



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Extracción de antioxidantes provenientes de la flor de compasúchil
(*Tagetes erecta*) para su aplicación en una margarina**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

Monroy Liebre Lorena Berenice

ASESORES:

**DRA. ANDREA TREJO MARQUEZ
M. EN C. SELENE PASCUAL BUSTAMANTE**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

UNAM
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Extracción de antioxidantes provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) para su aplicación en una margarina.

Que presenta la pasante: **Lorena Berenice Monroy Liebre**

Con número de cuenta: **416042175** para obtener el título de: **Ingeniera en Alimentos.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Marzo de 2023

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	
VOCAL	<u>I.A. Miriam Alvarez Velasco</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. María Andrea Trejo Márquez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Araceli Ulloa Saavedra</u>	
2do. SUPLENTE	<u>I.A. Verónica Romero Arreola</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el proyecto
PAPIIT:

“Desarrollo Tecnológico para el Aprovechamiento de
Frutas y Hortalizas (IT201216), de la Dirección
General de Asuntos del Personal Académico,
UNAM.”



“Por mi raza, hablará mi espíritu”

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por darme la oportunidad de concluir uno de los ciclos más importantes de mi vida, de ponerme en mi camino a personas maravillosas por todo lo que he recibido y todo lo que aún está por llegar. Por ponerme retos que me llenan de enseñanzas que me ayudan a saber quién soy y hasta donde quiero y soy capaz de llegar.

A mis padres, que me dieron la vida, por su amor, confianza y apoyo por brindarme su apoyo incondicional, queriendo lo mejor y siempre dando lo que más pueden, gracias a mi mamá por siempre apoyarme por siempre apoyarme a alcanzar mis sueños, por aconsejarme y guiarme a lo largo de este camino. A mi mamá por siempre estar ahí, por dar todo por mí y mis hermanos, a ustedes que me enseñaron que la única forma de alcanzar mis sueños es trabajando muy duro para poder lograrlos. A ustedes les debo todo lo que soy, por eso y más gracias.

A mi amor Iván por todo su apoyo, por acompañarme a mis trámites y nunca dejar que dejará este proyecto ni por trabajo, salud, u otras actividades, eres el mejor.

A mis tíos adoptivos por abrirme las puertas de su casa y de su corazón para concluir mis estudios universitarios, por aconsejarme y apoyarme en todo momento en que lo necesité y lo necesitó. Saben que son como unos padres para mí y sin su apoyo y cariño todo hubiera sido más difícil.

A mis abuelitos desde donde estén espero estén orgullosos de mí, que, aunque ya no están a mi lado los recuerdo con mucho amor y cariño porque cuidaron de mí, me formaron y me guiaron para ser una persona de valores y respeto.

A mis primas Odette y Paola por ser como unas hermanas para mí. Gracias por ser parte de mí como ya saben, son una pieza importante de mi vida, junto a ustedes crecí y son mis confidentes, la vida es mucho más bonita con ustedes y los problemas son mucho más fáciles de resolver, las quiero muchísimo.

A mi familia en general, mis hermanos por su cariño, mi tío Luis Enrique, mi tía Aury y Manuel, mi prima Mariana en general mis tíos y primos con los cuales fueron y son mi apoyo hasta estos días.

A mis amigos Dania, Nadia, Aldo, Itzel, pero en especial a mi amiga Joss por recomendarme el taller de frutos y hortalizas, gracias por ser incondicional, por las lecciones de vida y enseñanzas que me ayudaron a crecer en la universidad y por todo el apoyo y conocimiento compartido en las aulas y que sin ustedes mis amigos, mi estancia en la universidad no hubiera sido la misma.

A mi querido amor Iván por su amor, apoyo, por estar conmigo en las buenas en las malas y las peores como dice, y siempre darme ánimos por la culminar este proyecto, y todos lo demás para cumplir mis sueños.

A mis amigos Israel y Lupita que, aunque no nos veamos muy seguido sé que siempre estuvieron, están y estarán para festejar nuestros triunfos y fracasos.

A la U.N.A.M. especialmente a la F.E.S. Cuautitlán a la cuál aprecio por todos los momentos compartidos en las aulas y laboratorios por todas las herramientas brindadas que me llenaron de conocimiento y experiencias para fortalecerme y salir con una visión diferente de la vida.

A la Dra. Andrea Tejo por brindarme en todo momento su apoyo por compartirme sus conocimientos y siempre motivarme para la culminación del proyecto, por las invitaciones a los congresos, por sus consejos, por los momentos compartidos en el laboratorio y expos, por hacer que la estancia en el taller fuera de las mejores experiencias de la carrera, en verdad para mí es una de las mejores personas que he conocido en la vida, a la cuál admiro y respeto como mujer, profesionista y persona, por lo que agradezco a dios por ponerla en el camino para ayudarme a concluir esta etapa de mi vida con este proyecto .

A la M. en C. Selene Pascual por su paciencia, tiempo, apoyo y dedicación para concluir este trabajo, por su orientación y por siempre animarme a no desistir con las curvas de calibración o en un principio con la extracción de aceite esencial, por brindarme el laboratorio en todo momento para el avance de mi proyecto, por sus regaños para mejorar como persona y dar lo mejor de mí, infinitas gracias por que fue parte fundamental para la elección y conclusión de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Vargas por abrirme la puerta del laboratorio de analítica para brindarme su apoyo y enseñanzas para la identificación de los compuestos y así poder realizar parte de mi proyecto en el laboratorio.

A la Dra. Elvia Mayen por su apoyo, ánimo para obtener aceite esencial para hacer este trabajo aún más interesante.

A todos mis profesores, docentes, coordinadores, aquellos que me formaron académica y personalmente, les agradezco por sus enseñanzas y porque algunos sé qué me motivaron para ser mejor persona, para llegar hasta aquí.

1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades de la flor de cempasúchil(<i>Tagetes erecta</i>).....	3
2.1.1 Origen e importancia cultural.....	3
2.1.2 Descripción botánica de la flor de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>).....	4
2.1.3 Producción y distribución de la flor de cempasúchil.....	5
2.1.4 Usos y aplicaciones de la flor de cempasúchil.....	6
2.1.5 Composición química.....	6
2.2 Antioxidantes.....	10
2.2.1 Mecanismos de acción.....	11
2.2.2 Tipos de antioxidantes.....	12
2.2.2.1 Sintéticos.....	12
2.2.2.2 Naturales.....	13
2.3 Compuestos fenólicos.....	14
2.3.1 Características generales.....	14
2.3.2 Métodos de extracción.....	21
2.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	23
2.4 Generalidades de las grasas y aceites.....	24
2.4.1 Ácidos grasos.....	25
2.4.2 Principales cambios químicos durante el almacenamiento de los aceites.....	26
2.4.2.1 Oxidación lipídica.....	26
2.4.2.2 Tipos de oxidación.....	27
2.4.2.3 Factores que inciden en la autooxidación.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos Particulares.....	29
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30

4.1 Material de estudio.....	30
4.2 Acondicionamiento de la flor de cempasúchil.....	30
4.3 Obtención de los extractos etanólicos de la flor de cempasúchil.....	31
4.4 Identificación de compuestos polifenólicos mediante electroforesis capilar.....	33
4.4.1 Identificación de compuestos polifenólicos mediante electroforesis capilar.....	33
4.4.2 Estándares.....	34
4.4.3 Condiciones para la identificación de polifenoles por electroforesis capilar.....	34
4.4.4 Hidrólisis del extracto para la identificación de compuestos.....	36
4.4.4.1 Preparación de solución hidrolizante.....	36
4.4.5 Identificación de polifenoles en extracto etanólico hidrolizado a partir de electroforesis capilar.....	37
4.5 Formulación de la margarina.....	38
4.6 Evaluación de la oxidación lipídica en la margarina.....	39
4.7 Técnicas analíticas.....	40
4.8 Análisis estadístico.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1 Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidantes de extractos de flor de cempasúchil.....	46
5.1.1 Cuantificación de fenoles totales.....	46
5.1.2 Identificación de flavonoides.....	48
5.1.3 Identificación de polifenoles en extracto etanólico hidrolizado a partir de electroforesis capilar.....	53
5.3 Parámetros de calidad de la margarina en condiciones aceleradas.....	57
5.3.1 Índice de acidez.....	58
5.3.2 Índice de peróxidos.....	59
5.4.4 Color.....	63
6. CONCLUSIONES.....	65
7. RECOMENDACIONES	66
8. BIBLIOGRAFÍA.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Planta silvestre de *T. erecta* (Cempasúchil) (A) y Flor de cempasúchil (B).....3

Figura 2. Morfología de la flor de cempasúchil.....4

Figura 3. Fenoles encontrados en la flor de cempasúchil.....9

Figura 4. Compuestos flavonoides identificados en el extracto de la flor de cempasúchil.....9

Figura 5. Mecanismo de acción del ácido gálico sobre radical libre del ácido oleico.....12

Figura 6. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia.....13

Figura 7. Clasificación de polifenoles.....16

Figura 8. Mecanismo de inhibición de radicales libres por compuestos fenólicos.....19

Figura 9. Estructura base de los flavonoides.....19

Figura 10. Fenómeno de cavitación en la extracción asistida por ultrasonido (UAE).....24

Figura 11. (a) Estructura química de ácido graso esteárico, (b) Estructura química de ácido graso insaturado linoleico.....25

Figura 12. Estructura general de un ácido graso.....26

Figura 13. Estructura de un ácido graso polinsaturado.....28

Figura 14. Diagrama de bloques para el acondicionamiento de la flor de cempasúchil.....30

Figura 15. Pétalos de la flor de cempasúchil(A) y Flor de cempasúchil seca y molida(B).....31

Figura 16. Diagrama de proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil.....32

Figura 17. Extractos etanólicos de la flor de cempasúchil.....33

Figura 18. Equipo de electroforesis capilar.....33

Figura 19. Hidrólisis del extracto.....35

Figura 20. Proceso de separación por electroforesis capilar.....36

Figura 21. Identificación de compuestos por electroforesis capilar.....37

Figura 22. Muestra del extracto para identificación de compuestos.....37

Figura 23: Electroferograma extracto etanólico hidrolizado.....38

Figura 24. Aceite de oliva (A) y aceite de coco (B).....38

Figura 25. Diagrama de flujo para la elaboración de la margarina.....39

Figura 26. Curva patrón empleado para la cuantificación de fenoles.....40

Figura 27. Evaluación del contenido de flavonoides.....41

Figura 28. Determinación de la curva estándar para determinación de la capacidad antioxidante.....42

Figura 29. Evaluación de acidez.....43

Figura 30. Evaluación de índice de peróxido.....	43
Figura 31. Determinación de índice de kreis.....	44
Figura 32. Representación del espacio cromático cilíndrico.....	45
Figura 33. Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE bajo diferentes condiciones	46
Figura 34. Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE empleando una mezcla etanol: agua en una proporción 70:30 bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.....	47
Figura 35. Contenido de flavonoides presentes en los extractos de la flor de cempasúchil Obtenidos por el método de UAE a mezclas etanol-agua (70:30) y (80:20) por 20 y 40 min..	49
Figura 36. Contenido de flavonoides presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE a 25° C y a 70° C durante 20 y 40 minutos	50
Figura 37. Contenido de capacidad antioxidante en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE a mezclas etanol-agua (70:30), (80:20) por 20 y 40 min....	51
Figura 38. Capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el Método de UAE a temperatura ambiente y a 70° C con diferentes tiempos.....	52
Figura 39: Electroferograma extracto etanólico hidrolizado.....	54
Figura 40: Electroferograma extracto etánolico hidrolizado con Naringina.....	55
Figura 41. Electroferograma extracto etánolico hidrolizado con Arbutina.....	55
Figura 42. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el índice de acidez de la margarina.....	56
Figura 43. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el índice de peróxidos.....	58
Figura 44. Evaluación del índice de Kreis en la margarina de aceite de coco y aceite de oliva agregando el extracto de flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas.....	60
Figura 45. Color de la margarina.....	62
Figura 46. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el color la margarina de aceite de coco y aceite de oliva agregando el extracto de flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas.....	63
Figura 47. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el color la margarina de aceite de coco y aceite de oliva agregando el extracto de flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas.....	64

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la flor de cempasúchil.....5

Tabla 2. Ejemplos de metabolitos secundarios (*Tagetes erecta*)7

Tabla 3. Principales características de los subgrupos que conforman a los polifenoles.....17

Tabla 4. Principales características de los subgrupos que conforman a los flavonoides.....20

Tabla 5. Procedimientos de lavado al inicio del capilar34

Tabla 6. Procedimiento de separación de compuestos fenólicos por electroforesis capilar...35

Tabla 7. Información de estándares empleados para la identificación de polifenoles.....35

Tabla 8. Formulación para la elaboración de la margarina.....38

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Significado	Símbolo	Significado
ppm	Partes por millón	BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxianisol	TBHQ	Test-butil-hidroquinona
M	Molar	EQ	Toxiquita
µm	micromoles	EC	Electroforesis capilar
UAE	Extracción asistida por ultrasonido	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
KI	Yoduro de Potasio	N	Normalidad
rpm	Revoluciones por minuto	µl	Microlitro
PUFAs	Ácido graso poliinsaturado	psi	Libra sobre pulgada cuadrada
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	UV	Ultravioleta
ABTS+	Ácido 2,2'- azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6	µm	Micrómetro
mM	Milimolar	°C	Grado Celsius
Nm	Nanómetros	pH	Potencial Hidrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio	TE	Equivalente en Trolox
KOH	Hidróxido de potasio	mV	Milivoltios
V	Volt	mM	Milimol
CFT	Espectrometría de Flavonoides	FDA	Food and Drug Administration
AG	Ácido gálico	ADN	Ácido desoxirribonucleico
HCl	Ácido Clorhídrico	KI	Yoduro de Potasio
DMSO	Dimetilsulfóxido	kHz	Kilohertz
°	Radical	E310	Galato de propilo

RESUMEN

La flor de cempasúchil es representativa de México debido a su uso ornamental en las festividades de día de muertos, pero pasando estas fechas, está es desechada sin importar las propiedades que contiene por lo que en este trabajo se pretende el aprovechamiento de la flor de cempasúchil. El objetivo es la extracción por ultrasonido e identificación de los compuestos bioactivos presentes en la flor de cempasúchil para su uso como antioxidantes dentro de la formulación de una margarina. Los extractos fueron obtenidos mediante un pretratamiento, se utilizó el método de ultrasonido en diferentes condiciones: dos mezclas etanol-agua (70:30 y 80:20) durante 20 y 40 minutos a temperatura ambiente y 70 °C, en donde se evaluaron el contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante. La identificación de polifenoles se llevó a cabo por electroforesis capilar, utilizando un capilar con un largo total de 51.9 cm, una distancia al detector de 41.7 cm y un diámetro interno de 50 μm , además de una solución buffer de boratos 0.05 M a temperatura ambiente. Posteriormente se elaboró una margarina aplicando los extractos como antioxidantes, evaluando el índice de peróxidos, acidez e índice de Kreis. De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que el método de ultrasonido ayudó a la extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil, encontrándose que al incrementar la temperatura a 70 °C ayudó a la liberación de los compuestos, específicamente los fenoles. Las condiciones de extracción óptimas fueron 40 min a 70 °C con una mezcla de etanol-agua de 70:30. Los fenoles identificados fueron naringina y arbutina. Los extractos de flor de cempasúchil se aplicaron al 0.1 % como antioxidante a una margarina recién elaborada; registrándose que inhiben la oxidación lipídica de manera similar a los antioxidantes artificiales como BHT. Se concluye que los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por ultrasonido son una opción tecnológica viable para el control de la oxidación lipídica en margarina.

1. INTRODUCCIÓN



“Un viaje de mil millas empieza con un primer paso”

-Benjamín Frankiln

1. INTRODUCCIÓN

La flor de cempasúchil es una de las flores más representativas de México (Rzedowki, 2001), es característica por su aroma y el principal uso que se le da a nivel nacional es ornamental durante los días 1 y 2 de noviembre, que es una de las temporadas de mayor producción, una vez pasada las festividades, la flor es desechada sin importar las propiedades fitoquímicas que contiene; como una gran variedad de antioxidantes naturales, como: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y otros componentes de valor nutricional como minerales. El carotenoide principal encontrado en los pétalos es *transluteína* (C₄₀H₅₆O₂) (Gómez *et al.*, 1978) utilizado principalmente como pigmento para la piel de aves y huevos (Del Villar *et al.*, 2010), en cuanto a la presencia de flavonoides se encuentran la quercetina, mirecitina, apigenina, kaempferol (Faizi y Naz, 2004) en mayor proporción, así mismo los ácidos sináptico, cúmarico, clorogénico, principalmente, aunque se han detectado 7 compuestos más, si bien en menor proporción (Kasisoon *et al.*, 2012).

Existen diversos métodos para la extracción de estos compuestos bioactivos. Uno de estos es la extracción asistida por ultrasonido, la cual utiliza sonido de alta frecuencias, con el fin de desprender el compuesto buscado de la materia vegetal en donde las partículas sólidas y líquidas vibran, se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente. De acuerdo con algunos autores esta técnica es más económica y tienen los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas (Rostagno *et al.*, 2003).

Una de las aplicaciones de los compuestos antioxidantes presentes en la flor de cempasúchil extraídos por ultrasonido es en grasas y aceites, los cuales pueden sufrir transformaciones químicas que reducen el valor nutritivo del alimento, produciendo compuestos volátiles que le imparten olores y sabores desagradables (Navas, 2010). Debido a que la oxidación lipídica es uno de los procesos más relevantes en el deterioro de diversos alimentos, como lo son los aceites de origen vegetal, pues son ricos en ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a sufrir

un daño severo, su importancia radica en los beneficios que ofrecen, como la protección contra enfermedades cardiovasculares, prevención de artritis, cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, entre otros (Gogus y Smith, 2010).

La trascendencia de investigar un antioxidante natural como aprovechamiento de una flor nativa de México, es tanto desde un punto de vista de la salud como también comercial.

Con base a lo anterior, en este proyecto se pretende la extracción de los compuestos bioactivos fenoles y flavonoides principalmente, provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) por el método de ultrasonido, así como la identificación de estos compuestos mediante electroforesis capilar para su posterior aplicación como antioxidante en una margarina.

2. ANTECEDENTES



“La mejor forma de predecir el futuro es creándolo”

-Peter F. Drucker

2. Antecedentes

2.1 Generalidades de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)

2.1.1 Origen e importancia cultural

La flor de cempasúchil es originaria de México, su nombre proviene del náhuatl “cempohualxochitl” que significa cempoalli, veinte y xóchitl, flor) que puede traducirse como “veinte flores” o “varias flores” (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019).

La flor de cempasúchil simboliza el “Día de Muertos” en México, gracias a su color y aroma más representativos de las ofrendas para los muertos además de ser una de las flores más representativas de México.

Se coloca en altares, lápidas, iglesias o panteones los días 1 y 2 de noviembre cuando se celebra en nuestro país a los muertos, gracias a su color y aroma es uno de los elementos más representativos de las ofrendas. Nuestros antepasados asimilaban el color amarillo de la flor de cempasúchil con el sol, razón por la que la utilizaban en las ofrendas. La tradición marca hacer senderos con las flores, desde el camino principal hasta el altar de la casa con la finalidad de guiar a las almas hacia los altares (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019). La flor era considerada por los mexicas como un símbolo de vida y muerte (Figura 1).



Figura 1. Planta silvestre de *T. erecta* (cempasúchil) (A) y flor de cempasúchil (B)

Fuente: Hernández (2017)

2.1.2 Descripción botánica de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*)

Planta herbácea anual, erecta, ramificada, y muy aromática; de 3 a 180 cm de alto, sus tallos son gruesos y glabros de raíz angulosa a redondeados (Figura 2). Presenta hojas pinnadas profundamente pigmentadas con 6-17 segmentos lineales-lanceolados, cada segmento de 1-4 cm x 0.5-2 cm, glandular, agudo en ambos extremos y dentados al margen. Presenta un capítulo terminal solitario sobre el pedúnculo (3-12 cm de largo) provistos de brácteas: flores liguladas generalmente presentes (200 hasta 400 pétalos), sus corolas en tipos silvestres presentan coloración amarilla, amarillo limón, naranja a rojo marrón oscuro (Tim, 2012).



Figura 2. Morfología de la flor de cempasúchil

Fuente: Hernández (2017)

Sus botones pueden alcanzar los cinco centímetros de diámetro. Sus tallos son estriados y sus cabezuelas solitarias agrupadas sobre pedúnculos provistos de brácteas. Pertenece a la familia de la Asterácea, es característica por su olor y aroma, habita en climas cálidos, cálidos, secos y templados (Argueta *et al.*, 1994).

El género *Tagetes* es un grupo heterogéneo respecto a la morfología de las raíces, los tallos. El género *Tagetes* es un grupo heterogéneo respecto a la morfología de las raíces, los tallos, las hojas y homogéneo en las características

de las inflorescencias (Tabla 1). Tal familia es de los grupos de plantas vasculares más grande que hay junto con las Fabaceae, Gramíneas, Orchidaceae y Euphorbiaceae. A nivel mundial cuenta con alrededor de 1.535 géneros y de 23,000 a 32,000 especies (Tapia, 2010; Katinas *et al.*, 2007).

Tabla 1. Taxonomía de la flor de cempasúchil

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

Fuente: Rzedowski (2001)

2.1.3 Producción y distribución de la flor de cempasúchil

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) informó que, en 2018, el abasto de flor de cempasúchil para las festividades tradicionales del Día de Muertos está garantizado, gracias al incremento en la producción que se registró debido al esfuerzo de los productores y al acompañamiento de la dependencia.

Esta flor ornamental se cultiva principalmente en 20 municipios pertenecientes a los estados de Puebla, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca y San Luis Potosí. Actualmente se cosechan alrededor de mil 900 hectáreas de cempasúchil en México, con una producción media de más de 15 mil toneladas anuales, donde el estado de Puebla es el principal productor con el 77 % de la producción nacional (SAGARPA, 2018).

2.1.4 Usos y aplicaciones de la flor de cempasúchil

La referencia más antigua se encuentra en el Códice Florentino, del siglo XVI donde se señala como una planta ceremonial y estética. El 2 de noviembre se emplea como ornamental para la celebración del Día de Muertos. La *T. erecta* en México es cultivada con fines comerciales como colorante natural de textiles y para el control de plagas (Pupo *et al.*, 2007). Debido a que sus flores por su fuente rica de carotenoides y sus derivados xantofílicos son utilizados en la elaboración de alimentos balanceados y también como colorantes para alimentos de consumo humano; los principales usos de esta especie en nuestro país son: ornamental, pigmento para las carnes de aves y yemas de huevo, para teñir lana, tela e hilos (Khachick, 1995).

La *T. erecta* se prescribe actualmente para atender principalmente padecimientos digestivos y respiratorios, así como enfermedades de filtración cultural, en que se involucran síntomas relacionados con la ansiedad o “los nervios”. Es una planta usada por los pobladores en la medicina tradicional en la localidad del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Hernández, 2007).

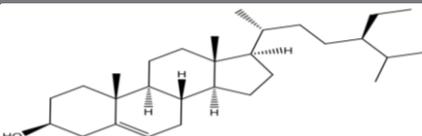
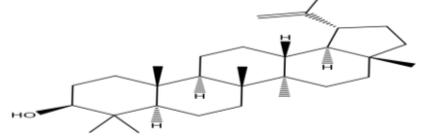
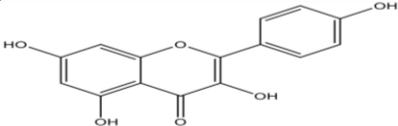
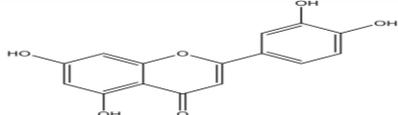
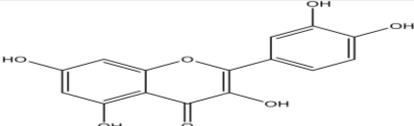
2.1.5 Composición química

Las flores y los pétalos, que le dan el color característico, son ricos en carotenoides, éstos varían en concentración dependiendo de la variabilidad morfológica de las especies (Serrato *et al.*, 2008). Los carotenoides que se han identificado son luteína, xantofila y cinco ésteres de ambos componentes con ácidos grasos de 10, 16 y 18 carbonos; los monoterpenos dipenteno y mentol, así como piretrinas. En las flores y en las raíces se han detectado componentes de tipo terpenoide como: B-sitosterol y luperol (Xu *et al.*, 2004); hay presencia de flavonoides tales como: luteolina, patuletina, quercetina y kaempferol (Gong *et al.*, 2011), así como taninos 3,4-di-O-[siringato]- α -D-glucipiranososa y 3,4-di-O-[siringato]- β -D-glucopiranososa (Zhou *et al.*, 2012).

Numerosos estudios encuentran sustancias de importancia biológica: carotenoides, como luteína y zeaxantina en mayor proporción (88 y 92 %); flavonoides y fenoles; poli acetilenos cíclicos (tiertenilo); monoterpénoides (Heywood *et al.*, 1997). Campbell *et al.* (1982) reportan un derivado poliacetilénico en la raíz, el cual después corroboran Morallo y Decena (1984) como a-tertienilo con función insecticida. La flor es donde se concentra la mayor actividad antioxidante (Tabla 2).

En general las partes comestibles contienen componentes bioactivos como compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, que aparecen principalmente en forma de pigmentos naturales, la mayoría de los cuales conservan propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas. Las flores comestibles se conocen desde la antigüedad y siguen siendo populares en la gastronomía moderna por sus valores nutritivos, junto con las apariencias para usar como materiales de decoración (Shi *et al.*, 2008; Kaisoon *et al.*, 2012).

Tabla 2. Ejemplos de metabolitos secundarios (*Tagetes erecta*)

Nombre	Estructura química
β-sitosterol	
Liperol	
Kaempferol	
Luteolina	
Quercetina	

Fuente: Pérez (2016)

La flor de cempasúchil es una planta rica en compuestos fitoquímicos como son:

- Ácidos grasos

Los ácidos grasos dominantes presentes en la flor es el ácido linoleico (<23.41%), el ácido palmítico (>24.22 %) y el ácido oleico (>20.12 %). Los ésteres de luteína, α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol son compuestos antioxidantes dominantes en los extractos de flores (Gong *et al.*, 2011).

- Pigmentos

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

- Aceite esencial

En Venezuela, en 2009, fueron identificados veinticinco compuestos en el aceite esencial de *T. erecta*, de los cuales se encontraron linalol (22.5 %), 2-hexil-1-decanol (18.3 %), piperitona (13.4 %), acetato de terpil (7.8 %) y cariofileno (6.6 %) como componentes principales (Martínez *et al.*, 2009).

- Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos detectados en el extracto etanólico de la flor de cempasúchil en mg/100 g. Se observa en la Figura 3 un total de 942.25 (mg/g). Incluyendo ácido gálico 14.74 mg; ácido protocatecúico, 10.9 mg; ácido p-hidroxibenzoico, 3.44 mg; ácido clorogénico, 13.64 mg; ácido vinílico, 47.81; ácido cafeico, 3.65 mg; ácido sirínigico, 15.83 mg; ácido p- cúmarico, 253.05 mg; ácido ferúlico, 48.61 mg; ácido sinápico, 531.39 mg; y total 942.25 mg (Kaisoon *et al.*, 2012). Como se

puede observar en la Figura 3, el ácido sinápico y el p-ácido cúmarico fueron los que se encontraron mayoritariamente.

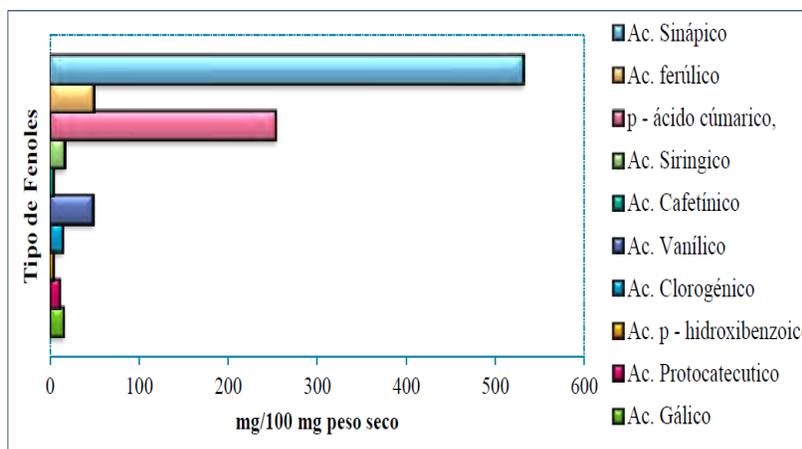


Figura 3. Fenoles encontrados en la flor de cempasúchil

Fuente: Kaisoon et al. (2012)

- Flavonoides

Los compuestos flavonoides que se encuentran en los extractos de las flores (mg/100g peso seco) son los siguientes: rutina 5.09 mg; miricetina 54.81 mg; quercitina, 13.57 mg; apigenina, 8.41 mg; kaempferol 25.863 mg; (como se muestra en la Figura 4 reportando un total de 165.3 mg).

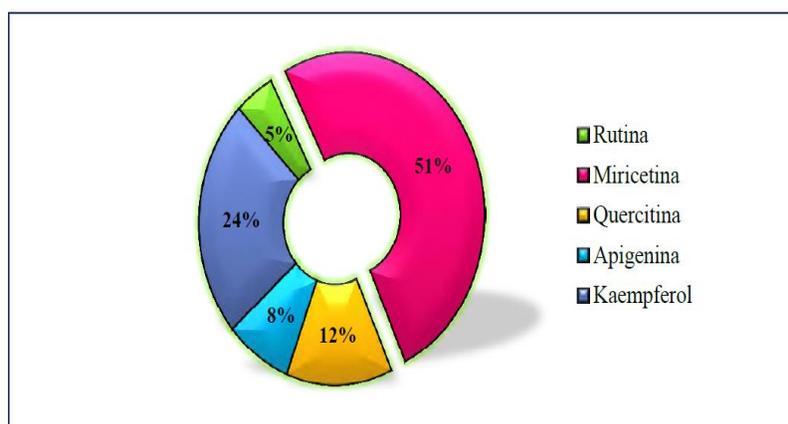


Figura 4. Compuestos flavonoides identificados en el extracto de la flor de cempasúchil

Fuente: Faizi y Naz (2004)

2.2. Antioxidantes

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos biológicos y químicos que actúan en el cuerpo humano con la función de evitar la oxidación de los componentes que conforman las principales estructuras celulares.

Cualquier sustancia que retasa, previene o elimina el daño oxidativo a una molécula. Así que los antioxidantes en el cuerpo humano funcionan como un sistema de defensa que regula a las especies reactivas y radicales libres que se llegan a generar como parte de las funciones normales del metabolismo celular o bien que pueden ser asimilados o inducidos por efecto de diferentes factores ambientales o fisiológicos (Halliwell, 2009).

Los antioxidantes se definen como sustancias que al estar presentes en los alimentos en bajas concentraciones comparadas con la de una sustancia susceptible de oxidación, disminuye notoriamente o previene la oxidación de dicha sustancia.

En sistemas biológicos, el daño oxidativo al ADN y proteínas es de gran importancia en las células de todo el cuerpo y puede ser un gran riesgo que propicia el desarrollo de cáncer, así como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, por lo cual se esperaría que los antioxidantes capaces de disminuir este daño *in vivo* tuviesen efectos anticancerígenos. A pesar de esto, un antioxidante puede ser capaz de proteger un sistema alimenticio o biológico, pero puede no funcionar en otro (Guo, 2009).

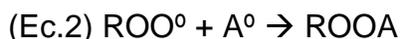
Los compuestos antioxidantes cumplen varias funciones, entre la más importante en la industria de alimentos es el retraso de la oxidación de compuestos lipídicos contenidos en diferentes productos. Gracias a la adición de antioxidantes, se puede prevenir la aparición de sabores extraños y rancidez (fenómenos relacionados con la peroxidación de los lípidos), así como mantener el valor nutricional de los alimentos. Diversos compuestos pueden ejercer un efecto antioxidante. Entre ellos se encuentran los antioxidantes fenólicos de origen natural, divididos en flavonoides y ácidos fenólicos, que se caracterizan por contener más de un grupo fenol en su estructura. Para aprovechar las ventajas de

estos compuestos, se debe estudiar el fenómeno de la oxidación, que afecta tanto a sistemas biológicos dentro del cuerpo humano como a diversos alimentos. Conociendo los mecanismos que imperan sobre estas reacciones, se pueden encontrar alternativas para retrasar estos procesos y preservar el valor nutritivo de los alimentos (Quiñones y Alexandre, 2012).

Sin embargo, detrás de muchas enfermedades crónicas, cuya aparición es retrasada y su gravedad disminuida por el consumo de alimentos de origen vegetal se encuentran procesos de estrés oxidativo medidos por radicales libres, que conducen progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células. Este estrés se podría definir como un desequilibrio entre los pro-oxidantes y/o radicales libres por una parte y los sistemas antioxidantes del organismo por otra (Barberán, 2003).

2.2.1 Mecanismos de acción

La ecuación 1 describen la donación de átomos de hidrógeno (H^0) de antioxidantes a los radicales libres formando un compuesto peroxi-antioxidante (ROOA) que es estable e inocuo (Brewer, 2011).



A continuación, en la Figura 5 se muestra el mecanismo de acción de un galacto de ácido gálico sobre los radicales libres del ácido oleico (Badui, 2006):

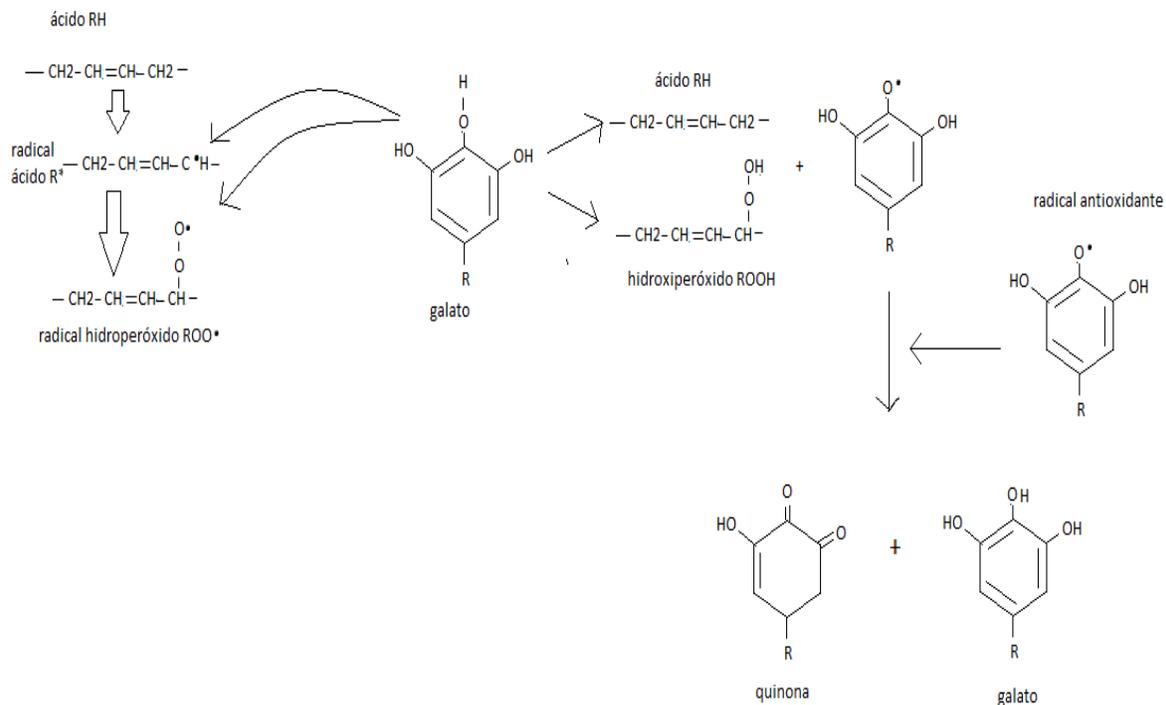


Figura 5. Mecanismo de acción del ácido gálico sobre radical libre del ácido oleico

Fuente: Badui (2006)

2.2.2 Tipos de antioxidantes

Existen dos grupos según su origen: los naturales y los sintéticos (Badhui,2006).

2.2.2.1 Sintéticos

Entre los antioxidantes sintéticos más empleados por la industria de alimentos destacan: butil-hidroxitolueno (BHT; E321), butil-hidroxianisol (BHA; E320), tert-butil-hidroquinona (TBHQ), etoxiquina (EQ), galato de propilo (E 310) y quelantes de metales como EDTA y ácidos cítricos (Figura 6). El BHT y BHA son los antioxidantes fenólicos monovalentes más comunes de origen sintético, fuertemente solubles en grasa e insolubles en agua, el BHA se encuentra en el

comercio como copos de cera blanca y el BHT como compuesto cristalino de color blanco (Shahidi y Wanasundara, 1992). Son efectivos para la estabilización de aceites vegetales a la concentración máxima permitida de 75 mg/kg; en alimentos como una margarina (CODEX STAN 32-1989).

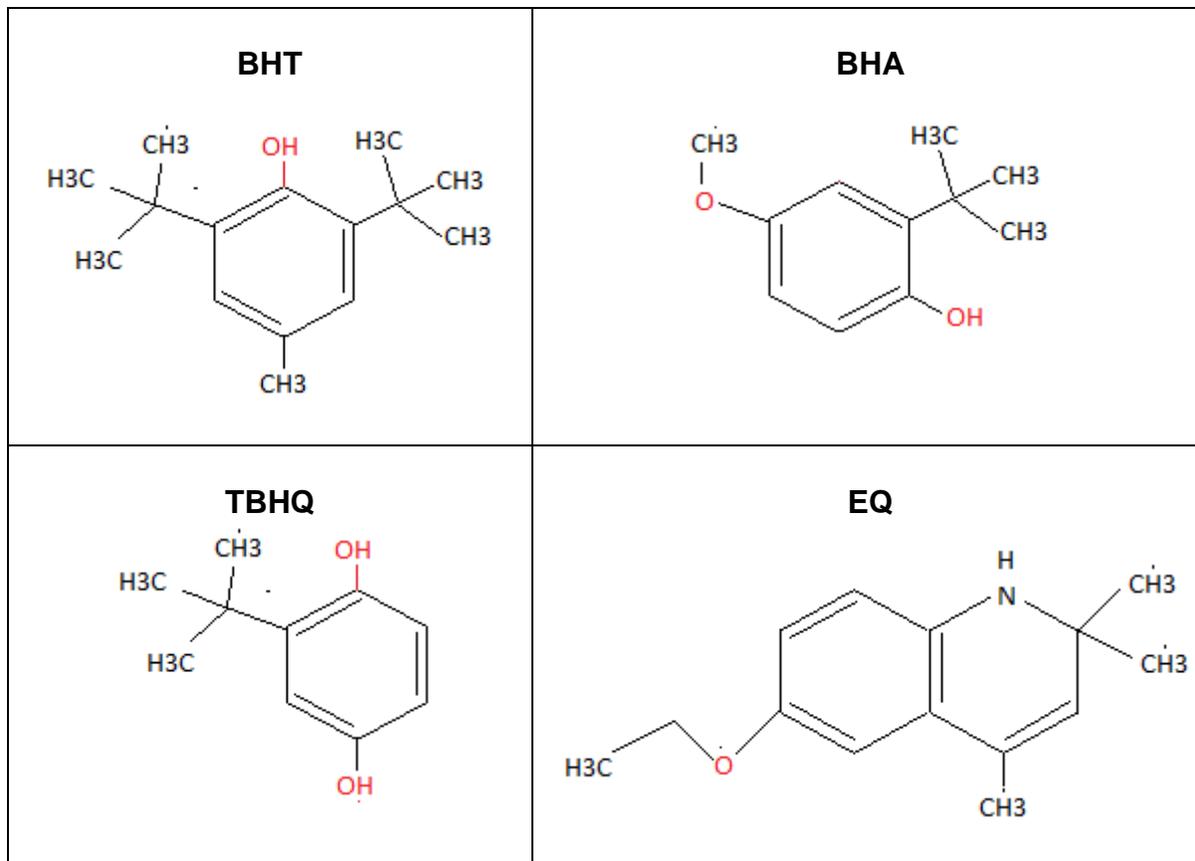


Figura 6. Antioxidantes sintéticos más usados en la industria alimenticia
Fuente: Shahidi y Wanasundara (1992)

2.2.2.2 Naturales

Entre los antioxidantes naturales que más se emplean como preservantes se encuentran: el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y diversos derivados del ácido rosmarínico. Tales compuestos pueden ser obtenidos: mediante extracción directa desde sus fuentes naturales (donde existen en abundancia), o bien, mediante síntesis química. Una ventaja de los antioxidantes naturales sobre los sintéticos es

que sus límites máximos permitidos son superiores al de los sintéticos, por ejemplo, la dosis normal de tocoferoles en aceites que contiene elevados PUFAs son de hasta 2000 ppm (Lampi *et al.*, 2002).

Existen diversos antioxidantes de origen natural que han sido estudiados para incrementar la estabilidad oxidativa del aceite, por lo tanto, la adición de antioxidantes naturales aumenta el tiempo de estabilidad dependiendo de su tipo y concentración (Ixtaina *et al.*, 2012).

2.3 Compuestos fenólicos

2.3.1 Características generales

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

Estos compuestos han sido objeto de numerosos estudios debido a su capacidad antioxidante y su efecto benéfico en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, como cardiovasculares y cáncer (García, 2009).

En la industria de alimentos, la presencia de polifenoles puede limitar el deterioro por reacciones de oxidación y, por lo tanto, extender su vida comercial. Esto también tiene un impacto en la salud del consumidor ya que es conocido el papel de los radicales libres en la génesis de numerosas enfermedades (García, 2009).

Los antioxidantes fenólicos bloquean la propagación de la reacción en cadena por su capacidad de reaccionar con diferentes tipos de radicales (Martel & Pascal, 2000).

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

De forma general los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos que a su vez son derivados del ácido hidroxibenzoico, entre ellos se encuentran el ácido parahidroxibenzoico, ácido protocatético, ácido cumárico, ácido sináptico y cafeico considerados como antioxidantes primarios, pues al contener hidroxilos fenólicos hacen que tengan carácter ácido, lo que los hace que sean aceptores de radicales libres (Tabla 3).

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuosos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de la partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia (Howard, 2003; Khanna *et al.*, 1980). Con base en la estructura los polifenoles se dividen en dos grupos: Los flavonoides y los no flavonoides (Figura 7).

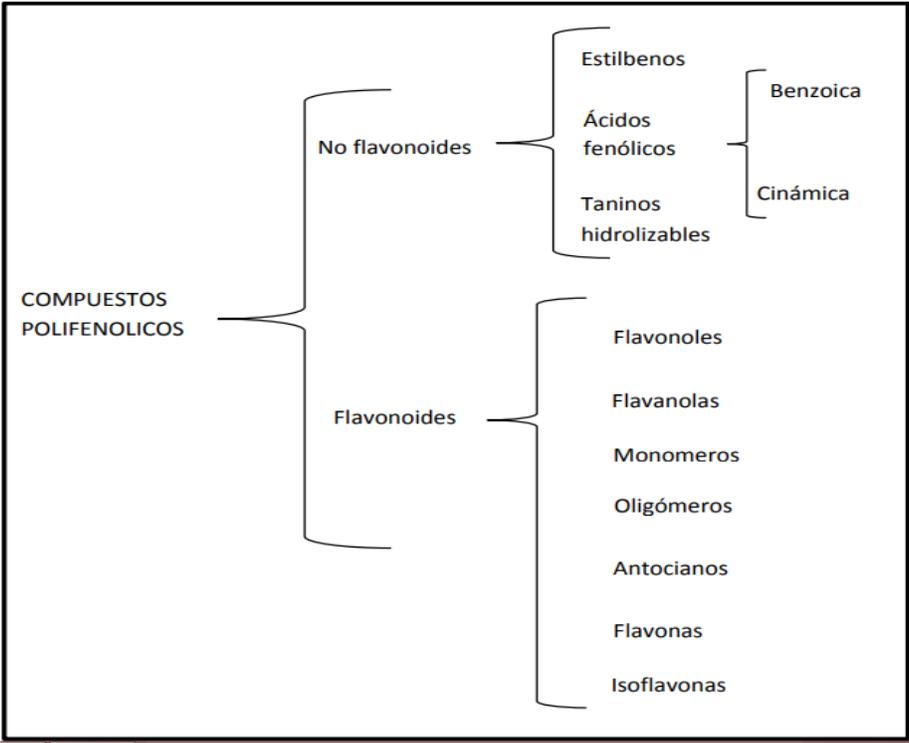
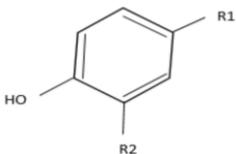
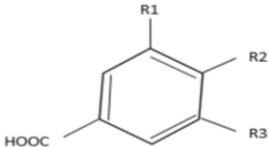
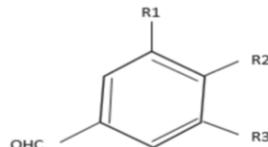
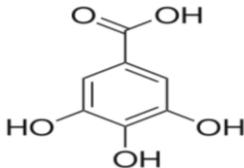
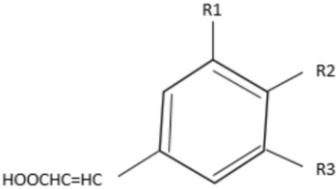


Figura 7. Clasificación de polifenoles

Fuente: Hu (2010)

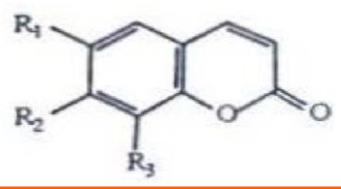
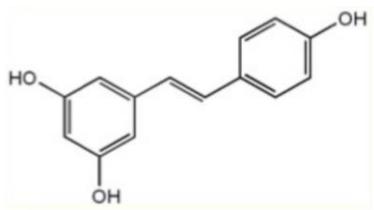
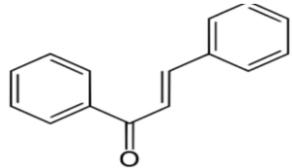
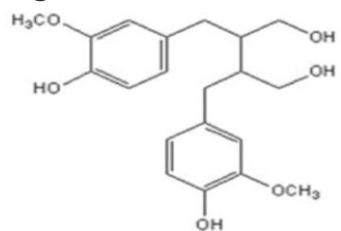
No flavonoides: Son un conjunto de moléculas entre los polifenoles que a diferencia del grupo descrito anteriormente (flavonoides) no comparten una estructura base que relacione a todos los elementos, por lo que la clasificación de los componentes que abarca este grupo ésta dictaminada por el número de anillos fenólicos que contiene y con base en los diferentes elementos estructurales que ligan estos anillos a otros.

Tabla 3. Principales características de los subgrupos que conforman a los polifenoles

Estructura química	Grupos funcionales	Fuente alimenticia
Fenol simple 	R1=H y R2=OCH ₃ (Guayacol) R1=CH ₂ CH=CH ₂ Y R2=OCH ₃ (eugenol) R1=CH ₂ CH ₂ OH Y R2=H (Tirosol)	Vino café, aceite de oliva virgen
Ácidos fenólicos 	R1, R2, R3=OH (ácido gálico) R1 Y R3=, R2= OH (ácido 4-hidrobenzoico)	Ciruelas, cerezas, manzanas, fresas, nuez pecanera, uvas, frambuesa, grosellas col china, café, té negro, té verde y vino blanco
Aldehídos benzoicos 	R1 Y R3=H, R2=OH Y R3=OCH ₃ (vainilla) R1 Y R3=H, R2= OH (4-hidroxibenzaldehído)	Mango, vainilla, lichis, vino, nueces y cítricos.
Taninos hidrolizables 		Fresas, arándanos, uva, manzana, granada, frambuesas, moras, harina de cebada, té verde y leguminosas
Ácido hidroxicinámico 	R1 Y R3=H, R2=OH (p-cumárico) R2y R3=OH, R1=H (cafeicos) R1=H, R2=OH Y R3=OCH ₃ (ferúlico)	Café, manzanas, ciruelas, chabacanos, nectarinas, duraznos, membrillo, papa, pera, lechuga, zanahoria, arándanos, moras, uva, naranja, betabel, brócoli, berenjena, espárragos, trigo y tomate.

Fuente: Adaptado de Rabassa (2012)

Tabla 3. Principales características de los subgrupos que conforman a los polifenoles (Continuación).

Estructura química	Grupos funcionales	Fuente alimenticia
Cumarinas 	R1 Y R2= OH, R3=H (esculetina) R1=OCH ₃ , R2=OH Y R3=H (escopoletina)	Zanahoria, té verde, archicoria, apio, naranja y toronja.
Estilbenos 	R1 Y R2=H (resveratrol) R1=H Y R2= glucosa (peceído)	Uvas y sus productos
Chalconas 		Manzanas y tomates.
Lignanós 		Semillas de linaza, vino, cerveza, té café, col rizada, chocolate, chabacano, durazno, fresa y pera.

Fuente: Adaptado de Rabassa (2012)

La propiedad antioxidante de los polifenoles se debe a que son compuestos que pueden donar fácilmente hidrógeno o electrones a partir de los grupos hidroxilo situados a lo largo del anillo aromático de esta manera inhibe la actividad antioxidante de los radicales libres, también tienen el potencial de quelar metales de transición. Estructuralmente los polifenoles son moléculas estables ya que tienen la capacidad de estabilizar y deslocalizar el electrón desemparejado dentro de su anillo una vez interactuado con la especie reactiva (Dey *et al.*, 2016) (Ver Fig. 8).

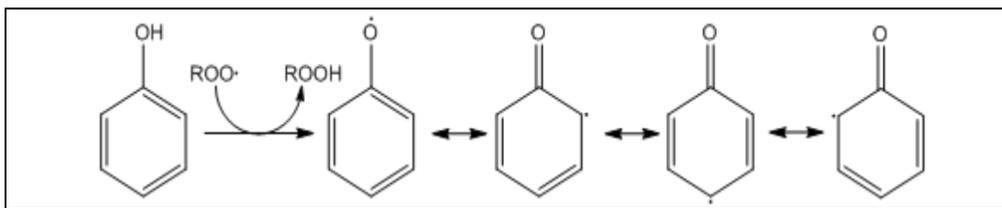


Figura 8. Mecanismo de inhibición de radicales libres por compuestos fenólicos
 Fuente: Adaptado de Dey *et al.* (2016).

Flavonoides: Son pigmentos heterocíclicos que confieren colores como amarillo, rojo y azul a una gran variedad de plantas, frutas y hortalizas, además de estar presentes en productos como el café, té negro, la cocoa, la cerveza y el vino. Se estima que el valor medio de ingesta de estos alimentos es de 23 mg/día, siendo la quercetina la predominante con un valor promedio de 16 mg por día (Martínez *et al.*, 2002).

Los flavonoides están estructuralmente constituidos por dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C) (Figura 9). Se clasifican con base en el grado de oxidación del anillo C y de la posición del anillo B (Tabla 4), además de que cada sub-grupo se diferencia por la posición y el número de grupos hidroxilo que presentan y de los diferentes grupos funcionales que contienen (metilos, azucares o ácidos orgánicos) (Quiñones y Alexandre, 2012).

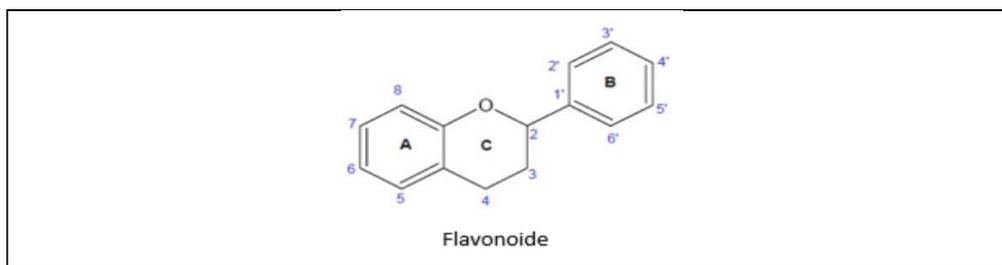
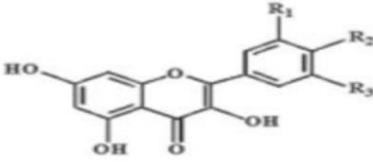
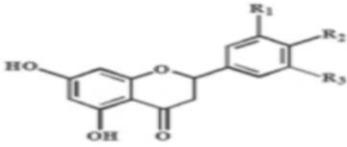
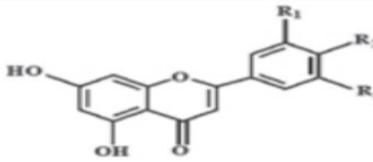
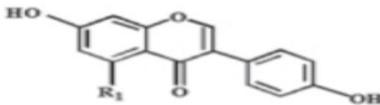
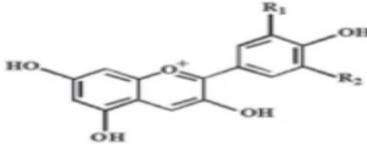
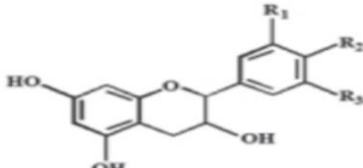


Figura 9. Estructura base de los flavonoides
 Fuente: Adaptado de Quiñones y Alexandre (2012)

Tabla 4: Principales características de los subgrupos que conforman a los flavonoides

Estructura base	Grupos funcionales	Alimentos en los que se presentan
 <p>Flavonoles</p>	<p>R1 y R2= OH, R3=H (Quercetina) R2=OH, R1 Y R3=H (Kaempferol)</p>	<p>Naranjas, manzanas, albaricoques, arándanos, zarzamoras, cervezas, frutos de sauco, pomelos, limones, melocotones, ciruelas, frambuesas, grosellas, uvas, fresas, té y vino</p>
 <p>Flavanonas</p>	<p>R1=OH, R2= OCH₃ (Hesperatina) R1= H, R2=OH (Naringenina)</p>	<p>Toronjas, limones, naranjas, tomates y hojas de menta</p>
 <p>Flavonas</p>	<p>R1 Y R2=OH (Luteolina) R2=OH (Apingenina)</p>	<p>Toronjas, limones, naranjas, pimientos rojos, perejil y apio</p>
 <p>Isoflavonas</p>	<p>R1=OH (Genisteina) R1= H (Daidzeina)</p>	<p>En leguminosas, principalmente la soya y sus derivados</p>
 <p>Antocianinas</p>	<p>R1 Y R2= OH(Delfinidina) R1=OH Y R2=H (Cianidina)</p>	<p>Manzanas, zarzamoras, grosellas, arándanos, nectarinas, melocotones frambuesas, fresas, uvas, peras, betabel, cebolla morada, berenjena, ciertas variedades cereales y vino.</p>
 <p>Flavanoles</p>	<p>R1 Y R2=OH, R3=H (Catequina); R1, R2 Y R3= OH (Galocatequina); Dímeros y oligómeros (procianidinas); Polímeros (proantocianidinas o taninos condensados)</p>	<p>Manzana, albaricoques, nectarinas, melocotones, peras y uvas, fresas, chocolate, vino y té.</p>

Fuente: Adaptado de Quiñones y Alexandre (2012) y Ornelas *et al.* (2012)

Los flavonoides que pertenecen al vasto grupo de compuestos fenólicos son de interés particular ya que parecen pertenecer en todas las funciones que se les atribuyen a los metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides son pigmentos naturales que se encuentran distribuidos en plantas, frutas, verduras y diferentes bebidas (Lock, 1994).

2.3.2. Métodos de extracción

La extracción de compuestos polifenólicos a partir de fuentes naturales es una operación común en la industria de alimentos, llevada a cabo mediante procedimientos tales como: la extracción con disolventes, la destilación a vapor, maceración y ultrasonido, principalmente. Dependiendo del método utilizado, pueden emplearse cantidades variables tanto de disolvente como de energía, obteniéndose diferentes rendimientos (Rodríguez-Riera, 2014).

En años recientes, se han desarrollado tecnologías limpias de extracción de gran eficiencia de componentes biológicamente activos provenientes de fuentes naturales, sin que ocurra pérdida de la actividad biológica, con buen rendimiento y una elevada pureza. La extracción asistida por ultrasonido tiene requerimientos instrumentales bajos y su aplicación resulta oportuna cuando la estabilidad del componente activo a extraer se afecta con las temperaturas elevadas de los procesos convencionales.

Las distintas metodologías propuestas para llevar a cabo la extracción de polifenoles difieren en cuanto a variable de operación tales como: la temperatura, el tipo de disolvente, el tiempo de extracción y la relación soluto-disolvente. La combinación más apropiada de estos parámetros es fundamental para lograr los mejores resultados en cuanto al contenido de polifenoles, flavonoides y otras sustancias antioxidantes (Cruz, 2012).

En general, cualquier proceso está basado en una primera extracción con agua o disolventes orgánicos polares o la mezcla entre ellos (metanol, propanol, acetona, dimetilformamida, acetato de etilo, n-hexano, isooctano, éter de petróleo, éter

dietílico) obteniéndose en el exacto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (Ignat *et al.*, 2011).

Además de los disolventes, también el tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto hasta 24 horas teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones (Bennett *et al.*, 2004).

Las condiciones de extracción y la selección de los disolventes dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos que queremos extraer.

El tiempo óptimo de extracción de polifenoles es de 50-60 minutos (Deshpande, 1985).

Los métodos para la separación de componentes valiosos toman ventaja de la variación de la solubilidad de las fracciones en función del solvente y de la temperatura, por lo cual, esta última debe controlarse durante todo el proceso. Además, algunos de los componentes importantes pueden presentar propiedades termosensibles (Fernoli, 1975).

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material vegetal fresco, aunque esta también puede realizarse con el material vegetal seco siempre y cuando el proceso de secado no altere la composición de los flavonoides. El material vegetal debe molerse finalmente para de esta forma facilitar la extracción de los compuestos flavonoicos; estos compuestos se pueden extraer indistintamente debido a la solubilidad que estos presentan en diferentes solventes orgánicos. Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos instituidos o azúcares son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua. Por otro lado, las agliconas menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en solventes tales como éteres y cloroformo (Baran *et al.*, 1997).

2.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

En años recientes, se han desarrollado tecnologías limpias y extracción de gran eficiencia de componentes biológicamente activos provenientes de fuentes naturales, sin que ocurra pérdida de la actividad biológica con buen rendimiento y una elevada pureza. La extracción asistida por ultrasonido tiene requerimientos instrumentales bajos y su aplicación resulta oportuna la estabilidad del componente activo a extraer se afecta con las temperaturas elevadas de los procesos convencionales. El ultrasonido se basa en el fenómeno de cavitación dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonido dentro de un líquido (Figura 10). El tiempo de vida de la burbuja es del orden de los microsegundos, su impulsión violenta genera, de manera localizada y transitoria, temperaturas elevadas en el interior de la burbuja, presiones y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilos, hidroperoxilos y el peróxido de hidrógeno (Xinfeng Cheng, 2015).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza ondas de frecuencia determinada que facilitan la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas del medio vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. La intensificación en la eficacia de la extracción de productos naturales ha sido atribuida a la propagación de la onda de presión ultrasónica a través del disolvente, lo que genera la cavitación, así como efectos térmicos y mecánicos (Rodríguez- Riera, 2014).

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonido de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente (Gao y Liu, 2005)., como se observa en la Figura 10. De acuerdo con algunos autores esta técnica es más económica y tienen los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas (Rostagno *et al.*, 2003).

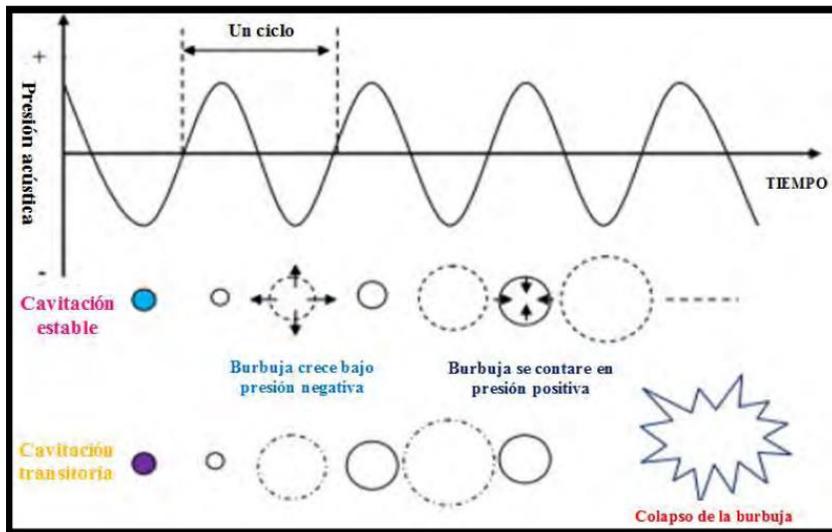


Figura 10. Fenómeno de cavitación en la extracción asistida por ultrasonido (UAE)
Fuente: Xinfeng Cheng (2015)

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

2.4 Generalidades de las grasas y aceites

Químicamente, las grasas son generalmente triésteres del glicerol y ácidos grasos. Las grasas pueden ser sólidas o líquidas a temperatura ambiente, dependiendo su estructura y composición. Aunque la palabra aceites, suele emplearse para referirse a lípidos que son líquidos a temperatura ambiente y grasas suele designar a los lípidos sólidos a temperatura ambiente. La palabra lípidos se emplea para referirse a ambos tipos, líquidos y sólidos (Bailey, 1984).

Todas las grasas son insolubles en agua teniendo una densidad significativamente inferior (Nawar, 2010).

Muchos aceites vegetales son preferibles a las grasas animales para el consumo humano. Esto se debe a que son ricos en ácidos grasos mono o poliinsaturados, una cualidad muy importante para la transformación de grasa en el organismo humano (Lawson, 1999).

2.4.1 Ácidos grasos

Algunas características de los ácidos grasos que influyen en las propiedades físicas y química de grasas, y aceites, son: número de dobles enlaces o insaturaciones en la cadena de carbonos, longitud y posición *cis* ó *trans* del doble enlace (Figura 11 y 12).

Los ácidos grasos saturados se caracterizan porque cada átomo de carbono está unido a otros dos átomos de carbono y a 2 átomos de hidrógeno. Los ácidos grasos insaturados tienen uno o más átomos de carbono enlazados a un segundo átomo de carbono mediante un doble enlace, ocasionando que la molécula no sea lineal (Charley, 2005; Aarhus, 2006; Nawar, 2010).

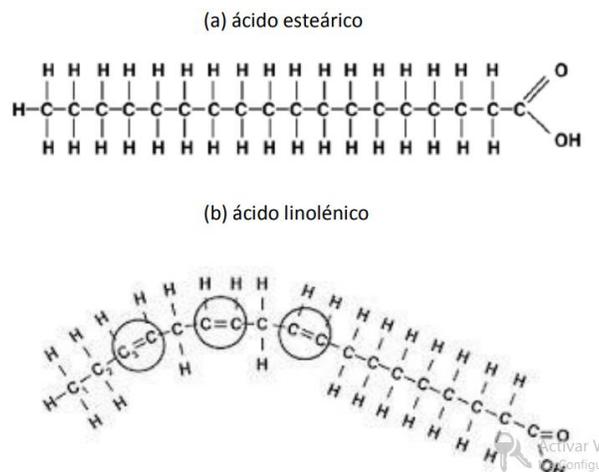


Figura 11. (a) Estructura química de ácido graso esteárico, (b) Estructura química de ácido graso insaturado linoleico
Fuente: (Aarhus, 2006).

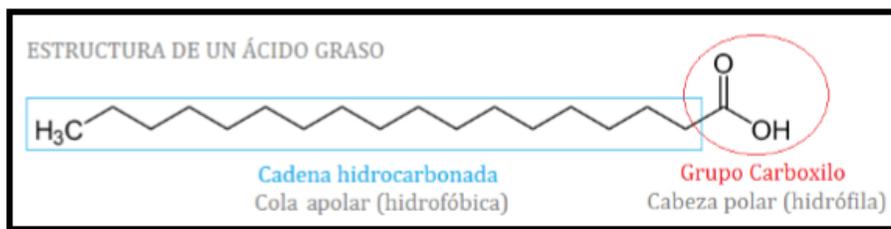


Figura 12. Estructura general de un ácido graso
Fuente: Gogus y Smith (2010)

Si la cadena de carbonos es larga y saturada, el punto de fusión del compuesto se incrementará, de manera inversa entre más dobles enlaces o insaturaciones tenga la cadena de carbonos, el punto de fusión disminuirá (Charley, 2005; Kellens, 2013),

Los aceites contienen ácidos grasos insaturados o polinsaturado, que le dan la característica líquida a temperatura ambiente. Los aceites insaturados, son susceptibles a la hidrogenación, con la que se elaboran las margarinas, donde los aceites líquidos se transforman en grasa o en una sustancia semisólida. Estos aceites hidrogenados son nocivos para la salud, ya que contribuyen al aumento de los niveles de colesterol en sangre, mucho más que las grasas vegetales o las animales, debida a su contenido en ácidos grasos *trans* (Ziller, 1996).

2.4.2 Principales cambios químicos durante el almacenamiento de los aceites

2.4.2.1 Oxidación lipídica

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

2.4.2.2 Tipos de oxidación

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

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

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

Por su parte los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como lo es el ácido α linolénico que pertenece a la familia ω -3 de ácidos grasos esenciales, son que poseen, es de un doble enlace entre sus carbonos como la Figura que ofrecen importantes beneficios para la salud y nutrición, como la protección contra enfermedades cardiovasculares, precepción de artritis, cáncer,

enfermedades coronarias, diabetes, entre otros (Gogus y Smith, 2010). Sin embargo, difieren según el grado de insaturación (Figura 13).

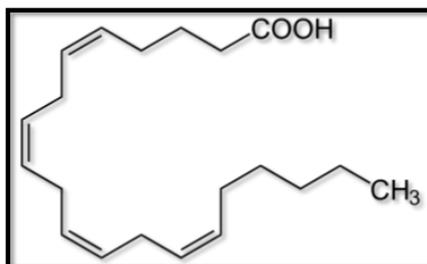


Figura 13. Estructura de un ácido graso poliinsaturado

Fuente: Gogus y Smith (2010)

Sin embargo, la presencia de PUFAs en los alimentos determina en gran medida la estabilidad oxidativa del aceite. De esta manera, cualquier especie oxidante cuyo potencial de reducción se encuentra por encima del de los PUFA-H puede iniciar la oxidación (Gogus y Smith, 2010).

2.4.2.3 Factores que inciden en la autooxidación

Los factores que inciden en la autooxidación de lípidos son: (Mercedes *et al.*, 2009):

- **Temperatura:**

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

- **Metales:**

El cobre y el hierro promueven el inicio de la autooxidación, aunque se encuentren en concentraciones menores que 1 ppm, por lo que es muy

importante evitar todo contacto con recipientes o equipo elaborado con estos metales. El cobre tiene más especificidad para catalizar la oxidación de las grasas lácteas, mientras que el segundo favorece la oxidación de los aceites vegetales. Los ácidos grasos libres solubilizan estos iones y facilitan su acción catalizadora pues, provocan un mayor contacto con el lípido.

- **Luz:**

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

- **Actividad acuosa:**

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

“Si tiene un sueño y crees en él, corres el riesgo de que se convierta en realidad”

-Walt Disney



3. OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Extraer compuestos bioactivos provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en diferentes condiciones de extracción por ultrasonido, así como la caracterización química de los extractos obtenidos para su aplicación como antioxidante en una margarina.

3.2 Objetivos Particulares

Objetivo particular 1. Extraer compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por ultrasonido a 20 y 40 minutos utilizando diferentes mezclas agua-etano (30-70 % y 80-20 % agua) para seleccionar las condiciones que permitan obtener los compuestos con mayor capacidad antioxidante y altos rendimientos.

Objetivo particular 2. Extraer compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil por ultrasonido variando la temperatura (23 °C y 70 °C) para seleccionar las condiciones que permitan obtener los compuestos con mayor capacidad antioxidante y altos rendimientos.

Objetivo particular 3. Identificar los compuestos bioactivos en el extracto obtenido a partir de las condiciones propuestas, mediante electroforesis capilar del extracto etanólico para su posterior aplicación a una margarina.

Objetivo particular 4. Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de extracto natural de la flor de cempasúchil y un antioxidante sintético sobre la oxidación lipídica en margarina evaluando parámetros de calidad (índice de acidez, índice de peróxidos, índice de Kreis), para establecer la concentración de antioxidante natural que evite la rancidez del producto.



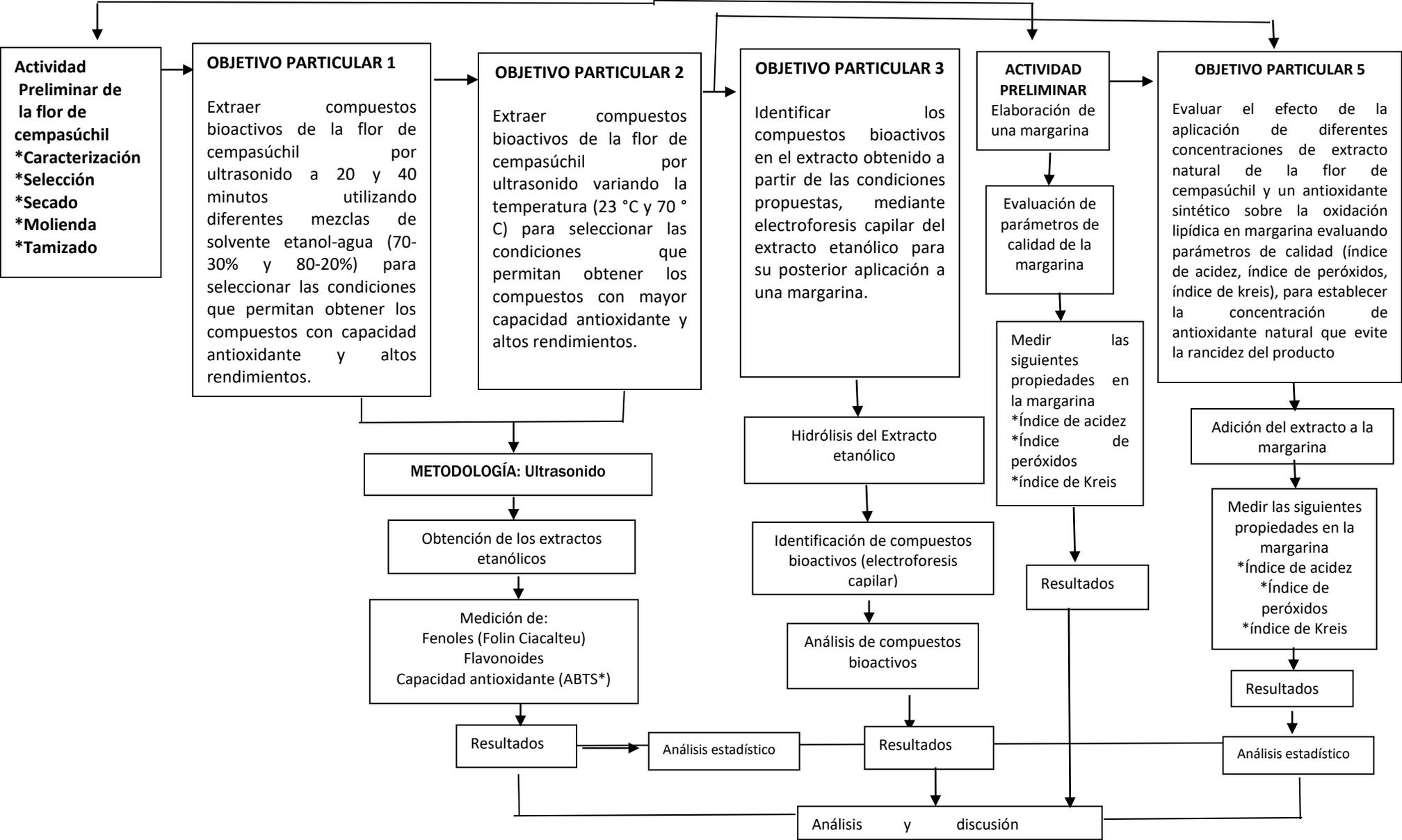
4. Metodología Experimental

El éxito no es la clave de la felicidad.

La felicidad es la clave del éxito.

-Herman Cain

OBJETIVO GENERAL:
Extraer compuestos bioactivos provenientes de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en diferentes condiciones de extracción por ultrasonido, así como la caracterización química de los extractos obtenidos para su aplicación como antioxidante en una margarina.



4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Material de estudio

La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) que se empleó es originaria del estado de Estado de México, la cual fue transportada al laboratorio de Postcosecha del Centro de Asimilación Tecnológica de la FESC-UNAM para su posterior acondicionamiento.

4.2 Acondicionamiento de la flor de cempasúchil

La flor de cempasúchil fue tratada previamente para poder realizar la extracción de compuestos, el procedimiento que se llevó a cabo se observa en la Figura 14.

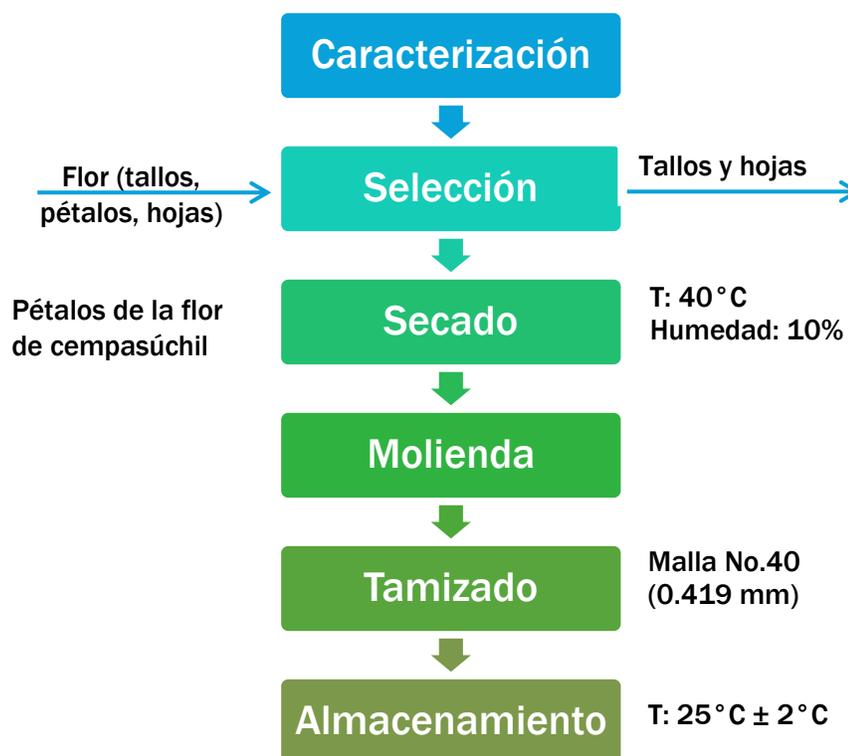


Figura 14. Diagrama de bloques para el acondicionamiento de la flor de cempasúchil

La flor de cempasúchil se recibió en forma de manojos, los cuales fueron almacenados en la cámara de refrigeración para evitar el deterioro de éstos.

Caracterización: Se llevó a cabo una caracterización en función del color, de esta manera se seleccionó un rango de tonalidad de las flores; eliminando las que no cumplieron con un color amarillo intenso a naranja (Figura 15 A).

Selección: Se realizó la selección de la parte aérea de la flor, por lo que se deshojó de forma manual para trabajar con los pétalos, y el resto fue desechado.

Secado: Se realizó el secado en donde los pétalos fueron colocados en charolas de forma uniforme para someterse a un secado por estufa alcanzando una humedad final de 10 ± 2 %.

Molienda y tamizado: Se procedió a una molienda para disminuir el tamaño de partícula haciéndolo pasar por una malla No.40, obteniendo así un tamaño de partícula de 0.419 mm (Figura 15B).

Almacenamiento: La flor en polvo fue envasada y almacenada en un lugar seco a una temperatura de 25 ± 2 °C para su posterior uso (Mendoza, 2018).



Figura 15. Pétalos de la flor de cempasúchil (A) y Flor de cempasúchil seca y molida (B)

4.3 Obtención de los extractos etanólicos de la flor de cempasúchil

Una vez secos y molidos los pétalos de la flor de cempasúchil, se procedió a la obtención de los compuestos bioactivos mediante el método de extracción por ultrasonido en donde se empleó una relación 1:10 muestra: solvente, utilizado como solvente una mezcla de etanol-agua (70:30) y (80:20), por 20 y 40 minutos. Posteriormente los extractos se almacenaron (Figura 16).



Figura 16. Diagrama de proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil.



Figura 17. Extractos etanólicos de la flor de cempasúchil

Posteriormente se evaluó el efecto de la temperatura (25 y 70 °C) y el tiempo (20 y 40 min) de extracción de compuestos bioactivos por el método de ultrasonido. Para establecer las condiciones idóneas se evaluó en los extractos el contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante.

4.4 Identificación de compuestos polifenólicos mediante electroforesis capilar

Para poder ser empleado en la industria es necesario tener la certeza de los compuestos que presentan, su estructura y reactividad para así asegurar la producción de un producto saludable para el consumo humano.

4.4.1 Equipo

Para realizar la identificación de polifenoles se empleó la técnica de electroforesis capilar utilizando un equipo marca Berckman Coulter, modelo P/ACE™ MDQ con detector de arreglo de diodos a 200 nm (Figura 18).



Figura 18. Equipo de electroforesis capilar

4.4.2. Estándares.

Para la identificación de los polifenoles se utilizaron los estándares que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Información de estándares empleados para identificación de polifenoles

Nombre	Pureza
Naringina	≤95.0 %
Ácido gálico	≤97.0 %
Catequina hidrato	≤98.0 %
Ácido clorogénico	≤95.0 %
Ácido siríngico	≤95.0 %
Tirosol	≤95.0 %
Kaempferol	≤90.0 %
Epicatequina	≤90.0 %
Arbutina	≤95.0 %
Quercetina hidrato	≤95.0 %
Apigenina	≤97.0 %
Ácido dihidroxibenzoico	≤96.0 %
Rutina	≤94.0 %

4.4.3. Condiciones para la Identificación de polifenoles por electroforesis capilar

La identificación de compuestos se llevó a cabo según las etapas descritas por Granados López en 2014 (Figura 19).

En la tabla 6 y 7 se muestran los procedimientos de lavado inicial del capilar y para la separación de compuestos fenólicos por electroforesis capilar.

Tabla 6. Procedimiento de lavado al inicio del capilar

ETAPA	PRESIÓN (psi)	Tiempo (min)	Solución
ENUAGUE	20	5	Agua desionizada
INYECCIÓN	20	10	NaOH (0.1 M)
SEPARACIÓN	20	5	Agua desionizada
ENUAGUE	20	10	Buffer boratos pH 9.4 30 mm

Fuente: Granados López (2014)



Figura 19. Proceso de separación por electroforesis capilar

Tabla 7. Procedimiento de separación de compuestos fenólicos por electroforesis capilar

Evento	Operación	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	15 min	Buffer (boratos 50 mM)
2	Inyección	Presión	5 s	Muestra
3	Espera	-	0.2 s	Buffer (boratos 50 mM)
3	Separación	Voltaje	25 min	Buffer (boratos 50 mM)

Fuente: Granados López (2014)

4.4.4 Hidrólisis del extracto para identificación de compuestos

Para identificar compuestos que suelen encontrarse unidos a azúcares o polimerizados, se llevó a cabo la hidrólisis del extracto etanólico.

4.4.4.1 Preparación de solución hidrolizante

La solución hidrolizante debe contener los siguientes reactivos, para ello fue necesario realizar los cálculos correspondientes para obtener la cantidad de reactivo a agregar (Granados, 2014).

- NaOH 1.8 N
- 10mM EDTA 98 %
- Ácido ascórbico 1 %

Para hidrolizar el extracto fue necesario agregar en partes iguales solución hidrolizante y extracto etanólico, calentar a baño maría a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos con agitación constante, posteriormente se centrifugó durante otros 30 minutos y se filtró la solución resultante (Figura 20).



Figura 20. Muestra del extracto para identificación de compuestos

El extracto se concentró por evaporación controlada del disolvente utilizando un evaporador con un flujo de nitrógeno a 20 psi de presión y 35 °C de temperatura durante 30 minutos para disminuir el volumen del extracto, posteriormente se adicionaron 5 ml de solución hidrolizante.

La solución anterior fue puesta en baño de agua con agitación constante a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos, el hidrolizado se trasvasó a tubos de centrifuga de polisulfona y se centrifugó a 8000 rpm durante un periodo de 15 minutos; el sobrenadante fue filtrado a través de acródiscos milipore de 0.45 µm de tamaño de poro, posterior a ello se llevó a un volumen de 10 ml y fue sometido al proceso de separación por electroforesis capilar (Figura 21 y 22).



Figura 21. Hidrólisis del extracto



Figura 22. Identificación de compuestos por electroforesis capilar

4.4.5. Identificación de polifenoles en extracto etanólico hidrolizado a partir de electroforesis capilar.

La solución hidrolizada se identificó mediante electroforesis capilar obteniendo el siguiente electroferograma (Figura 23).

4.5 Formulación de la margarina

Los aceites utilizados para la elaboración de la margarina fueron aceite de coco y aceite de oliva (Figura 23). La formulación propuesta se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Formulación para la elaboración de la margarina

Ingredientes	Porcentaje (%)
Aceite de coco	52.80
Aceite de oliva	19.44
Yema de huevo	13.88
Leche	11.11
Saborizante (vainilla)	2.77



Figura 23. Aceite de oliva (A) y aceite de coco (B)

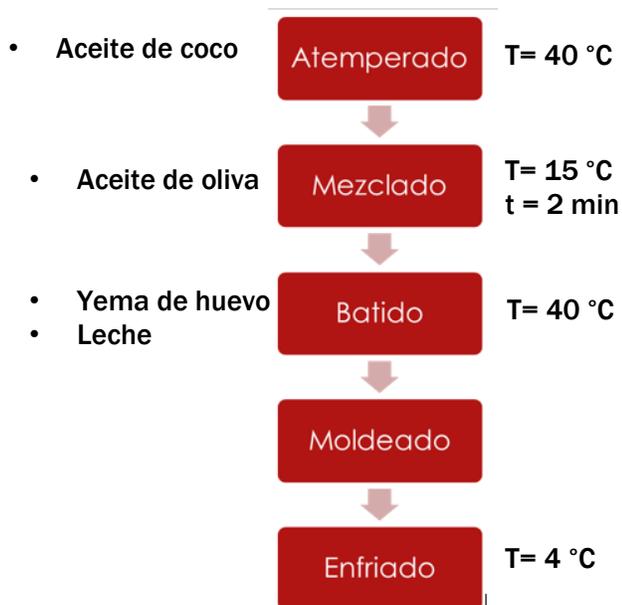


Figura 24 Diagrama de proceso para la elaboración de una margarina sabor vainilla

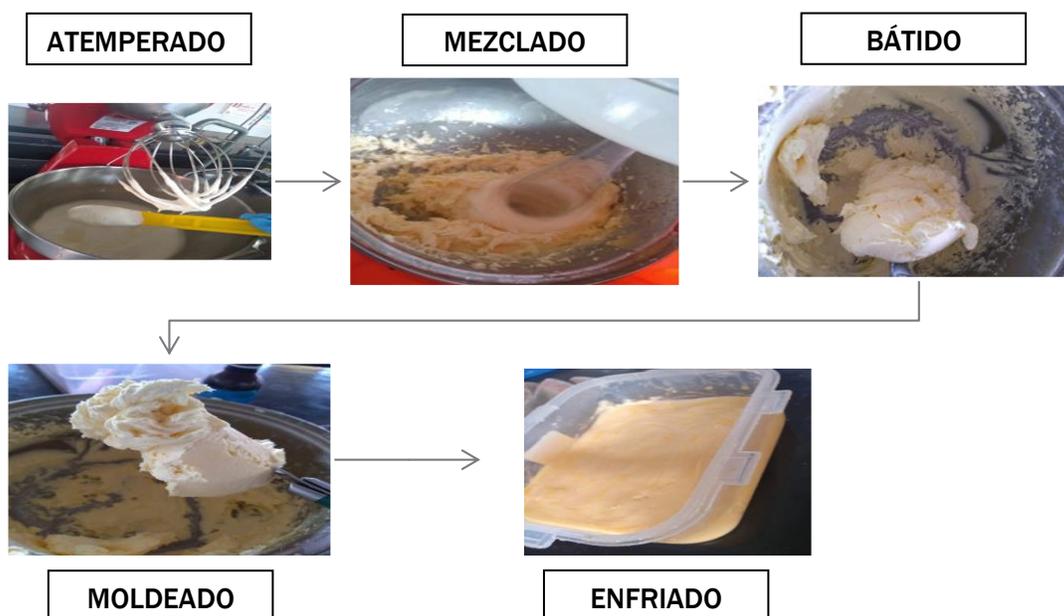


Figura 25. Diagrama de elaboración de la margarina

4.6 Evaluación de la oxidación lipídica en la margarina

Para la evaluación del efecto antioxidante de los extractos de cempasúchil, primero fue necesario realizar una margarina, ya que las existentes en el mercado ya contienen antioxidantes.

4.6.1 Evaluación del efecto antioxidante de los extractos de cempasúchil aplicado en la margarina

Para medir el efecto antioxidante del extracto de flor de cempasúchil en el control de la oxidación lipídica, se evaluaron diferentes parámetros de calidad (índice de acidez, índice de peróxidos e índice de Kreis; en la margarina elaborada con aceite de coco y aceite de oliva bajo condiciones de deterioro, es decir, induciendo la oxidación por medio de la elevación de la temperatura a 150 °C durante 10 y 20 minutos, comparando con una muestra control, una muestra con la adición del antioxidante natural a partir de la flor de cempasúchil a concentraciones de 0.05,

0.8 y 0.1 % y otra muestra con antioxidante sintético (BHT) a una concentración máxima permitida de 75 mg/kg; en alimentos como una margarina.

4.7 Técnicas analíticas

- **Fenoles totales**

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (SIGMA-ALDRICH), a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente, lo cual se realizó en un espectrofotómetro marca VELAB modelo VE-5600UV a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de polifenoles (García-Martínez *et al.*, 2016). En cuanto más contenido de fenoles tenga una sustancia, los químicos harán que el color azul tenga una mayor intensidad, como se muestra en la Figura 27. Donde la curva tiene diferentes concentraciones de ácido gálico, provocando las diferentes tonalidades de azul. Por esto los resultados se reportan en g o mg AG/ 100 b.h.



Figura 26. Curva patrón empleado para la cuantificación de fenoles

- **Flavonoides**

La quercetina, es un citroflavonoide que confiere una coloración amarillo-verdoso, dentro de este grupo se encuentran el Kaempferol y mircetina (Figura 27). El contenido total de flavonoides (CFT) de los extractos es establecido por espectrofotometría (Cornejo-García, 2012). Los resultados se expresan en mg de Quercetina/ mg de muestra.



Figura 27. Evaluación del contenido de flavonoides

- **Capacidad antioxidante**

El método se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical catiónico de color verde azulado ABTS⁺ se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio, por lo que se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical a 734 nm, como porcentaje de inhibición catión ABTS⁺ (Re *et al.*, 1999). Para la determinación se empleó Trolox como estándar y los resultados se expresaron en mM Trolox.

La capacidad antioxidante se reporta como equivalente de Trolox, se basa en la decoloración del radical catiónico ABTS⁺ como resultado de la transferencia de un átomo de hidrógeno de un compuesto antioxidante (Borrelli *et al.*, 2002).

Los extractos se obtuvieron mediante la extracción por ultrasonido con una mezcla etanol-agua (70-30 %) a 70 °C durante 40 minutos con una relación 1:400. El radical libre fue producido mediante la reacción con persulfato de potasio y el

reactivo ABTS. La solución se ajustó a una absorbancia de 0.700 ± 0.2 a 734 nm. Para la curva patrón se llevaron a cabo ensayos con cada una de las soluciones preparadas del estándar Trolox (200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 μl) de la solución del radical coloreada de ABTS y agitar y una vez que transcurrieran 7 min. Se midió la absorbancia a 7834 nm y registró la lectura AF (señal inhibida). Por cada solución del estándar Trolox, se preparó una celda a la que se le añadió 100 μl de metanol a 1900 μl de la solución del radical coloreado ABTS. La absorbancia se midió a 734 nm y se registró la lectura como A_0 (blanco o señal no inhibida). Los resultados se expresaron en mmol equivalentes de Trolox / g de muestra (Figura 28).

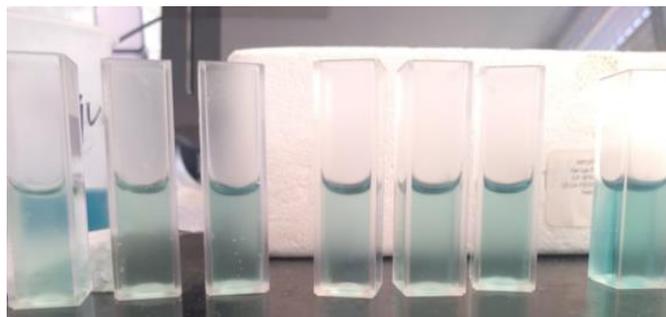


Figura 28. Determinación de la curva estándar para determinación de la capacidad antioxidante

- **Índice de acidez**

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

El procedimiento se efectuó por triplicado, consistió en pesar 1 g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL de alcohol neutralizado (empleando tiras de indicador de pH) 60 °C, para después titular con KOH 0.0025 N, se agitó después de cada adición de álcali (Figura 29). El índice de acidez se calculó como mg de KOH por g de muestra y el índice de acidez como % ácido oleico (A.O.A.C, 1980 y Kira, 1991).



Figura 29. Evaluación de acidez

- **Índice de Peróxido**

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

Para llevar a cabo la determinación se pesó 1 g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se agregó 10 mL de solución de ácido glacial y cloroformo 3:2, y 0.16 mL de una solución saturada de KI, una vez transcurrido 1 min se le añadió 10 mL de agua destilada y como indicador 0.16 mL de almidón al 1 %, se procedió a titular con una solución de tiosulfato sódico al 0.1 N (Kira, 1991). Los resultados se expresan en miliequivalentes de peróxido por kg de muestra (Figura 30).



Figura 30. Evaluación de índice de peróxido

- **Índice de Kreis**

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

Empleando tubos de ensaye, se añadió 0.5 g de muestra, a estos se le agregaron 1 mL de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 0.25 mL de disolución de floroglucina, la mezcla se agitó burbujeando aire entre 2 a 3 segundos, posteriormente se calentó a baño María a 45 °C por 15 minutos. Las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm frente a un blanco de reactivos. El índice de Kreis se calculó como la absorbancia a 545 nm/g de grasa (Figura 31).



Figura 31. Determinación de índice de kreis

- **Color**

El color de las muestras se determinó con ayuda de un colorímetro Minolta Modelo CR300, el cuál es un instrumento diseñado para dirigir un haz de luz paralela monocromática a través de una muestra y medir la intensidad del haz luminoso emergente. La fracción de luz incidente absorbida por la muestra a una longitud de onda está relacionada con el paso óptico y con la concentración de la especie absorbente (X-rite, 2002).

Para la determinación de color se colocó el colorímetro en la superficie del objeto al cuál se le determinó este parámetro, como se muestra en Figura 33. Una vez realizada la medición, se obtendrán las coordenadas L, a y b con las cuales se calculó, luminosidad, tonalidad y croma.

La tonalidad del ángulo Hue ($^{\circ}$ Hue) se calcula con los valores a y b

$$H = \arctan(b/a)$$

En caso de que sea negativa y b positiva se calcula de la siguiente forma:

$$H = 180 + \arctan(b^*/a^*)$$

El croma que indica la intensidad o saturación de color, se calcula mediante la ecuación:

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

Con base a estos atributos del color se derivan varios indicadores que ayudan a conocer el deterioro o cambio de color en un material en particular teniendo como restricción las características de este y los procesos a los que le han sometido.

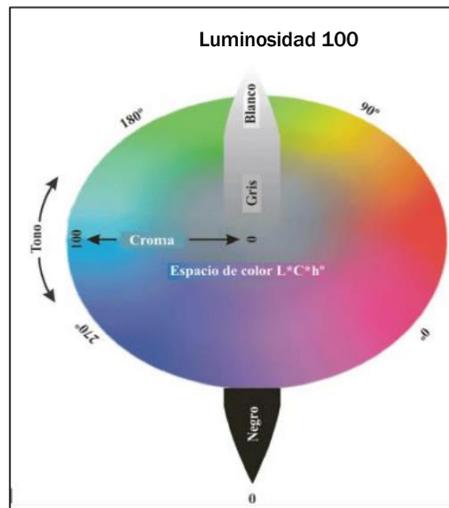


Figura 32. Representación del espacio cromático cilíndrico CIE-L*a*b*

Fuente: Padrón-Pereria et al. (2012)

4.8. Análisis estadístico

Para el desarrollo de este experimento se propuso un diseño factorial completo de dos factores a dos niveles (2^2) con tres réplicas del punto central. El diseño propuesto se realizó en el programa DX5.

El diseño experimental se realizó para la medición de todos los parámetros.

Las variables de respuestas fueron analizadas mediante un ANOVA.

“Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber”

-Albert Einstein



5.RESULTADOS y DISCUSIÓN

5. Resultados y Discusión

5.1. Evaluación del contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante de extractos de flor de cempasúchil

Para la extracción de los compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil se cuantificaron los fenoles totales, los flavonoides y la capacidad antioxidante.

5.1.1. Cuantificación de fenoles totales

Las numerosas investigaciones químicas, biológicas y farmacológicas llevadas a cabo sobre los fenoles están ampliando el conocimiento e importancia de estos compuestos en la vida humana (Okude e Ito, 2011). Es difícil encontrar un sector en el que los fenoles no tengan cabida, bien de forma natural o como aditivos. Esta gran aplicabilidad se debe a sus variadas propiedades antioxidantes (Sochor *et al.*, 2010; Motilva *et al.*, 2013; Tuyen *et al.*, 2017).

La alimentación como actividad industrial o comercial de productos alimenticios, es donde más valor se da a los compuestos fenólicos, diferenciando dos grupos principales: 1) Alimentos cuyo contenido fenólico es intrínseco al propio producto y, 2) productos a los que se les incorpora o incrementa este tipo de compuestos (Arapitsas, 2012).

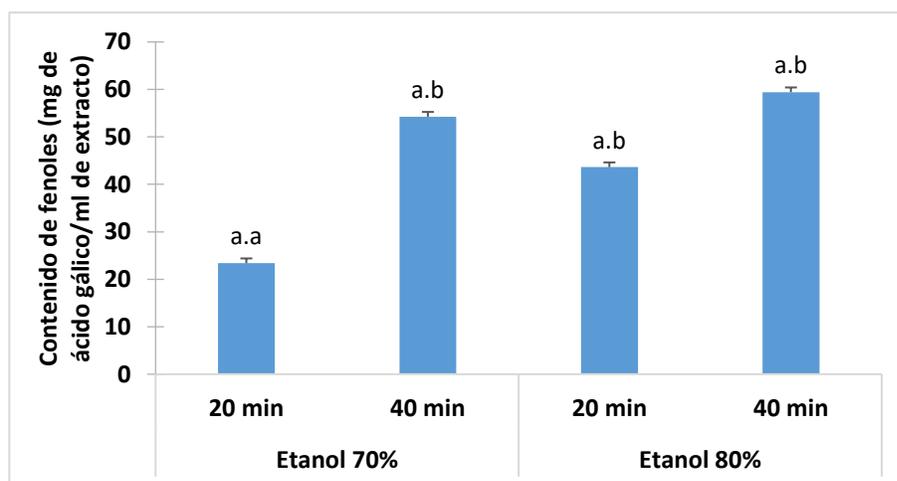


Figura 33. Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE bajo diferentes condiciones. La primera letra representa que

diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la solución, mientras que la segunda letra representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

En la Figura 33 se presentan los resultados obtenidos del contenido de fenoles totales de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de ultrasonido a temperatura ambiente (25 °C).

Como se observa en la Figura 33, el contenido de fenoles fue 8.6 % mayor en los extractos obtenidos con una mezcla etanol-agua (80-20) durante 40 min, alrededor de 59.41 mg de ácido gálico / ml del extracto de flor de cempasúchil no habiendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la mezcla de la solución cuando se emplea una mezcla etanol-agua 70-30 % y una de 80-20 % durante 40 minutos, a diferencia de lo que se observó en el tiempo de extracción donde muestra diferencia significativa ($p \leq 0.05$) observando que al aumentar el tiempo de 20 a 40 minutos, la extracción por ultrasonido aumenta el contenido de fenoles en un 56.8 %.

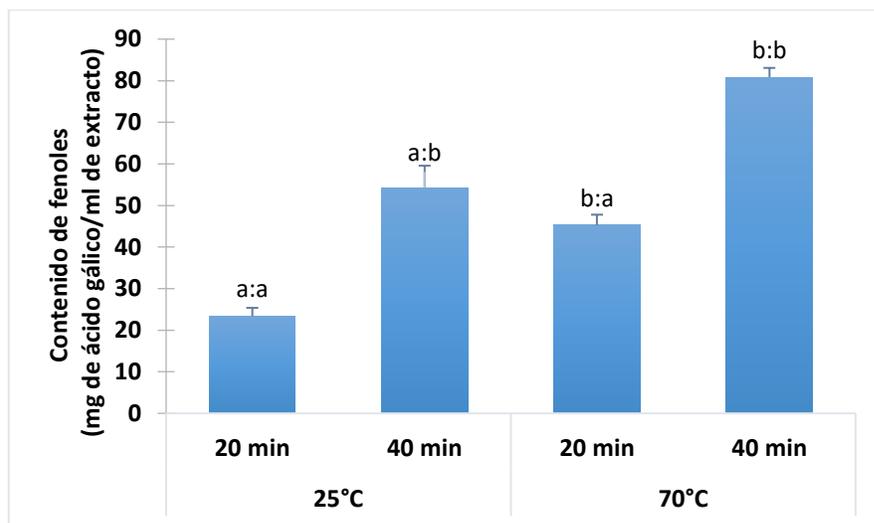


Figura 34. Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE empleando una mezcla etanol: agua en una proporción 70:30 bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo. La primera letra representa que diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la solución, mientras que la segunda letra representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

En la Figura 34 se muestra el efecto de la temperatura en la extracción de los compuestos bioactivos.

La temperatura es una de las variables más importantes durante la extracción por ultrasonido, ya que resulta ser más eficiente la obtención de compuestos al incrementar la temperatura. Se observa que los extractos obtenidos a una temperatura de 70 °C durante 40 minutos presentaron el mayor contenido de fenoles totales: 80.85 mg de ácido gálico/ ml de extracto en la flor de cempasúchil, con respecto al contenido de fenoles en el extracto obtenido a temperatura ambiente (23 °C). Los resultados obtenidos pueden ser explicados de investigaciones anteriores, donde se ha establecido que el incremento de temperatura favorece las reacciones de división, el rompimiento de la pared celular, y debido a que la energía térmica aumenta la vibración molecular y por lo tanto la división y separación de los compuestos, lo que favorece la ruptura de fuerzas intermoleculares y de algunos enlaces (Duque, 2005), dando como resultado mayor contenido de fenoles en el extracto.

5.1.2 Cuantificación de flavonoides

Los flavonoides que pertenecen al vasto grupo de compuestos fenólicos son de interés particular ya que parecen pertenecer en todas las funciones que se les atribuyen a los metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides son pigmentos naturales que se encuentran distribuidos en plantas, frutas, verduras y diferentes bebidas (Lock, 1994).

Los flavonoides son compuestos fenólicos con una alta capacidad antioxidante que están presentes en la mayoría de las plantas, especialmente en las frutas y las hortalizas. Su actividad antioxidante ha atraído fuertemente la atención de las industrias de procesamiento de alimentos y de las compañías de pigmentos, cosméticas y farmacéuticas por lo cual la importancia de su cuantificación y las aplicaciones de los flavonoides.

En el caso del contenido de flavonoides, se observa en la figura 35 que hay mayor concentración de estos compuestos con la mezcla de disolvente etanol-agua (70-30 %), presentando diferencia significativa con respecto a los datos obtenidos en el extracto con 80 % etanol.

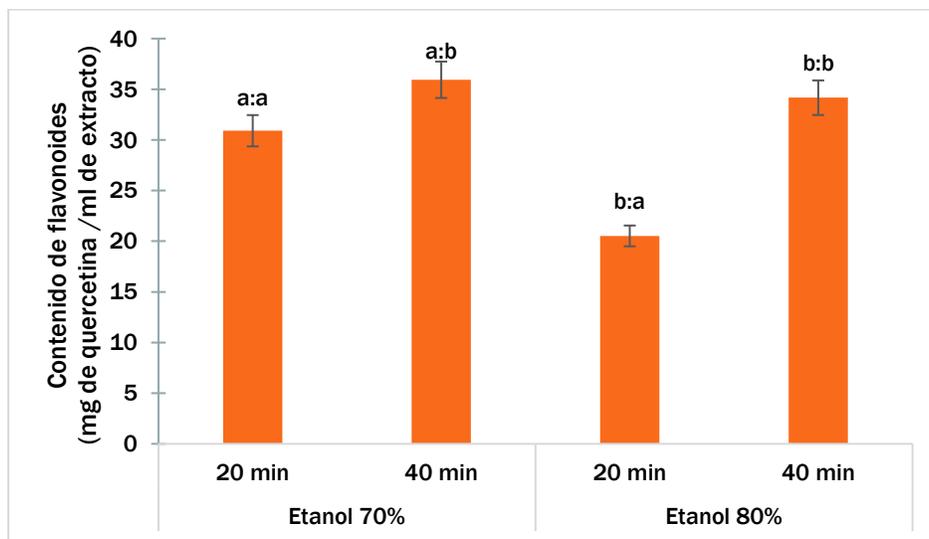


Figura 35. Contenido de flavonoides presentes en los extractos de la flor de campasúchil obtenidos por el método de UAE a mezclas etanol-agua (70:30) % y (80:20) % por 20 y 40 minutos. La 1ra letra indica que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la solución mientras que las 2das letras indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

Por otro lado, para 70 % de etanol también se presentó efecto por el tiempo de extracción en donde a 20 minutos se obtuvieron 30.90 mg de quercetina/ ml de extracto y al aumentar el tiempo de extracción a 40 min también aumenta el contenido de flavonoides obteniéndose 35.92 mg de quercetina/ml de extracto, es decir que el tiempo también presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

En el caso del contenido de flavonoides, se observa que hay mayor concentración de estos compuestos es con una mezcla etanol-agua (70:30 %) por 40 minutos a 70 °C, lo que sucede es que al aumento del tiempo favorece la ruptura de la pared celular del material, logrando mayor extracción de compuestos, resultando ser diferentes significativamente ($p \leq 0.05$) en la de compuestos en el extracto cuando

se somete a una temperatura de 25 °C y 70 °C por 40 min , presentando una concentración de flavonoides del 35.93 mg de quercetina/ml de extracto.

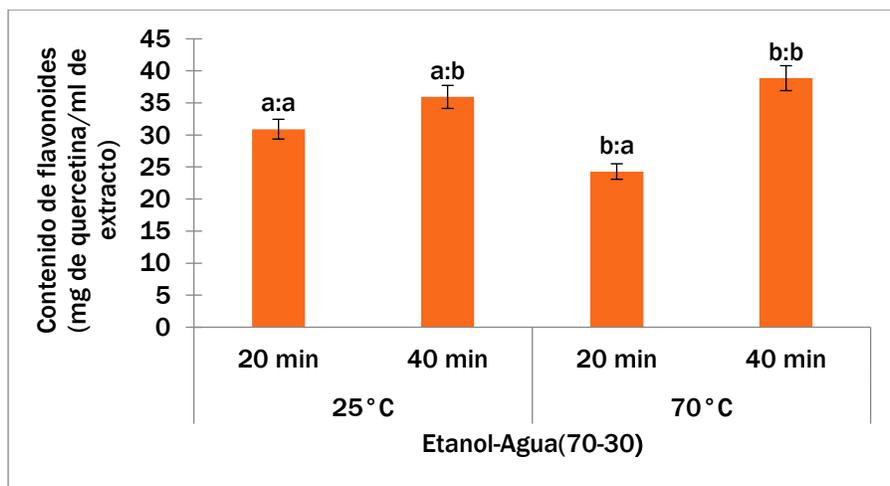


Figura 36. Contenido de flavonoides presentes en los extractos de la flor de compasúchil obtenidos por el método de UAE a 25 °C y a 70 °C, durante 20 y 40 min. La primera letra representa que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la temperatura, mientras que la segunda letra representa que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

Como se observa la Figura 36 se encontró mayor concentración de flavonoides en los extractos obtenidos por ultrasonido a 70°C y 40 minutos siendo de 38.86 mg de quercetina/ml de extracto, comparado con los extractos obtenidos a una temperatura de 25°C siendo 35.93 mg de quercetina/ ml de extracto, esto debido a que la temperatura pudo ayudar a mejorar la extracción de los compuestos flavonoides esto debido a que el fenómeno de cavitación que está presente en el método de UAE , y la alta presión junto con la temperatura que se genera, destruye las paredes celulares de la planta matriz y el contenido es puesto en libertad en el medio (Chemat *et al.*, 2011).

De acuerdo con Badui (2006), la resonancia que le confieren los anillos bencénicos presentados en la estructura de los flavonoides; hace que la estabilidad molecular sea mayor, soportando tanto bajas y altas temperaturas, hasta 300 °C, a su vez pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos

sin perder sus propiedades estructurales, además de ser muy estables al calor, pues se observa que mientras transcurre el tiempo, dichos compuestos parecen tener mayor estabilidad.

5.1.3 Capacidad antioxidante

En diferentes estudios se han reportado la capacidad de ciertos compuestos para retrasar la oxidación de aceites vegetales, así como de grasa de origen animal (Eskin y Przybylski, 2000) estudiaron antioxidantes sintéticos y naturales aplicándolos en aceite para observar que compuestos retrasaban la oxidación con mayor efectividad. Sin tomar en cuenta los compuestos sintéticos, el kaempferol, la quercetina y mirecetina presentaron 56.70 y 80 % de inhibición de la formación de los peróxidos (Eskin y Przybylski, 2000).

Es necesario mencionar que compuestos fenólicos tales como flavonoides y derivados del ácido cinámico (ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido sinápico y caféico), son considerados antioxidantes primarios, pues al contener hidrógenos fenólicos hacen que tengan un carácter ácido, lo que hace que sean aceptores de radicales libres, y de acuerdo con el pH en que se encuentran pueden actuar como agente quelante de metales (Decker, 2002).

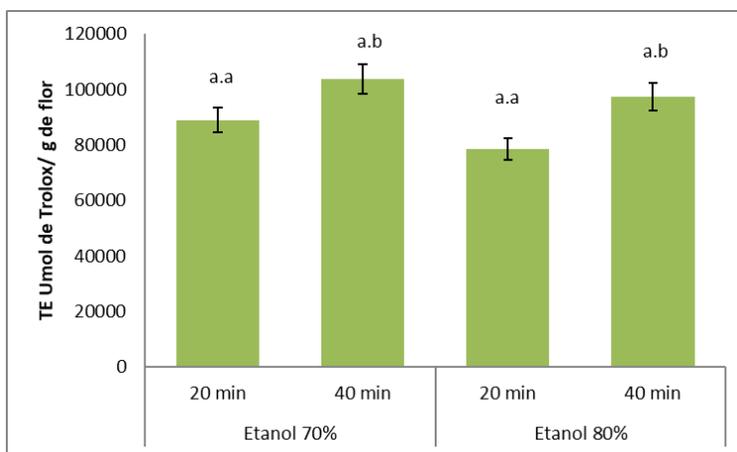


Figura 37. Contenido de capacidad antioxidante en los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE a mezclas etanol-agua (70:30), (80:20) por 20 y 40 minutos. La primera letra representa que no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por la solución mientras que la segunda letra representa que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

La capacidad antioxidante de la flor de cempasúchil fue determinada ya que presenta el patrón encontrado en el contenido de fenoles totales, debido a que esta propiedad está relacionada con el tipo de compuestos fenólicos contenidos.

Como se puede observar en la Figura 38 la capacidad antioxidante tiene la misma tendencia que la de flavonoides, de tal manera que el extracto que presenta la mayor capacidad antioxidante es con una mezcla etanol-agua (70:30) a 40 minutos dando como resultado 163.22 TE $\mu\text{mol/g}$ de flor de cempasúchil representando que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) por la solución, pero sí por el tiempo de extracción (Figura 37).

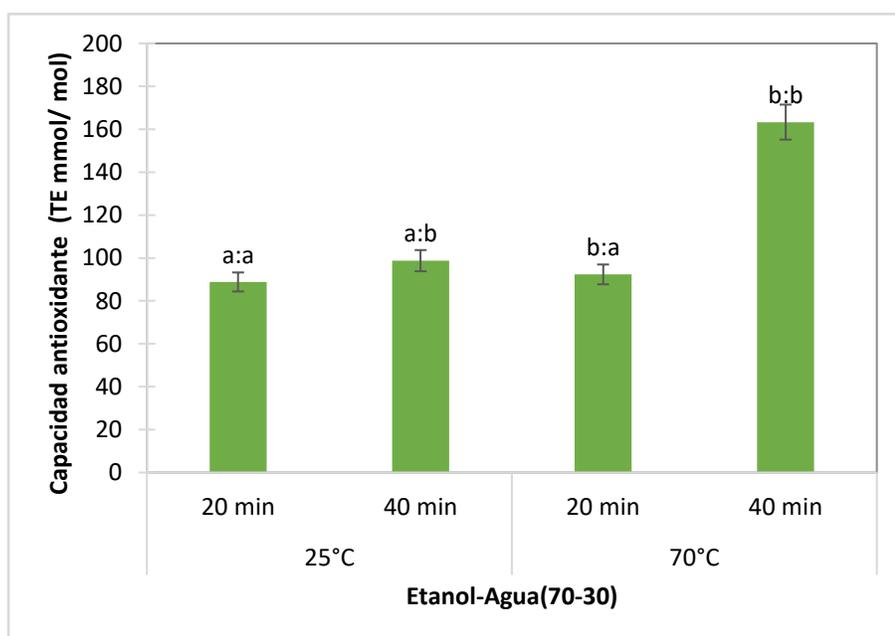


Figura 38. Capacidad antioxidante de los extractos de la flor de cempasúchil obtenidos por el método de UAE a temperatura ambiente y a 70 °C con diferentes tiempos. La primera letra representa que no hay diferencia significativa ($p\leq 0.05$) por la temperatura mientras que la segunda letra representa que hay diferencia significativa ($p\leq 0.05$) por el tiempo de extracción.

Como se puede observar en el caso de capacidad antioxidante, evaluando tiempo y temperatura se observa una tendencia similar a lo obtenido en el contenido de fenoles totales, en donde la mayor concentración de estos compuestos se observa en los extractos obtenidos a una temperatura de 70 °C durante 40 minutos

alrededor de 163.32 TE $\mu\text{mol/g}$ de flor de cempasúchil aproximadamente (Figura 38), si se habla del tiempo, presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$), en la capacidad antioxidante los extractos obtenidos con un proceso de 40 min a 70 °C, debido a que el aumento de la temperatura y el tiempo se vio favorecida la ruptura de la pared celular del material, logrando mayor extracción de compuestos fenólicos y por lo tanto también aumentando la capacidad antioxidante en un 52.53 % cuando se somete a una temperatura de 20 a 40 min. Es decir, en este caso la actividad antioxidante está dada principalmente por los compuestos fenólicos y de éstos, dicha respuesta está dada por la estructura que poseen (Rastija y Medic, 2009).

5.2 Identificación de polifenoles en extracto etanólico hidrolizado a partir de electroforesis capilar.

La principal razón para realizar la identificación de polifenoles presentes en un extracto etanólico de flor de cempasúchil fue que estos polifenoles se pretenden utilizar como una fuente alternativa de conservadores para la producción de aceites y mantequillas orgánicos, logrando así la disminución en el uso de reactivos nocivos para la salud y por ende la disminución de contaminación. Pero para antes poder ser empleado en la industria es necesario tener la certeza de los compuestos que presentan, su estructura y reactividad para así asegurar la producción de un producto saldable para el consumo humano.

La solución hidrolizada se identificó mediante electroforesis capilar obteniendo el siguiente electroferograma (Figura 39). Una vez obtenido el electroferograma de la misma forma que se hizo anteriormente se compararon las señales con los estándares para darse una idea de que compuestos se trataban en función de su tiempo de migración.

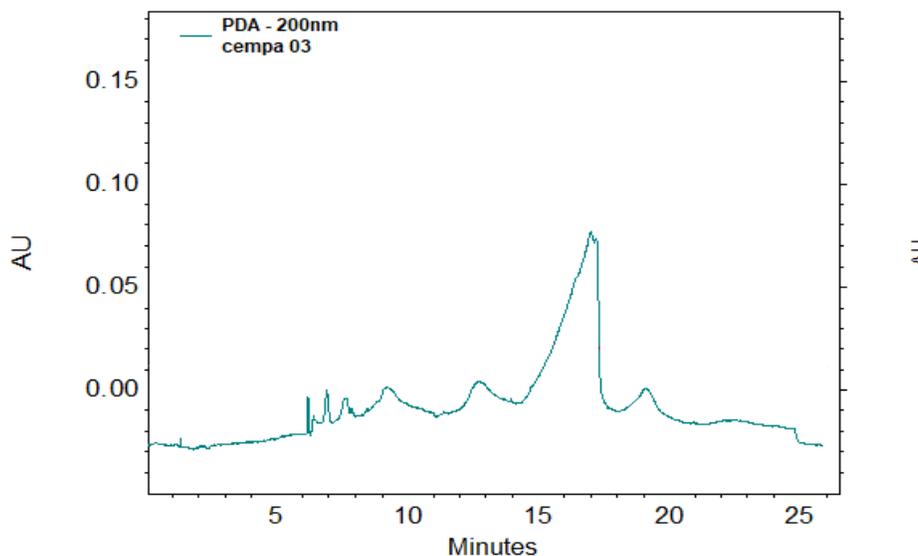


Figura 39: Electroferograma extracto etanólico sin estándar

Se obtuvieron distintas señales, lo que indica que el extracto contiene diversos polifenoles los cuales presentan diferentes tiempos de retención, en función de estos tiempos se comparó con una base de datos.

Se comenzaron a hacer distintas corridas añadiendo diferentes estándares con la finalidad de identificarlos por el aumento en su señal en el extracto problema tales como Arbutina, (-) Epicatequina, (+) Catequina, Kaempferol, Apigenina, Tirosol y Ácido Gálico trataban en función de su tiempo de migración. Una vez que se realizaron las corridas con los estándares mencionados anteriormente no se obtuvo ningún resultado satisfactorio, ya que ninguna señal aumentó su intensidad, por lo que no se trataba del compuesto en sí consultando la bibliografía (Xu-I-Wei, 2014). Donde se descubrió que, en efecto, el extracto contiene polifenoles como la arbutina, kaempferol, apigenina, etc, pero estos contienen diversos carbohidratos (polifenoles glucosilados) añadidos a su cadena por lo cual no presentan la misma estructura que los compuestos estándares y esto influye en el tiempo de migración.

Conociendo este problema se tomó la decisión de hidrolizar el extracto para así eliminar las cadenas de carbohidratos esto a partir de una solución hidrolizante obteniéndose el siguiente electroferograma (Figura 40).

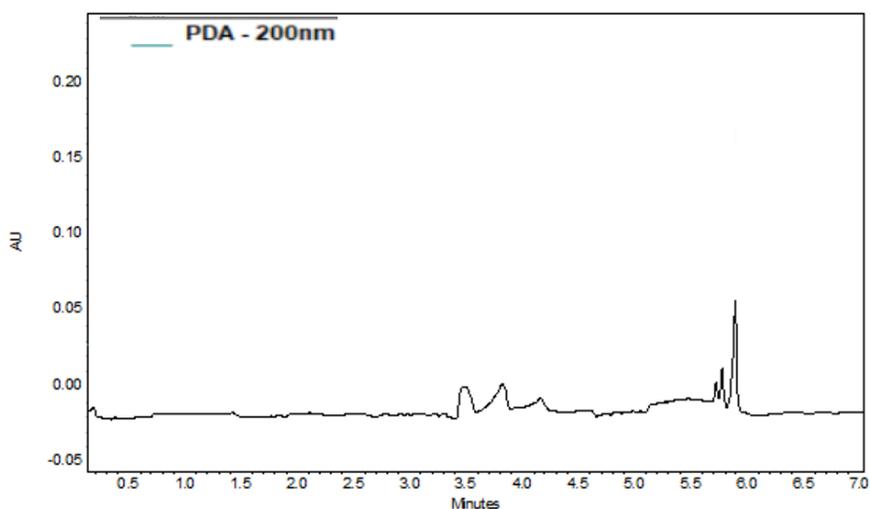


Figura 40: Electroferograma extracto etanólico hidrolizado

Tras la obtención del electroferograma del extracto hidrolizado y el análisis de las señales se hicieron pruebas añadiendo distintos estándares (Figura 41).

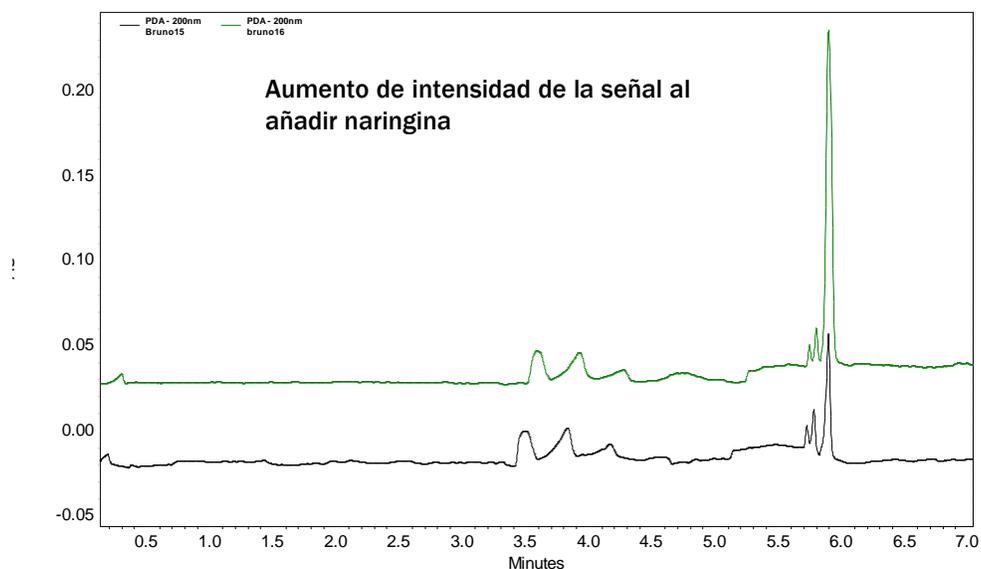


Figura 41. Electroferograma extracto etanólico hidrolizado con naringina

En la Figura 41 se observa que al añadir naringina la señal que se obtuvo a un tiempo de 5.9 minutos, la señal aumenta por lo que se puede confirmar la presencia de naringina como compuesto bioactivo presente en el extracto de la flor

de cempasúchil. De igual forma al agregar arbutina (Figura 42) es evidente el aumento en la señal presente a los 4.2 minutos, lo que nos indica presencia de arbutina en el sistema.

En función de lo encontrado en la literatura se agregaron estándares de ácido gálico, ácido cafeico, kaempferol, apigenina, tirosol, rutina y quercetina; pero ninguno de ellos arrojó buenos resultados, es decir que las señales aumentaron al agregar los estándares al extracto por lo cual nos indicaba que no había presencia de estos compuestos, por lo que para continuar con la identificación se realizó una lectura de los espectros de absorción de todas las señales que se presentan para así poder comparar los espectros con los reportados en la literatura como luteína, luteolina, glucopiranosido, quecetagetina, mirecetina, crisocriol, kaempferitrina (Xu, 2012)

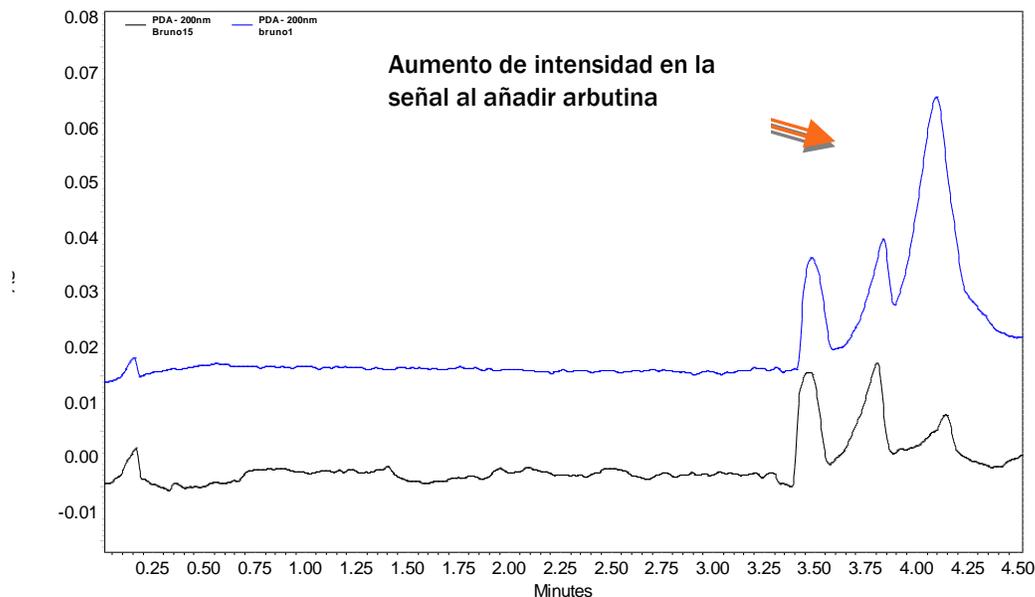


Figura 42. Electroferograma extracto etanólico hidrolizado con arbutina

5.3 Parámetros de calidad de la margarina en condiciones aceleradas

Los lípidos son uno de los principales componentes de los alimentos y son importante en la dieta porque son fuente de energía y de nutrientes esenciales. Sin embargo, un consumo elevado de ciertos componentes lipídicos puede ocasionar daños a la salud (Scrimgeour, 2005).

La oxidación lipídica es uno de los principales mecanismos de deterioro de los alimentos. Los problemas de calidad se manifiestan por cambios adversos en el sabor, color, textura y valor nutritivo, y la posible producción de compuestos tóxicos (Gray *et al.*, 1996). Esto se ve reflejado en pérdidas económicas y problemas de salud (Insani *et al.*, 2008).

Varios esfuerzos han sido hechos para proporcionar estabilidad a los lípidos presentes en los alimentos. Para disminuir la rancidez de aceites y grasas, se han usado antioxidantes sintéticos como ter-butil-4-hidroxianisol (BHA) y ter-butil-4-hidroxitolueno (BHT), y antioxidantes naturales como tocoferoles. Sin embargo, en varios países está restringido el uso de BHA y BHT, como aditivos en los alimentos, porque estos antioxidantes parecen causar un efecto indeseable (Inatani *et al.*, 1983). Por eso se ha centrado la atención en plantas comestibles como fuentes de antioxidantes naturales seguros y más efectivos. Se ha enfatizado la investigación en el efecto antioxidante y en la estructura química de los compuestos activos (Chang *et al.*, 1977; Schmidt-Hebbel, 1980; Inatani *et al.*, 1983; Cuvelier *et al.*, 1994; Giese, 1994; Frankel *et al.*, 1996).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los diferentes parámetros que permitieron medir la calidad en los aceites usados en la margarina (aceite de coco y aceite de oliva), como el índice de acidez, índice de peróxidos, así como el índice de Kreis para así analizar el efecto del extracto en el alimento.

5.3.1 Índice de acidez

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

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta para el índice de acidez indica el comportamiento de las variables como la concentración y tiempo. A continuación, en la Figura 43 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados a la margarina en respuesta al índice de acidez.

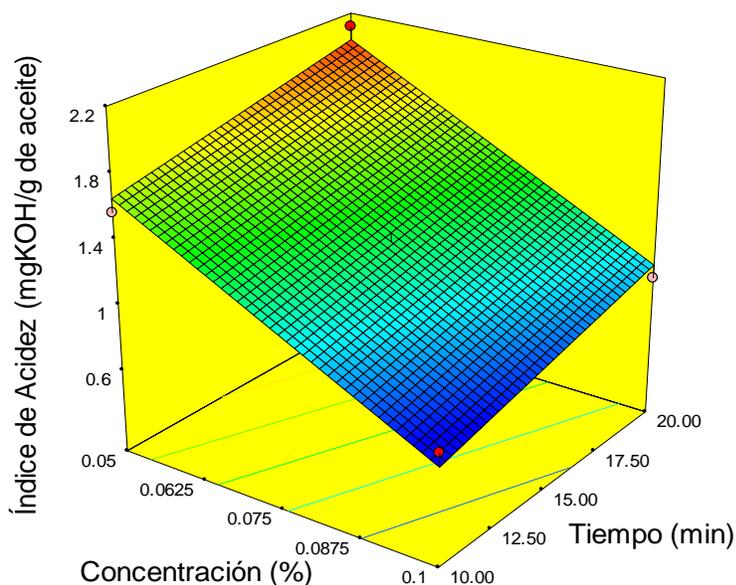


Figura 43. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el índice de acidez de la margarina.

Como se observa en la Figura 43, hay mayor índice de acidez en la margarina con una menor concentración de extracto de flor de cempasúchil, expuestas a 20 min de tratamiento a 150 °C (2.11 mg KOH/g de aceite), ya que conforme aumenta la concentración de extracto de flor de cempasúchil a 0.1 % se obtiene mayor efecto inhibitorio en el proceso de la liberación de ácidos grasos dentro de la margarina presentando valores de 0.759 mg KOH/g de aceite con 10 minutos de tratamiento,

obteniendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el índice de acidez de la margarina, es importante señalar que también se observó efecto por el tiempo de tratamiento, por lo que la interacción de los dos factores afecta en la cantidad de ácidos grasos liberados bajo las condiciones propuestas, demostrando que a mayor concentración del extracto y menor tiempo de degradación de los aceites (coco y oliva) presentes en la margarina, se obtiene un menor índice de acidez, lo cual posee un efecto positivo importante para la margarina mostrando resultados favorables.

Por otra parte, es importante señalar aplicando un antioxidante sintético (BHT) el índice de acidez obtenido en la margarina es de 0.675 mg KOH/g de aceite expuesta al 150 °C por 10 min, mientras que para la margarina tratada con 0.1 % de extracto con tiempo de tratamiento de 10 min a 150 °C el valor de índice de acidez fue de 0.759 mg KOH/g de aceite. Por lo que emplear el extracto de cempasúchil fue competitivo evitando la degradación de los ácidos libres presentes en los aceites vegetales (aceite de coco y aceite de oliva) si se compara con el tratamiento empleado con el antioxidante sintético BHT (terbutil hidroxitolueno) debido a la composición rica en flavonoides y compuestos fenólicos mayormente, logrando de esta forma retrasar la auto oxidación mediante la inhibición de la formación de radicales libres o mediante la interrupción de la propagación del radical en uno (o más) mecanismos (Nawar,1996).

5.3.2 Índice de peróxidos

El índice de peróxidos indica la calidad de la grasa en un alimento. Este índice nos permite apreciar los compuestos per oxidados que se forman en las fases iniciales de la rancidez (iniciación y propagación) donde los valores tienden a disminuir si la oxidación lipídica se encuentra en estado avanzado. El estado de oxidación inicial del aceite se encuentra en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa, permitiendo detectar la oxidación de los aceites y grasas. De acuerdo con las normas establecidas por el Codex Alimentario, se debe considerar un valor

máximo de peróxido en otras grasas y aceites 10 miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite valores superiores a estos, se debe considerar al aceite de mala calidad. A continuación, en la Figura 44 se muestra el efecto del tiempo y la temperatura con respecto a la degradación de la margarina en los diferentes tratamientos.

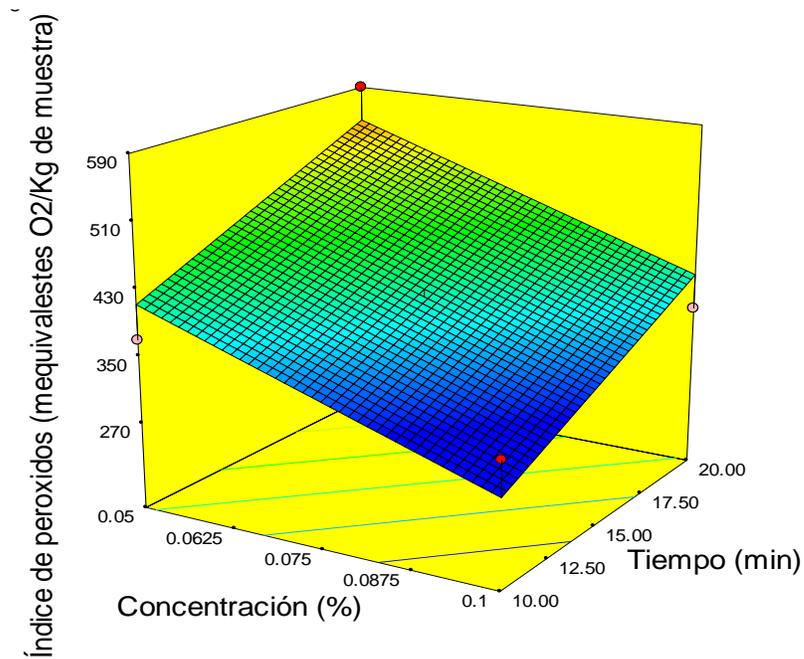


Figura 44. Efecto de la presencia de los extractos de compasúchil sobre el índice de peróxidos.

En la Figura 44 se observa que al incrementar la concentración de extracto (0.1 %) en la formulación de la margarina con un tratamiento de 10 min a 150 °C hay una menor generación de peróxidos en el producto, presentando valores de 314.88 mequivalentes de peróxido/Kg de aceite, seguido del tratamiento a 20 min, en donde la presencia de peróxidos fue de 362.48 mequivalentes de peróxido/Kg de aceite, en el caso de las margarinas adicionadas con 0.05 % de extracto de flor de compasúchil tratada a 10 y 20 min obtuvieron valores de peróxidos en un intervalo de 371.51 a 590 mequivalentes de peróxido/Kg de aceite, en donde el efecto en los peróxidos estuvo dado por la interacción de los factores (concentración de extracto y tiempo de tratamiento).

Comparando los resultados obtenidos de peróxidos de la margarina adicionada con extracto de flor de cempasúchil y los peróxidos obtenidos con la margarina adicionada con BHT, se observó que hay al menos 36 % menos incidencia de peróxidos en la margarina con extracto de cempasúchil con respecto a la margarina adicionada con BHT. Mostrando mayor efectividad por lo que los extractos de flor de cempasúchil podrían considerarse una alternativa natural para su aplicación como antioxidantes. Al igual que en un estudio donde utilizaron un extracto de *Crataegus mordenensis* como antioxidante y mostró inhibir la formación de hidroperóxidos en aceite de girasol a 65° C (Aladedunye *et al.*, 2014). Encontrando mejores resultados que con el aceite de oliva donde los resultados si mostraron cierta reacción por parte de la fracción polar del aceite, pero esta fue inferior a la de BHT (Papadopoulos & Boskou, 1991).

5.3.3 Índice de Kreis (IK)

El índice de Kreis al igual que el índice de peróxidos, es un indicador de la evolución de la autooxidación que se basa en la detección de compuestos carbonílicos producidos en el deterioro del material lipídico como productos secundarios de esta, los cuales son más estables que los peróxidos. Indica el estado de oxidación en la margarina, los valores altos demuestran oxidación en la muestra, los resultados son obtenidos por medio de un espectrofotómetro, pues se basa en la producción de color debido a la reacción extremadamente sensible entre la floroglucina y un compuesto presente en los aceites rancios (Kira, 1991). A continuación, en la Figura 45 se muestra el efecto del tiempo-temperatura con respecto a la degradación de la margarina en los diferentes tratamientos empleados donde se observó que después de someterlos a condiciones de cinética acelerada se hace aún más evidente el deterioro, así como la inhibición de la oxidación lipídica de la margarina.

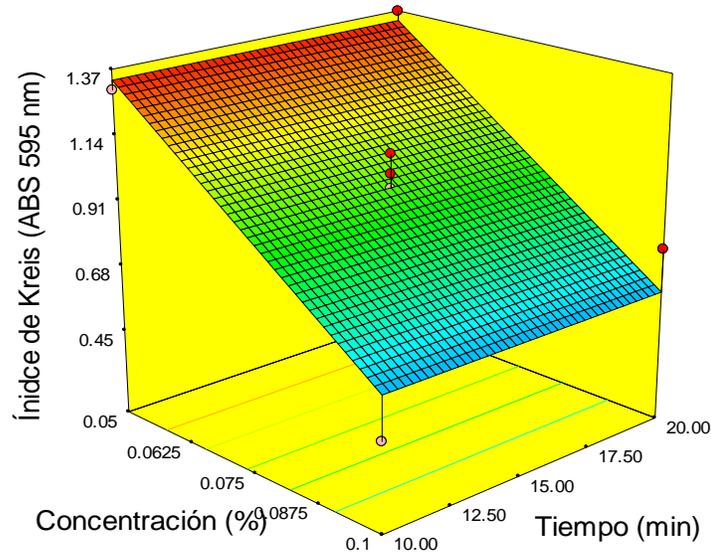


Figura 45. Evaluación del índice de Kreis en la margarina de aceite de coco y aceite de oliva agregando el extracto de flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas.

En la Figura 45 cuando se adiciona el antioxidante natural a su máxima concentración (0.1 %) en la margarina hay mayor inhibición de la formación de compuestos derivados de la oxidación lipídica, de la misma forma emplear concentraciones bajas de extracto de flor de cempasúchil no evita la oxidación, presentando efecto por la concentración de extracto de flor de cempasúchil, no así para el tiempo de tratamiento. La margarina adicionada con 0.1 % de extracto de flor de cempasúchil tratada por 10 min presentó 0.456 ABTS a 595 nm. Mientras que la margarina adicionada con 0.05 % tratada por 10 y 20 min presentó valores de 1.299 a 1.368 ABTS a 595 nm, respectivamente sin diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

5.4.4 Color

La evaluación de los descriptores físicos, en este caso el color, se tomó como un factor de calidad, debido a que éste puede sufrir un cambio por efecto del tiempo y temperatura. Para describir las diferencias en distintos tiempos y temperaturas de

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

A continuación, en la Figura 46 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados a la margarina en respuesta al color.



Figura 46. Color de la margarina

Se realizó una comparación entre la margarina con el extracto natural y el antioxidante sintético a diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento. Los resultados y la variación de color se muestran en la Figura 47.

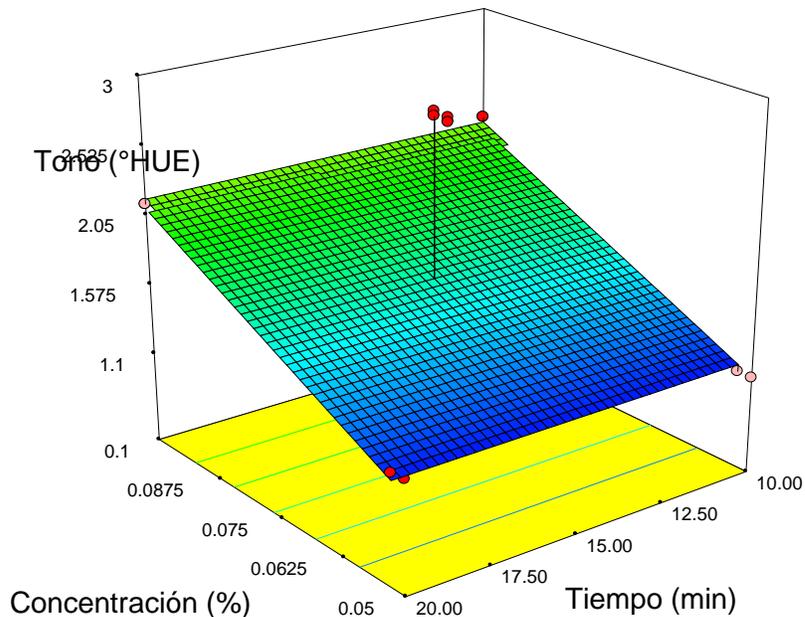


Figura 47. Efecto de la presencia de los extractos de cempasúchil sobre el color la margarina de aceite de coco y aceite de oliva agregando el extracto de flor de cempasúchil como antioxidante sometido a condiciones aceleradas.

Se observa que al someter la margarina a tiempos largos (15 y 20 min) no existe diferencia significativa en el tono por efecto del tiempo teniendo una pendiente ≈ 0 , pero sí presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en la concentración. Los resultados obtenidos indican que la concentración a la que es más resistente y que presentó mayor estabilidad a una concentración del extracto más alta al 0.1 % ya que presentaron valores de L (luminosidad) a y b, incluso más bajos que con el BHT. Según los datos recabados podemos ver que la luminosidad (L^*), así como los demás factores analizados en los cambios de color (a^* , b^*) se vieron reducidos en las diferentes tiempos y concentraciones, por lo que la margarina presentando una notable degradación de los 10 min, 15 min y 20 min y a concentración de 0.5 %.



” No importa lo que te diga la gente, las palabras y las ideas pueden cambiar el mundo”

-Robin Williams

6.CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye los siguiente:

1. El extracto etanólico de cempasúchil obtenido a partir del método por ultrasonido variando la mezcla de solvente etanol-agua y el tiempo de extracción pudo ayudar a establecer la relación (70-30) % durante 40 min ya que presento mayor contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante.

2. La temperatura a 70 °C favorece la extracción, por lo tanto se obtiene un mayor contenido de compuestos antioxidantes o específicamente polifenoles y a su vez dan como respuesta mayor capacidad antioxidante, lo que indica que, al incrementar la temperatura de forma moderada, podemos lograr una mayor eficiencia en la extracción de compuestos del cempasúchil.

3. Mediante la identificación por electroforesis capilar se pudieron determinar aquellos compuestos que se encuentran en la flor de cempasúchil. Para realizar la identificación de polifenoles con estándares puros fue necesario realizar la hidrólisis del extracto ya que es muy costoso utilizar y encontrar estándares glucosilados.

Los polifenoles que fue posible identificar por electroforesis capilar fueron *naringina* y *arbutina* a las condiciones de secado para el almacenamiento de los pétalos

4. Los extractos de cempasúchil aplicados en la margarina inhiben la oxidación lipídica esto en concentraciones de 0.1%, teniendo resultados similares a los obtenidos con antioxidantes artificiales como BHT, siendo una opción viable para la aplicación en productos lipídicos para evitar en cierta medida el deterioro ocasionado por la oxidación lipídica.

7. RECOMENDACIONES



"Tu actitud, no tu aptitud, determina tu altitud"

-Zig Ziglar

RECOMENDACIONES

1. Debido a que el tiempo ayudó a la extracción de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como fenoles y flavonoides se recomienda realizar más investigaciones con tiempos superiores a los propuestos en este proyecto.
2. En cuanto a la identificación de compuestos debido a que únicamente fue posible identificar dos polifenoles naringina y arbutina, es necesario verificar que solo naringina y arbutina son los que se preservan con el tratamiento de secado de los pétalos ya que pudieron perderse los polifenoles más pequeños con el procesado.
3. Continuar con la identificación de los compuestos bioactivos mediante la identificación de las señales restantes con la lectura de los espectros de absorción de todas las señales que se presentan para así poder comparar los espectros con los reportados en la literatura como luteína, luteolina, glucopiranosido, quecetagetina, mirecetina, crisocriol, kaempferitrina (Xu, 2012)
4. Se recomienda complementar la investigación realizando vida de anaquel de la margarina ya con el extracto para saber los días de vida útil con y sin el antioxidante y así compararlo con los antioxidantes que ya se encuentran en el mercado.
5. Se sugiere realizar alguna otra formulación cambiando los aceites utilizados para verificar si el antioxidante reacciona de la misma manera con otros ayudando igualmente a evitar la oxidación lipídica.
6. Realizar el estudio con una margarina orgánica.



8. BIBLIOGRAFÍA

“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica”

-Aristóteles

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarhus, Karlshamn. (2006). *Seminario de aceites y grasas comestibles*. Morelia, Michoacán.
2. Aladedunye, F., Przybylski, R., Niehaus, K., Bednarz, H., Matthaus, B. (2014). Phenolic extracts from *Crataegus mordenensis* and *Prunus virginiana*: Composition, antioxidant activity and performance in sunflower oil. *Food Science and Technology*, 59, 308-319 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.002>
3. Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food chemistry*, 135 (3): 1708-1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
4. Argueta, V., Cano, A.L. y Rodarte M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I y III. Instituto Nacional Indigenista. México.
5. Badui D. S. (2006). Química de los alimentos. 4ª ed. México, Pearson.
- 12.
13. Baran, R., Mayen M., Merida J., Medina J. (1997) Changes in phenolic compounds and colour in pole cherry wines subjected to fining treatment. *Zelebenin Unterss Forsch A. Food*, 2005, no.6, p.474-478.
14. Barberán, F.A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*, 5(2), 41-53. Murcia, España.
15. Bennett, R.N., Mellon, F.A., Kroon, P.A. (2004). Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion- Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 428-438. <https://doi.org/10.1021/jf030530p>
16. Borrelli, R., Viscotu, A., Mennella, C., Anese, M., y Floglian, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 22:6527-6533. <https://doi.org/10.1021/jf025686o>
17. Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential 851 Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
18. Chang, S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O. and Huang, C. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, 42, 1102-1106. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
19. Charley, H. (2005). Tecnología de alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos (2ºed). México: Ed. Limusa.

20. Chemat, F., Zill-e-Huma, Kamram, K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
21. CODEX STAN 32-1989. Recuperado el 6 de febrero de 2022: <http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e06.htm#fn13>
22. Cornejo-García FR, (2012). Recuperación de compuestos fenólicos de bagazo de uva roja (*Vitis vinífera*) por microondas y métodos convencionales. Tesis de Maestría en Nutrición Humana, Universidad Autónoma de Querétaro. México.
23. Cruz, L. (2012). Extracción de polifenoles a partir de hollejo de uva. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22(3), 10-15. La Habana, Cuba.
24. Cuvelier, M., Berset, C. and Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 665-669. <https://doi.org/10.1021/jf00039a012>
25. Decker, E.A. (2002). Antioxidant mechanisms. In: Akhoh, D.; Min, D.B. Editors. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2 ed New York. USA: Marcel Dekker, Inc. pp.530-556.
26. Del Villar, A, A, Vanegas, P.E. Y Paredes, L. (2010). Marigold regeneration and molecular analysis of carotenogenic genes. *Methods Mol Biology*, (589), 213-221. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_20
27. Deshpande, S.C. (1985). Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. *Journal of Food Science* 50, 905.
28. D. Dey, S. Das, H. R. Yadav, A. Ranjani, L. Gyathri, S. Roy, P. S. Guin, D. Dhanasekaran, A. R. Choudhury, M. A. Akbarsha, B. Biswas, *Polyhedron* 2016, 106, 106–114.
29. Duque, M.A. (2005). El Aroma frutal de Colombia. Editorial Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia, p:345.
30. Eskin, N.A., & Przybylski, R. (2000). Antioxidants and Shelf Life of Foods. En N.A. Eskin, & D.S. Robinson (Edits.), *Food Shelf-Life Stability* (pág.370). Florida, USA: CRC PRESS.
31. Faizi, S. y Naz, A. (2004). Palmitoleate (=9 Z). Hexadeca-9 enoate) esters of oleanone triterpenoids from the golden flowers of *Tagetes erecta*. Isolation and autoxidation products. *Helvetica Chimica Acta*, (87), 46-56. <https://doi.org/10.1002/hlca.200490016>
32. FAO (2010). Recuperado el 15 de marzo del 2021, de <http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>
33. Fernoli, G. (1975). *Handbook of flavor ingredients*. New York: CRC PRESS.

34. Frankel, E., Huang, S., Aeschbach, R. and Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituent, carnolic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, *44*, 131-135.
35. García. (2009). Compuestos bioactivos de frutos templados y sus beneficios en la salud. En G.A. González Aguilar.E. Álvarez Parrilla. L. A. De la Rosa. I. G. Olivas& J.F. Ayala Zavala (Edis). Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos y cortados(págs..195-210). México: Trillas.
36. García Martínez, E.; Fernández- Segovia. I. y Fuentes-López, A. (2016). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Universidad Politécnica de Valencia, España.
37. Gao, M. y Lio, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*, 1461-1463. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-6809-1>
38. Gau, W., Plosche, H.J. y Funche, C. (1983). Mass spectrometric identification of xanthophylls fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography. *Journal Chromatography*, *262*, 277-284.
39. Giese, J. (1994). Spice and seasoning blends: a taste for all seasons. *Food Technology*, *48*, 88-98.
40. Gogus, U. y Smith, C. (2010). N-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Journal of Food Science and Technology*. *45*, 417-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02151.x>
41. Gómez, R, Gaño, F.M. y Macarula, J.M (1978). Carotenoids from marigold (*Tagetes erects*) petals and their esterified fatty acids. *Esp Fisiol*, *34*(3), 253-256.
42. Gong, Y., Plander, S., Zu, H., Sumando, B. y Gao, Y. (2011). Supercritical CO₂ extraction of oleoresin from marigolds (*Tagetes erecta*.) flowers and determination of its antioxidant components with online HPLC- abets (+) assay. *Journal of Food Science and Technology*, *91*(5), 2875-2881. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4537>
43. Granados López, G. (2014). Optimización de métodos de extracción de compuestos fenólicos de la planta hojasén *Fluorensia Cernua* D.C. para su determinación por electroforesis capilar. Cuautitlán Izcalli Estado de México: UNAM.
44. Halliwell, B. (2009). The wanderings of free radical. *Free Radical Biology and Medicine*.

45. Hernández, S.B. (2007). Caracterización fisicoquímica del aceite de semilla de Calabaza modificado. Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Oaxaca. México.
46. Heywood, V. H.J.B. Haruna y B.L. Turner. (1997). *The biology and chemistry of the Compositae, 1*. Academic Press. London.
47. Howard, L.R. (2003). Effects of temperature and solvent properties on liquid-solid phase equilibrium of -pyrazinamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18), 5207-5213. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00286.s001>
48. Hu, M. (2012). Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols': Call to Arms. *Molecular pharmaceutics*, 803-806.
49. Ignatia. Volm, I., & Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835
50. Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 521-528.
51. Ixtaina, V.y., Nolasco, S.M. y Tomás, M.C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 1077-1090. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1990-x>
52. Kaisoon, O., Konczak, I. y Sriamorn, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Research International*, 46(2). 563-571. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.016>
53. Kellens, M. (2013). Oil Modification Processes. En W. In Hamm, & R. Hamilton, *Edible oil Processing*. Sheffield Academic.
54. Khachick, F. (1995). Process of isolation, purification and recrystallization of luteins from saponified marigold oleoresin and uses thereof, United States Patent. 5.382.714.
55. Khanna, S., Viswanathan, P., Krishnan, P., & Sanwal, G.G. (1980). Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry total phenolics in the presence of reducing agents*, 7(9), 1513-1517.
56. Kira, R. S (1991). *Pearson's composition and Analysis of Food*. Ed. Longman Scientific and Technical. USA.420-445
57. Lampi, A. M., Kamal, E. A y Piironen, V. (2002). Tocopherols and Tocotrienols from Oil and 1020 Cereal Grains. In: *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*. Vol. 2 /Eds. J. Shi, G. 1021 Mazza, M. Le Maguer). CRC Press, Boca Raton, 1-38.

58. Lock, O. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Segunda Edición: 123-124.
59. López, J. (2008). Los alimentos funcionales: Importancia y Aplicaciones. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Chile. *Fat science technology*, 11, 428-432.
60. Martel, P., & Pascal, G. (2000). Aditivos antioxidantes. En J.L. Multo (Ed.), Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias (pág. 806). Zaragoza: ACRIBIA.
61. Martínez, R., Diaz, B., Vázquez, L., Compagnone, R.S., Tillett, S., Canelón, D.J., Torrinco, F. y Suárez, A.I. (2009). Chemical composition of essential oils and toxicological evaluation of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* from Venezuela. *J Essent Oil Bear Plant*, 12 (4), 476-481. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2009.10643747>
62. Martínez, S.; J. González; J. Culebras & M. Tuñón. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*; 17(6):271-8.
63. Mendoza Pérez L. B. (2018). Extracción de compuestos bioactivos de la flor de cempasúchil para su aplicación como antioxidante en aceite de pepita de calabaza. Estado de México: UNAM.
64. Morallo, R. y Decena (1984). The activity, isolation, purification, and identification of the insecticidal principles from *Tagetes*. En: *Biological Abstracts*. 77(10).8187.
65. Navas, H. (2010). Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales por presión en frío a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales. Tesis Doctoral. Univ. de Castilla La Mancha, Facultad de Ciencias Químicas. España
66. Nawar, W.F. (1996). Lipids In: Fennema O, editor. Food chemistry. 3rd ed New York: Marcel Dekker, INC. 225-320.
67. Nawar, W. (2010). Lípidos. En O. R. Fennema, Química de los alimentos (2^o ed.). Zaragoza: Ed. Acribia.
68. Nazk, M., y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolic. *Food Journal Chromatography. A*, 1054, 95-111.
69. Papadopoulos, G., Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal American Oil Chemists' Society*, Champaign, v.68, n.9, p.669-671. <https://doi.org/10.1007/bf02662292>
70. Pezzuto, J.M. y Park, E. J. (2002). Antioxidation and antioxidants. *Encyclopedia of pharmaceuticals Technology*, 97-113.

71. Pupo B, Herrera L, Vargas B, Marreo Y Arévalo R, Jiménez C. (2007). Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas en condiciones *in vitro*. *Centro Agrícola* 36 (2):77-81
72. Quiñones M., M. y Alexandre A., (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.*; 27(1):76_89.
73. Rastija, V y Medic S.M. (2009). QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(1), 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.001>
74. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay *Free Rad. Biol. Med* (26),1231-1237.
75. Rivera, Y., Gutiérrez, C., Gómez, R., Matute, María., Izaguirre, C. (2014). Cuantificación del deterioro de aceites vegetales usados en procesos de frituras en establecimientos ubicados en el Municipio Libertador del Estado Mérida. *Universidad de los Andes Mérida, Venezuela Ciencia e Ingeniería*, 35(3), 1157-164.
76. Rodríguez-Riera, Z (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *CENIC Ciencias Químicas*, (45), 139-147.
77. Rostagno, M., Palma. M., y Barroso, C. (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119-128. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)01184-1)
78. Rzedowski, G.C. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. (2ª ED.), Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
79. SAGARPA (2018) . SIAP. Recuperado el 15 agosto del 2020 de: <http://sagarpa.gob.mx/>
80. Schmidt-Hebbel, H. (1980). Las Especies (condimentos vegetales), su Importancia en Química y Tecnología de Alimentos y en el Arte Culinario. Fundación Chile, Santiago de Chile.
81. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado el 26 DE octubre del 2021 de: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cempasuchil-la-flor-de-muertos-que-embellece-mexico>
82. Serrato M, Sánchez J, Barajas J, García F, Del Villar A, Arenas M, Aguire A, Santiago R, Moreno S, Barradas V, Gómez H. (2008). Carotenoides y características

- morfológicas en cabezuelas de muestras mexicanas de *Tagetes erecta*. *Revista Fictotecnica Mexicana* 31(3):67-72.
83. Shahidi, F. y Wanasundara, P.K. (1992). Phenolic antio-xidants. *Crit ev Food Sci Nut*, 32,67-103.
84. Siddhuraju, P. y Becker, K. (2003). Antioxidants properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drum stick tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51,214-2155. <https://doi.org/10.1021/jf020444+>
85. Sochor, J.; Zitka, O.; Skutkova, H.; Pavlik, D.; Babula, P.; Horna, A.; Adam V.; Provazanik, I. & Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15:6285-6305. <https://doi.org/10.3390/molecules15096285>
86. Tinoi, J., Rakariyatham, N. Y Deming, R.L. (2006). Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected glowering plants in north Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*, 33(2), 327-334.
87. Tuyen, P. T.; Xuan, T.D.; Khang, D. T.; Ahmad, A.; Quan, N. V.; Tu Anh, T. T.; Anh, L.H. & Minh, T.N. (2007). Phenolic Compositions and Antioxidant Properties in Bark, Flower, Inner Skin, Kernel, and Leaf Extracts of *Castanea crenata* Sieb. Et Zucc. *Antioxidants* 6 (31): 1-14. <https://doi.org/10.3390/antiox6020031>
88. Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Mdiedo, P., Gueimonde, M., González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food and Function*, 6(8), 2424-2439. <https://doi.org/10.1039/c5fo00322a>
89. X-rite-(2002). Guía para entender la comunicación del color. Recuperado el 20 de febrero del 2021, de http://www.mcolorcontrol.com/archivos/10-001_understand_color_es.pdf
90. Xu, G.C. Fazio, S.P.T. (2004) Matsuda. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*.65,261-291. <https://doi.org/10.1002/chin.200422256>
91. Xu LW et al. (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes L.* *Chinese Herbal Medicines*, 2012, 4(2): 103-117
92. XU Li-wei, CHEN Juan, QI Huan-yan, SHI Yan-ping. (2014). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes L.* *Chines Herbal Medicines*, 4(2), 103-117

-
93. Zhou X, Huang S, Weng J, Wang C. (2012). New tannin-related compounds from *Tagetes erecta* New tannin-related compounds from 37(3):315-8
94. Ziller, S. (1996). Grasas y Aceites Alimentarios. Zaragoza España: Acribia.