



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación del contenido de flavonoides y capacidad antioxidante en una bebida funcional del extracto de las hojas de apio (*Apium graveolens*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ITZEL KARINA ROMERO MORENO



MÉXICO, CDMX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Profesores:

PRESIDENTE: Patricia Severiano Pérez

VOCAL: Verónica García Saturnino

SECRETARIO: Minerva Monroy Barreto

1° SUPLENTE: Juan Rolando Vázquez Miranda

2° SUPLENTE: Adrián De Santiago Zarate

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA

En el Anexo del Laboratorio 3D, Laboratorio de Química Analítica, Edificio A. Departamento de Química Analítica y en el Anexo del laboratorio 4D, Evaluación Sensorial-Investigación. Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Minerva Monroy Barreto

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Patricia Severiano Pérez

SUSTENTANTE:

Itzel Karina Romero Moreno

AGRADECIMIENTOS AL APOYO TÉCNICO

Este trabajo se realizó con el apoyo del programa UNAM-DGAPA/PAPIME 205822, Química analítica sustentable; desarrollo de protocolos de prácticas aplicando reactivos verdes y diseño de un prototipo fotométrico elaborado con materiales accesibles.

PRESENTACIÓN EN CONGRESO

La difusión del trabajo realizado en este proyecto se presentó en el siguiente congreso:

XXXIV Congreso Nacional de Química Analítica y XXIV Simposio Estudiantil organizado por la Asociación Mexicana de Química Analítica (AMQA) con presentación del trabajo en modo póster: "Evaluación del contenido de flavonoides y capacidad antioxidante en los extractos de apio (*Apium graveolens*)" realizado del 21 al 23 de septiembre del 2022 en los Espacios Magnos de la sede Marfil del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis.....	3
1 ANTECEDENTES	4
1.1 Apio (<i>Apium graveolens</i>)	4
1.1.1 Descripción	4
1.1.2 Clasificación taxonómica y variedades	6
1.1.3 Producción	7
1.1.4 Usos medicinales	8
1.1.5 Propiedades farmacológicas.....	9
1.1.6 Composición nutricional.....	11
1.1.7 Fitoquímica.....	12
1.2 Alimentos funcionales	13
1.3 Flavonoides	13
1.3.1 Apigenina	16
1.3.2 Quercetina.....	17
1.4 Determinaciones analíticas	18
1.4.1 Capacidad antioxidante (FRAP)	19
1.4.2 Ensayo de Shinoda	20
1.4.3 Flavonoides totales (AlCl ₃)	20
1.5 Evaluación Sensorial	21
2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
2.1 Materiales y métodos.....	26
2.1.1 Equipo	26
2.1.2 Reactivos.....	26
2.2 Selección de muestra vegetal	26
2.3 Preparación de muestra vegetal.....	26
2.3.1 Determinación del % de Humedad.....	27
2.4 Secado	27
2.5 Molienda	27
2.6 Extracción	27
2.6.1 Maceración a temperatura ambiente.....	27
2.6.2 Extracción a 48°C.....	28

2.7	Desarrollo de los Métodos Analíticos	28
2.7.1	Reacción de Shinoda.....	28
2.7.2	Flavonoides totales según Zhishen (AlCl ₃).....	29
2.7.3	Capacidad antioxidante (FRAP, por sus siglas en inglés (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)).....	30
2.7.4	Formulación de una bebida funcional del extracto de las hojas de apio	30
2.7.5	Evaluación Sensorial bebidas de apio	32
3	Resultados y análisis de resultados	33
3.1	Determinación de humedad	33
3.2	Capacidad antioxidante (FRAP)	34
3.2.1	Determinación de la capacidad antioxidante.....	35
3.3	Reacción de Shinoda	38
3.3.1	Cinética de reacción.....	39
3.3.2	Cuantificación de flavonoides (Shinoda).....	40
3.4	Flavonoides totales (AlCl₃)	43
3.4.1	Ensayo colorimétrico AlCl ₃	45
3.5	Evaluación de las formulaciones de la bebida funcional a base del extracto de las hojas de apio	50
3.5.1	Características fisicoquímicas de las bebidas.....	50
3.6	Capacidad antioxidante (FRAP) en bebidas	51
3.7	Cuantificación de flavonoides (Shinoda) en bebidas	53
3.8	Evaluación Sensorial de las bebidas	55
3.8.1	Prueba JAR y Análisis de Penalidad.....	57
4	Conclusiones	61
5	Referencias bibliográficas	63
6	ANEXOS	69
6.1	ANEXO A (PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y PRUEBAS ANALÍTICAS).....	69
6.2	ANEXO B (CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN AFECTIVA DE DOS BEBIDAS DE APIO)	71
6.3	ANEXO C (ANÁLISIS ESTADÍSTICO EVALUACIÓN SENSORIAL).....	75

INTRODUCCIÓN

En México, existe un sin fin de plantas medicinales de uso tradicional, producto de la combinación de la herbolaria precolombina y la europea. Se utilizan las diferentes partes de la planta, según sea la afectación, el padecimiento o la receta por utilizar. Lo más común es usar las hojas y las flores, y esporádicamente, el tallo o la raíz. Las plantas medicinales se pueden usar en diversas formas, por ejemplo, directamente, prepararse como infusiones o en presentación homeopática (Maldonado et al., 2017).

Entre las plantas medicinales se encuentra el apio (*Apium graveolens*) es considerado una hortaliza de gran valor por su uso como alimento y planta medicinal, gracias a sus propiedades nutricionales; y a pesar de que el consumo se centra principalmente en el tallo, pocos saben que sus hojas (uno de los principales residuos que se generan) son ricas en compuestos bioactivos, los cuales son una fuente importante de flavonoides naturales y contienen grandes cantidades de antioxidantes capaces de reducir radicales libres (Kooti et al., 2014).

Entre los antioxidantes que se encuentran en mayor concentración en la hoja de apio, se reportan a la apigenina, un flavonoide. Este compuesto posee propiedades biológicas anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales (Perea, 2021).

Las propiedades de los flavonoides están directamente relacionadas con su estructura química; por lo que es muy importante estudiar estas moléculas a detalle, (Varas, 2004) con la finalidad de extender el conocimiento y el uso completo del apio en alimentos y bebidas que aporten beneficios por el contenido de flavonoides y sus propiedades antioxidantes.

En este trabajo se realizaron determinaciones analíticas, tanto cualitativas como cuantitativas, en diferentes secciones del apio (hojas, tallo y centro) para conocer la capacidad antioxidante por el método FRAP, la presencia y cuantificación de flavonoides por la reacción colorimétrica Shinoda, así como el análisis general del contenido de flavonoides totales por el ensayo del tricloruro de aluminio ($AlCl_3$).

También se propuso utilizar el extracto acuoso de las hojas de apio, para el desarrollo una bebida funcional con aporte de flavonoides (tipo flavonas) y antioxidantes, accesible para los consumidores que opten por disponer de las propiedades que le confieren beneficios a la salud.

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y realizar la determinación cuantitativa de flavonoides presentes en los extractos de apio, para su empleo en la elaboración de una bebida funcional.

Objetivos específicos

- Obtener los extractos vegetales de diferentes secciones del apio para su evaluación.
- Desarrollar un método cuantitativo para la determinación de flavonoides, con base en la reacción de Shinoda.
- Determinar la capacidad antioxidante por el método FRAP (reducción del hierro) en los extractos de apio.
- Analizar el alcance de los resultados obtenidos empleando el ensayo de $AlCl_3$ para el contenido de flavonoides totales.
- Elaborar una bebida funcional a partir de los extractos de las hojas de apio.
- Analizar el contenido de flavonoides y capacidad antioxidante en la bebida funcional.
- Realizar una evaluación sensorial sobre el grado de aceptación de los consumidores.

Hipótesis

El apio contiene compuestos bioactivos (flavonoides) que pueden extraerse, cuantificarse espectrofotométricamente y emplearse en la elaboración de una bebida funcional agradable, al consumidor.

1 ANTECEDENTES

1.1 Apio (*Apium graveolens*)

El apio es una planta con muchas propiedades medicinales (diurético, emenagogo, estomáquico, sedante, carminativo, expectorante, entre otras) y pertenece a la familia de Apiaceae, cuyo nombre científico es *Apium graveolens*. La etimología de su nombre proviene del Céltico apon, que significa agua y del epíteto graveolens de grave olor, debido a la intensidad del aroma que posee (Tavico, 2014).

Es procedente del Mediterráneo, existiendo otros centros secundarios como el Cáucaso y la zona del Himalaya. Se conocía en el antiguo Egipto. Su uso como hortaliza se desarrolló en la Edad Media cuando creció el interés por sus propiedades medicinales, se mejoró su productividad y se ensayó su cultivo. Desde entonces, su desarrollo ha sido constante. Hoy día, el apio es muy cultivado en las regiones templadas de todo el mundo, en particular en Europa y América del Norte (Cárdenas et al., 2016).

1.1.1 Descripción

El apio (figura 1) es una planta de cultivo bianual con respecto a la producción de semilla y anual para consumo en fresco, que tiene las siguientes características (Surec, 2017):

- La raíz principal es del tipo pivotante, poco profunda, provista de un sistema de raíces secundarias abundantes, adventicias y superficiales, la cual puede alcanzar longitudes de 50-70 cm y 20-30 cm de ancho.
- Las hojas del apio son erectas y tienen un sólido peciolo, el limbo está dividido en 5 a 10 segmentos. Los peciolos son notablemente nervados, muy anchos en la base y contienen cantidades comparativamente grandes de almidón. Estos limbos foliares son pignado-partidos (hojas dispuestas a uno y otro lado del peciolo) pequeñas y de color verde intenso, insertas en un peciolo largo que constituye la parte comestible. Al llegar a su madurez alcanzan una altura de 60 cm a 90 cm.

- La inflorescencia, es una umbela compuesta, las flores (actinomorfas y hermafroditas) son pequeñas y de color blanco, tiene cinco pétalos, cinco estambres y dos pistilos, cáliz con cinco sépalos y un ovario ínfero de dos carpelos. La polinización es cruzada, se considera una planta alógama sin embargo, presenta un 5% de autogamia (autopolinización).
- Durante el primer año desarrolla el aparato vegetativo formado por un tallo corto, cubierto por una roseta de hojas muy divididas, de peciolo largo, acostillado y carnoso conocido con el nombre de pencas; que pueden alcanzar alturas de 60-100 cm. A lo largo del segundo año de vida de la planta, produce largos tallos florales en forma de umbela (todas las flores salen de un mismo punto). La floración en el apio se motiva principalmente por la acción de temperaturas vernalizantes (7-10°C) durante período de 14-28 días de estímulo vernalizador.
- Las semillas dentadas son muy pequeñas y oblongas, ya que pueden llegar a medir de 1.5 a 2 mm de longitud. Los frutos son diaquenios, de color marrón, sin pubescencia, redondeado con la base acorazonada, comprimidos lateralmente y recorridos por surcos en toda su longitud, sobre los que se insertan canales resiníferos portadores de aceites esenciales con un olor característico. Estos frutos son considerados usualmente semillas, siendo sensibles al desgrane.

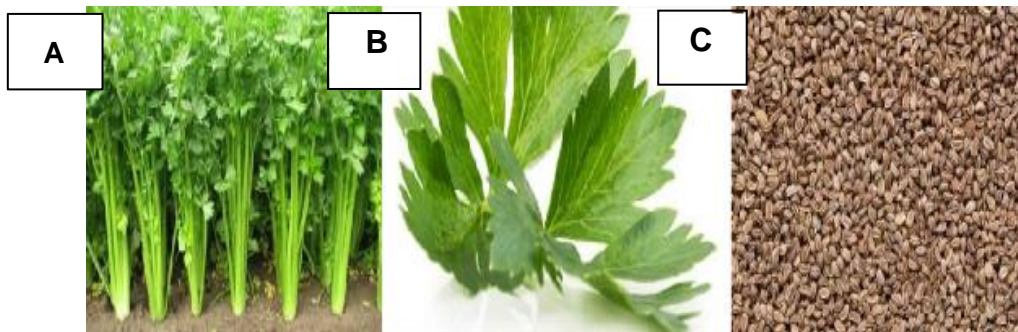



Figura 1. *Apium graveolens* (A. Planta entera de apio; B. Hojas de apio; y C. Semillas de apio).

1.1.2 Clasificación taxonómica y variedades

De acuerdo con lo propuesto por Carl Linneo, el apio se clasifica desde el punto de vista taxonómico como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Apio (Carrillo, 2002).



REINO	Plantae
SUBREINO	Tracheobionta
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteriade
ORDEN	Apiales
FAMILIA	Apiaceae
GÉNERO	<i>Apium</i>
ESPECIE	<i>Apium graveolens</i>

Dentro de esta especie existen tres tipos de cultivo:

- *Apium graveolens* var. *dulce* Pers. o apio acostillado, con pecíolos carnosos, gruesos, largos (pencas), que constituyen el principal aprovechamiento.
- *Apium graveolens* var. *rapaceum* o apio nabo o de raíz, de pecíolos menos desarrollados, más oscuros y con hipocótilo globoso que contiene parte de la raíz, comestible y almacenable.
- *Apium graveolens* var. *secalinum* de aspecto más silvestre, sus hojas se utilizan en su totalidad como condimento.

En México la variedad “dulce” (sabor agradable) es la más conocida, su consumo puede ser de diversas maneras ya sea en fresco para ensaladas, como planta aromática en sopas o en forma deshidratada como condimento en polvo (sal de apio), por lo que es considerado una de las 37 hortalizas más importantes, al tener un alto valor comercial y nutricional por sus hojas y tallos comestibles ricos en fibra dietética, vitaminas y minerales.

1.1.3 Producción

De acuerdo a las estadísticas agrícolas de la producción de apio en México desde 1980, a pesar de la pandemia en 2020 la producción obtenida fue de 84,075 toneladas (+15.6% en comparación con 2019) figura 2, con 1,994 hectáreas cosechadas (+13.7%) y un rendimiento promedio nacional de 42.2 toneladas por hectárea (+1.7%).

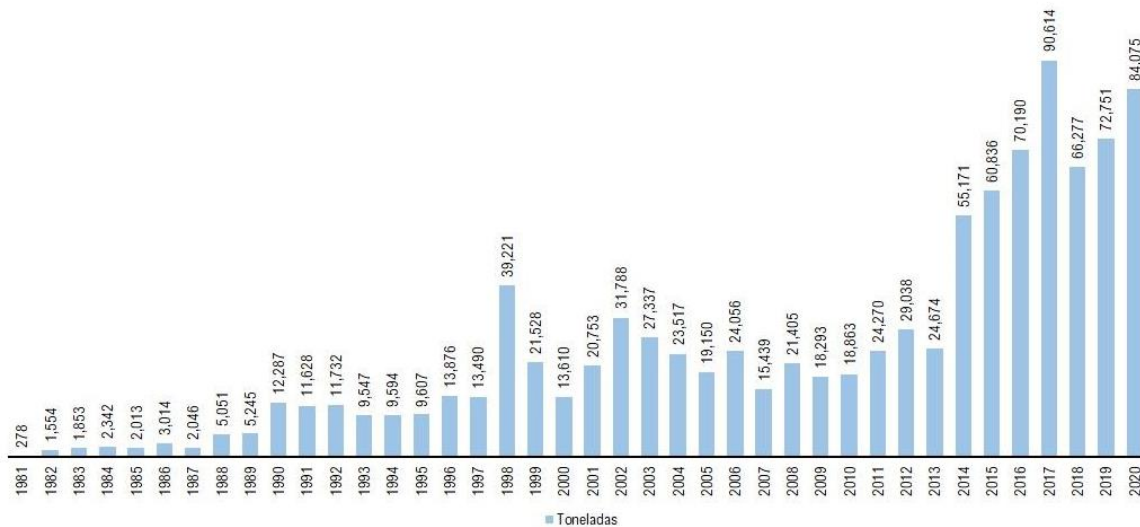


Figura 2. Producción obtenida de apio en México (SIAP, 2020).

Dentro de los estados de México, Guanajuato destaca como el principal productor con 30,873 toneladas (36.7%), seguido por Baja California con 16,995 toneladas (20.2%) y Sonora con 15,839 toneladas (18.8%), siendo estas 3 entidades donde se cultiva principalmente el apio y del cual el 75.8% representa la producción nacional (figura 3).

El valor de producción generado por Guanajuato es de 180 millones de pesos (31.7%), seguido de Baja California con 179 millones de pesos (31.5%) y Sonora con 97 millones de pesos (17.1%), obteniéndose así 569 millones de pesos como el valor total de la producción nacional de apio (SIAP, 2020).

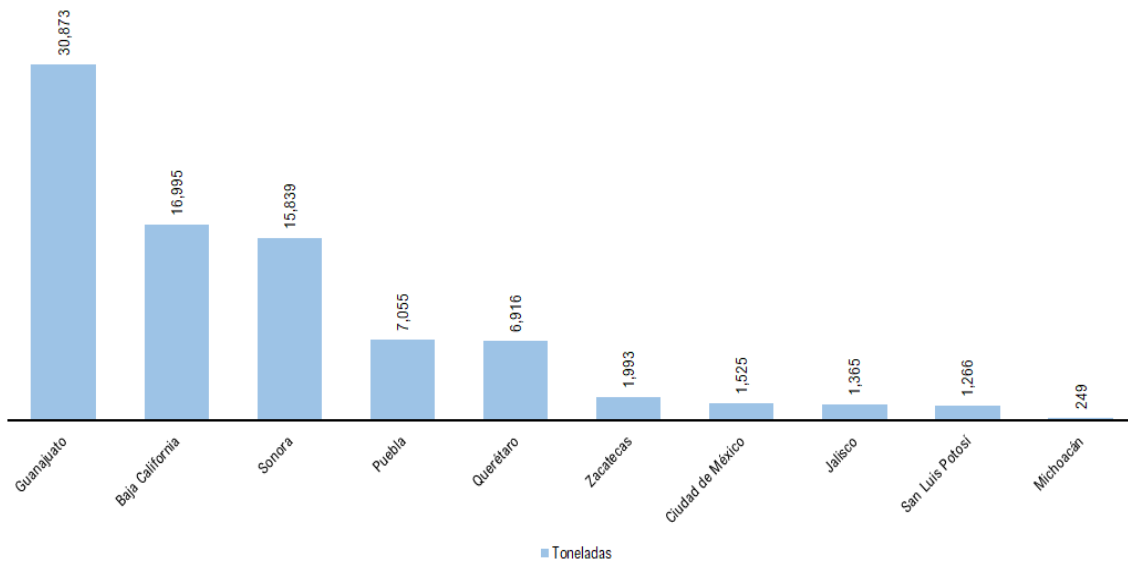


Figura 3. Estados con mayor producción de apio (SIAP, 2020).

1.1.4 Usos medicinales

Desde la antigüedad el ser humano se ha enfrentado a un sinnúmero de enfermedades y malestares con los cuales ha lidiado, y buscado erradicar a través de diferentes alternativas. Es por ello que al apio se le conoce por uso como tónico cardíaco para reducir la presión arterial en los tiempos de la medicina tradicional africana de Tobago y Trinidad (Rafif et al., 2021).

De igual manera se distingue por ser utilizado contra los helmintos, los problemas articulares, los problemas estomacales (alivio de los dolores de garganta y de las flatulencias) y los espasmos, así como sedante, carminativo, diurético, antiséptico urinario, cálculos renales, emenagogo, laxante, bronquitis, asma, artrosis y dolores artríticos. Tiene efectos importantes en la conservación de la mucosa gástrica y el fortalecimiento del corazón. Su raíz provoca un aumento del calcio y una disminución del potasio en el tejido cardíaco. También existen beneficios potenciales relacionados con la pérdida o el control del peso por ser una hortaliza baja en calorías, efectos positivos sobre el sistema inmunitario por su contenido de vitaminas A y C, además de combatir el insomnio y el edema postnasal (Salehi et al., 2019).

1.1.5 Propiedades farmacológicas

El apio es conocido por tener una variedad de actividades farmacológicas, a continuación se mencionan algunas (Rafif et al., 2021):

- Actividad antimicrobiana. Las plantas de apio desempeñan un papel importante en la prevención del crecimiento microbiano por sus efectos antibacterianos y antifúngicos. Los extractos han demostrado acción contra varias bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Hafnia alvei* y *Staphylococcus aureus*, así mismo contra varios hongos como *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Trichophyton longifusus*, *Microsporum canis*, *Candida glabrata* y *Candida albicans*.
- Actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos y los flavonoides son los principales responsables de una gran fuente de antioxidantes presentes en plantas como el apio. Estudios realizados informan de la actividad antioxidante tanto in vitro como in vivo (Salehi et al., 2019). Tal es el caso de la actividad antioxidante de las hojas de apio, al capturar la actividad radical del 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo un antioxidante natural que inhibe el proceso oxidante, el cual se asocia también con otros compuestos antioxidantes como L-triptófano y derivados de metoxi-fenil cromenona.
- Actividad anticancerígena. El apio contiene importantes compuestos activos llamados ftálicos, estos compuestos muestran protección contra el cáncer, el colesterol y la presión arterial alta. El compuesto más activo es la sedanolida, ya que ayuda a combatir tumores en pacientes con cáncer. De igual manera el apio puede reducir las mutaciones en las células cancerosas al combatir los radicales libres que se encuentran en las células que han sido dañadas, reduciendo así el potencial de estas células para mutar en células cancerosas.
- Actividad antiinflamatoria. La planta tiene componentes que poseen potentes efectos antiinflamatorios, entre ellos la actividad inhibitoria de apiina contra la producción de óxido nítrico (NO) y óxido nítrico sintasa (iNOS) que pueden ser inducidos. La luteolina, una flavona natural con diversas actividades biológicas

presenta una importante actividad en modelos de inflamación aguda y crónica (Salehi et al., 2019). Además, los polisacáridos que se encuentran en el apio, como el apiuman, pueden aumentar la producción de interleucina-10 (IL-10), disminuir IL-1 β y reducir la migración de neutrófilos, lo que causa actividad antiinflamatoria.

- Actividad hepatoprotectora. Las semillas de apio tienen una fuerte actividad contra el daño hepático inducido por el paracetamol y el tetracloruro de carbono. También pueden reducir el riesgo de desarrollar hepatotoxicidad incluyendo alanina transaminasas, albúmina, fosfatasa alcalina, aspartato transaminasa y proteína total.
- Actividad antiplaquetaria. El apio presenta compuestos de apigenina, que desempeñan un papel en la inhibición del difosfato de adenosina, el colágeno y la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico. Además, puede inhibir la agregación inducida por colágeno-adenosina difosfato en la sangre.
- Actividad antidiabética. Las semillas de apio pueden regular la actividad de todas las enzimas antioxidantes, promover el aumento de peso, mejorar las complicaciones del estrés acompañadas de diabetes mellitus y mantener niveles normales de glucosa en sangre.
- Actividad antidiarreica. Debido a los flavonoides que contiene la planta de apio, existe una reducción de la motilidad gastrointestinal, la inhibición de la síntesis de prostaglandina y la contracción del músculo intestinal.

1.1.6 Composición nutricional

El apio es un alimento de bajo contenido energético; su consumo resulta saludable y refrescante gracias a su contenido en agua y sales minerales. Después del pepino esta hortaliza es la de menor valor energético, además posee una excelente fuente de potasio que contribuye al funcionamiento normal del sistema nervioso y de los músculos. En la tabla 2 se muestra el contenido nutricional del apio.

Tabla 2. Valor nutricional por 100 g de apio (Salehi et al., 2019).

Nutrientes		Valor/100 g (Unidad)
Energía		78 kJ (18 kcal)
Proteínas		1.6 g
Lípidos		0.3 g
Carbohidratos		2.3 g
Fibra		1.8 g
Agua		95.4 g
Aminoácidos	Arginina	45 mg
	Histidina	25 mg
	Isoleucina	50 mg
	Leucina	75 mg
	Lisina	75 mg
	Metionina	18 mg
	Fenilalanina	45 mg
	Treonina	45 mg
	Triptófano	12 mg
	Tirosina	25 mg
	Valina	75 mg
Minerales	Sodio	75 mg
	Potasio	320 mg
	Magnesio	9 mg
	Calcio	70 mg
	Manganeso	150 µg
	Hierro	530 µg
	Zinc	310 µg
	Fosforo	80 mg
	Yodo	3 µg
	Selenio	1-10 µg
Vitaminas	Vitamina A, RAE	22 µg
	Vitamina B1	35 µg
	Vitamina B2	70 µg
	Vitamina B6	200 µg
	Vitamina C	8 mg
	Vitamina E	0.27 mg
	Vitamina K	100 µg
	Nicotinamida	900 µg
	Ácido pantoténico	510 µg
	Ácido fólico	7 µg

1.1.7 Fitoquímica

Diversas investigaciones han demostrado que los extractos de apio presentan componentes responsables de la actividad biológica. Algunos análisis fitoquímicos indican la presencia de compuestos como son los aminoácidos, cumarinas, terpenos, saponinas, azúcares, taninos, alcaloides, flavonoides y otros compuestos fenólicos en las semillas, tallos y hojas de *Apium graveolens*. En la tabla 3 se muestran los compuestos más representados en la literatura.

Tabla 3. Composición fitoquímica del apio.

» Compuestos fenólicos (ácido cafeico, ácido cafeoilíquínico, catequina, catecol, ácido clorogénico, crisina, ácido rosmarínico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido <i>p-cumárico</i> , ácido protocatecúico, pirogalol, ácido salicílico y ácido siríngico).
» Furanocumarinas (apigravina, celereósido, bergapteno, ostenol, apiumósido, isoimperatorina, celerina, isopimpineline, apiumetina, xantotoxina, el 5-hidroxi-metoxipsoraleno y 8-hidroxi-metoxipsoraleno).
» Flavonoides (apigenina, hesperitina, luteolina, quercetina, apiina, isoquercitina, kaempferol, graveobiósido A y B, daidzeína, genisteína, isorhamnetina).
» Dihidroestilbenoides (lunularia) y Fitoesteroles (β -sitosterol, indosterol).
» Otros compuestos (ácido fítico, metilamina, dimetilamina, N-pentilamina, anilina, benzilamina).
» En semillas ftálidos como sedanenolida (3-n-butyl-4, 5-dihidroftálido), sedanolida y la 3-n-butylftálido.
» En el aceite esencial (2-3 %) terpenos como limoneno (54-60 %), selineno (13 %), mirceno (19-28 %), γ -terpineno (1.0-1.2 %), α - y β -pineno (0.2-0.5 %).

¹Los ftálidos son un subgrupo de productos naturales pertenecientes en su mayoría a la familia Apiaceae que incorporan en su estructura doce átomos de carbono y se encuentran en la naturaleza como monómeros y dímeros, que de acuerdo con su origen biosintético pertenecen al grupo de las acetogeninas.

1.2 Alimentos funcionales

Se consideran alimentos funcionales aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar (SENC, 2016).

En los flavonoides se conocen diferentes propiedades como: efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antivirales, participan en el metabolismo celular, actúan como inhibidores enzimáticos y en procesos de transferencia de energía (Martínez et al., 2002). De tal manera que al integrar estos componentes en un alimento se obtienen beneficios a la salud y por ende se le da un valor agregado.

Las bebidas funcionales son importantes dado que ofrecen beneficios para la salud y el autocuidado; pueden ser naturales como el té (contiene antioxidantes en forma natural) o pueden adicionarse nutraceuticos como calcio de leche, omegas, proteína aislada de soya, fibras, prebióticos, probióticos, polifenoles, vitaminas, minerales, entre otros.

En la elaboración de nuevos productos funcionales se requiere encontrar la mezcla óptima de ingredientes que permita generar un nuevo producto cuya formulación ofrezca características de producto funcional con alto valor nutricional y en las que se mantengan propiedades organolépticas de aroma y sabor deseables (Salamanca, 2010).

1.3 Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal, son pigmentos naturales que también se encuentran en frutas, verduras, semillas, flores, en diversas bebidas como el vino, té verde y té negro. Protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos UV, la contaminación ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides son consumidos en la dieta de forma habitual y son necesarios debido a que el

organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos nutricionales (Martínez et al., 2002).

Son un grupo extenso de compuestos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano y de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6-C3-C6'). Este esqueleto está compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico, en el que los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (figura 4) (Cartaya y Reynaldo, 2001). De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y por lo tanto estructuras polifenólicas.

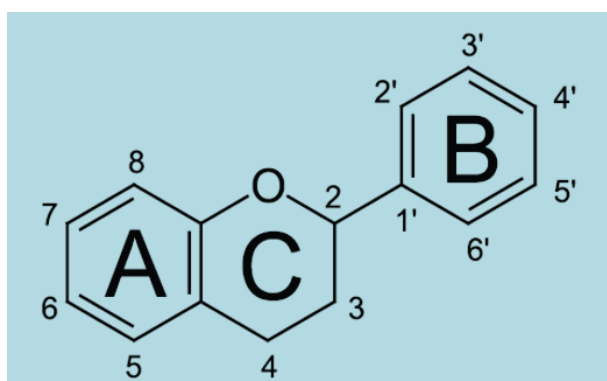


Figura 4. Estructura base de los flavonoides.

Actualmente se han reportado alrededor de 10,000 variantes estructurales de flavonoides, los cuales se han clasificado en 6 grupos basándose en la variación del pirano: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Lu et al., 2013), (figura 5).

La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existe una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos) (Manach et al., 2004).

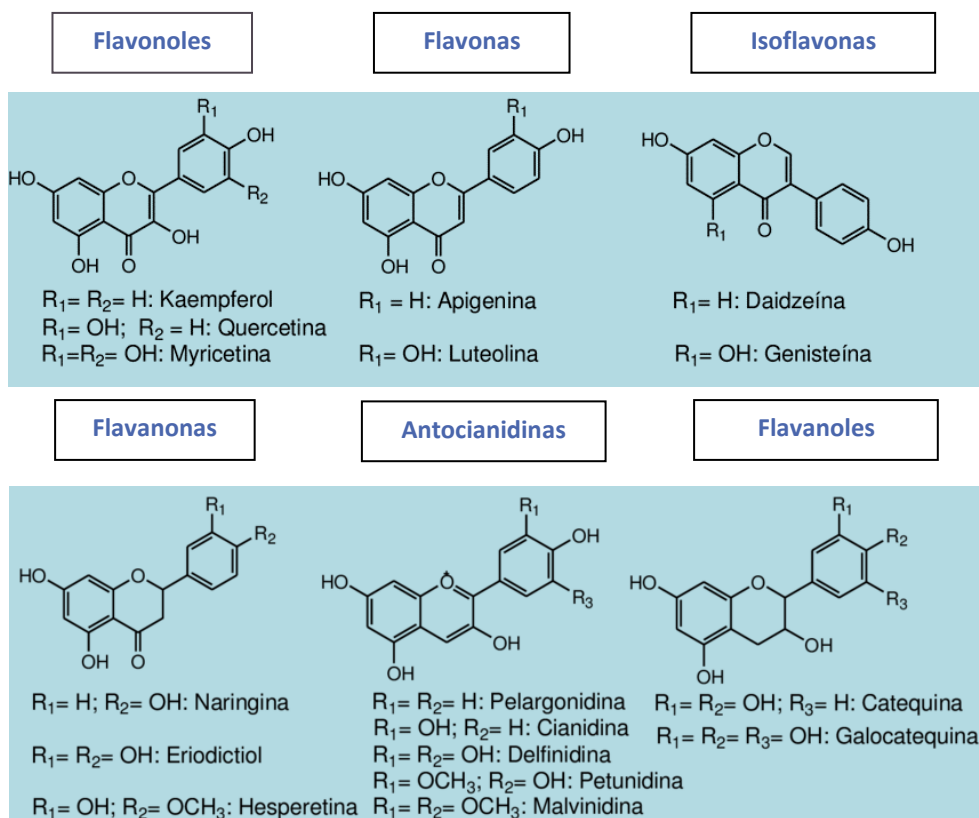


Figura 5. Clasificación de los flavonoides con base en su estructura.

Se considera que, dentro del grupo de los flavonoides, los más sobresalientes por su interés farmacológico son las flavonas, flavonoles, flavanonas y sus correspondientes heterósidos.

De acuerdo con su actividad farmacológica, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). Asimismo, tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. De igual forma actúan inhibiendo sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular como: catecol O-metil transferasa (COMT), con lo que

aumentan la duración de la acción de las catecolaminas, incidiendo por tanto en la resistencia vascular; la histidina decarboxilasa, afectando por tanto a la acción de la histamina; las fosfodiesterasas, por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria, etc.

También los flavonoides ejercen otras acciones: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica, antidepresiva, anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria. En fitoterapia se emplean principalmente en casos de fragilidad capilar como venotónicos, así como en proctología, metrorragias y retinopatías (Tránsito, 2002).

Dentro de la composición fitoquímica, algunos de los flavonoides que se han reportado del apio y que son objeto de estudio en el presente trabajo son:

1.3.1 Apigenina

El compuesto 4',5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona), comúnmente nombrado apigenina pertenece a la clase flavona (figura 6) y está presente en un amplio rango de plantas. En fuentes naturales, la apigenina se produce en una forma glicosídica, donde la estructura del núcleo tricíclico está ligado a un resto de azúcar a través de grupos hidroxilo (O-glucósidos) o directamente a un carbono (C-glucósidos), esta modificación parece ser crítica para el almacenamiento y transporte de apigenina en plantas.

Es reconocida como un flavonoide bioactivo que ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Los estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en flavonas está relacionada con un menor riesgo de ciertos tipos de cáncer, en particular cáncer de mama, tracto digestivo, piel, próstata y ciertas neoplasias malignas hematológicas. Se ha sugerido que la apigenina puede ser protectora en otras enfermedades que se ven afectadas por el proceso oxidativo, como los trastornos cardiovasculares y neurológicos (Shukla y Gupta, 2010).

Entre las fuentes principales de apigenina encontramos las flores de la manzanilla, el apio, perejil, además de numerosas plantas aromáticas como la menta, mejorana, orégano, tomillo, salvia, la col china, ajo, guayaba, romero y en menor cantidad otros

alimentos como las alcachofas, el vino tinto, la cerveza, la miel, las lechugas, el zumo de pomelo, los chiles, la cebolla roja, el nabo o el té verde.

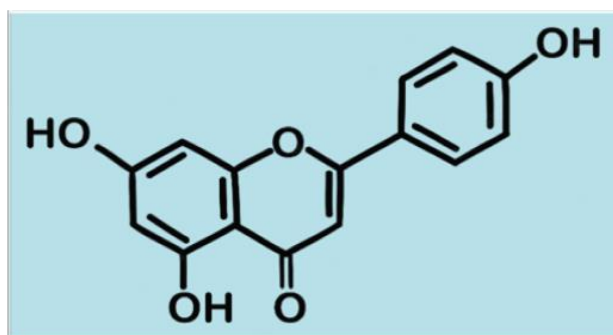


Figura 6. Estructura de la Apigenina.

1.3.2 Quercetina

El compuesto 2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4*H*-1-benzopiran-4-ona, comúnmente nombrado quercetina es un flavonol (figura 7) ampliamente presente en las plantas y exhibe una variedad de actividades biológicas. Es considerado el flavonoide más abundante y habitual en la dieta humana, ya que forma parte de otros flavonoides, como la naringenina o la rutina, que tienen grupos de azúcar unidos a ella.

Se conoce por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, las cuales están íntimamente relacionadas con la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares y cáncer. Estudios *in vivo* e *in vitro* han encontrado también que tiene actividad antibacteriana y reduce efectivamente la formación de biopelículas al inhibir la expresión de genes relacionados, actividad antitumoral, actividad antiangiogénica, etc. Además, juega un papel importante en la reducción de micotoxinas, protegiendo a las células del daño.

Se encuentra ampliamente en la naturaleza, incluidas manzanas, bayas, vegetales del género Brassica, alcaparras, uvas, cebollas, cebolletas, vino tinto, té y tomates, así como en muchas semillas, nueces, flores, cortezas y hojas. También en plantas medicinales, como *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* y saúco, no obstante se deriva principalmente de cebollas, manzanas y té (Yang et al., 2020).

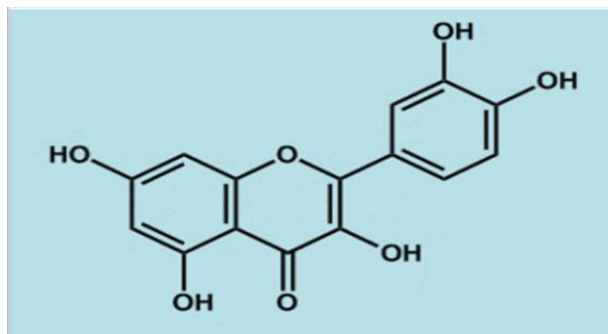


Figura 7. Estructura de la Quercetina.

1.4 Determinaciones analíticas

La espectrofotometría de UV-Vis es una técnica útil en la caracterización de flavonoides, una razón es porque se requiere poco material para realizar los análisis y porque se puede obtener información estructural importante al obtener el espectro UV-Vis después de usar reactivos específicos que reaccionan con uno o más grupos funcionales unidos al núcleo de difenilpirano (C6-C3-C6').

Los espectros de UV-Vis obtenidos de algunos flavonoides en metanol consisten de dos picos con un máximo de absorción localizado en el intervalo de 240-280 nm (banda II) correspondientes al cinamoilo (anillo B) y el otro localizado en el intervalo de 300 a 400 nm (banda I) correspondiente al benzoílo (anillo A). La forma y localización de las bandas I y II es afectada por los grupos unidos a los anillos A y B (Justino, 2017).

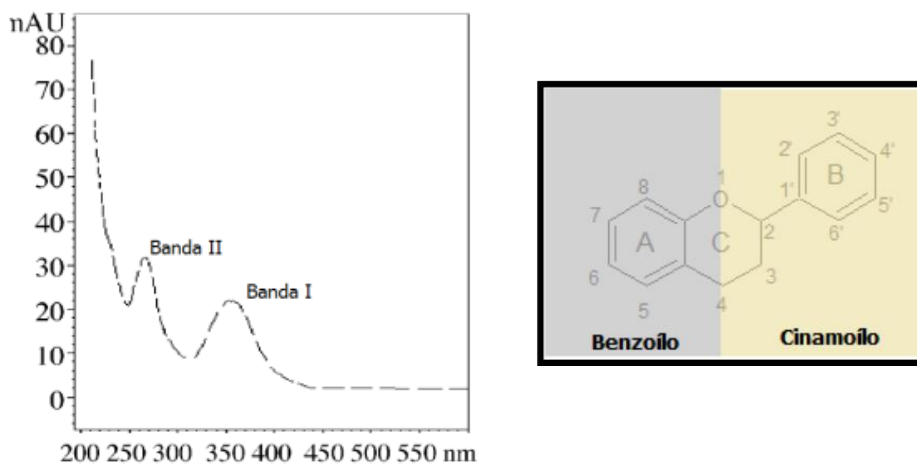


Figura 8. Espectro UV característico de flavonoides.

Esto funciona cuando contamos con el flavonoide puro, sin embargo en muestras complejas donde existe más de un componente, esto no ocurre, se requiere una separación para poder usar la espectroscopia UV-Vis como método de identificación.

Para obtener el espectro de flavonoides sin la interferencia de otros compuestos presentes como los fenólicos, se ha reportado el uso de reacciones con diferentes reactivos específicos. Como ejemplo, se encuentra el uso de magnesio o zinc metálico en presencia de ácido clorhídrico que producen una eliminación reductiva en el flavonol para obtener la antocianidina lo que origina un dramático cambio de color; otra reacción es la que se considera es una quelación de $AlCl_3$, la cual funciona con determinados flavonoides.

En general si se cuenta con los flavonoides puros se puede determinar su estructura empleando diversas técnicas espectroscópicas como espectroscopia infrarroja, la resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, las cuales son usadas como técnicas complementarias que permiten la elucidación estructural del compuesto.

De tal manera que las determinaciones espectrofotométricas empleadas en este trabajo se describen a continuación:

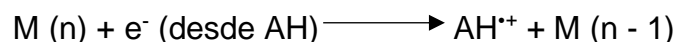
1.4.1 Capacidad antioxidante (FRAP)

Para la determinación de la capacidad antioxidante existen varias técnicas que se basan principalmente en dos mecanismos de reacción: transferencia de electrones (ET, Electron Transfer) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, Hydrogen Atom Transfer) (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005). Aunque también existen mecanismos mixtos, en los cuales hay una transferencia de un protón seguida a la transferencia de un electrón o caso contrario, la transferencia del electrón seguida de un protón.

Dentro de los métodos basados en el mecanismo HAT, se encuentran el método ORAC (Oxygen Radicals Absorbance Capacity) y el TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), mientras que para los mecanismos ET, se encuentran el

método DPPH, TEAC (del inglés Trolox equivalent antioxidant capacity) y FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Huang et al., 2005).

Siguiendo el mecanismo ET para el ensayo FRAP, este consiste en la transferencia de un electrón desde la molécula antioxidante hacia la especie radicalaria, reduciendo a esta última. La reacción involucrada es la siguiente:



1.4.2 Ensayo de Shinoda

El ensayo de Shinoda, es una prueba cualitativa que permite identificar la presencia de flavonoides (estructura de un núcleo benzopirona) que contiene un extracto vegetal. Esta prueba es una reacción del magnesio en medio ácido (figura 8), reduciendo el flavonoide generando así un producto coloreado que va desde el rojo, anaranjado hasta el violeta, en donde se considera positiva la presencia de flavonoides si aparece dicha coloración característica (Ochoa et al., 2018).

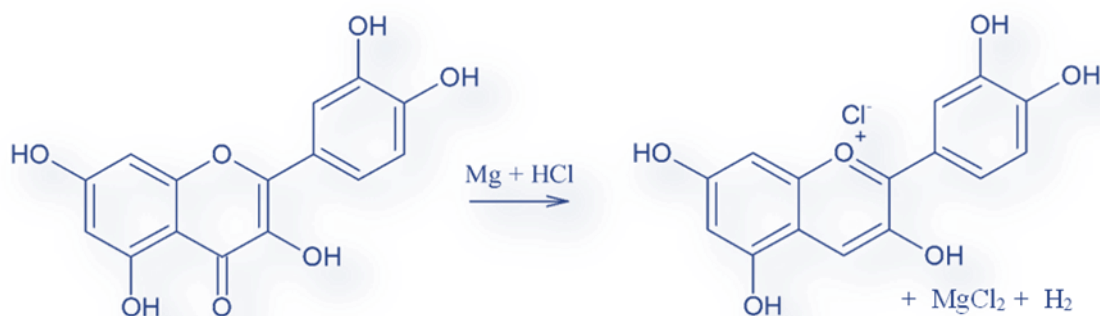


Figura 9. Reacción general de Shinoda.

1.4.3 Flavonoides totales (AlCl₃)

El uso de tricloruro de aluminio (AlCl₃) en el diagnóstico de la presencia de determinados grupos químicos se empleó primero para antocianinas, aunque posteriormente, se ha propuesto su uso en métodos espectrofotométricos para la determinación de flavonoides totales en las plantas.

En este método el catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides (figura 9), que produce en el análisis espectrofotométrico, un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Amaya y Portillo, 2013).

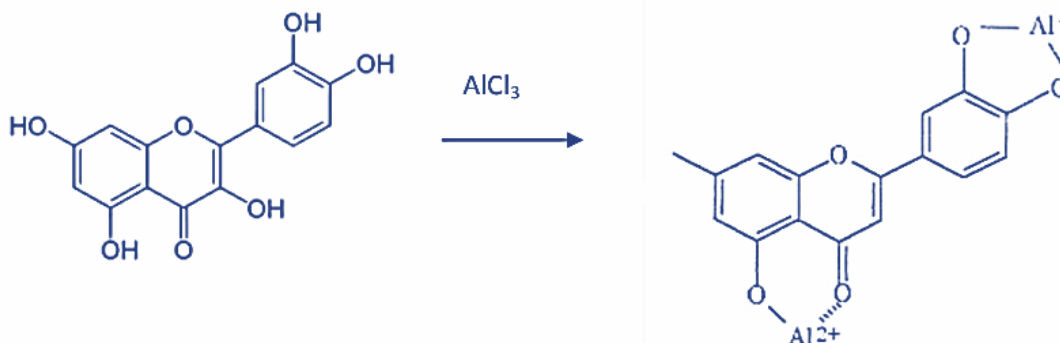


Figura 10. Complejo flavonoide-Al(III).

1.5 Evaluación Sensorial

La Evaluación Sensorial comprende un conjunto de técnicas para una medición precisa de las respuestas humanas a los alimentos y minimiza los efectos potencialmente sesgados de la identidad de marca y otra información que pueda tener influencia en la percepción del consumidor (Lawless y Haymann, 2010). Asimismo, nos proporciona información sobre la calidad de los alimentos evaluados y las expectativas de aceptabilidad de parte del consumidor, con lo cual brinda a la industria, la oportunidad de aprovechar y aplicar estas mediciones.

La importancia de la evaluación en las industrias de alimentos radica principalmente en varios aspectos como (Hernández, 2005):

- Control del proceso de elaboración: debido al cambio de algún componente del alimento o por que se varié la formulación; a la modificación de alguna variable del proceso o por la utilización de una máquina nueva/moderna.
- Control durante la elaboración del producto alimenticio: cuando se realiza a cada una de las materias primas que entran al proceso, al producto intermedio o terminado. Esto permite hacer un seguimiento al producto para evitar

alteraciones en las características en cada etapa del proceso principalmente en los Puntos Críticos de Control (PCC).

- Vigilancia del producto: en cuanto a la estandarización, la vida útil del producto y las condiciones que se deben tener en cuenta para la comercialización de los productos cuando se realizan a distancias alejadas de la planta de procesamiento o cuando son exportados, ya que se deben mantener las características sensoriales de los productos durante todo el trayecto hasta cuando es preparado y consumido.
- Influencia del almacenamiento: para mantener el producto que se encuentra en almacenamiento, bajo condiciones óptimas para que no se alteren las características sensoriales, por lo que es necesario verificar las condiciones de temperatura, ventilación, tiempo de elaboración y almacenamiento, las condiciones de apilamiento y la rotación de los productos.
- Sensación experimentada por el consumidor: se basa en el grado de aceptación o rechazo del producto por parte del consumidor, ya sea comparándolo con uno del mercado (competencia), con un producto nuevo con diferentes formulaciones o simplemente con un cambio en alguno de los componentes con el fin de mejorarlo, teniendo en claro el propósito, aspecto o atributo que se va a medir.
- La evaluación sensorial permite medir el tiempo de vida útil de un producto alimenticio.

En cuanto a las metodologías sensoriales estas se dividen en dos grandes grupos: metodologías analíticas y metodologías afectivas (figura 10).

Las metodologías analíticas estudian los límites en que son percibidas las muestras, si existen diferencias sensorialmente perceptibles entre ellas, las características de las muestras y la intensidad en las que se presentan, entre otras. Para realizarlas se necesitan jueces entrenados y el nivel de entrenamiento dependerá del tipo de prueba a realizar y del alimento a evaluar.

En una metodología afectiva se trabajará con consumidores que serán seleccionados en función del objetivo de la prueba y estos pueden ser consumidores habituales (es decir, personas que consumen de manera regular el producto) o no habituales (que lo consumen de forma esporádica, tal vez un refresco en meses) o estarán definidos en función de sus características sociodemográficas (edad, género, escolaridad, nivel socioeconómico, por mencionar algunas) (Severiano, 2019).

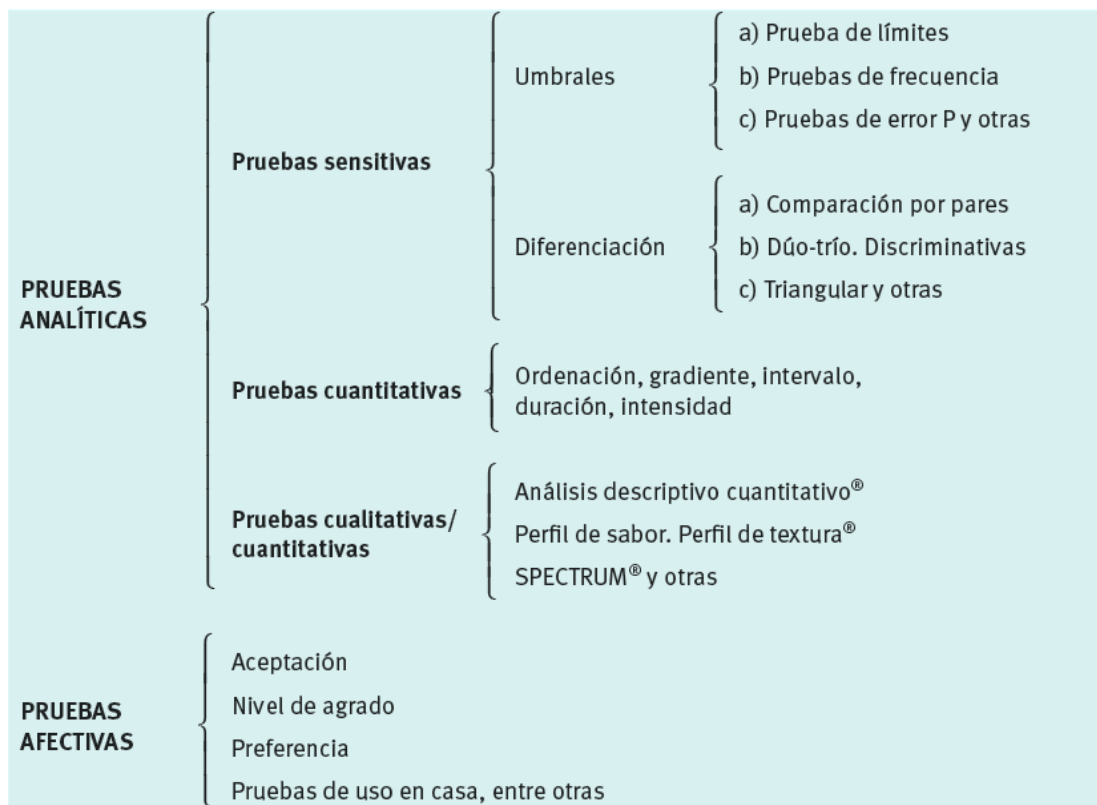


Figura 11. Clasificación general de las pruebas sensoriales (Severiano, 2019).

De tal manera que los métodos descriptivos son los más utilizados en el análisis sensorial, pero son más complejos, ya que implican la detección y la descripción de los componentes sensoriales cualitativos (apariencia, sabor, textura, aroma, regusto y propiedades de sonido) y cuantitativamente (grado de intensidad de esos aspectos) de un producto por parte de los paneles de jueces entrenados (Murray y col., 2001).

También en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de evaluación sensorial que han permitido obtener métodos de descripción rápida, que han logrado reducir el tiempo de entrenamiento y con ello disminuir los costos que se producen con la formación y mantenimiento de un panel entrenado; mediante estos métodos se puede trabajar directamente con consumidores (personas sin entrenamiento) para la descripción sensorial de alimentos y productos no alimentarios (Alcántara y Freitas, 2018).

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 11 se presenta un esquema del desarrollo experimental realizado en este trabajo.

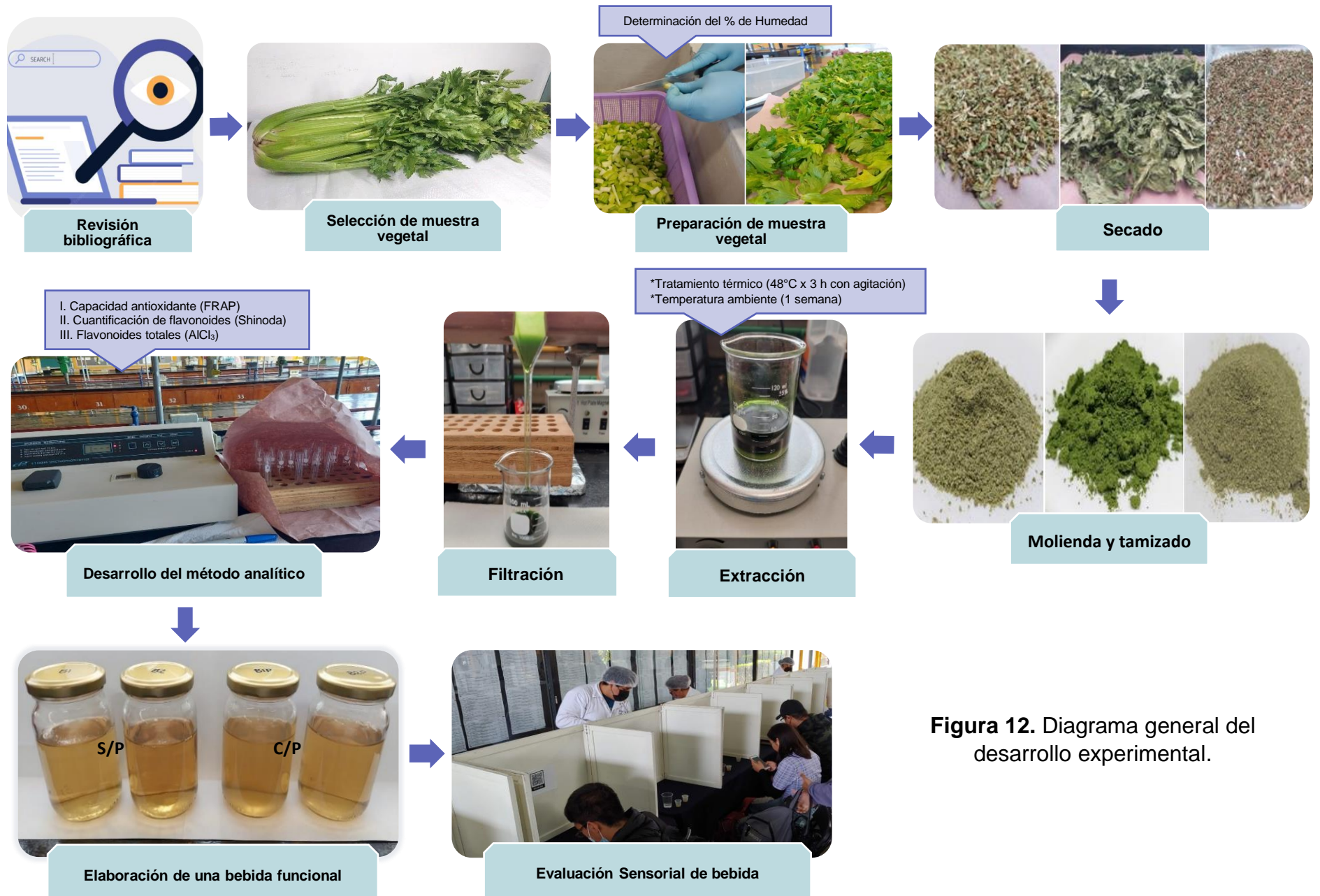


Figura 12. Diagrama general del desarrollo experimental.

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Equipo

Balanza analítica (Velab AB Series), espectrofotómetro Uv-Vis (Cole Parmer 1100 RS), estufa de vacío (Ecoshel HV-20), parrilla con agitación (Thermo Scientific super Nuova), potenciómetro (Hanna instruments HI991003) y refractómetro (KingtonStar ATC).

2.1.2 Reactivos

Ácido acético (CH_3COOH) (J.T. Baker, 99.7%), tricloruro de aluminio (AlCl_3) (J.T. Baker, 97.7%), apigenina (Apg) (Bright Sunlight, 98%), biftalato de potasio (KHP) (Sigma-Aldrich, 99.5%), dihidrato de Quercetina (Q) (Millipore, 98%), cloruro ferrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker, 99%), sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (J.T. Baker, 100%), ácido clorhídrico concentrado (HCl) (Sigma-Aldrich, 37%), nitrito de sodio (NaNO_2) (J.T. Baker, 97%), hidroxido de sodio (NaOH) (J.T. Baker, 98%), magnesio metálico (Mg) (Sigma-Aldrich, 98%), etanol (EtOH) (J.T. Baker, 99.7%) y 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$ HPLC).

2.2 Selección de muestra vegetal

La planta de apio se compró en el local de frutas y verduras “Ciro y Flores familia” en Azcapotzalco, donde se seleccionaron y clasificaron 3 muestras (tallo, hojas y centro) del lote, retirando el material dañado, decolorado o enfermo por insectos u hongos.

2.3 Preparación de muestra vegetal

Se realizó un lavado de las muestras de apio obtenidas, con agua potable y posteriormente una desinfección empleando un desinfectante natural comercial a base de extracto de semillas cítricas al 0.21% (Quality Day), para finalmente eliminar el exceso de agua con una centrifugadora de verduras.

2.3.1 Determinación del % de Humedad

Para determinar el contenido de humedad de la muestra de apio (tallo y hojas previamente seleccionadas), se empleó el método gravimétrico (AOAC, 1990), el cual se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de agua de la muestra, que es secada en estufa hasta obtener una masa constante (Vicencio, 2016). Este procedimiento se realizó por duplicado con una muestra de 2 g a 104°C x 1 h.

La pérdida de peso representa la humedad de la muestra. La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{G_{\text{muestra húmeda}} - G_{\text{muestra seca}}}{G_{\text{muestra húmeda}}} \times 100$$

2.4 Secado

Las muestras de apio una vez preparadas se dejaron secar a temperatura ambiente y a la sombra por 1 semana sobre papel estraza, cuidando que durante el proceso el material estuviera protegido de la luz y el polvo; hasta llegar a una humedad alrededor del 4%.

2.5 Molienda

Las muestras secas de apio se colocaron en un molino eléctrico hasta conseguir un polvo fino, para proceder a tamizar (tamiz # 80) y así eliminar partículas grandes. Finalmente se almacenaron por separado en tallo, hojas y centro, donde se conservaron en un lugar seco a una temperatura no mayor a 30°C para su posterior uso.

2.6 Extracción

2.6.1 Maceración a temperatura ambiente

En frascos ámbar de 100 mL se colocaron 0.5 g de la parte objeto de estudio del apio (tallo, hojas o centro) y se agregaron 50 mL de una solución de Etanol/agua (EtOH/H₂O) (80:20 v/v), posteriormente se dejó macerar por 1 semana a temperatura ambiente en un lugar protegido de la luz para evitar la degradación de los flavonoides. Se filtró y el extracto obtenido se colocó en un frasco ámbar para su posterior análisis.

2.6.2 Extracción a 48°C

En vasos de precipitados de 100 mL se colocaron 0.5 g de la parte objeto de estudio del apio (tallo, hojas o centro) y se agregaron 50 mL de una solución de EtOH/H₂O (80:20 v/v), después se efectuó la extracción por 3 horas a una temperatura de 48°C con agitación. Se filtró y el extracto obtenido se colocó en un frasco ámbar para evitar la degradación de los flavonoides y realizar su posterior análisis. Estas condiciones se seleccionaron de acuerdo con la revisión previa de los diferentes estudios relacionados, como lo es el artículo de extracción de flavonoides en hojas de *Annona muricata* L. (García et al., 2016).

2.7 Desarrollo de los Métodos Analíticos

Se propone la cuantificación de los flavonoides presentes en los extractos de apio, así como la determinación de la capacidad antioxidante mediante espectrofotometría UV-Vis. Para la cuantificación de los flavonoides se plantea el uso de dos ensayos; la reacción de Shinoda para la determinación cuantitativa y la prueba de flavonoides totales por el reactivo de tricloruro de aluminio (AlCl₃). En cuanto a la capacidad antioxidante se determina por el método FRAP.

2.7.1 Reacción de Shinoda

2.7.1.1 Cinética de reacción

De una solución madre de 500 ppm de apigenina se preparó un estándar de 100 ppm para efectuar la cinética. Se colocaron 2 mL de la disolución anterior en una celda, se añadieron 0.05 g de magnesio metálico (Mg) y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl). Después de 3 minutos de haber empezado la reacción, se procede a tomar la lectura a una longitud de onda de 478 nm en el fotómetro cada minuto hasta completar un tiempo de 60 minutos.

2.7.1.2 Curva de calibración

A partir de una solución madre de 990 ppm de Apigenina, se prepararon una serie de disoluciones para obtener concentraciones de 10, 50, 150, 250, 350 y 500 ppm (mg compuesto/L disolución). Posteriormente en matraces volumétricos de 10 mL se añadieron 2 mL de cada estándar, 0.1 g de Mg metálico y 1 mL de HCl

concentrado, transcurridos 20 min se llevaron a la marca de aforo con etanol EtOH/H₂O (80:20 v/v). Después de 1 hora se tomó la lectura a 478 nm en el fotómetro Cole-Parmer® para obtener las absorbancias.

2.7.1.3 Reacción con los extractos y bebidas de apio

Las muestras de apio se agregaron en matraces volumétricos de 10 mL de acuerdo con el anexo A, considerando también la adición de 0.1 g de Mg metálico y 1 mL de HCl concentrado para efectuar la reacción. Transcurridos 20 min se llevaron a la marca de aforo con EtOH/H₂O (80:20 v/v) y pasado 1 h se tomó la lectura a 478 nm en el espectrofotómetro para obtener las absorbancias. Este procedimiento se hizo por triplicado en cada muestra y empleando la curva de calibración se calcularon las concentraciones para obtener el valor promedio.

2.7.2 Flavonoides totales según Zhishen (AlCl₃)

El contenido de flavonoides totales según Zhishen se determinó de acuerdo con dos ensayos mayoritariamente aplicados en la formación de complejos aluminio-flavonoides.

2.7.2.1 Procedimiento 1

En celdas de vidrio para fotómetro se agregaron 1 mL de la solución prueba (apigenina 100 ppm, quercetina 100 ppm o extracto apio) con 1.0 mL de solución de AlCl₃ 2%. Posteriormente se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un análisis espectral en el rango de 300 a 600 nm contra el blanco y se midió la absorbancia a 420 nm.

2.7.2.2 Procedimiento 2

En matraces volumétricos de 10 mL se agregaron 1 mL de la solución prueba (apigenina 100 ppm, quercetina 100 ppm o extracto apio) con 4 mL de H₂O destilada y 0.3 mL nitrito de sodio (NaNO₂) 5%. Después de 5 min se adicionaron 0.3 mL AlCl₃ 10% y pasados 6 min, 2 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M, finalmente se completó el volumen total con agua destilada. Se realizó un análisis espectral en el rango de 300 a 600 nm contra el blanco y se midió la absorbancia a 510 nm.

2.7.3 Capacidad antioxidante (FRAP, por sus siglas en inglés (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter)).

2.7.3.1 Curva de calibración

A partir de una solución madre 1.2 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se prepararon una serie de disoluciones para obtener concentraciones de 30, 80, 120, 160 y 200 μM Fe^{2+} . Posteriormente en celdas se añadieron 250 μL de cada estándar y 2 mL del reactivo FRAP (mezcla de 0.3 M de buffer acetatos (pH 3.6), 0.01 M TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) y 0.02 M de cloruro férrico (30:3:3, v:v:v)) protegiendo de la luz con un papel estraza. Después de 40 min se realizó la medición de las absorbancias a 594 nm en el espectrofotómetro Cole-Parmer®.

2.7.3.2 Reacción con los extractos y bebidas de apio

En matraces volumétricos se agregaron 1 mL de cada muestra y se realizaron las respectivas diluciones de acuerdo con el anexo A. Posteriormente en celdas espectrofotométricas se añadieron 250 μL de cada disolución y 2 mL del reactivo FRAP protegiendo de la luz con un papel estraza. Después de 40 min se tomó la lectura a 594 nm en el espectrofotómetro para obtener las absorbancias. Este procedimiento se hizo por triplicado en cada muestra y empleando la curva de calibración se calcularon las concentraciones hasta sacar el valor promedio.

2.7.4 Formulación de una bebida funcional del extracto de las hojas de apio

Con el polvo obtenido de las hojas de apio se realizaron dos formulaciones para elaborar una bebida funcional (tabla 5).

Tabla 5. Formulaciones utilizadas para la realización de una bebida funcional.

Formulación	B1	B2
Ingredientes	%	%
Agua	91.98	94.18
Hojas de apio	1	1
Aceite esencial de limón	0.02	0.02
Jugo de limón	4	3
Jarabe de agave	3	1.8

El proceso que se llevó a cabo en la elaboración de la bebida funcional para ambas formulaciones se muestra en la figura 12, donde las bebidas se sometieron a un tratamiento de pasteurización. No obstante se realizó una preparación de la bebida adicional, que omite esta etapa, siendo denominado posteriormente como muestra “Sin tratamiento”.

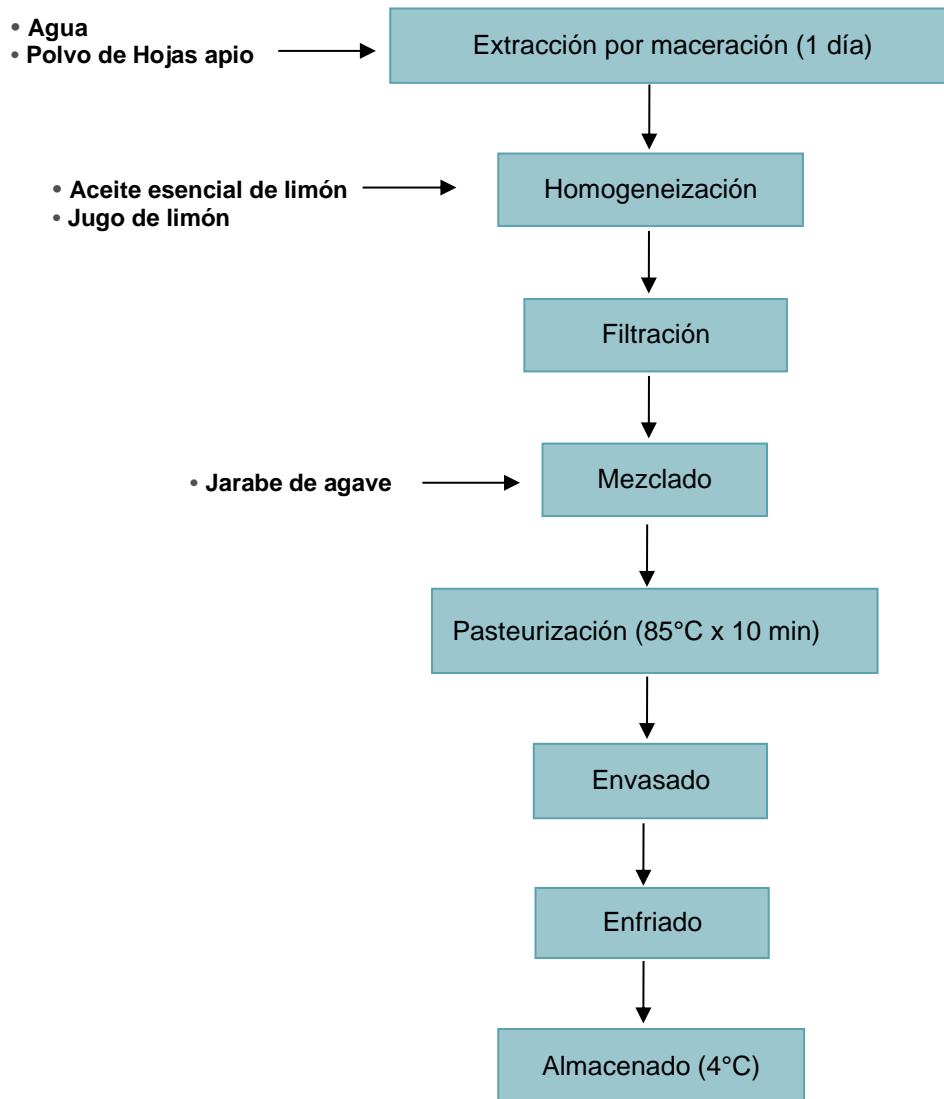


Figura 13. Diagrama del proceso para la elaboración de la bebida funcional con extracto de las hojas de apio.

2.7.5 Evaluación Sensorial bebidas de apio

Una vez preparadas las bebidas de apio se distribuyeron en vasos del número cero (figura 13), donde se agregaron 15 mL como muestra y se codificaron con un número de tres dígitos para realizar las evaluaciones correspondientes.

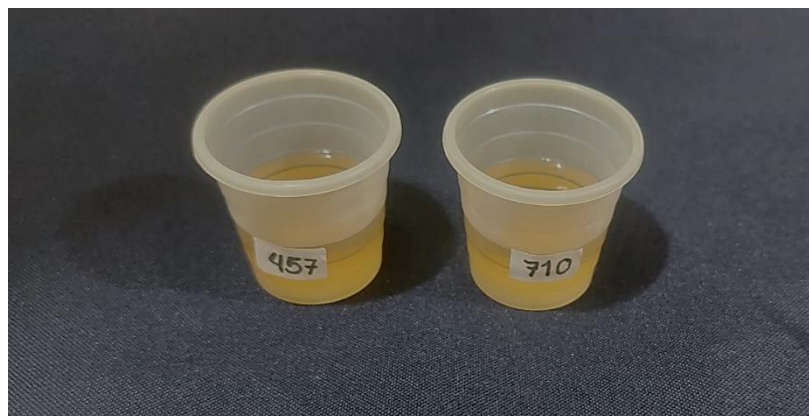


Figura 14. Muestras de bebidas de apio.

Se llevó a cabo una serie de pruebas afectivas con 160 consumidores, donde se evaluaron dos muestras de bebidas de apio. El formato del cuestionario se puede consultar en el anexo B, en la evaluación de nivel de agrado se empleó una escala hedónica de 9 puntos (1= me disgusta muchísimo, 2= me disgusta mucho, 3 = me disgusta, 4= me disgusta poco, 5= ni me gusta ni me disgusta, 6= me gusta poco, 7= me gusta, 8= me gusta mucho y 9= me gusta muchísimo), en la valoración individual de atributos una escala Just About Right (*JAR* por sus siglas en inglés) de 5 puntos (1= mucho menos de lo que me gusta, 2= menos de lo que me gusta, 3= justo como me gusta, 4= más de lo que me gusta, 5= mucho más de lo que me gusta); así como una prueba de preferencia y aceptabilidad de las bebidas de apio.

Esta evaluación se realizó en el vestíbulo del edificio A, el 17 de agosto del 2022 en la Facultad de Química, UNAM. Se efectuó la prueba con el semáforo epidemiológico en verde y tomando en cuenta las medidas de higiene por el tema de la pandemia de Covid-19, en la cual se les entregó a los consumidores el cuestionario a responder junto con las muestras codificadas y un vaso con agua.

Análisis estadístico

Para la parte de evaluación sensorial en la prueba de nivel de agrado y *JAR* se empleó un ANOVA a una vía y para conocer entre qué muestra había diferencia se aplicó la prueba de cuadrados mínimos de Fisher (DMS). En la prueba de preferencia se realizó el análisis de Friedman. El nivel de significancia empleado fue $\alpha=0.05$.

3 Resultados y análisis de resultados

3.1 Determinación de humedad

Se determinó el % de Humedad mediante un método gravimétrico de secado en estufa (104°C x 1 h) en las hojas y tallo del apio fresco. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Determinación de humedad del apio.

Contenido de humedad (%)		
Muestras de apio	Hojas	Tallo
	87 ± 0.2	94 ± 0.5

Se observa que el contenido de humedad es mayor en el tallo con 94% (equivalente a 94 g de H₂O en 100 g de tallo fresco), mientras que en las hojas es de 87% (equivalente a 87 g de H₂O en 100 g de hoja fresca). En la literatura se ha reportado que la humedad en las hojas del apio suele fluctuar entre 80.3 - 93.5% y en los tallos de un 95% (Zelenkov et al., 2021, Sufiyan et al., 2012), consistente con lo informado en este estudio para ambas muestras. También coincide con lo mencionado por Ware, donde alrededor del 95% de su peso es agua (correspondiente a la parte de los tallos) (Ware, 2018), mientras que las hojas se distinguen por ser ricas en fibra (Rodríguez y Rojas, 2022).

El contenido de humedad sirve como un factor de calidad tanto en la conservación de alimentos, como en su vida útil, puesto que una humedad excesiva puede

provocar una proliferación microbiana, al igual que activar procesos enzimáticos, que pueden producir un daño en la materia vegetal (apio) y que además afectarían en las posteriores determinaciones analíticas, ya que las sustancias a analizar pueden sufrir pérdidas o alteraciones y así mismo no obtener resultados reproducibles.

3.2 Capacidad antioxidante (FRAP)

El método FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos (Prior et al., 2005).

La reacción mide la reducción del complejo amarillo de Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), donde el hierro férrico (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a ion ferroso para formar al complejo azul de Fe^{2+} -TPTZ a través de un antioxidante en medio ácido. Cualquier electrón donado por una sustancia con una alta reactividad y un bajo potencial redox, puede llevar a la formación del complejo azul $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ TPTZ (figura 14).

Cabe mencionar que esta reacción al producir un cambio de color se puede monitorear mediante la absorbancia a 595 nm después de 4 minutos, considerando el método original. No obstante Pulido en 2000, recomienda realizar la medición después de 30 minutos de reacción, debido a que posterior a los 4 minutos muchos compuestos todavía no han terminado de reaccionar (Pulido et al., 2000).

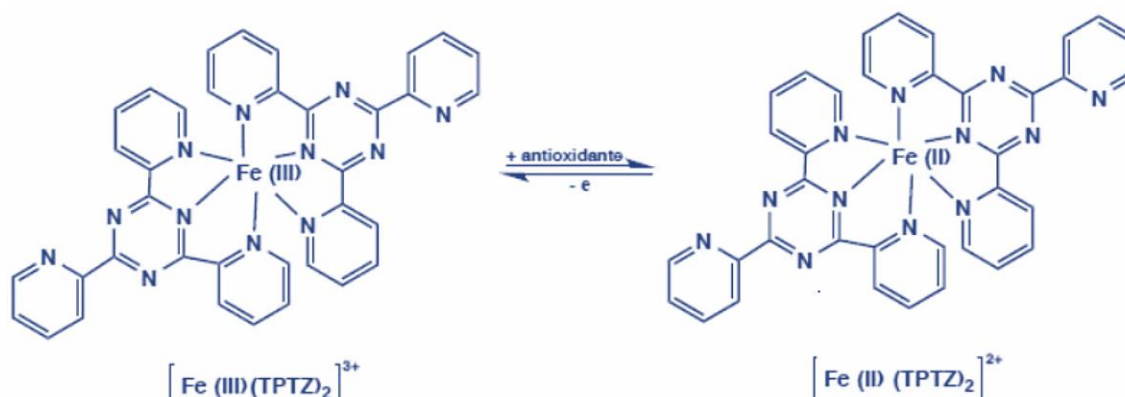


Figura 15. Reacción del método FRAP.

3.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante

En la figura 15 se presenta la curva de calibración obtenida para la capacidad antioxidante por el método FRAP en los extractos etanólicos de apio, utilizando el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como estándar de referencia y realizando la medición a una longitud de 594 nm. Los datos obtenidos se ajustaron a una línea recta. Para verificar que el modelo de la línea recta es adecuado se calculó el coeficiente de determinación (r^2). En este caso se consideró que el valor de 0.9995 garantiza el ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibrado.

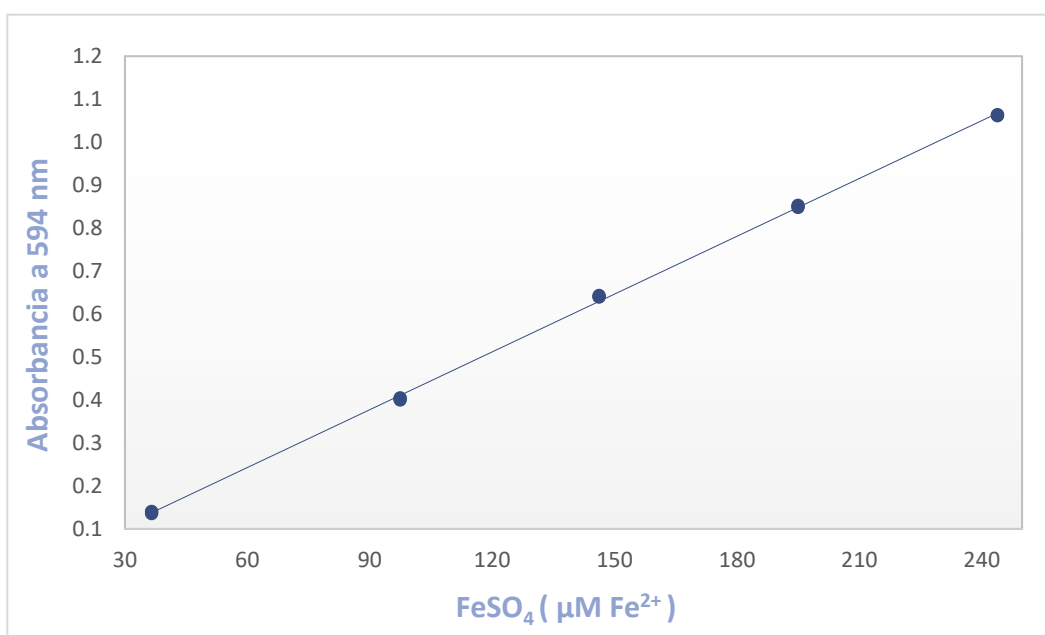


Figura 16. Curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por el método FRAP.

Mediante la ecuación del ajuste de la recta y el valor de absorbancia obtenido para cada uno de los extractos de apio, se determinó la capacidad antioxidante, los resultados son expresados en términos de micromol de Fe^{2+} , por cada gramo de muestra ($\mu\text{M Fe}^{2+}$ /g muestra).

En la tabla 7, se aprecian las diferencias significativas (IC=95%) entre las muestras que se obtuvieron del análisis ANOVA, siendo los extractos donde se aplica un tratamiento térmico (48°C por 3 h con agitación), los que presentan mayor

capacidad antioxidante con respecto a los de temperatura ambiente, donde Ht (Hojas tratamiento) > Ha (Hojas ambiente), Tt (Tallo tratamiento) > Ta (Tallo ambiente) y Ct (Centro tratamiento) > Ca (Centro ambiente).

Por otro lado, los valores de capacidad antioxidante obtenidos para las hojas son mayores con respecto a las otras secciones del apio lo que es congruente con lo que menciona Wolski et al., dado que las hojas son las que poseen mayor capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales (Wolski et al., 2002).

Dentro de los compuestos que funcionan como antioxidantes en las hojas de apio, se han reportado gran variedad de ácidos fenólicos, flavonoides e isoflavonas (Sorour et al., 2015). Entre estos, los flavonoides; luteolina y apigenina son los que se encuentran en mayor concentración. Este último compuesto como se ha visto anteriormente se distingue por sus propiedades benéficas para la salud: capacidad antiinflamatoria, anticancerígenas, antivirales y antioxidantes (Qian et al., 2011; Malhotra, 2012).

Tabla 7. Capacidad antioxidante utilizando el método FRAP en los extractos de apio analizados.

Extracto apio	Capacidad antioxidante (FRAP) $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g muestra}$
Ht	152.13 \pm 0.34 ^a
Ha	139.71 \pm 0.67 ^b
Tt	18.09 \pm 0.22 ^a
Ta	12.99 \pm 0.28 ^b
Ct	49.92 \pm 0.39 ^a
Ca	39.32 \pm 0.36 ^b

Notas: H=hojas, T=tallo, C=centro; t=tratamiento térmico y a=temperatura ambiente.

Promedio de tres mediciones \pm desviación estándar, los superíndices indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

El desarrollo del color del método FRAP con los extractos de apio se observa en la figura 16, donde todos los extractos presentaron un resultado positivo, es decir, contienen compuestos antioxidantes (reductores) que reducen el Fe^{3+} del complejo Fe^{3+} -TPTZ, a un complejo colorido azul. No obstante en los extractos de hojas, centro y tallos con tratamiento térmico (Ht, Tt y Ct) predomina una coloración más intensa, lo que nos indica mediante los resultados obtenidos en la tabla 7 que estos extractos contienen más antioxidantes con respecto a los de temperatura ambiente (Ha, Ta y Ca), pero sobre todo en la sección de hojas.

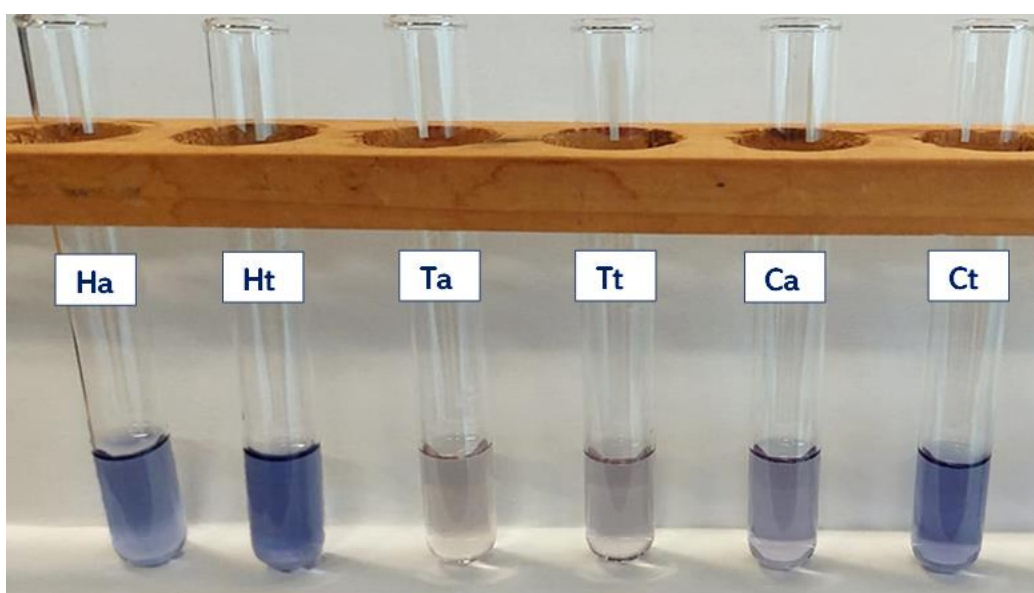


Figura 17. Capacidad antioxidante (FRAP) en los extractos de apio.

3.3 Reacción de Shinoda

Este ensayo detecta la presencia de anillos γ -benzopirona, porción estructural característica de los flavonoides de mayor abundancia en la naturaleza (extractos vegetales), donde la reducción del flavonoide se efectúa mediante el empleo de magnesio en medio ácido.

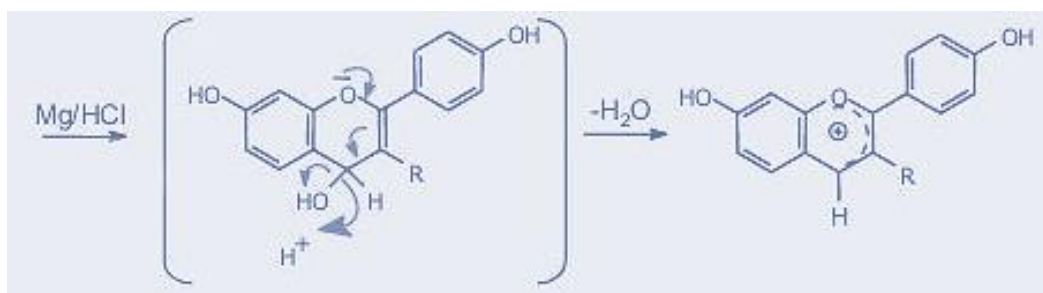


Figura 18. Inducción de la formación de la antocianidina (Shinoda).

En dicha reacción el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico concentrado, obteniéndose como productos al hidrógeno molecular (eliminado en forma de gas) y el cloruro de magnesio, en consecuencia se produce la conversión del flavonoide en la antocianidina que tiene un sistema extendido de electrones conjugados que constituyen el cromóforo, formando así las coloraciones características (figura 17).

La reacción es positiva (indicativa de la presencia de flavonoides) cuando se presenta un cambio de color, como las flavonas al dar coloración naranja, los flavonoles coloración roja y ocasionalmente los flavanoles, las flavanonas y los flavononoles coloraciones verdes o azules (Domínguez, 1973).

Particularmente este ensayo se realizó para los estándares de apigenina, quercetina y los extractos de apio. La apigenina (flavona) presentó coloración naranja y la quercetina (flavonol) coloración roja (esto se puede observar en la figura 18), que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos. En cuanto a los extractos de apio estos presentaron también una coloración naranja indicativo de flavonas aunque con diferente intensidad, por lo que se empleó el

estándar de apigenina para realizar su cuantificación, los resultados se mostrarán más adelante.

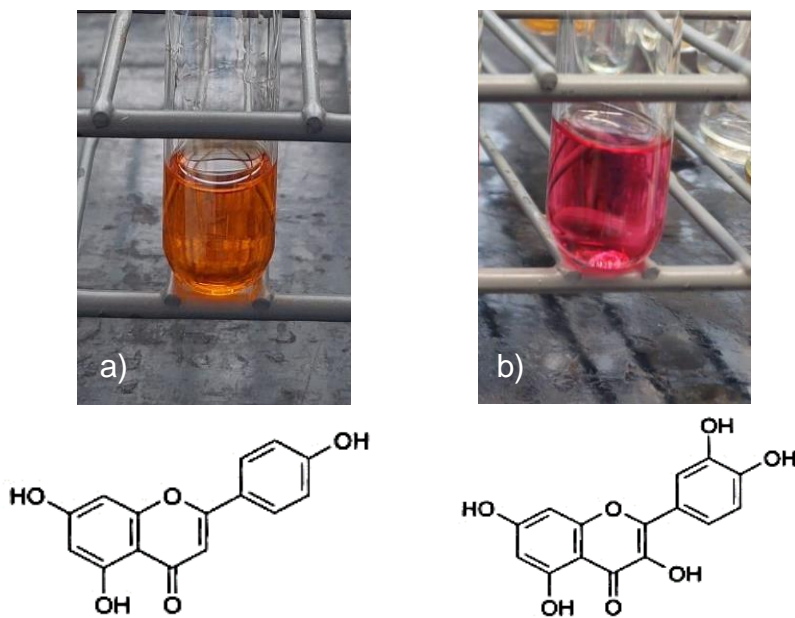


Figura 19. Reacción de Shinoda en estándares de Apigenina (a) y Quercetina (b).

3.3.1 Cinética de reacción

La gráfica de la cinética de reacción se muestra en la figura 19 y se observa que es estable a partir de los 25 minutos, por lo que se decidió realizar la determinación al paso de 1 hora.

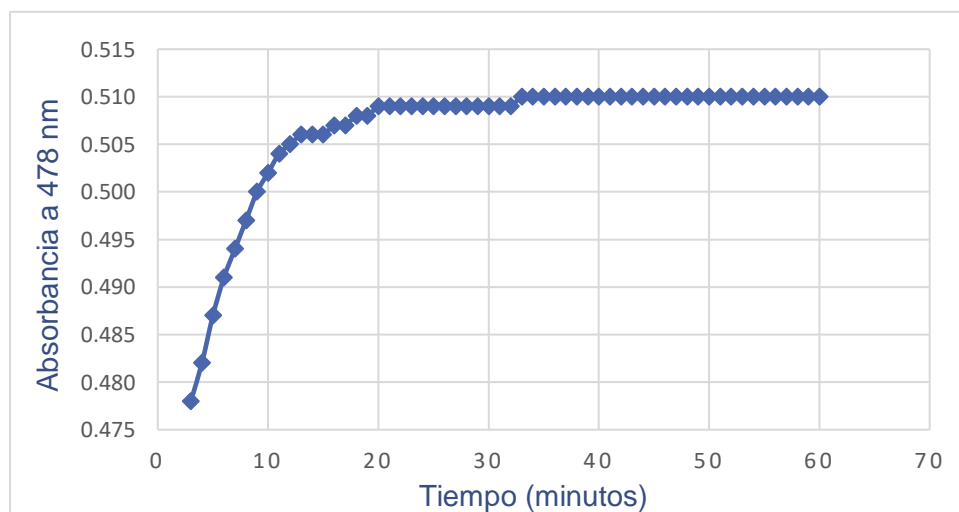


Figura 20. Cinética de la Reacción de Shinoda.

3.3.2 Cuantificación de flavonoides (Shinoda)

En la figura 20 se presenta la curva de calibración obtenida para el ensayo de la reacción de Shinoda en los extractos etanólicos de apio, utilizando apigenina como estándar de referencia y realizando la medición a una longitud de 478 nm. Los datos obtenidos se ajustaron a una línea recta. Para verificar que el modelo de la línea recta es adecuado se calculó el coeficiente de determinación (r^2). En este caso se consideró que el valor de 0.9982 garantiza el ajuste de los puntos experimentales, a la recta de calibrado.

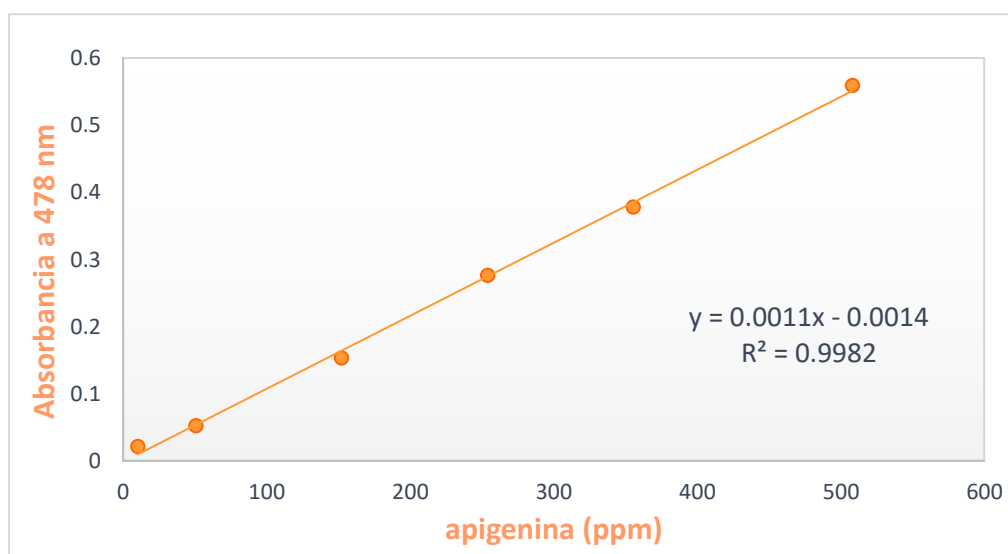


Figura 21. Curva de calibración de apigenina para cuantificación de flavonoides por Shinoda.

A partir del ajuste lineal de la curva de calibración calculada y teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido para cada uno de los extractos de apio, se determinó la concentración flavonoides del tipo flavonas (tabla 8), reportándose los resultados en términos de miligramos de flavonas, por cada gramo de muestra (mg flavonas/g muestra).

Tabla 8. Cuantificación de flavonoides utilizando la reacción de Shinoda en los extractos de apio analizados.

Extracto apio	Cuantificación de flavonoides (Shinoda) mg flavonas/g muestra
Ht	49.47 ± 0.11 ^a
Ha	37.44 ± 0.18 ^b
Tt	2.73 ± 0.03 ^a
Ta	1.55 ± 0.02 ^b
Ct	26.99 ± 0.18 ^a
Ca	21.43 ± 0.21 ^b

Notas: H=hojas, T=tallo, C=centro; t=tratamiento térmico y a=temperatura ambiente.

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar, los superíndices indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

De acuerdo con la tabla 8, el contenido de flavonoides del tipo flavonas es mayor en los extractos donde se emplea un tratamiento térmico (48°C por 3 h con agitación) en comparación a los de temperatura ambiente, se puede observar que $H_t > H_a$, $T_t > T_a$ y $C_t > C_a$, aunque los extractos de hojas destacan por su contenido. Además, entre los resultados obtenidos para cada una de las secciones del apio existe una diferencia estadísticamente significativa (IC=95%), esto se comprueba con la realización de una ANOVA.

El ensayo de Shinoda en esencia se considera una prueba cualitativa para verificar la presencia de flavonoides, en el caso de estudio, se identificó la presencia de flavonas como principal componente. Con este resultado se propuso realizar el análisis cuantitativo empleando la apigenina como estándar, el cual además, es reportado como uno de los flavonoides predominantes en el apio (Sheng, 2016).

La reacción de Shinoda se considera positiva por el cambio de color en los extractos de apio (imagen de referencia de los extractos obtenidos por tratamiento térmico, figura 21), cuyo resultado evidencia la presencia de flavonoides del tipo flavonas por

la aparición de una coloración naranja, mayoritariamente en las hojas y centro, esto se puede observar en la figura 22.

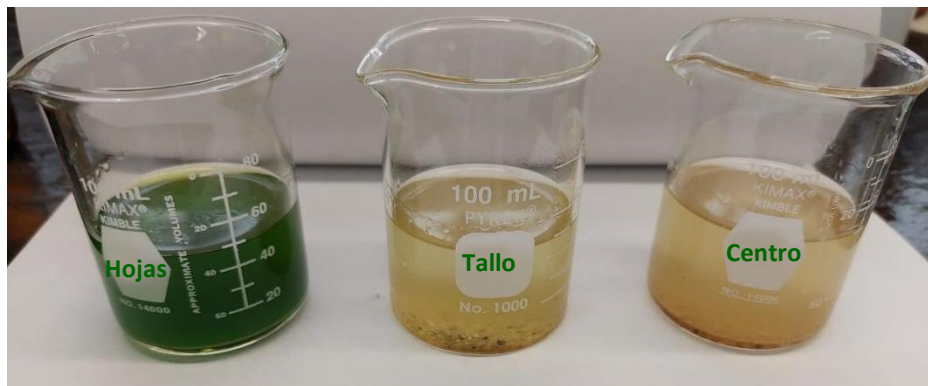


Figura 22. Extractos obtenidos en las diferentes secciones del apio (antes de la reacción).



Figura 23. Reacción de Shinoda en los extractos de apio.

3.4 Flavonoides totales (AlCl₃)

La determinación colorimétrica de flavonoides totales con cloruro de aluminio, donde se utiliza Al(III) como agente complejante fue propuesto por primera vez por Christ y Müller en 1960 para derivados de flavonol en fármacos y es considerado un parámetro importante para evaluar muestras de alimentos o plantas medicinales.

Este método se basa en la formación de quelatos de Al(III)-flavonoides. Los grupos oxo e hidroxilo presentes en el flavonoide (figura 23) tienen una gran afinidad para unirse a iones metálicos como el Al(III), principalmente en una proporción de 1:1, según las condiciones experimentales (Shraim et al., 2021).

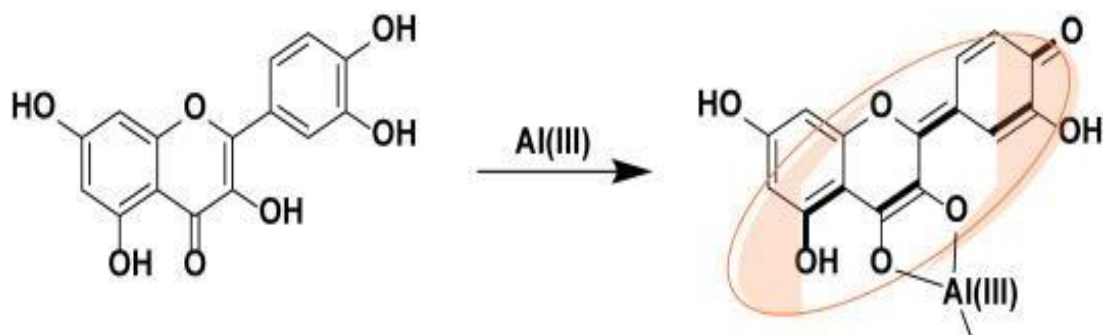


Figura 24. Reacción esquemática del complejo Al(III)-flavonoide.

Sin embargo con el tiempo, el método original ha pasado por varias modificaciones, de ahí que tras una amplia investigación en la literatura se observó una variación en las condiciones experimentales tras la aplicación de la reacción de complejación de Al(III)-flavonoides. En la tabla 9, se muestra una breve descripción de los estudios que emplean esta reacción para la evaluación del contenido de flavonoides totales (CFT) en diferentes tipos de muestras.

Tabla 9. Ejemplos de estudios que emplean la quelación con Al(III) para la evaluación del contenido total de flavonoides.

Muestra	Solución de Al(III)	Medio	Tiempo (min)	λ máx (nm)	Estándar	Referencia
Propóleos	2 %	CH ₃ COOH glacial	30	415	Galangina	Cvek et al. 2007
Hierbas	2 %	–	60	420	Quercetina	Ordóñez et al. 2006
Hierbas	1,5 %	–	2	415	Quercetrina	Chen et al. 2007
Orégano	2 %	–	10	430	Rutina	Licina et al. 2013
Frutas	2 %	–	10	415	Catequina	Praveen y Awang 2007
Extracto de hierbas	10 %	CH ₃ COOK	30	415	Rutina	Gouveia y Castilho 2011
Hierbas	0.1 M	CH ₃ COOK	20	410	Rutina	Zhang et al. 2013
Té	25 g/L	CH ₃ COONa	15	430	Rutina	Cimpoiú et al. 2011
Miel	10 %	NaNO ₂ + NaOH	11	510	Quercetina	Marghitas et al. 2009
Vinos	1 %	NaNO ₂ + NaOH	5	510	Catequina	Ivánova et al. 2010
Jengibre	10 %	NaNO ₂ + NaOH	10	430	Quercetina	Ghasemzadeh et al. 2010
Hierbas	10 %	NaNO ₂ + NaOH	5	510	Quercetina	Eghdami y Sadeghi 2010

Considerando la información obtenida se decidió realizar el ensayo de flavonoides totales utilizando AlCl₃ en presencia y ausencia de NaNO₂ como se menciona en la literatura. Los estándares más utilizados son quercetina, catequina y rutina, por lo que en este trabajo nuevamente se usaron como estándares la quercetina y la apigenina, además del extracto de apio (muestra de estudio) a fin de evaluar la validez del ensayo en un rango de absorción entre 300 y 600 nm.

3.4.1 Ensayo colorimétrico AlCl_3

En el principio del método colorimétrico con cloruro de aluminio se espera que la unión de los flavonoides al metal forme complejos ácidos estables con el grupo ceto C-4 y el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de las flavonas y los flavonoles. También la reacción puede formar complejos lábiles al ácido con los grupos orto-dihidroxilo del anillo A o B de los flavonoides, como representación en la figura 24 se muestran las estructuras de los flavonoides empleados.

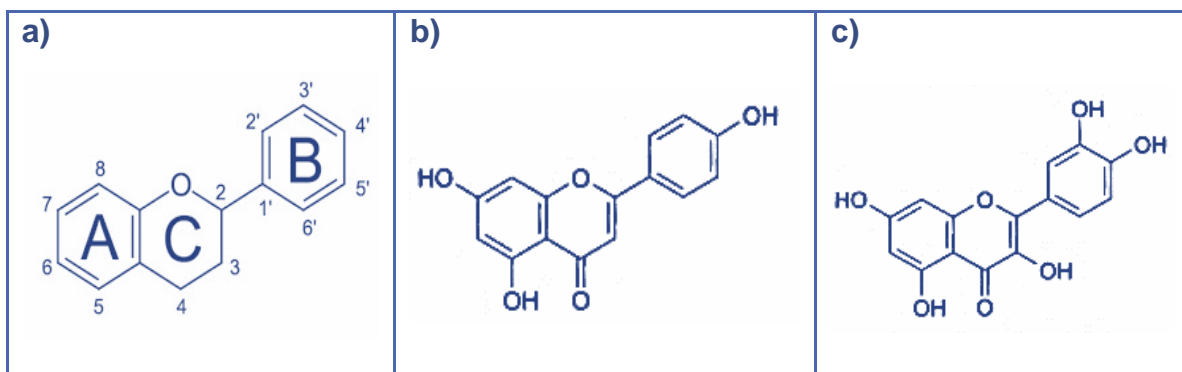


Figura 25. Flavonoides: a) estructura química general, b) apigenina (flavona) y c) quercetina (flavonol).

Por lo que antes de aplicar un tratamiento con los ensayos colorimétricos de AlCl_3 se analizaron los espectros de cada solución prueba (apigenina, quercetina y extracto de apio), en la figura 25 se observa que la apigenina como el extracto de apio muestran un perfil espectroscópico similar en la región visible (300-400 nm), en cuanto a la quercetina solo presenta una absorción máxima en 380 nm y no muestra absorbancia apreciable más allá de 440 nm.

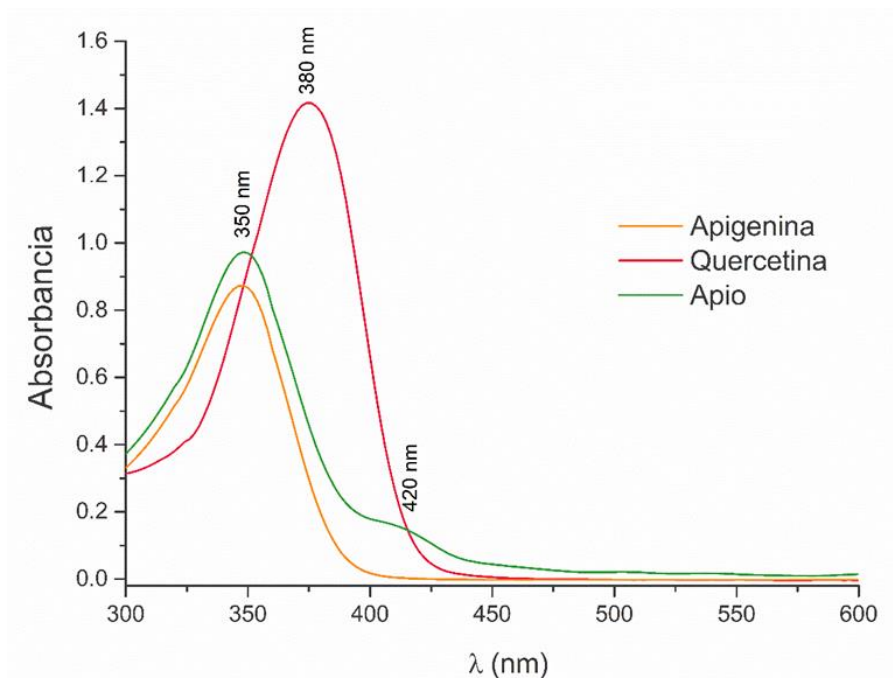


Figura 26. Espectros de soluciones sin tratamiento.

3.4.1.1 Interacción de AlCl_3 con soluciones en ausencia de NaNO_2

Experimentalmente cuando se usa AlCl_3 en ausencia de NaNO_2 , se forman complejos de Al(III) -flavonoides de color amarillo, cuya absorbancia es medida a una longitud de onda entre 410 y 440 nm, dependiendo del estándar de flavonoide empleado (Zhang et al., 2013; Chandra et al., 2014 ; Aryal et al., 2019). Aunque algunos autores mencionan que la determinación del CFT utilizando el AlCl_3 sólo es posible si la formación de los quelatos metálicos de los flavonoides individuales es cuantitativa y uniforme (Christ y Müller, 1960).

En la figura 26 se muestran los espectros de las soluciones prueba al formar complejos con AlCl_3 en ausencia de NaNO_2 . La adición de AlCl_3 a la quercetina resultó en un cambio batocrómico (rojo) en λ máx. de 380 a 430 nm por los grupos orto-dihidroxilo (figura 24 c), mientras que en la apigenina se contempla la aparición de una nueva banda en los 385 nm, lo que nos indicaría la formación del complejo entre los grupos C-5 hidroxilo y C-4 ceto (figura 24 b). Por ende podemos apreciar que el extracto de apio presenta un perfil espectroscópico similar a la apigenina.

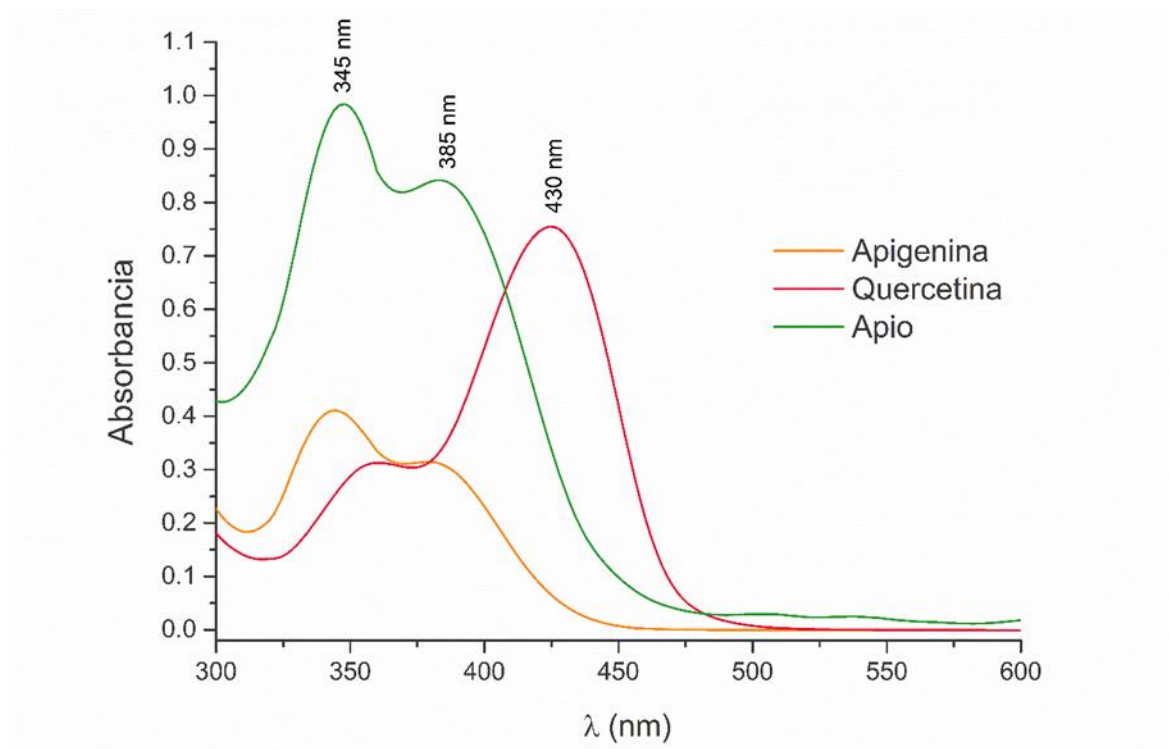


Figura 27. Espectros de absorción de la interacción de Al(III) con las soluciones.

Como se observa en la figura 26 la absorbancia del complejo de quercetina-Al(III) presenta un desplazamiento de la banda de absorción y se localiza en 430 nm. Los hallazgos similares en la literatura han informado que cuando se usa MeOH, EtOH o H₂O en cualquier mezcla, la λ máx. se sitúa en el intervalo de 425 a 430 nm (Cornard y Merlin, 2002). Por lo que el uso de una longitud de onda fuera de ese rango reducirá innecesariamente la sensibilidad del método. De ahí que la apigenina a pesar de formar el complejo y presentar un máximo de absorción alrededor de 385 nm, no es una reacción que permita realizar la cuantificación en la región del espectro visible.

3.4.1.2 Interacción de AlCl_3 con soluciones en presencia de NaNO_2

En este ensayo ocurre la nitrosilación en anillos aromáticos que presentan un grupo catecol con sus tres o cuatro posiciones no sustituidas o estéricamente bloqueadas, en la que experimentalmente tras la adición de Al(III) , se forma una solución amarilla del complejo, pero que inmediatamente se vuelve roja tras la adición de NaOH (Pekal y Pyrzynska, 2014). Por lo tanto el NaNO_2 sirve como agente nitrante, el cual es selectivo para los dioles vecinales aromáticos (Barnum, 1977) que producen un derivado flavonoide-nitroxilo caracterizado por la aparición de una nueva banda de absorción que es medido a 510 nm, un esquema de la reacción se representa en la figura 27.

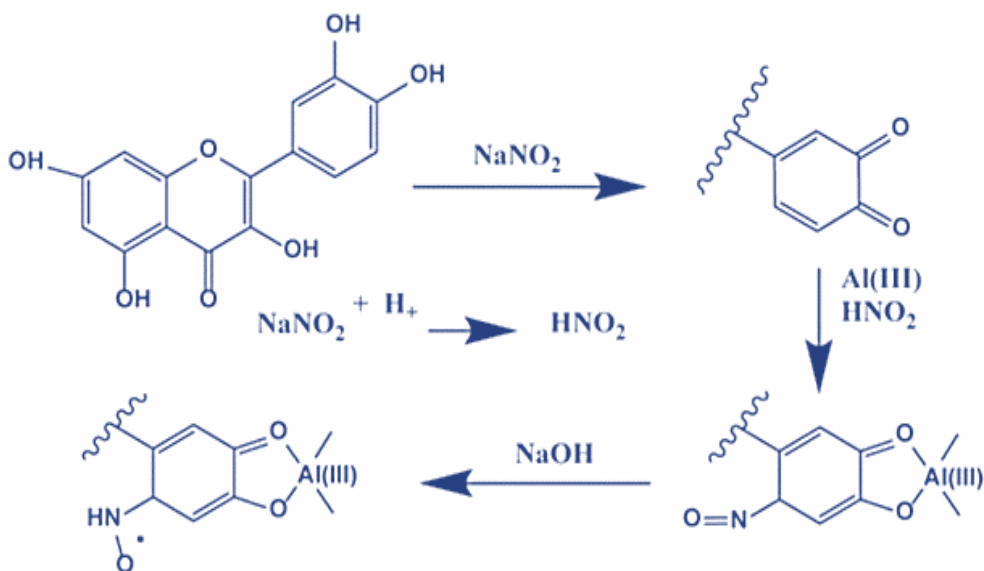


Figura 28. Esquema de la complejación de Al(III) -flavonoides en presencia de NaNO_2 .

En la figura 28 se presentan los espectros de absorción para la interacción de Al(III) con las soluciones en presencia de NaNO_2 . El perfil del espectro de la quercetina experimenta un desplazamiento al agregar NaNO_2 de 430 nm, a un máximo de absorción en 338 nm. En cuanto a la apigenina y el extracto de apio se observa una banda de absorción localizada en 390 nm, de tal manera que muestran desplazamiento batocrómico como en el ensayo anterior, sin embargo este cambio no es observable en el visible. No se observa un máximo de absorción en longitudes

cercanas a 510 nm como lo recomienda este ensayo en la literatura (Eghdami y Sadeghi, 2010) para que pueda ser cuantificable.

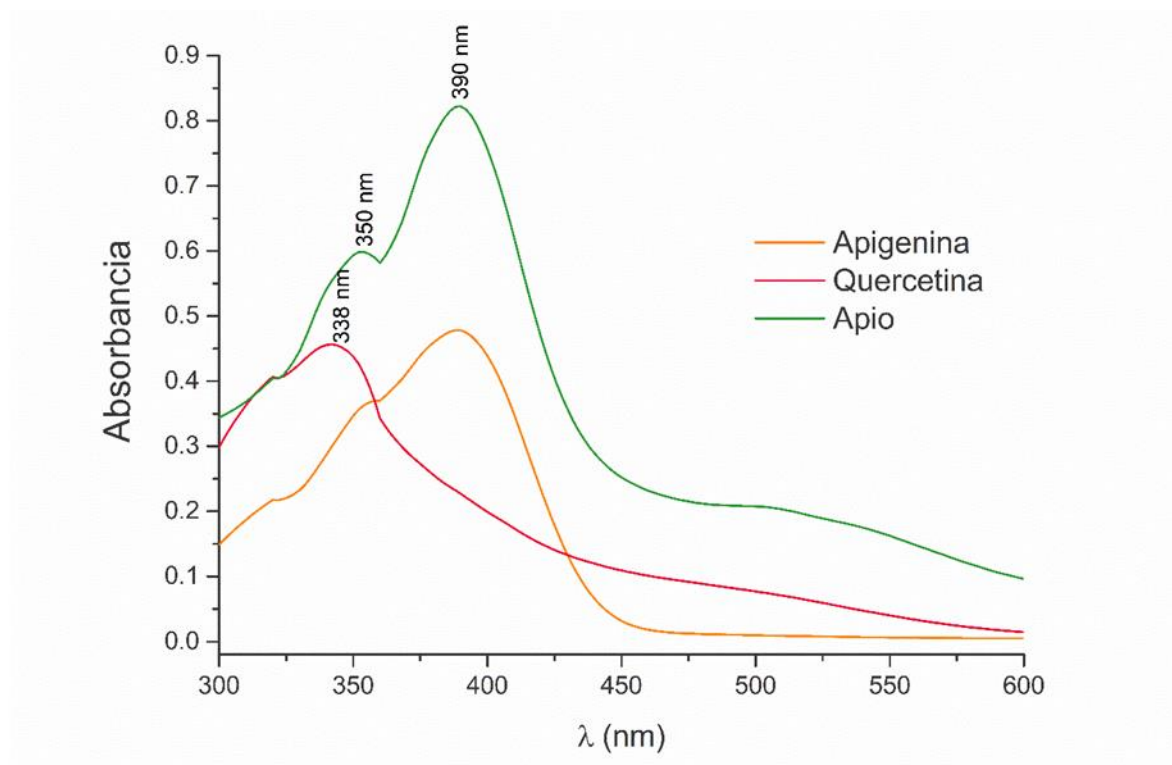


Figura 29. Espectros de absorción de la interacción de Al(III) con soluciones en presencia de NaNO₂.

El estándar de apigenina y el extracto de apio al reaccionar con AlCl₃ no muestran absorción en la λ máx. reportadas (420 y 510 nm) indicando que los métodos son inadecuados para la estimación del contenido total de flavonoides cuando la apigenina es el flavonoide principal. Mammen y Daniel informan que los métodos empleando AlCl₃ que involucran la quelación de flavonas y flavonoles no reaccionan uniformemente, lo que indica que son inadecuados para la estimación del contenido de flavonoides en muestras desconocidas o en este caso, cuando la apigenina es la flavona principal (Mammen y Daniel, 2012).

En consecuencia esta determinación mediante el ensayo colorimétrico de AlCl₃ se vuelve dependiente del estándar de flavonoides empleado en el proceso de cuantificación.

3.5 Evaluación de las formulaciones de la bebida funcional a base del extracto de las hojas de apio

En la elaboración de las bebidas se utilizaron las hojas de apio secas y molidas, dado que de las secciones de la planta analizadas previamente, está es la que posee mayor contenido de flavonoides del tipo flavonas y antioxidantes, de tal manera que se prepararon dos formulaciones para obtener una bebida funcional y así comprobar si mantienen las mismas características, asimismo a otro lote de formulaciones se aplicó un tratamiento de pasteurización con el fin de evaluar si existen cambios debido a esta etapa.

A las bebidas preparadas se les realizó una caracterización fisicoquímica (°Brix, pH, % acidez), contenido de flavonoides por Shinoda, capacidad antioxidante por FRAP y se efectuó una evaluación sensorial a consumidores mediante pruebas afectivas para saber su grado de aceptación, estos resultados se muestran más adelante.

3.5.1 Características fisicoquímicas de las bebidas

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las bebidas con y sin un tratamiento de pasteurización.

Tabla 10. Características fisicoquímicas de la bebida funcional de apio.

Bebida	°Brix	pH	% acidez (ácido cítrico)
B1	< 0.5	3.4	0.21
B2	< 0.5	3.7	0.12
B1P	< 0.5	3.4	0.21
B2P	< 0.5	3.7	0.12

Notas: B1= Bebida con + agave y limón, B2= Bebida con - agave y limón (sin tratamiento); B1P= Bebida con + agave y limón, B2P= Bebida con - agave y limón (pasteurizadas).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de las bebidas se analizan a continuación:

- Los °Brix miden la cantidad de sólidos solubles disueltos en una solución acuosa, generalmente azúcares, no obstante este valor no pudo ser determinado en las muestras, dado que al ser tan pequeño no es apreciable por el refractómetro, lo que nos indicaría que las bebidas no presentan un alto contenido de azúcares.
- El pH mide la acidez o alcalinidad de una disolución, es decir la concentración de iones H^+ , el cual por medio de un potenciómetro las bebidas presentaron un pH ácido, siendo mayor en B2 y B2P con 3.7, debido a que en su formulación, contienen menor cantidad de jugo de limón.
- El % de acidez (ácido cítrico) nos indica el contenido de ácidos orgánicos libres y se expresa como el % del ácido predominante en la muestra, que en este caso mediante una titulación potenciométrica el valor obtenido es mayor en las bebidas B1 y B1P con 0.21% de ácido cítrico, ya que en su formulación hay un mayor porcentaje de jugo de limón.

Los métodos analíticos aplicados en las bebidas formuladas fueron la capacidad antioxidante FRAP y la cuantificación de flavonoides por el método de Shinoda.

3.6 Capacidad antioxidante (FRAP) en bebidas

En la tabla 11 se muestra los valores obtenidos mediante la curva de calibración, que son expresados en términos de micromol de Fe^{2+} , por cada mililitro de muestra ($\mu M Fe^{2+} / mL$ muestra).

Tabla 11. Capacidad antioxidante utilizando el método FRAP en las bebidas formuladas.

Bebida	Capacidad antioxidante (FRAP) $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mL muestra}$
B1	110.33 ± 0.13^a
B2	119.25 ± 0.26^b
B1P	115.39 ± 0.22^a
B2P	122.60 ± 0.24^b

Notas: (B1= Bebida con + agave y limón, B2= Bebida con - agave y limón) sin pasteurizar; (B1P= Bebida con + agave y limón, B2P= Bebida con - agave y limón) pasteurizadas.

Promedio de tres mediciones \pm desviación estándar, los superíndices indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Los resultados muestran que entre B1 y B2 hay un incremento en la capacidad antioxidante de 110.33 a 119.25 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mL muestra}$, esto se le puede atribuir a la interacción de los compuestos bioactivos presentes principalmente en el jugo de limón y apio, entre ellos los flavonoides hesperidina y apigenina como los más abundantes respectivamente, dado que en la formulación de B1 el % jugo de limón es mayor que en B2, causando un posible antagonismo entre sus compuestos.

No obstante al aplicar un tratamiento de pasteurización en B1P y B2P no se observa un cambio relevante en la capacidad antioxidante con relación a B1 y B2 respectivamente, de tal manera que este proceso no altera la capacidad antioxidante en las bebidas, aunque esto depende también de los compuestos bioactivos.

En la figura 29 se observa el desarrollo del color del método FRAP en las bebidas, donde se muestran resultados positivos, dado que también contienen compuestos antioxidantes (reductores) que reducen el Fe^{3+} del complejo $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$, a un complejo colorido azul, esto se debe a que prevalece cierta cantidad de antioxidantes en las bebidas, ya sea con o sin un tratamiento de pasteurización al provenir todas de un extracto de hojas.

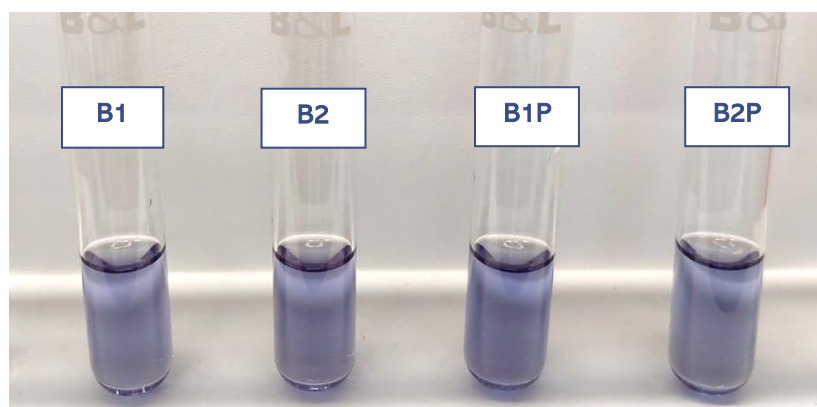


Figura 30. Capacidad antioxidante (FRAP) en bebidas.

3.7 Cuantificación de flavonoides (Shinoda) en bebidas

El contenido de flavonoides del tipo flavonas en las bebidas se muestra en la tabla 12, estos resultados son obtenidos a partir de la curva de calibración y expresados en términos de miligramos de flavonas, por cada mililitro de muestra (mg flavonas/mL muestra).

Tabla 12. Cuantificación de flavonoides utilizando la reacción de Shinoda en las bebidas formuladas.

Bebida	Cuantificación de flavonoides (Shinoda) mg flavonas/mL muestra
B1	23.75 ± 0.11 ^a
B2	26.07 ± 0.18 ^b
B1P	25.46 ± 0.28 ^a
B2P	27.97 ± 0.21 ^b

Notas: (B1= Bebida con + agave y limón, B2= Bebida con - agave y limón) sin pasteurizar; (B1P= Bebida con + agave y limón, B2P= Bebida con - agave y limón) pasteurizadas.

Promedio de tres mediciones ± desviación estándar, los superíndices indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

Como se puede observar en la tabla 12, el contenido de flavonoides del tipo flavonas en las bebidas presenta las mismas características que en la capacidad antioxidante, ya que entre B1 y B2 hay un incremento del contenido de flavonoides

de 23.75 a 26.07 mg flavonas/mL muestra. Así mismo al aplicar un tratamiento de pasteurización en B1P y B2P no existe un cambio representativo con respecto a B1 y B2, en consecuencia el calentamiento como el tiempo de procesamiento en la pasteurización no influyen en el contenido de flavonoides (tipo flavonas).

En la figura 30 se muestra el ensayo de Shinoda en las bebidas, siendo esta una reacción positiva por la aparición de una coloración naranja intensa que es característica de flavonas, que de igual manera como en la capacidad antioxidante prevalece cierta cantidad de flavonoides en las bebidas, ya sea con o sin un tratamiento de pasteurización al proceder todas de un extracto de hojas.

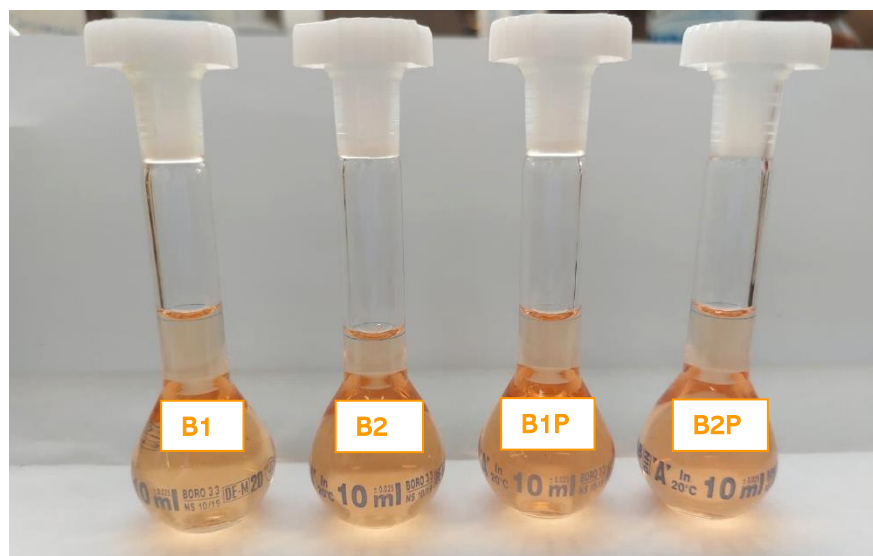


Figura 31. Reacción de Shinoda en bebidas.

Por lo tanto al partir de un 100% y al realizar todo el proceso en los extractos, los resultados en ambos ensayos muestran que en las bebidas cuya extracción se realizó en medio acuoso, se obtuvieron alrededor del 63% de flavonoides del tipo flavonas como la apigenina y un 80% de los antioxidantes en comparación a los presentes en los extractos EtOH/H₂O analizados.

También es importante mencionar que la capacidad antioxidante de los alimentos en general no se puede conferir a un grupo particular de flavonoides, ácidos fenólicos o estilbenos sino al conjunto de estos, y es necesario realizar más investigaciones para evaluar las sinergias o antagonismos entre los diferentes

compuestos (Kalt, 2005), así como el método empleado para la pasteurización, esto aplicaría también en la cuantificación de flavonoides por Shinoda para evaluar dicho efecto.

3.8 Evaluación Sensorial de las bebidas

Para evaluar el gusto del consumidor por las bebidas de apio, se realizó un cuestionario que abarcó: datos generales, prueba de nivel de agrado y gustos, preferencia por las muestras, así como la adquisición y compra.

Se realizó la prueba de nivel de agrado con escala hedónica de nueve puntos; valoración individual de atributos (escala *JAR* de 5 puntos); prueba de preferencia y aceptabilidad de la bebida de apio. Los atributos evaluados en la prueba *JAR* fueron sabor a apio, dulzor y sabor a limón.

En las pruebas afectivas participaron 160 consumidores, el 61% mujeres y el 39% hombres, esto debido al aumento de la presencia de las mujeres a nivel superior. La mayoría de los encuestados tenían entre 18 y 25 años, estos representaron un 93% del total y el porcentaje disminuye conforme aumenta la edad, siendo solo el 1% las personas con más de 46 años.

El 90% de los encuestados consumen agua de frutas o verduras, de ellos el 62% consume apio, mayormente la parte del tallo, seguido del apio entero y por último las hojas, que corresponden al 71%, 24% y 5% respectivamente. La frecuencia de consumo fue generalmente 1 vez al mes con el 52% y 1 vez a la semana con el 7%, esto se puede observar en la figura 31. Cabe mencionar que el 66% del total de los consumidores no conocen que el apio además de ser un alimento es utilizado como planta medicinal.

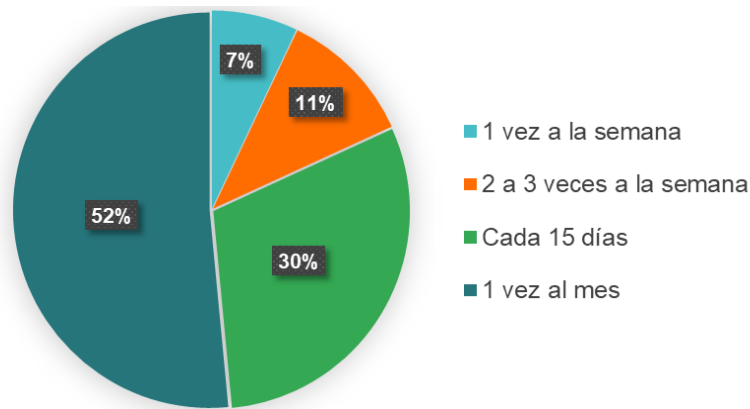


Figura 32. Frecuencia de consumo de apio.

Para realizar la prueba de nivel de agrado general se empleó el cuestionario que se encuentra en el anexo B, en el cual se presentó a los consumidores una escala hedónica estructurada de 9 puntos, siendo la muestra B1 la que obtuvo mayor agrado con un promedio de 5.894 que corresponde a **me gusta poco** en comparación con la muestra B2 con un promedio de 5.406 que está más cercano a **ni me gusta ni me disgusta**, la diferencia encontrada entre las muestras fue estadísticamente significativa esto se puede observar en la figura 32.

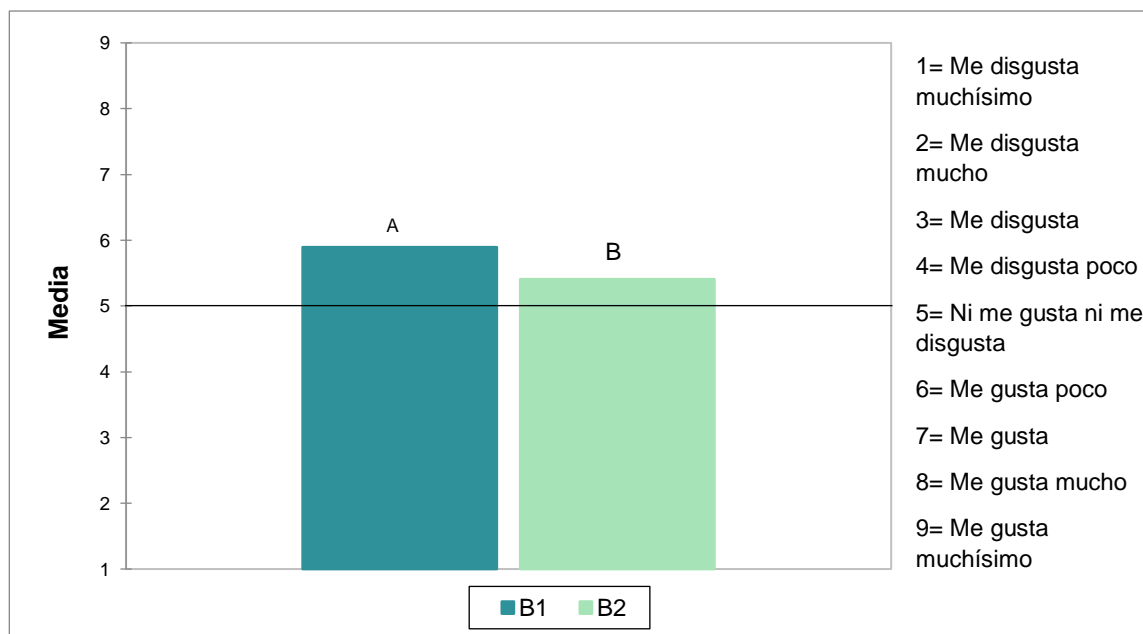


Figura 33. Nivel de agrado de la bebida de apio.

^{AB} Distinta letra indica que existe diferencia estadísticamente significativa con $\alpha=0.05$

3.8.1 Prueba JAR y Análisis de Penalidad

Para la prueba JAR se observa en la figura 33, que la muestra B1 es la que fue calificada con un promedio de 3.013 correspondiente a **justo como me gusta** en sabor a apio y promedios cercanos a **justo como me gusta** en sabor a limón y dulzor con 2.600 y 2.613 respectivamente; mientras que la muestra B2 en los atributos antes mencionados se evaluó con un promedio cercano a **justo como les gusta** en sabor a apio con 2.919, no obstante en sabor a limón y dulzor los promedios son cercanos a sabe menos de lo que les gusta a los consumidores con un promedio de 2.131 y 2.275 respectivamente.

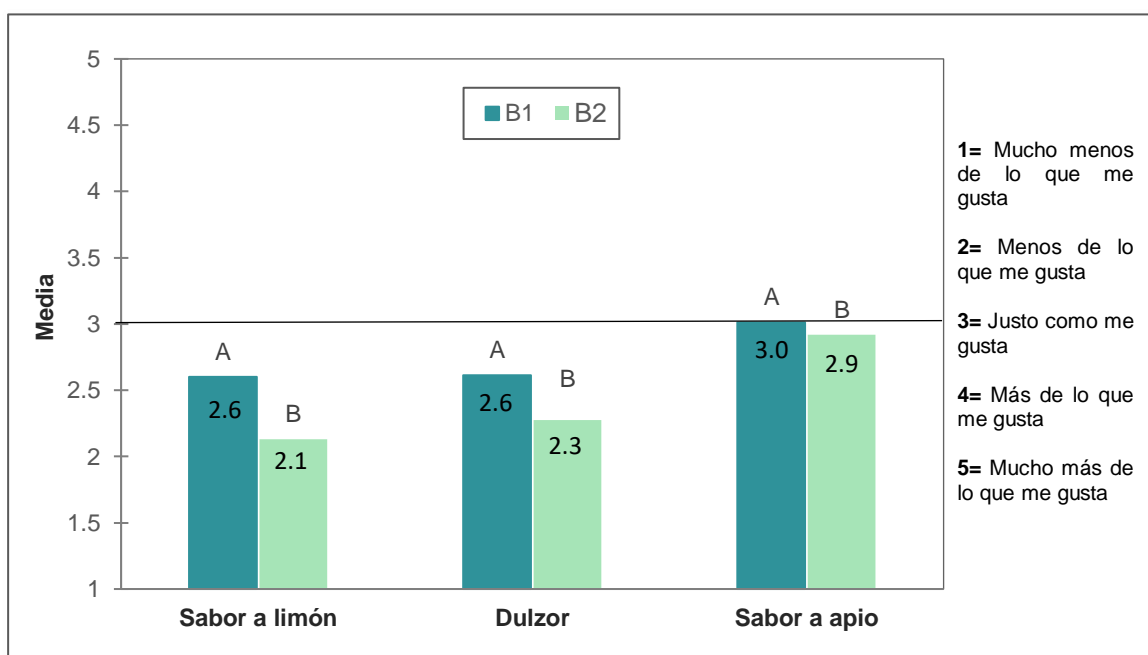


Figura 34. Prueba JAR de los atributos de la bebida de apio.

^{AB} Distinta letra indica que existe diferencia estadísticamente significativa con $\alpha=0.05$

Por lo anterior podemos decir que el sabor es un factor determinante de aceptación e intención de compra de un producto, más aún si éste es un producto nuevo, como es el caso de esta bebida a base de apio (Alvarado, 2015). El apio se caracteriza por tener un sabor amargo y fuerte aroma (conferido por sus compuestos fenólicos, tabla 3) el cual no es agradable para todas las personas, aunque en este estudio el sabor a apio en ambas bebidas fue justo como les gusta a los consumidores, dado

que la cantidad de hojas de apio en las formulaciones es la misma, sin embargo en el sabor a limón, los consumidores fueron capaces de detectar diferencias significativas en este atributo, ya que la cantidad de jugo de limón si varía en las formulaciones (B1>B2), mientras que el aceite esencial fue formulado en la misma proporción, por lo cual B1 tiene un promedio más cercano a justo como les gusta que B2 (sabe menos a limón de lo que les gusta).

También es importante considerar la acidez que proporciona el limón, ya que en un producto es indicador de calidad (Alvarado, 2015), por lo que en este caso la acidez correspondiente al porcentaje de ácido cítrico (predominante) en ambas bebidas fue aceptable con 0.21% en B1 y 0.12% en B2 (tabla 10).

Cabe mencionar que entre los componentes activos del jugo de limón se encuentran flavonoides, ácido ascórbico, cítrico y cafeico (Shahidi y Weerasinghe, 2004), mientras que el aceite esencial de limón California utilizado contiene terpenos (α -pineno, β -pineno, d-limoneno (principal constituyente), γ -terpineno) y sesquiterpenos (bisaboleno, cadineno), aldehídos (citrinal, octílico, nonílico), alcoholes (geraniol, linalol) y ácidos (acético, cáprico, caprílico) (Serio, 1952).

Para el gusto dulce se conoce que es de los únicos gustos que es aceptado de manera global por todas las culturas y etnias de la tierra como uno de los sabores más placenteros (Vera, 2008), por lo que los panelistas también fueron capaces de detectar diferencias significativas en el dulzor característico del jarabe de agave en la bebida, dado que la cantidad de igual forma varía en las formulaciones (B1>B2), siendo B1 con un promedio más cercano a justo como les gusta que B2 (sabe menos dulce de lo que les gusta).

El jarabe de agave al ser un endulzante líquido que solo presenta fructosa y fructooligosacáridos (1-kestosa, neokestosa y nistosa) en comparación con la sacarosa, posee propiedades que la hacen más atractiva y funcional, con una mayor dulzura, mayor solubilidad en agua, menor potencial cariogénico, asimilación independiente de la insulina, lo que permite a los diabéticos consumir este tipo de jarabes, así como su participación en la absorción de hierro (Fleming y GrootWassink, 1979; Henry, Crapo y Thorburn, 1991; Schved y Hassidov, 2008).

Para saber el efecto que tienen las características de la bebida en el nivel de agrado, se realizó el análisis de penalidad (tabla 13), en ella se puede observar que el consumidor penaliza con 1.511 sobre el nivel de agrado el que el sabor a apio no esté justo como le gusta, mientras que en el dulzor y el sabor a limón penalizaron con 1.323 y 0.742, que estos atributos no estén justo como le gusta. En general, lo que más penalizaron es que la bebida de apio tenga menos sabor a apio de lo que les gusta y más dulzor de lo esperado con un efecto mayor a 1.8.

Tabla 13. Penalidades de los atributos de la bebida de apio.

Variable	Nivel	Frecuencias	%	Suma (Agrado)	Media (Agrado)	Efectos sobre la media	Penalidades
Sabor a apio	Menos de lo que me gusta	57	35.63%	297.000	5.211	1.197	1.511
	Justo como me gusta	54	33.75%	346.000	6.407		
	Mas de lo que me gusta	49	30.63%	222.000	4.531	1.877	
Dulzor	Menos de lo que me gusta	92	57.50%	456.000	4.957	1.277	1.323
	Justo como me gusta	60	37.50%	374.000	6.233		
	Mas de lo que me gusta	8	5.00%	35.000	4.375	1.858	
Sabor a limón	Menos de lo que me gusta	105	65.63%	547.000	5.210	0.725	0.742
	Justo como me gusta	46	28.75%	273.000	5.935		
	Mas de lo que me gusta	9	5.63%	45.000	5.000	0.935	

Con los resultados antes mencionados, se determina que la muestra B1 fue la mejor calificada y de mayor aceptación; dado que la formulación elaborada cumple con los criterios de aceptabilidad en los consumidores, al tener un dulzor que contrarresta el sabor amargo del apio y realza el sabor del limón, que a su vez este ayuda a equilibrar el amargor y resaltar los otros sabores en la bebida, aunque la acidez otorgada por el limón también puede realzar el dulzor.

Para conocer si existía una muestra preferida se aplicó la prueba de preferencia encontrándose que existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Prueba de Friedman, anexo C), siendo la más preferida la muestra B1 (figura 34), esto nos brinda una idea más completa de la percepción que generó la bebida en el consumidor, la cual es influenciada en parte por el conjunto de los atributos mencionados anteriormente y por las experiencias de cada consumidor.

Se preguntó a los consumidores si les gustaría adquirir la bebida que prefirieron, el 82% de los consumidores indicaron que sí, además expresaron que el precio que están dispuestos a pagar por una presentación en botella de 450 mL es principalmente entre \$20.00 y \$29.00 con un 85% como se muestra en la figura 35 y en menor proporción con 1% entre \$40.00 y \$49.00, al igual que más de \$50.00.

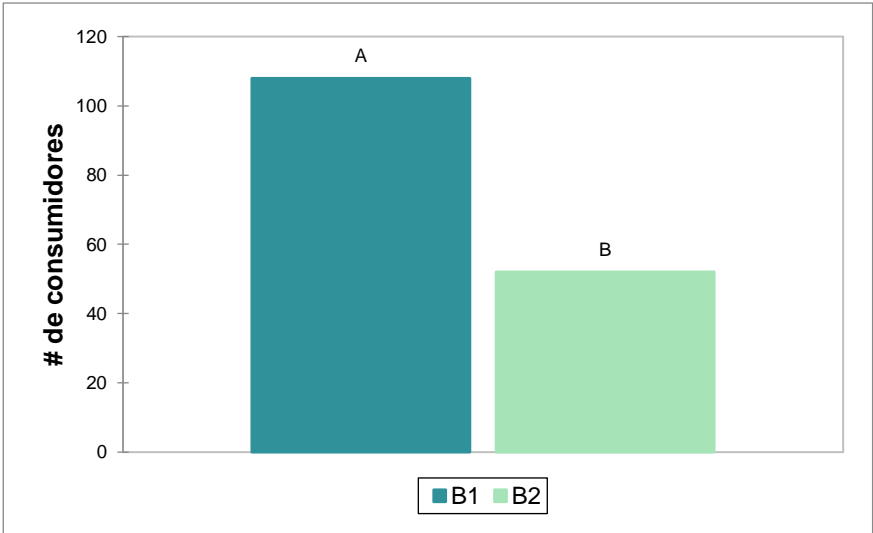


Figura 35. Prueba de preferencia

^{AB} Distinta letra indica que existe diferencia estadísticamente significativa con $\alpha=0.05$

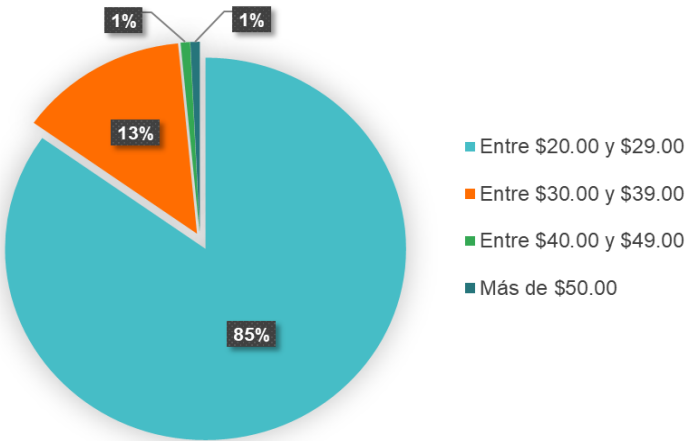


Figura 36. Costo dispuesto a pagar por una bebida de apio

4 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en la experimentación, se puede concluir que:

- En la reacción colorimétrica de Shinoda se logró determinar que el tipo de flavonoides presente en los extractos de apio eran principalmente flavonas por su característica coloración naranja. Se cuantificó usando, apigenina (flavona) como estándar, siendo en los extractos con tratamiento térmico los que presentan un mayor contenido de estos compuestos y en cuya sección de hojas es más notable por su contenido de 49.47 mg flavonas/g muestra de hojas secas.
- En la determinación de capacidad antioxidante por el método FRAP para los extractos de apio, se observan resultados similares a la reacción de Shinoda. Los extractos con tratamiento térmico tienen mayor capacidad antioxidante, sobre todo en las hojas con 152.13 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ /g muestra de hojas secas.
- El estudio del contenido de flavonoides totales mediante dos de los ensayos mayoritariamente aplicados en la formación de complejos aluminio-flavonoides, como es la interacción de AlCl_3 en ausencia y en presencia de NaNO_2 , no muestran absorción en la λ máx. reportadas de 420 y 510 nm respectivamente, estableciendo así que el método no es apropiado para la estimación del contenido total de flavonoides, con apigenina como flavonoide principal.
- Se desarrollaron dos formulaciones de bebidas funcionales con las hojas de apio por su gran contenido de compuestos bioactivos (flavonoides).
- En las bebidas de apio, a pesar de que la extracción se realizó en medio acuoso, se obtuvieron alrededor del 63% de flavonoides del tipo flavonas como la apigenina y un 80% de los antioxidantes en comparación a los extractos EtOH/H₂O analizados en las determinaciones analíticas.
- En la evaluación sensorial de las bebidas de apio, la formulación con mayor aceptación fue la B1, con un 82% de adquisición, ya que presentó

características sensoriales aceptables por los consumidores potenciales que estarían dispuestos a comprarla por un costo entre \$20.00 y \$29.00.

- La aplicación del extracto de hojas de apio en bebidas aportaría un ingrediente funcional al producto, con sabor refrescante y considerable aporte, tanto de flavonoides, como antioxidantes.

5 Referencias bibliográficas

- Alvarado, J. 2015. *Desarrollo de una bebida de naranja (Citrus sinensis) con apio (Apium graveolens) y chía (Salvia hispánica)*. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Zamorano, Honduras.
- Amaya, L. y Portillo, C. 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. San Salvador, El Salvador. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5311/1/16103410.pdf>
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. y Koirala, N. 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants*. 8(4), 96-108.
- Barnum, D. 1977. Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Analytica Chimica Acta*. 89(1), 157-166. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)83081-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)83081-6)
- Benzie, I. y Strain, J. 1996. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay". *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Campillo, N. 2011. Introducción al análisis químico. [En línea] Disponible en: <https://www.um.es/documents/4874468/11830096/tema-1.pdf/1c49a077-8b02-405d-9100-ee5f7f1b1b7b>
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M., Elsohly, M. y Khan, I. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2014:253875. Doi: [10.1155/2014/253875](https://doi.org/10.1155/2014/253875)
- Chang, C., Yang, H., Wen, M. y Chern, C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug análisis*. 10(3).
- Chen, L., Ding, L., Yu, A., Yang, R., Wang, X., Li, J., Jin, H., Zhang, H. 2007. Continuous determination of total flavonoids in *Platycladus orientalis* (L.) Franco by dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line derivatization and ultraviolet-visible detection. *Analytica Chimica Acta*. 596(1), 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.063>
- Cimpoiu, C., Cristea, M., Hosu, A., Sandru, M., Seserman, L. 2011. Antioxidant activity prediction and classification of some teas using neutral networks. *Food Chemistry*. 127(3), 1333-1328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.091>
- Cárdenas, C., Mera, E., Tirado, F., Silva, S. y Anglas, M. 2016. *Estudio fitoquímico y preliminar en el extracto hidroalcohólico de hojas del (Apium graveolens var) apio*. [En línea] Disponible en:

<https://pdfcookie.com/documents/pdfcookie-nvogwwn8ro28>. [Último acceso el 09 de noviembre de 2021].

- Cartaya, O. y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-11.
- Cornard, J. y Merlin, J. 2002. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 92(1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00469-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00469-5)
- Cvek, J., Medić, M., Jasprica, I., Zubočić, S., Vitali, S., Mornar, A., Vedrina, I., Tomić, S. 2007. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*. 18: 451-459. <https://doi.org/10.1002/pca.1001>
- Domínguez, A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. 1a. Edición. Límusa. México. p. 84-85.
- Eghdami, A. y Sadeghi, F. 2010. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea Millefolium*. *Organic Chemistry Journal*. 2:81-84.
- García, Y., Salomón, S., Acosta, J., Romero, A., López, M. y Mercado, J. 2016. Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. *Cubana de Plantas Medicinales*. 21(3), 298-307.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. y Rahmat, A. 2010. Antioxidant activities, total phenolic and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*. 15(6), 4324-4333. <https://doi.org/10.3390/molecules15064324>
- Gouveia, S. y Castilho, P. 2011. Antioxidant potential of *Artemisia argentea* L'Hér alcoholic extract and its relation with the phenolic composition. *Food Research International*. 44(6), 1620-1631. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.040>
- Hernández, E. 2005. Evaluación Sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6), 1841-1856.
- Ivanova, V., Stefanova, M. y Cinnici, F. 2010. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 75(1), 5-59. <https://doi.org/10.2298/JSC1001045I>
- Justino, G (Ed.). 2017. *Isolation and structure identification of flavonoids*. Flavonoids from biosynthesis to human health. Doi: 10.5772/65575
- Kalt, W. 2005. Effects of production y processing factors on major fruit y vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*. 70(1),11-19.
- Khalil, A., Nawaz, H., Ghania, J., Rehman, R. y Nadeem, F. 2015. Value Added Products, Chemical Constituents and Medicinal Uses of Celery (*Apium*

graveolens L.) - A Review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 8, 40-45.

- Lawless, H. y Haymann, H. 2010. *Sensory evaluation of food. principles and practices*. 2a ed. Springer, Food science texts series.
- Licina, B., Stefanovic, O., Vasic, S., Radojevic, I., Dekic, M., Comic, L. 2013. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. *Food Control*. 33(2), 498-504. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.020>
- Liria, M. 2007. *Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos*. Lima, AgroSalud, p. 4.
- Lu, M., Xiao, T. y Zhang, H. 2013: Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 432: 701-704.
- Maldonado, S., Díaz, R. y González, M. 2017. Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral. México, INIFAP, p. 7.
- Malhotra, S. 2012. Celery. En: *Handbook of herbs and spices*. 12: 249-267.
- Mammen, D. y Daniel, M. 2012. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*. 135(3), 1365-1368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.109>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez L. 2004. Polifenoles: fuentes alimentarias y biodisponibilidad. *Am J Clin Nutr*, 79: 727-747.
- Mărghitas, L., Dezmirean, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*. 112(4), 863-867. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.055>
- Martínez, S., Gonzáles, J., Culebras, J. y Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6), 271- 278
- Ochoa A, Lassny S, Sarmiento M, Andrea JU, De C, Aplicadas YA-UDCAV, et al. Estudio fitoquímico de la especie vegetal y evaluación de su actividad biológica. 2018. Available from: https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS_2018-05-22.pdf
- Ordoñez, A., Gómez, J., Vattuone, M., Isla, M. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*. 97(3), 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.024>
- Pecal, A. y Pyrzynska, K. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*. 7:1776-1782.
- Perea, J. 2021. *Efecto del flavonoide apigenina sobre la corriente de canales ASIC en neuronas de ganglios de la raíz dorsal de rata neonata*. [Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina]. Repositorio Institucional Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

<https://repositorioinstitucional.buap.mx/server/api/core/bitstreams/75fc6475-4313-41c8-9db0-bebd89a64f0e/content>

- Praveen, K. y Awang, B. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *J Eng Sci Technol.* 2:70-80.
- Prior, R., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(10), 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L. y Saura-Calixto, F. 2000. "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay" *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 48(8), 3396-3402.
- Qian, Z., Ming-Ming, Z., Pei-Lin, C., Yun-Ying, C. y Xiang-Ling, T. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery. *Journal of Food Science.* 76 (5), C680-C685.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos naturales con efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares. *Nutrición Hospitalaria.* 27(1).
- Rafif, A., Intan, T., Muhammad, A., Rafi, A., Budi, E., Cashyer, S. y Fadholly, A. 2021. Review on the Pharmacological and Health Aspects of *Apium Graveolens* or Celery: An Update. *Systematic Reviews in Pharmacy,* 12(1), 606-609.
- Ramírez, C. 2020. *Evaluación de la extracción de flavonoides a partir de la cáscara de naranja.* [Tesis de Licenciatura, Fundación Universidad de América]. Repositorio Institucional Universidad de América. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8180/1/6151508-2020-2- IQ.pdf>
- Rodríguez, X. y Rojas, F. 2022. Valor nutricional de hojas y tallos de brócoli, apio y betarraga disponibles en un mercado mayorista de Santiago de Chile. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.* 20(3). <https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.03.97>
- Rożek, E., Nurzyńska, R., Sałata, A. y Gumiela, P. 2016. The chemical composition of the essential oil of leaf celery (*apium graveolens* L.) under the plants irrigation and harvesting method. *Hortorum Cultus,* 15(1), 150-154.
- Salamanca, G., Osorio, P. y Montoya, M. 2010. Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borojo. *Revista Chilena de Nutrición.* 37(1), 87-96.
- Salehi, B., Venditti, A., Freza, C., Yucetepe, A., Altuntas, Ü., Uluata, S., Butnariu, M., Sarac, I., Shaheen, S., Petropoulos, S., Matthews, K., Kilic, C., Atanasova, M., Adetunji, C., Ademiluyi, A., Özcelik, B., Tsouh, P., Martins, N., Cho, G. y Rad, J. 2019. *Apium* Plants: Beyond Simple Food and Phytopharmacological Applications. *Applied Sciences.* 9 (17), 2-28. <https://doi.org/10.3390/app9173547>

- Schmidh, S. y Fontana A. 2007. Water activity values of select food ingredients and products. En su: Water activity in foods. 1ra. edición. USA. IFT Press, Blackwell Publishing. p. 407-420.
- SENC. 2016. *Guía de Alimentos Funcionales*. [En línea] Disponible en: <https://www.fesnad.org/index.php?seccion=dinamico&subSeccion=documento&idF=4> [Último acceso 20/10/22]
- Severiano, P. 2019. ¿Qué es y cómo se utiliza la evaluación sensorial?. *Interdisciplina*. 7(19), 47-68.
- Shraim, A., Ahmed, T., Rahman, M y Hijji, Y. 2021. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT-Food Science and Technology*. 150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Sheng, H. 2016. Chinese Herbal Medicine-Derived Products for Prevention or Treatment of Diseases Affecting Quality of Life y Deciphering the Biosynthetic Pathways of Bioactive Compounds *In Planta* Using Omics Approaches. **En:** H. Sheng, L. Shyur, D. Chandra, Y. Chang y S. Yang. eds. *Medicinal Plants – Recent Advances in Research and Development*. Singapur: Springer, 1 y 5.
- Shukla, S. y Gupta, S. 2010. Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *National Institutes of Health*. 27: 962-978.
- SIAP, 2020. *Apio*. [En línea] Disponible en: <http://cincopordia.com.mx/files/pages/0000000023/ApioOptimizado.pdf> [Último acceso el 26/07/2023].
- Sorour, M., Hassanen, N. y Ahmed, M. 2015. Natural antioxidant changes in fresh and dried celery (*Apium graveolens*). *American Journal of Energy Engineering*. 3 (2-1), 12-16.
- Sufiyan S, Mansoor M, Singla RK, Khan S. Isolation of 3-n-Butyl Phthalide & Sedanenolide from *Apium graveolens* Linn. *Indo Glob J Pharm Sci*. 2012; 2(3):258-261. <http://iglobaljournal.com/wp-content/uploads/2012/11/6.-Fazal-SS-et-al-2012.pdf>
- Surec, S. 2017. Evaluación de tres densidades de siembra en la producción de apio, (*Apium graveolens* L.), en la aldea Chirijuyú, Tecpán, Chimaltenango, Guatemala, C.A. [Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio Centroamericano SIIDCA-CSUCA.
- Tavico, P. 2014. *Importancia y aprovechamiento de las propiedades medicinales del apio (Apium graveolens) en la Escuela Oficial Urbana Mixta Guamarkah Jornada Vespertina, del Municipio de Santa Cruz del Quiché, El Quiché*. (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de San Carlos Guatemala, Guatemala.
- Tránsito, M. 2002. Flavonoides. *OFFARM: farmacia y sociedad*. 21(4), 108-113.

- Vicente, L., Prieto, M. y Morales, A. 2003. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista Toxicológica*, 30, 171-181.
- Vidaurre, M., Querevalú, L., Martínez, Elena y Ruiz, S. 2001. Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Revista Médica Vallejana*, 4(2), 125-129.
- Ware, M. 2018. Apio: Beneficios para la salud e información nutricional. [En línea] Disponible en: <https://es.wordssidekick.com/celery-health-benefits-nutrition-facts-13814>. [Último acceso el 7/8/2023].
- Wolski, T., Dyduch, J. y Najda, A. 2002. Evaluation of content and composition of phenolic acids and tannins in leaf dry matter of two celery cultivars (*Apium graveolens* L. var. dulce mil. pers.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture*. 5 (1), 1-5.
- Yang, D., Wang, T., Long, M. y Li, P. 2020. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxid Med Cell Longev*. Vol. 2020, artículo ID 8825387, 13 páginas.
- Zelenkov, V., Ivanova, M. y Latushkin, V. 2021. Elemental composition of *Apium graveolens* L. seeds as an indicator of the nutritional value of competitive organic products. *Earth Environ Sci*. 650:012055. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/650/1/012055>.
- Zhang, D., Luo, M., Wang, W., Zhao, C., Gu, C., Zu, Y., Fu, Y. 2013. Variation of active constituents and antioxidant activity in pyrola [*P. incarnata* Fisch.] from different sites of Northeast China. *Food Chemistry*. 141(3), 2213-2219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.045>
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. y Tang, T. 2010. Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study of different extraction technologies. *Food Analytical Methods*, 3 (2), 90-97.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A (PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y PRUEBAS ANALÍTICAS)

Extractos de apio

Tipo de extracción/ Muestras apio	Maceración a temperatura ambiente (1 semana)	Tratamiento térmico (48°C x 3h con agitación)
Hojas	0.5 g muestra seca en 50 mL EtOH/H ₂ O (80:20 v/v)	
Tallo		
Centro		

Reacción de Shinoda

En matraces volumétricos de 10 mL se agregaron las siguientes proporciones tanto para los extractos y bebidas de apio para efectuar la reacción, una vez transcurridos 20 min. se llevaron a la marca de aforo con EtOH/H₂O (80:20 v/v) y pasado 1 h se realizó la toma de lectura a 478 nm en el espectrofotómetro.

Muestras	Alícuota	Reacción
Ha	1 mL	+ 1mL EtOH 80% + 0.1g Mg + 1 mL HCl concentrado
Ht	1 mL	
Ta	6 mL	+ 0.1g Mg + 1 mL HCl concentrado
Tt	6 mL	
Ca	1 mL	+ 1mL EtOH 80% + 0.1g Mg + 1 mL HCl concentrado
Ct	1 mL	
B1	1 mL	
B1P	1 mL	
B2	1 mL	
B2P	1 mL	

Capacidad antioxidante (FRAP)

De cada muestra (extractos y bebidas de apio) se tomó 1 mL y se realizaron las respectivas diluciones en matraces volumétricos llevando al volumen con agua destilada. En celdas se añadieron 250 μ L de cada disolución y 2 mL del reactivo FRAP protegiendo de la luz con un papel estraza, después de 40 min. se realizó la toma de lectura a 594 nm en el espectrofotómetro.

Muestras	Dilución	Reacción
Ha	1:10	250 μ L de disolución + 2 mL del reactivo FRAP (mezcla de 0.3 M de buffer acetatos (pH 3.6), 0.01 M TPTZ y 0.02 M de FeCl ₃ (30:3:3, v:v:v).
Ht	1:10	
Ta	1:5	
Tt	1:5	
Ca	1:5	
Ct	1:5	
B1	1:10	
B1P	1:10	
B2	1:10	
B2P	1:10	

6.2 ANEXO B (CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN AFECTIVA DE DOS BEBIDAS DE APIO)

El presente estudio se realiza para evaluar una bebida a base de apio. Los resultados solo se usarán con fines académicos.

DATOS GENERALES

Edad:

- a) 18 – 25
- b) 26 – 35
- c) 36 – 45
- d) Más de 46

Con qué género se identifica:

- a) Masculino
- b) Femenino
- c) Otro

¿Consume agua de frutas o verduras?

- a) Si
- b) No

¿Usted consume apio?

- c) Si
- d) No

¿Sí la respuesta anterior es afirmativa, qué parte del apio es la que más consume?

- a) Hojas
- b) Tallo
- c) Todo
- d) No aplica

¿Con qué frecuencia consume apio?

- a) 1 vez a la semana
- b) 2 - 3 veces por semana
- c) Cada 15 días
- d) 1 vez al mes
- e) No aplica

¿Usted conoce que el apio además de ser un alimento es utilizado como planta medicinal?

- a) Sí
- b) No

INSTRUCCIONES: A continuación, le presentamos una serie de preguntas sobre una bebida a base de apio. Por favor lea con cuidado y contesta lo que se pide, cualquier duda que surja no dude en preguntar al coordinador de la prueba.

Anote el código de la muestra

R= _____

Indique que tanto le gusta la muestra marcando la opción que corresponda en la escala (Marca con una "x" sobre el # de tu elección).



¿En cuanto al sabor a apio indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 1	
Sabe mucho menos a apio de lo que me gusta	
Sabe menos a apio de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Sabe más a apio de lo que me gusta	
Sabe mucho más a apio de lo que me gusta	

¿En cuanto al dulzor indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 1	
Mucho menos dulce de lo que me gusta	
Menos dulce de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Más dulce de lo que me gusta	
Mucho más dulce de lo que me gusta	

¿En cuanto al sabor a limón indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 1	
Sabe mucho menos a limón de lo que me gusta	
Sabe menos a limón de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Sabe más a limón de lo que gusta	
Sabe mucho más a limón de lo que me gusta	

Nota: Una vez terminado, enjuague su boca con agua antes de probar la siguiente muestra.

DESPUÉS DE ENJUAGARSE EVALÚE LA SIGUIENTE MUESTRA

Anote el código de la muestra

R= _____

Indique que tanto le gusta la muestra marcando la opción que corresponda en la escala (Marca con una "x" sobre el # de tu elección).



¿En cuanto al sabor a apio indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 2	
Sabe mucho menos a apio de lo que me gusta	
Sabe menos a apio de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Sabe más a apio de lo que me gusta	
Sabe mucho más a apio de lo que me gusta	

¿En cuanto al dulzor indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 2	
Mucho menos dulce de lo que me gusta	
Menos dulce de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Más dulce de lo que me gusta	
Mucho más dulce de lo que me gusta	

¿En cuanto al sabor a limón indica que tanto le gusta la muestra? Marca con una "x" la casilla de tu elección.

Muestra 2	
Sabe mucho menos a limón de lo que me gusta	
Sabe menos a limón de lo que me gusta	
Justo como me gusta	
Sabe más a limón de lo que gusta	
Sabe mucho más a limón de lo que me gusta	

AL HABER PROBADO LAS MUESTRAS PUEDE INDICAR:

¿Cuál fue su preferencia? (Anote el código de la muestra)

R= _____

¿Estaría dispuesto a adquirir esta bebida?

- a) Si
- b) No

¿Cuánto estaría dispuesto a pagar por una botella de 450 ml?

- a) Entre \$20.00 y \$29.00 _____
- b) Entre \$30.00 y \$39.00 _____
- c) Entre \$40.00 y \$49.00 _____
- d) Más de \$50.00 _____

Comentarios adicionales:

R= _____

6.3 ANEXO C (ANÁLISIS ESTADÍSTICO EVALUACIÓN SENSORIAL)

ANOVA del nivel de agrado de la bebida de apio

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Muestras	1	19.013	19.013	7.411	0.007
Error	318	815.787	2.565		
Total corregido	319	834.800			

ANOVA del atributo sabor a limón de la bebida de apio

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	1	17.578	17.578	18.111	<0.0001
Error	318	308.644	0.971		
Total corregido	319	326.222			

ANOVA del atributo dulzor de la bebida de apio

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	1	9.112	9.112	13.940	0.000
Error	318	207.875	0.654		
Total corregido	319	216.988			

ANOVA del atributo sabor a apio de la bebida de apio

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	1	0.703	0.703	0.731	0.393
Error	318	305.919	0.962		
Total corregido	319	306.622			

PRUEBAS DE DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA DE FISHER (DMS)

Agrado	
B1	5.894 a
B2	5.406 b
Pr > F(Modelo)	0.007
Significativo	Sí
Pr > F(muestras)	0.007
Significativo	Sí

Sabor a limón	
B1	2.600 a
B2	2.131 b
Pr > F(Modelo)	<0.0001
Significativo	Sí
Pr > F(muestras)	<0.0001
Significativo	Sí

Dulzor	
B1	2.613 a
B2	2.275 b
Pr > F(Modelo)	0.000
Significativo	Sí
Pr > F(muestras)	0.000
Significativo	Sí

Sabor a apio	
B1	3.013 a
B2	2.919 b
Pr > F(Modelo)	0.393
Significativo	No
Pr > F(muestras)	0.393
Significativo	No

Prueba de Friedman de los resultados en la Prueba de Preferencia

Esta prueba se usa cuando los datos se ordenaron en forma de rangos y se quiere saber si las muestras son iguales o diferentes entre ellas. Para calcular el valor se utiliza la fórmula de la ecuación 1:

$$X^2 = \left[\frac{12}{np(p+1)} \right] * (\sum T_p^2) - 3n(p+1) \quad \text{--- Ecuación 1}$$

Donde:

n = número de consumidores

p = número de muestras evaluadas

T_p = suma de los valores para cada muestra evaluada

Sustituyendo valores en la ecuación 1:

$$X^2 = \left[\frac{12}{(160)(2)(3)} \right] * [(212^2 + 268^2)] - [(3 * 160)(2 + 1)]$$
$$X^2 = [0.0125] * [116768] - [1440]$$
$$X^2 = 19.6$$

Para la comparación con valores de tablas $\alpha = 0.05$

Se tiene que:

$$X^2_{tablas} = 3.84$$

Entonces:

$$X^2_{calculada} > X^2_{tablas}$$
$$19.6 > 3.84$$

∴ Existe diferencia significativa entre las muestras

Al determinarse que las muestras son diferentes, es necesario saber cuál de ellas es diferente, así que se calcula la distancia mínima d , que debe de existir entre dos diferencias de rangos para que los productos puedan ser declarados como diferentes (ecuación 2):

$$\delta = \frac{1.96}{\sqrt{6}} \sqrt{nxpx(p+1)} \quad \text{--- Ecuación 2}$$

Donde:

n = número de consumidores

p = número de muestras evaluadas

Sustituyendo valores en la ecuación 2:

$$\delta = \frac{1.96}{\sqrt{6}} \sqrt{160x2x(3)} \quad \text{--- Ecuación 2}$$

$$\delta = 0.80016665\sqrt{960}$$

$$\delta = 24.79$$