácido oleico. (O'Brien, 2009).

Durante la evaluación de la estabilidad oxidativa del aceite se utilizó el método de la estufa de Schaal, de acuerdo con las recomendaciones del método AOCS Cg 5-97 y adaptando la temperatura a 55 °C. Este método permite medir la evolución de la oxidación de un aceite en menor tiempo del que se requiere en una prueba a condiciones reales; así también, considera que un día de almacenamiento a 65 °C es equivalente a un mes de almacenamiento a temperatura ambiente. (Khan & Shahidi, 2001; Yim, et al., 2013). Los cambios en la oxidación fueron monitoreados mediante las pruebas de índice de acidez, índice de yodo e índice de peróxidos.

#### **5.5.1 Índice de Acidez**

La liberación de los ácidos grasos resulta de la reacción entre el agua y los triacilglicerol, conocida como lipólisis, causada por enzimas o condiciones extremas de pH y calentamiento. (Chen, 2011). Los grupos carboxilo de los ácidos grasos no son fácilmente solubles en los aceites y provocan que las moléculas se sitúen en la superficie del aceite donde disminuyen la tensión superficial y actúan como prooxidantes al incrementar la difusión del oxígeno atmosférico dentro del aceite, acelerando su oxidación. Por tal motivo, la concentración de ácidos grasos libres puede utilizarse para indicar el grado de deterioro de un aceite debido a la hidrólisis de triacilglicerol (Choe, 2006, Abdulkarim, 2007).

En concordancia con la norma mexicana NMX- F-109-SCFI-2014, los aceites de oliva extra vírgenes no deben presentar acidez libre, expresada como ácido oleico, mayor a 0.8 g por 100 g de aceite.



*Gráfica 6:* Índice de acidez a través del tiempo en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). El superíndice <sup>a</sup> representa el índice promedio que al repetirse significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

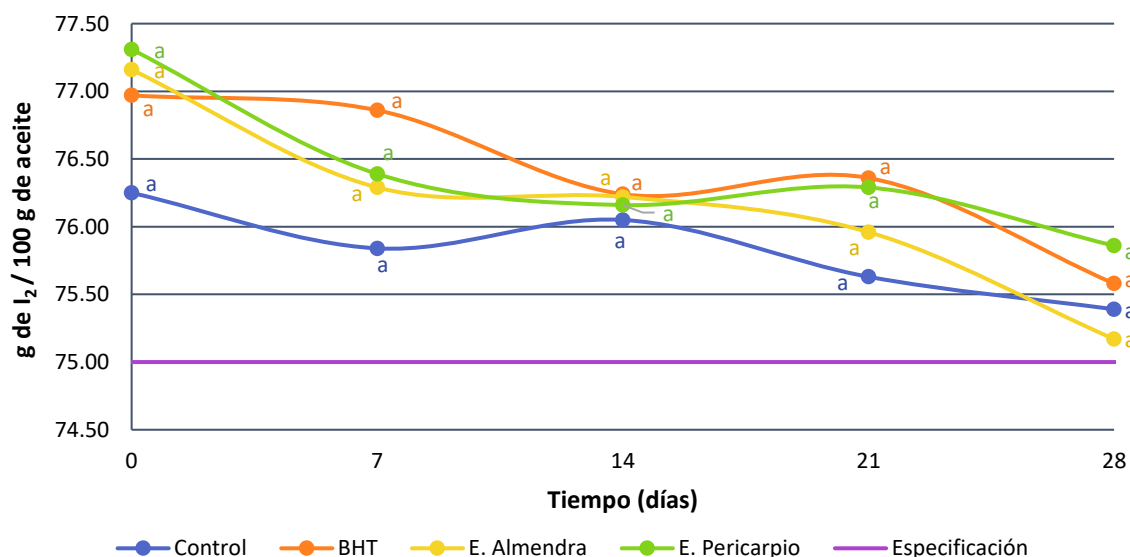
La Gráfica 6 exhibe el comportamiento de cada tratamiento de aceite de oliva durante los monitoreos de índice de acidez por 28 días. Primeramente, se observa un aumento de acidez en el aceite a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Desde el inicio hasta el final, la muestra control presentó siempre el mayor valor de acidez. Por su parte, las muestras con antioxidante sintético y con extractos añadidos muestran comportamientos muy similares, principalmente entre el aceite con BHT y aquél adicionado con extracto de almendra de semilla, mientras que el aceite adicionado con extracto etanólico de pericarpio de semilla presenta una tendencia de menor aumento de acidez que las demás muestras.

El análisis estadístico en la Gráfica 6 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, indicando que no hay un efecto sobre la acidez del aceite de oliva al adicionarlo con BHT o con algún extracto de semilla de chincuya (ver Tabla 9 en el anexo). Adicionalmente, en ningún momento del análisis se supera el valor máximo permitido de 0.8 % de ácidos grasos libres especificado por la norma mexicana.

### 5.5.2 Índice de Yodo

Los cambios oxidativos en los aceites se caracterizan, además del incremento en su contenido de ácidos grasos libres, por la disminución de su insaturación. (Zahir, 2014). De esta manera, el descenso en los valores de índice de yodo es indicativo del aumento en la velocidad de oxidación que involucra a los enlaces dobles. (Herchi, 2016).

De acuerdo con la norma mexicana NMX-F-109-SCFI-2014, un aceite de oliva extra virgen debe mostrar un valor de índice de yodo de entre 75 y 94 g I<sub>2</sub>/100 g de aceite.



Gráfica 7: Índice de yodo a través del tiempo en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). El superíndice <sup>a</sup> representa el índice promedio que al repetirse significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La Gráfica 7 presenta los comportamientos de las muestras de aceite de oliva adicionado con antioxidantes en la estabilidad de las insaturaciones de los ácidos grasos en un periodo de 28 días. Se observa principalmente una disminución en los valores de índice de yodo durante el periodo de almacenamiento en todas las muestras.

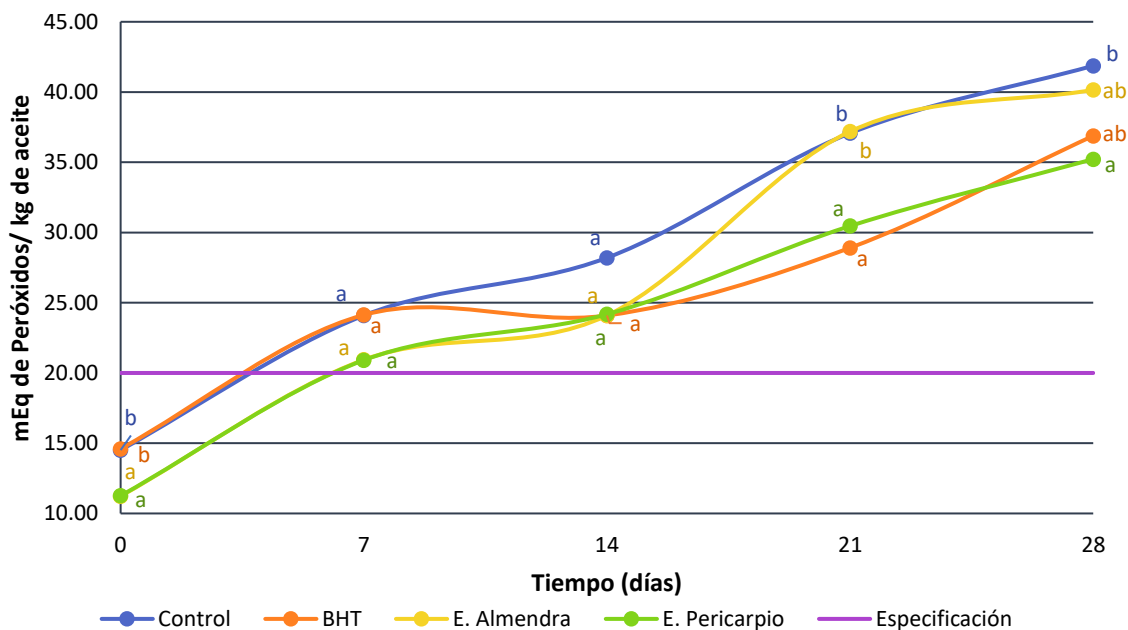
La muestra control presenta el menor contenido de insaturaciones hasta el día 28, día en el cual el aceite adicionado con extracto de almendra de semilla presenta el menor valor de todos los tratamientos ( $75.17 \pm 0.77$  g de  $I_2/100$  g) y el que inicialmente demostraba un comportamiento similar a la muestra adicionada con extracto de pericarpio. Dentro de los días 7 a 21, el BHT confiere mayor estabilidad a los dobles enlaces del aceite, aunque al final es superado por el aceite con extracto de pericarpio de semilla.

Una vez más, el análisis estadístico (ver también Tabla 10 en el anexo) advierte que, al no existir diferencia significativa entre los tratamientos, la adición de antioxidantes al aceite de oliva no ejerce un efecto considerable en la estabilidad de los enlaces dobles de los triacilgliceroles presentes en dicho aceite. De igual manera, la especificación de la norma mexicana sobre el índice de yodo (75 a 94 g de  $I_2 / 100$  g de muestra) se cumple en cada uno de los monitoreos.

### **5.5.3 Índice de Peróxidos**

Los principales productos de la primera etapa de la autoxidación de aceites son los peróxidos e hidroperóxidos, los cuales proceden de la reacción en cadena de los radicales libres que atacan a las ligaduras dobles de lípidos a temperatura ambiente. Estos mismos productos llevan a la formación de compuestos volátiles que afectan la calidad del aceite. El calentamiento es un factor que promueve tanto la formación como la degradación de los peróxidos. El índice de peróxidos resulta de gran utilidad para evaluar el grado de deterioro al que ha llegado un aceite. (Kaleem, 2015; Gharby, 2016).

La norma mexicana NMX-F-109-SCFI-2014 establece que un aceite de oliva virgen debe presentar valor igual o menor a 20 miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite.



**Gráfica 8:** Índice de peróxidos a través del tiempo en diferentes tratamientos de aceite de oliva extra virgen a 55 °C por 28 días, utilizando un control de aceite y una concentración de 150 ppm en muestras con BHT y extractos de semilla de chincuya.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). Los superíndices <sup>a, ab, b</sup> representan los índices promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>b</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La Gráfica 8 muestra la evolución de la oxidación del aceite adicionado con antioxidantes mediante el índice de peróxidos monitoreado por 28 días. Aquí se aprecia un aumento general en el contenido de peróxidos en las muestras de aceite a lo largo del almacenamiento. Inicialmente, entre los días cero y siete, el comportamiento de las muestras se divide en dos grupos: la muestra control y aquella adicionada con BHT contra las muestras con extractos de semilla de chincuya añadidos, hasta el día 14 donde la muestra control presenta un mayor aumento de peróxidos. El comportamiento anterior se invierte después del día 14 al

## ***Resultados y Discusión***

agruparse el aceite control y aceite con extracto de almendra de semilla contra el aceite con BHT y el aceite con extracto de pericarpio de semilla; pudiendo indicar esto que los polifenoles contenidos en el pericarpio de la semilla son más estables sobre el tiempo a temperatura de 55 °C que los polifenoles en la almendra de semilla o que la cantidad de polifenoles en el extracto de almendra es insuficiente para continuar retrasando la oxidación.

Debido al calentamiento de la muestra de aceite comercial previo a los monitoreos, empleado de acuerdo con Iqbal (2008) y Chong (2015), la especificación en la norma mexicana sobre el valores máximo permitidos de 20 mEq de oxígeno activo o peróxidos por kg de aceite no se cumple desde antes del séptimo día de monitoreo, por lo que la evaluación de la eficiencia antioxidante se basa principalmente en la diferencia significativa encontrada entre los valores promedio en cada tratamiento de aceite para cada día de monitoreo.

El análisis estadístico mostrado en la Gráfica 8 (ver también Tabla 11 en el anexo) confirma las diferencias significativas entre los tratamientos, principalmente en los días 0 y 21. Al inicio la diferencia significativa entre los grupos de muestra control y aceite con BHT contra las muestras con extractos de semilla sugiere que hay un efecto regulador de formación de peróxidos en estas últimas aun cuando la oxidación del aceite haya iniciado antes de la adición de los antioxidantes. Por otro lado, al día 21 sucede la misma diferencia significativa pero esta vez señalando que el efecto protector es dado por el BHT en lugar del extracto de almendra de semilla. Al final, en el día 28 solamente pueden considerarse significativamente diferentes la muestra control y el aceite con extracto de pericarpio. Cabe mencionar que es en tres ocasiones que el aceite con extracto de pericarpio de semilla obtenido con etanol presenta diferencia significativa, indicando que la adición de este extracto aporta un efecto protector contra la formación de peróxidos asociado a la presencia de compuestos fenólicos en dicho extracto.

## 6. CONCLUSIONES

- ◆ Los disolventes con los cuales se obtiene mayor rendimiento de extracción mediante maceración son diclorometano para la almendra de semilla y etanol-agua al 50 % acidificado al 0.1 % para el pericarpio de semilla de chincuya.
- ◆ La mayor extracción de compuestos fenólicos y la mayor capacidad antioxidante se obtienen con disolventes polares, principalmente mediante etanol-agua al 50% acidificado al 0.1 % en el caso de la almendra de semilla ( $8.652 \pm 0.386$  mg de EAG /g y  $0.594 \pm 0.012$   $\mu\text{g/mL}$ ) y etanol al 95 % para el pericarpio de semilla ( $1456.523 \pm 111.577$  mg de EAG/g y  $0.0026 \pm 0.0008$   $\mu\text{g/mL}$ ).
- ◆ La mayor concentración de polifenoles y la mayor actividad antioxidante de la semilla de *Annona purpurea* se encuentran en el pericarpio.
- ◆ La adición de extracto de almendra de semilla con etanol-agua al 50 % acidificado al 0.1 % no ejerce un efecto en la disminución de la oxidación del aceite de oliva bajo las condiciones empleadas en el experimento.
- ◆ El extracto de pericarpio de semilla con etanol al 95 % retarda significativamente la formación de peróxidos en aceite de oliva, lo cual indica que dicho extracto retrasa la oxidación de lípidos, posibilitando su uso como aditivo antioxidante natural en alimentos.

**7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abarca-Vargas, R., Pena Malacara, C. F., & Petricevich, V. L. (2016). Characterization of Chemical Compounds with Antioxidant and Cytotoxic Activities in *Bougainvillea x buttiana* Holttum and Standl, (var. Rose) extracts. *Antioxidants*, 5(4), 45.

Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, S. K. S., & Ghazali, H. M. (2007). Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*, 105(4), 1382-1389.

Adekunle, K. F. (2015). A review of Vegetable Oil-Based Polymers: Synthesis and Applications. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 5, 34-40.

Admassu, S. (2019). Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences Open Journal*, 5(2), 38-49.

Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valero, J. R. (2010). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227-249.

Albuquerque, T. G., Santos, F., Sanches-Silva, A., Oliveira, M. B., Bento, A. C., & Costa, H. S. (2014). Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits. *Food Chemistry*, 193, 187-195.

Aluyor, E. O., & Ori-Jesu, M. (2008). The use of antioxidants in vegetable oils - A review. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4836-4842.

AOCS Recommended Practice Cg 5–97. (1997). Oven storage test for accelerated aging of oils. Sampling and analysis of commercial fats and oils. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. 5<sup>a</sup> ed. AOCS Press, Champaign, IL. pp. 1-2.

Atta, Emad & H Mohamed, Nawal & Abdelgawad, Ahmed. (2017). Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types. *European Chemical Bulletin*. 6(8). 365-375.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(196), 2167-0412.



## **Bibliografía**

- Bancuta, O., Chilian, A., Bancuta, I., ION, R., Setnescu, R., Setnescu, T., & Gheboianu, A. (2016). Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*, 61(7-8), 1255-1264.
- Barakat, N., Makris, D. P., Kefalas, P., & Psillakis, E. (2009). Removal of olive mill waste water phenolics using a crude peroxidase extract from onion by-products. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 271-275.
- Barreca, D., Lagana, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Galtieri, A., & Bellocco, E. (2011). Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). *Food Research International*, 44(7), 2302-2310.
- Baskar, R., Rajeswari, V., & Kumar, T. S. (2007). *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experiment Biology*, 45, 480-485.
- Baskaran, R., Pullencheri, D., & Somasundaram, R. (2016). Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 82, 121-127.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. (4<sup>a</sup> ed.) Leipzig. Springer.
- Benites, R. S. R., Formagio, A. S. N., Argandoña, E. J. S., Volobuff, C. R. F., Trevizan, L. N. F., Vieira, M. C., & Silva, M. S. (2015). Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 685-691.
- Biba, V. S., Amily, A., Sangeetha, S., & Remani, P. (2014). Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 1595-1604.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.

Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.

CCA (2017), Caracterización y gestión de los residuos orgánicos en América del Norte, informe sintético, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 52 pp.

Chang, F. R., Chen, C. Y., Wu, P. H., Kuo, R. Y., Chang, Y. C., & Wu, Y. C. (2000). New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, 63(6), 746-748.

Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 901-916.

Chízar, C., Correa, A. M., Chang, V. G., Lobo, C. S., Quesada, H. A., Cerén, L. J. G., & Mejía, M. T. (2009). Plantas comestibles de Centroamérica. *Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. Santo Domingo de Heredia. Costa Rica*. Pp.: 35-37.

Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186.

Chong, Y. M., Chang, S. K., Sia, W. C. M., & Yim, H. S. (2015). Antioxidant efficacy of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. *Food Bioscience*, 12, 18-25.

Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC.(Annonaceae). *Natural Product Research*, 27(11), 1002-1006.

Cushnie, T. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377-386.

De Castro, M. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.

Deva, A. N., Arun, C., Arthanareeswaran, G., & Sivashanmugam, P. (2014). Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1148-1154.

## **Bibliografía**

Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and prospects. *Japi*, 52(794804), 4.

Dimarco, S. (2013). Trabajo, desarrollo y clasificación de residuos: transformaciones en el último medio siglo. *Estudios Sociológicos*, XXXI (91), 203-228.

Egydio-Brandão, A. P. M., Novaes, P., & Santos, D. Y. A. C. (2017). Alkaloids from *Annona*: Review from 2005 to 2016. *JSM Biochemistry & Molecular Biology*, 4(3), 1031.

Enger, E. D. & Smith, B. F., (2010). *Environmental science: A study of interrelationships*. 12<sup>a</sup> ed. Boston: McGraw-Hill.

García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A. M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Research International*, 78, 246-257.

Gharby, S., Harhar, H., Matthäus, B., Bouzoubaa, Z., & Charrouf, Z. (2016). The chemical parameters and oxidative resistance to heat treatment of refined and extra virgin Moroccan Picholine olive oil. *Journal of Taibah University for Science*, 10(1), 100-106.

Gil-Chávez, G. J., Heredia, J. B. & González-Aguilar, G. A. (2012). Cap. 20. Fluidos Supercríticos: Una alternativa para la extracción y aplicación de antioxidantes en la industria de alimentos. En G. Álvarez-Parrilla, E., Laura, A., González-Aguilar, G. A., & Zavala, J. F. A. (Eds.). *Antioxidantes en Alimentos y Salud*. (pp. 559-584). Clave Editorial. México, D.F.

González-Esquinca, A. R. (2005). La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y Tecnología en la Frontera*, 3, 41-52.

González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley-Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, 1-16.

González-Tepale, M. R., Reyes, L., Mayorga-Flores, M., Reyes-Trejo, B., Gómez-Zepeda, D., del Rio-Portilla, F., ... & Herbert-Pucheta, J. E. (2018). Cyclopurpuracin, a cyclopeptide from *Annona purpurea* seeds. *Phytochemistry Letters*, 23, 164-167.

González, T. Ma. R. (2019). Aislamiento y caracterización estructural de ciclopéptidos obtenidos del bagazo de las semillas de *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Gupta-Elera, G., Garrett, A. R., Martinez, A., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2011). The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Research International*, 44(7), 2205-2209.

Hammouda, F. M., El-Nasr, M. S., & Shahat, A. A. (1993). Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. *Plant Foods for Human Nutrition*, 44(2), 163-169.

Hasenhuettl, G. L., & Hartel, R. W. (Eds.). (2008). *Food emulsifiers and their applications* (Vol. 19). New York: Springer.

Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44-50.

Herchi, W., AMMAR, K. B., Bouali, I., Abdallah, I. B., Guetet, A., & Boukhchina, S. (2016). Heating effects on physicochemical characteristics and antioxidant activity of flaxseed hull oil (*Linum usitatissimum* L). *Food Science and Technology*, 36(1), 97-102.

Hernández-Fuentes, G. A., García-Argáez, A. N., Peraza Campos, A. L., Delgado-Enciso, I., Muñoz-Valencia, R., Martínez-Martínez, F. J., ... & Parra-Delgado, H. (2019). Cytotoxic Acetogenins from the Roots of *Annona purpurea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1870.

Hoornweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). *What a waste: a global review of solid waste management* Vol. 15. Washington, DC. World Bank.

Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., & Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41(2), 194-200.

Jagtap, U. B., & Bapat, V. A. (2012). Antioxidant activities of various solvent extracts of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit pulp. *Nutrafoods*, 11(4), 137-144.

Johnson, D. R., & Decker, E. A. (2015). The role of oxygen in lipid oxidation reactions: a review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 171-190.

## **Bibliografía**

- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Kaleem, A., Aziz, S., & Iqtedar, M. (2015). Investigating changes and effect of peroxide values in cooking oils subject to light and heat. *FUUAST Journal of Biology*, 5(2), 191-196.
- Kancheva, V. D., & T Kasaikina, O. (2013). Bio-antioxidants—a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4784-4805.
- Khan, M. A., & Shahidi, F. (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry*, 75(4), 431-437.
- Kothari, V., & Seshadri, S. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutrition & Food Science*, 40(4), 403-408.
- Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 18.
- LGPGIR. (8 de octubre de 2003). Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Diario Oficial de la Federación, 6.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Luna-Cazáres, L. M., & González-Esquinca, A. R. (2015). La Chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal): Una Planta Mesoamericana. *Anonáceas.*, 229.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nam, J. S., Park, S. Y., Jang, H. L., & Rhee, Y. H. (2017). Phenolic compounds in different parts of young *Annona muricata* cultivated in Korea and their antioxidant activity. *Applied Biological Chemistry*, 60(5), 535-543.

## **Bibliografía**

Nawar, W. W. (2000). Cap 5. Lípidos. En Fennema, O. (Ed.). *Química de los alimentos*. (pp. 269-381). 2ª Ed. Zaragoza. Editorial Acribia SA.

Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food Analysis Laboratory Manual*. 2ª Ed. New York: Springer.

NMX-F-101-SCFI-2012. Alimentos – Aceites y grasas vegetales o animales – Determinación de ácidos grasos libres – Método de prueba.

NMX-F-152-SCFI-2011. Alimentos – Aceites y grasas vegetales o animales – Determinación del índice de yodo por el método ciclohexano – Método de prueba

NMX-F-154-SCFI-2010. Alimentos – Aceites y grasas vegetales o animales – Determinación del valor de peróxido – Método de prueba

NMX-F-223-SCFI-2011. Alimentos – Aceite vegetal comestible – Especificaciones.

O'brien, R. D. (2008). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. (3ª Ed.). Boca Raton. CRC press.

OECD (2015), Environment at a Glance 2015: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264235199-en>

Olvera, G. A. L. (2013). Obtención de biodiesel a partir de aceite de la semilla de *Annona purpurea*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 51-54

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

Oviedo-Ocaña, R., Marmolejo-Rebellon, L., & Torres-Lozada, P. (2012). Perspectivas de aplicación del compostaje de biorresiduos provenientes de residuos sólidos municipales. Un enfoque desde lo global a lo local. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 11(20), 67-76.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

Pereira, X. N., Silva, F. S., Almeida, J. R. G. D. S., de Lima, J. T., de Araújo Ribeiro, L. A., Júnior, L. J. Q., & Barbosa Filho, J. M. (2012). Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. In *Phytochemicals as Nutraceuticals-Global Approaches to their Role in Nutrition and Health*. IntechOpen.

- Pokorný, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 223-227.
- Pokorny, J. (2007). Cap 11. Antioxidants in food preservation. En Rahman, M. S. (Ed.) *Handbook of Food Preservation*. (pp. 259-286). 2ª Ed. Boca Raton. CRC Press.
- Porras, Á. C. (2016). Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica. *Revista Academia y Virtualidad*, 9(2), 6.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Rahman, M., Hossain, S., Rahaman, A., Fatima, N., Nahar, T., Uddin, B., & Basunia, M. A. (2013). Antioxidant activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban: Impact of extraction solvent polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6).
- Rajalakshmi, D., & Narasimhan, S. (1996). Cap. 3. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. En Mahdavi, D. L., Deshpande, S. S. & Salunkhe, D. K. (Eds.). *Food Antioxidants* (pp. 79-172). Nueva York. CRC Press.
- Rejón-Orantes, J.C., González-Esquinca, A. R., de la Mora, M. P., Roldan, G. R., & Cortes, D. (2011). Annonomontine, an alkaloid isolated from *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. *Planta Médica*, 77(04), 322-327.
- Rodrigo-Illarri, J., Rodrigo-Clavero, M. E., & Fernández-González, J. M. (2014). Alternativas de valorización y eliminación de residuos sólidos urbanos. *Industiambiente*, 70-76
- Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104(3), 1048-1054.
- Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2017). Cap. 16. Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. En Domínguez, G. H. & González, M. M. J. (Eds.). *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 399-419). Amsterdam. Elsevier.
- Ros, M., Pascual, J. A., Ayuso, M., Morales, A. B., Miralles, J. R., & Solera, C. (2012). Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas: proyecto Life+ Agrowaste. *Residuos*, 130, 2-9.

## **Bibliografía**

Sabater, C., Sabater, V., Olano, A., Montilla, A., & Corzo, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation. *Food Hydrocolloids*, 98, 105238.

Salazar, R., & Soihet, C. (2001). Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. CATIE. 91 y 92.

Santos, L. A. R., Pimenta, L. P. S., & Amelia, M. (2010). Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 122, 1129–1138.

Sayago, A., Marín, M. I., Aparicio López, R., & Morales, M. T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58 (1), 74-86.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Informe de la situación del medio ambiente en México. *Compendio de Estadísticas Ambientales*. Disponible en:

[https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/pdf/Cap7\\_Residuos.pdf](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/pdf/Cap7_Residuos.pdf)

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.

Shetty, A. A., Magadum, S., & Managanvi, K. (2013). Vegetables as sources of antioxidants. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 2(1), 2.

Sonnet, P. E., & Jacobson, M. (1971). Tumor inhibitors II: cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8), 1254-1256.

Steinvorth, A. S. (2014). Residuos de alimentos: ¿problema u oportunidad. CEGESTI. Disponible en: [http://municipal.cegesti.org/articulos/articulo\\_02\\_191114.pdf](http://municipal.cegesti.org/articulos/articulo_02_191114.pdf)

Thorat, I. D., Jagtap, D. D., Mohapatra, D., Joshi, D. C., Sutar, R. F., & Kapdi, S. S. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*, 2(1), 81-104.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2019). *Annona purpurea*. 14 May 2019. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/1600805>



Vidal-Lezama, E. (2019). *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal especie nativa de México, subutilizada. *AgroProductividad*, 12(3).

Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.

Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6, 1-8.

Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., & Wozniak, L. A. (2010). A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3262-3288.

Womeni, H. M., Tonfack Djikeng, F., Iruku, N. S. S. P., Karuna, M. S. L., Prasad, R. B. N., & Linder, M. (2016). Valorization of soursop flowers (*Annona muricata* L.) as potent source of natural antioxidants for stabilization of palm olein during accelerated storage. *Food Science & Nutrition*, 4(6), 802-810.

Yanishlieva, M. (2001) Cap. 3. Inhibiting oxidation. En Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. H. (Eds.). *Antioxidants in food: practical applications* (pp. 22-70). Boca Raton. CRC Press.

Yim, H. S., Chye, F. Y., Liow, M. L., & Ho, C. W. (2013). Antioxidant potential of *Pleurotus porrigens* Extract and application in sunflower oil during accelerated storage. *Chiang Mai Journal of Science*, 40(1), 34-48.

Zahir, E., Saeed, R., Hameed, M. A., & Yousuf, A. (2014). Study of physicochemical properties of edible oil and evaluation of frying oil quality by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3870-S3876.

## 8. ANEXO

Tabla 7: Rendimientos de las extracciones por maceración secuencial.

Fracción		Almendra	Pericarpio
Masa Inicial (g)		1,500	900
Extracción con Hexano	Aceite obtenido (g)	234.24	1.19
	Rendimiento (%)	15.62	0.13
Extracción con Diclorometano	Extracto obtenido (g)	<b>98.42</b>	1.03
	Rendimiento (%)	<b>6.56</b>	0.11
Extracción con Acetato de etilo	Extracto obtenido (g)	47.61	0.52
	Rendimiento (%)	3.17	0.06
Extracción con Acetona	Extracto obtenido (g)	18.05	1.11
	Rendimiento (%)	1.20	0.12
Extracción con Etanol	Extracto obtenido (g)	31.33	6.65
	Rendimiento (%)	2.09	0.74
Extracción con Metanol	Extracto obtenido (g)	15.61	1.22
	Rendimiento (%)	1.04	0.14
Extracción con Etanol-Agua 50% acidificado al 0.1%	Extracto obtenido (g)	29.6	<b>15.5</b>
	Rendimiento (%)	1.97	<b>1.72</b>

Tabla 8: Cuantificación de compuestos fenólicos totales en extractos de almendra y pericarpio de semillas de *A. purpurea*.

Disolvente empleado en la extracción	Fenoles Totales (mg de EAG/g de extracto)	
	Extracto de Almendra	Extracto de Pericarpio
<i>Diclorometano</i>	2.413 ± 0.343 <sup>b</sup>	10.829 ± 1.184 <sup>a</sup>
<i>Acetato de etilo</i>	2.046 ± 0.099 <sup>b</sup>	65.195 ± 6.094 <sup>ab</sup>
<i>Acetona</i>	1.066 ± 0.081 <sup>a</sup>	117.639 ± 9.302 <sup>b</sup>
<i>Etanol</i>	2.617 ± 0.212 <sup>b</sup>	<b>1456.523 ± 111.577<sup>d</sup></b>
<i>Metanol</i>	7.017 ± 0.626 <sup>c</sup>	243.124 ± 11.018 <sup>c</sup>
<i>Etanol-Agua 50 % acidificado al 0.1 %</i>	<b>8.652 ± 0.386<sup>d</sup></b>	21.780 ± 0.960 <sup>a</sup>

n=4, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico realizado para cada fracción de semilla (columna). Los superíndices <sup>a-d</sup> representan valores promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>d</sup> el mayor promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa (p < 0.05).

Tabla 9: Actividad antioxidante de los extractos de almendra y pericarpio de semilla de *Annona purpurea*.

Disolvente empleado en la extracción	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Extracto de Almendra	Extracto de Pericarpio
<i>Diclorometano</i>	9.781 ± 0.286 <sup>d</sup>	0.8888 ± 0.1474 <sup>c</sup>
<i>Acetato de etilo</i>	8.650 ± 0.411 <sup>c</sup>	0.0680 ± 0.0015 <sup>ab</sup>
<i>Acetona</i>	36.300 ± 0.309 <sup>e</sup>	0.0448 ± 0.0042 <sup>a</sup>
<i>Etanol</i>	2.320 ± 0.155 <sup>b</sup>	<b>0.0026 ± 0.0008<sup>a</sup></b>
<i>Metanol</i>	0.640 ± 0.045 <sup>a</sup>	0.0236 ± 0.0006 <sup>a</sup>
<i>Etanol-Agua 50 % acidificado al 0.1 %</i>	<b>0.594 ± 0.012<sup>a</sup></b>	0.1878 ± 0.0125 <sup>b</sup>

n=4, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico realizado para cada fracción de semilla (columna). Los superíndices <sup>a-d</sup> representan valores promedio, donde <sup>a</sup> es el menor y <sup>d</sup> el mayor promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa (p < 0.05).

Tabla 10: Índice de acidez en aceite de oliva adicionado con BHT, extractos hidroetanólico de almendra y etanólico de pericarpio de semilla de chincuya y aceite control, almacenados a 55 °C por 28 días.

Tratamiento/Día	Índice de Acidez (g de ácido oleico / 100 g de aceite)				
	0	7	14	21	28
<b>Control</b>	0.230 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.245 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.263 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.271 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.287 ± 0.027 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	0.218 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.227 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.254 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.254 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.264 ± 0.015 <sup>a</sup>
<b>E. Almendra</b>	0.224 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.227 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.254 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.245 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.263 ± 0.014 <sup>a</sup>
<b>E. Pericarpio</b>	0.228 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.225 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.243 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.260 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.262 ± 0.013 <sup>a</sup>

n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). El superíndice <sup>a</sup> representa el índice promedio que al repetirse significa que no existe diferencia significativa (p < 0.05).

Tabla 11: Índice de yodo en aceite de oliva adicionado con BHT, extractos hidroetanólico de almendra y etanólico de pericarpio de semilla de chincuya y aceite control, almacenados a 55 °C por 28 días.

Índice de Yodo (g de I <sub>2</sub> / 100 g de aceite)					
Tratamiento/Día	0	7	14	21	28
<b>Control A</b>	76.25 ± 1.17 <sup>a</sup>	75.84 ± 0.84 <sup>a</sup>	76.05 ± 0.43 <sup>a</sup>	75.63 ± 0.27 <sup>a</sup>	75.39 ± 0.26 <sup>a</sup>
<b>BHT</b>	76.97 ± 0.83 <sup>a</sup>	76.86 ± 1.46 <sup>a</sup>	76.24 ± 0.81 <sup>a</sup>	76.36 ± 0.58 <sup>a</sup>	75.58 ± 0.16 <sup>a</sup>
<b>E. Almendra</b>	77.16 ± 2.88 <sup>a</sup>	76.29 ± 0.45 <sup>a</sup>	76.22 ± 0.90 <sup>a</sup>	75.96 ± 0.31 <sup>a</sup>	75.17 ± 0.77 <sup>a</sup>
<b>E. Pericarpio</b>	77.31 ± 0.79 <sup>a</sup>	76.39 ± 0.40 <sup>a</sup>	76.16 ± 0.33 <sup>a</sup>	76.29 ± 0.64 <sup>a</sup>	75.86 ± 0.57 <sup>a</sup>

n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). El superíndice<sup>a</sup> representa el índice promedio que al repetirse significa que no existe diferencia significativa (p < 0.05).

Tabla 12: Índice de peróxidos en aceite de oliva adicionado con BHT, extractos hidroetanólico de almendra y etanólico de pericarpio de semilla de chincuya y aceite control, almacenados a 55 °C por 28 días.

Índice de Peróxidos (mEq de Peróxidos / kg de aceite)					
Tratamiento/Día	0	7	14	21	28
<b>Control</b>	14.51 ± 0.05 <sup>b</sup>	24.09 ± 3.01 <sup>a</sup>	28.20 ± 3.64 <sup>a</sup>	37.07 ± 2.50 <sup>b</sup>	41.87 ± 2.47 <sup>b</sup>
<b>BHT</b>	14.60 ± 0.04 <sup>b</sup>	24.13 ± 0.07 <sup>a</sup>	24.09 ± 0.07 <sup>a</sup>	28.91 ± 0.08 <sup>a</sup>	36.88 ± 2.78 <sup>ab</sup>
<b>E. Almendra</b>	11.23 ± 2.71 <sup>a</sup>	20.94 ± 2.69 <sup>a</sup>	24.09 ± 0.07 <sup>a</sup>	37.19 ± 2.75 <sup>b</sup>	40.15 ± 2.54 <sup>ab</sup>
<b>E. Pericarpio</b>	11.26 ± 2.75 <sup>a</sup>	20.91 ± 2.72 <sup>a</sup>	24.18 ± 0.00 <sup>a</sup>	30.46 ± 2.64 <sup>a</sup>	35.22 ± 2.67 <sup>a</sup>

n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico realizado para cada día (columna). Los superíndices<sup>a, ab, b</sup> representan los índices promedio, donde<sup>a</sup> es el menor y<sup>b</sup> el mayor índice promedio. Cuando el superíndice se repite significa que no existe diferencia significativa (p < 0.05).