



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de los antioxidantes presentes en la semilla de tejocote residual

(Crataegus mexicana)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

ROMAN FUENTES VARGAS



MÉXICO, CD.MX,

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

- **Presidente: Federico Jesús Jiménez Cruz.**
- **Vocal: Irene Sara Audelo Méndez.**
- **Secretario: Lino Joel Reyes Trejo.**
- **1er. suplente: Margarita Romero Avila.**
- **2do suplente: Adriana Vega Pérez.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

1. LABORATORIO 208, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
2. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, ÁREA DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRÍCOLA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO.

ASESOR DEL TEMA: LINO JOEL REYES TREJO

FIRMA

SUPERVISOR TÉCNICO: BENITO REYES TREJO

FIRMA

SUSTENTANTE: ROMAN FUENTES VARGAS

FIRMA

Agradecimientos:

Al Subprograma 127 de formación Básica en Investigación por haberme dado la oportunidad de pertenecer a él.

ÍNDICE

INDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v-vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	vii-viii
RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 OBJETIVO.....	3
3 HIPÓTESIS	3
4 MARCO TEÓRICO.....	4-37
5 METODOLOGÍA.....	38-48
6 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	48-59
7 CONCLUSIONES.....	60
8 BIBLIOGRAFÍA.....	61-70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias entre Residuo y desecho.....	4
Figura 2. Vertedero de basura.....	5
Figura 3. Clasificación de residuos agroindustriales.....	6
Figura 4. Residuos alimenticios.....	7
Figura 5. Jerarquía de gestión de residuos.....	8
Figura 6. Antioxidantes con diferente tipo de mecanismo de actividad antioxidante (EDTA y vitamina C)	10
Figura 7. Ejemplo de un antioxidante primario y secundario (Catequina y β -caroteno)	10
Figura 8. Deslocalización electrónica en el radical fenólico.....	11
Figura 9. Estabilización del radical arilo por efecto conjugativo de un heteroátomos.....	11
Figura 10. Mezcla de compuestos que conforman al BHA.....	12
Figura 11. Ejemplo de antioxidantes artificiales.....	13
Figura 12. Estructura de flavan-3-ol.....	16
Figura 13. Estructuras de algunos alcoholes fenólicos.....	17
Figura 14. Ejemplos de ácidos fenólicos.....	18
Figura 15. Estructuras químicas de taninos uno condensado y el otro hidrolizable.....	19
Figura 16. Ejemplos de estilbenos.....	20
Figura 17. Ejemplo de lignanos.....	21
Figura 18. Reacción entre antioxidante un amntioxidante y el reactivo de DPPH.....	26
Figura 19. Mecanismo de oxidación de lípidos.....	28

Figura 20. Diagramas de orbital molecular del oxígeno.....	28
Figura 21. Formación de hidroperóxidos del ácido oleico por oxígeno triplete. En esta reacción el radical ataca al ácido graso permitiendo la interacción con el oxígeno.....	29
Figura 22. Formación de hidroperóxidos del ácido oleico por oxígeno singulete. En este caso el oxígeno ataca directamente al ácido graso.....	29
Figura 23. Cambios de diferentes parámetros durante el almacenamiento de aceites comestibles.	30
Figura 24. Compuestos químicos encontrados en el género <i>Crataegus</i>	34
Figura 25. Compuestos identificados en <i>Crataegus pinnatifida</i>	35
Figura 26. Árbol de <i>Crataegus mexicana</i>	36
Figura 27. Fruto de tejocote.....	37
Figura 28. Semilla de tejocote.....	40
Figura 29. Molienda de la semilla.....	40
Figura 30. Equipo de soxhlet.....	41
Figura 31. Equipo de sonicación.....	42
Figura 32. Lector de microplacas marca BIo Tek modelo Synergy.....	43
Figura 33. Microplaca con prueba de fenoles totales de un extracto metanólico de la semilla de tejocote.....	44
Figura 28. Microplaca con prueba de actividad antioxidante de un extracto acetónico de la semilla de tejocote.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estabilidad de aceites comestibles con antioxidad.....	33
Tabla 2. Contenido de algunos compuestos polifenólicos presentes en <i>Crataegus pinnafida</i>	34
Tabla 3. Caracterización de la semilla de tejocote.....	48
Tabla 4. Valores de polifenoles totales presentes en los distintos extractos de semilla de tejocote.....	50
Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de semilla de tejocote.....	52
Tabla 6. Índice de acidez en aceite de girasol con extracto de semilla de tejocote, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.....	55
Tabla 7. Índice de peróxidos en aceite de girasol con extracto de semilla de tejocote, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.....	57
Tabla 8. Índice de yodo en aceite de girasol con extracto de semilla de tejocote, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.....	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Rendimientos de los extractos de la semilla de tejocote, empleando diferentes técnicas y disolventes.....	49
Gráfica 2. Polifenoles totales en los extractos de tejocote mediante técnicas y disolventes diferentes expresados en mg de EAG/g de extracto.....	51
Gráfica 3. Actividad antioxidante presente en los extractos de semilla de tejocote residual, empleando diferentes técnicas de extracción y disolventes. El método por cual se determinó fue DPPH.....	53

Gráfica 4. Índice de acidez de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol con 150 ppm del extracto de semilla de tejocote y aceite de girasol con BHT a 55°C por 35 días.....55

Gráfica 5. Índice de peróxidos de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de girasol y aceite de girasol con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.....56

Gráfico 6. Índice de yodo de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de girasol y aceite de girasol con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días58

RESUMEN

Actualmente se vive un problema sobre los residuos que generan los procesos industriales y es necesario realizar una buena valorización de ellos. Así, en lugar de ser un inconveniente deberá ser fuente de aprovechamiento. Una parte de estos residuos son los de origen vegetal y son materia prima potencial para generar productos de alto valor agregado como los polifenoles, antioxidantes naturales de uso en la industria alimentaria.

El presente proyecto tiene como objetivo principal extraer, cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los fenoles presentes en la semilla de desecho de tejocote (*Crataegus mexicana*), con el objetivo de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

Para obtener los extractos se hizo uso de técnicas de extracción (mediante extractor Soxhlet, maceración y sonicación) y con disolventes.

La técnica más eficaz para la extracción de los compuestos fenólicos fue la sonicación utilizando como disolvente una mezcla acidificada a pH 3 de metanol acuoso al 80% con un tiempo óptimo de 64 minutos. Esto debido a que se tuvieron los rendimientos más altos (2%), buena actividad antioxidante (IC₅₀ de 0.0546 mg/mL) y un tiempo de extracción mucho menor comparado con las otras técnicas.

A pesar de haber obtenido un extracto con una buena actividad antioxidante bajo las condiciones de trabajo, no demostró ser capaz de actuar como un buen antioxidante en el aceite de girasol. Lo anterior podría explicarse suponiendo que solo algunos compuestos del extracto tienen actividad antioxidante por lo tanto el efecto protector será menor.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se vive un problema con los desechos generados por las actividades industriales y comunes de la población. Estos desechos son depositados en tiraderos donde no se aprovechan, es decir el problema radica en la poca valorización de estos residuos, los cuales pueden utilizarse como materia prima para generar nuevos productos. Datos del INEGI del año 2016 indicaron que en el país se recolectaron diariamente 86 mil 343 toneladas de basura, de las cuáles 12 843 se generaron en la Ciudad de México. De estos residuos, el 4.6% provienen de la Central de Abasto siendo en gran parte de tipo orgánico. ¿Se imaginan si aprovecháramos por lo menos una parte de estos residuos? Los residuos orgánicos son fuente de productos de alto valor agregado como enzimas, proteínas, antioxidantes, etanol, biodiesel, etc.

Es conocido que los antioxidantes pueden ser extraídos de desechos orgánicos, por lo que ha motivado a investigadores a extraerlos de diferentes fuentes orgánicas como manzana, plátano, naranja, ajo entre otros. Se han extraído antioxidantes de la cáscara, la pulpa e incluso de la semilla de diferentes frutos. Al contrario de la pulpa de las frutas, las semillas, son muchas veces consideradas basura, este material es rico en nutrientes y por tal razón debería ser valorizado para obtener el mejor provecho posible. En el caso particular de la semilla de tejocote mexicano (*Crataegus mexicana*), aún no se ha estudiado en el ámbito de una posible extracción de antioxidantes. Es por esto que el presente trabajo tiene el siguiente objetivo general: extraer, cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los fenoles presentes en la semilla de desecho de tejocote (*Crataegus mexicana*), con el propósito de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

¿Y por qué extraer antioxidantes de la semilla de tejocote si ya existen antioxidantes sintéticos como el BHT y el BHA? La respuesta es por una demanda de antioxidantes. Investigaciones en animales señalan que los antioxidantes artificiales a altas dosis presentaron efectos perjudiciales a la salud, es por eso que actualmente se han llevado estudios para obtener fuentes de antioxidantes naturales con el propósito de obtener alternativas más seguras y efectivas que puedan sustituir a los antioxidantes sintéticos que se utilizan como conservadores de alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Extraer , cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los fenoles presentes en la semilla de tejocote (*Crataegus mexicana*), con el proposito de poder incorporar el extracto obtenido a un aceite comercial para su uso como antioxidante natural.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una maceración secuencial ocupando como disolventes: acetona, metanol y etanol al 80%, para obtener compuestos fenólicos de la semilla de tejocote.
- Extraer de manera secuencial por la técnica de Soxhlet usando como disolventes: acetona y metanol para obtener antioxidantes fenólicos de la semilla de tejocote.
- Optimizar la extracción por sonicación ocupando una mezcla metanol-agua al 80% acidificando el medio a un pH de 3.5 realizando mediciones a los 16, 32, 64, 96 y 128 minutos.
- Cuantificar los polifenoles totales de los extractos obtenidos ocupando la técnica basada en el reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por el ensayo de DPPH.
- Evaluar el extracto con mayor actividad antioxidante en la estabilización de aceite de girasol extra-virgen, comparándolo con el BHT, midiendo los cambios de algunos parámetros de calidad del aceite: índice de acidez, índice de peróxidos e índice de yodo.

3. HIPÓTESIS

El extracto del residuo de las semillas de tejocote puede ser una alternativa a los antioxidantes artificiales si se logra determinar la presencia de compuestos fenólicos, comprobar su actividad antioxidante y que estos sean capaces de retrasar la oxidación en el aceite de girasol.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Los residuos

La palabra *Residuo* se aplica a los materiales que se generan en bajas cantidades al finalizar un proceso, no obstante, se le pueden conferir algún interés para su utilización. En ocasiones suele confundirse con desecho (figura 1), concepto que hace referencia a aquellos materiales que no poseen atributos de interés, por lo que se consideran como basura y se les debe dar una disposición final” (Saval, 2012).

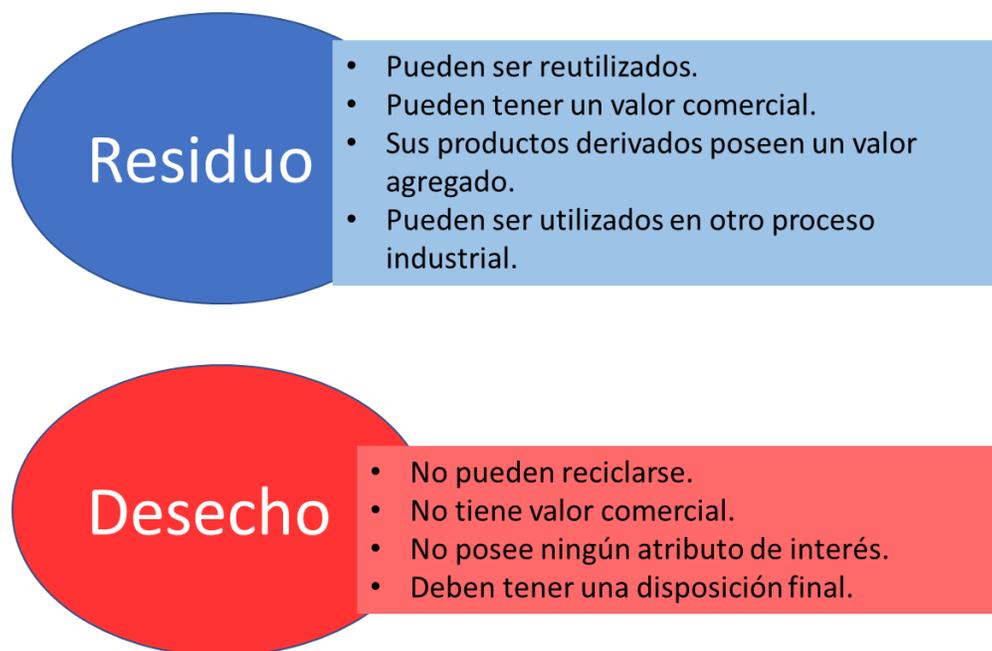


Figura 1. Diferencias entre Residuo y desecho.

Cuando los residuos no son reutilizados y se ponen en vertederos pierden propiedades importantes convirtiéndose en desechos, por eso es importante depositarlos en plantas recicladoras o centros de aprovechamiento (Casas, 2014).

Por ejemplo, antiguamente en la industria del queso el lactosuero se desechaba, mientras que en la actualidad se han hecho varios esfuerzos para aprovecharlo, ya sea como saborizante, aditivo o incluso como base para preparar bebidas frutales (DGCS, 2017).

Los residuos son actualmente un problema a nivel mundial y cada vez se producen en mayor cantidad (Figura 2), algunos se eliminan de una manera errónea o simplemente se almacenan en vertederos (Ki Lin, et al, 2014).



Figura 2. Vertedero de basura.

Entre los inconvenientes ambientales que pueden generar los residuos están: su acumulación indiscriminada en el agua haciéndola inapropiada para el consumo humano, la transmisión directa o indirecta de bacterias y parásitos y la inutilización de las tierras para su uso (Sáez y Urdaneta, 2014). Otro problema importante de la basura, es la generación de gases de efecto invernadero durante su proceso de descomposición, como el dióxido de carbono y el metano (Maqueda et al, 2005).

Los residuos no solo son un problema de tipo ambiental, sino social y económico. La inadecuada eliminación de residuos sólidos en el desarrollo de una región o país repercute en la calidad de vida de sus pobladores, reduciendo su productividad y por ende su contribución al desarrollo económico de la región (Sáez y Urdaneta, 2014).

Estos problemas han creado la necesidad de innovación industrial, siendo centro de atención para posibles mejoras en crecimiento económico, laboral y de competitividad. (Ki Lin, et al, 2014).

Por ejemplo, la Ciudad de México dispone de 4 infraestructuras de manejo de residuos: estaciones de transferencia, plantas de selección, plantas compactadoras, plantas de compostas y de disposición final (Sedema, 2017).

Durante 2015, en las plantas de composta se recibió un total de 506,577 toneladas de residuos orgánicos, con lo que se generaron 97,551.6 toneladas de composta (Sedema, 2017). A pesar de esta medida, el aprovechamiento de los residuos orgánicos en comparación con los inorgánicos es casi nulo, siendo del 1% y el 82.8% respectivamente (Sedema, 2017). Por lo que hay mucho trabajo que hacer respecto a la gestión de residuos orgánicos en la CDMX.

4.1.2 Clasificación de residuos

Con base al origen de los residuos, estos pueden ser clasificados como: industriales, agrícolas, sanitarios y sólidos urbanos. (Ki Lin, et al., 2013).

4.1.3 Residuos agroindustriales.

“La industria agrícola y todas las industrias de transformación que se derivan de ella generan grandes cantidades de *residuos agroindustriales*. Estos se pueden definir como todos aquellos materiales con contenido orgánico que se generan a partir de un proceso agrícola, su procesamiento o su comercialización” (Casas, 2014). Esto significa que los residuos agroindustriales son aquellos que provienen de frutas y vegetales, productos lácteos, carne y derivados (Figura 3) (Mirabella, et al., 2014).

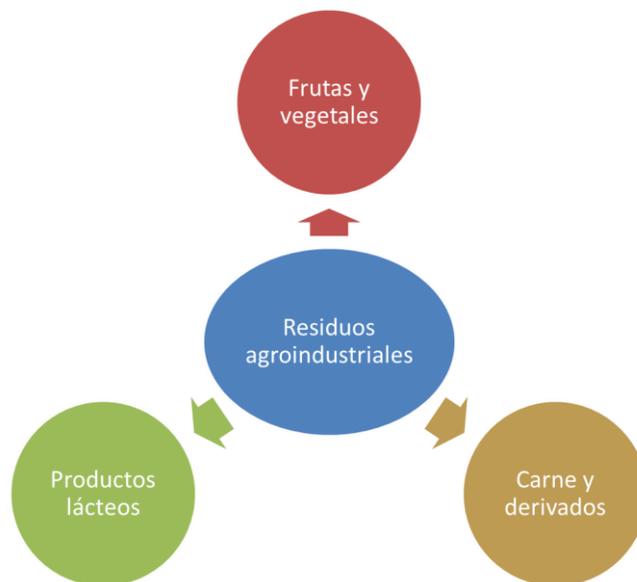


Figura 3. Clasificación de residuos agroindustriales.

4.1.4 Residuos alimenticios.

Los residuos alimenticios son alimentos que en lugar de ser consumidos terminaron como residuos (Figura 4). La producción de residuos alimenticios cubre todo el ciclo de vida de los alimentos: desde la cosecha, la fabricación y transformación industrial, así como la venta al menudeo y el hogar (Mirabella, et al., 2014).



Figura 4. Residuos alimenticios

4.1.4.1 Residuos alimenticios a nivel mundial

Los residuos alimenticios son la parte dominante de los residuos orgánicos, se estima que en el mundo se producen 1.6 gigatoneladas al año de estos residuos, generando gran preocupación. Dada la información anterior, es necesario implementar buenas estrategias para convertir estos residuos en recursos útiles (De Clercq, et al., 2017).

Por otro lado, se puede observar en la pirámide del manejo de residuos (Figura 5), que es fundamental reducir al mínimo los residuos, evitando que se conviertan en desechos (Neugebauer y Solowiej 2017).



Figura 5. Jerarquía de gestión de residuos

4.1.4.2 Residuos alimenticios como sustrato para generar compuestos de alto valor agregado.

Los residuos alimenticios han tenido como fin alimentación animal, composta, incineración y vertederos (Ki Lin et al., 2013). Sin embargo, a los residuos alimenticios se les puede dar otro uso, por ejemplo, se les puede utilizar como fuente de compuestos orgánicos. Muchos de ellos con alto valor agregado como fibras dietéticas, pigmentos, pectinas, oligosacáridos, flavonoides, carotenoides, compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas (Casas, 2014). Estos compuestos de alto valor agregado son aprovechados en la industria alimenticia. Al proceso de utilizar un residuo con una finalidad útil para sustituir a otros materiales se le denomina valorización (comisión europea, 2017)

4.1.4.3 Residuos de frutas y vegetales como fuente o sustrato de compuestos de valor.

Las industrias alimentarias producen gran cantidad de residuos de frutas y vegetales, entre los más relevantes se encuentran: los residuos por manzanas, granos, frutos cítricos, papas, tomates, frutas tropicales, aceitunas, entre otros. Algunos de los compuestos de alto valor que se han podido recuperar son: alimento para ganado, herbicidas, pesticidas, celulosa, aditivos, antioxidantes, antimicrobianos, alimentos funcionales, compuestos bioactivos, pectinas, fibra, flavonoides,

polifenoles, fenoles, fitoquímicos, carotenos, licopenos, carotenoides, azúcares, ácido láctico (Mirabella et al., 2014).

4.2 Antioxidantes.

Los antioxidantes (figura 5) son definidos biológicamente como compuestos o sistemas que pueden interactuar con radicales libres, evitando una reacción en cadena que puede provocar daños a moléculas vitales de un organismo (Orian y Escriche, 2015). Por ejemplo, los antioxidantes ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades degenerativas originadas por el estrés oxidativo (Shaidi, 2015). Por otro lado, los antioxidantes pueden definirse por su uso como aditivos, los cuales retrasan, controlan o inhiben la oxidación de un alimento, previniendo su deterioro (Shaidi, 2015). Químicamente, los antioxidantes abarcan una amplia categoría de moléculas (Sumaya et al., 2010), que pueden llevar al cabo su actividad por diversos mecanismos, algunos de ellos son (Orian y Escriche 2015):

- 1) Secuestrando especies que inician la peroxidación
- 2) Quelando iones metálicos para que no sean capaces de generar especies reactivas o descomponer peróxidos.
- 3) Extinguiendo el superóxido previniendo la formación de peróxidos.
- 4) Eliminar el estado excitado del oxígeno singulete previniendo la formación de peróxidos.
- 5) Rompiendo la cadena de reacción de autooxidación.
- 6) Reduciendo concentraciones localizadas de oxígeno.

La efectividad de la actividad antioxidante de estos compuestos depende de sus características químicas y la ubicación dentro del alimento (cercanía a los fosfolípidos de la membrana, interface de emulsión o en las fases acuosas). Algunos antioxidantes (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, vitamina C, vitamina E) tienen diversas propiedades biológicas, tales como anti-inflamatorias, anti-cancerígenas, anti-ateroescleróticas, reducir la incidencia de enfermedades coronarias y contribuir al mantenimiento de salud del intestino por la modulación del balance de la microbiota intestinal (Orian y Escriche 2015).

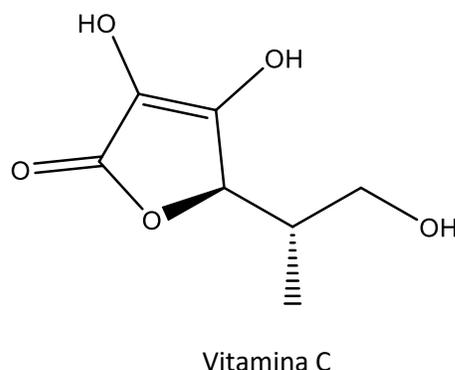
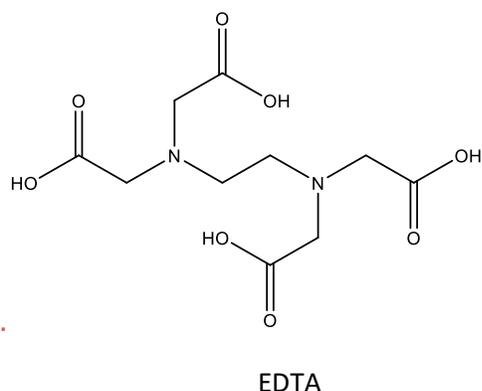


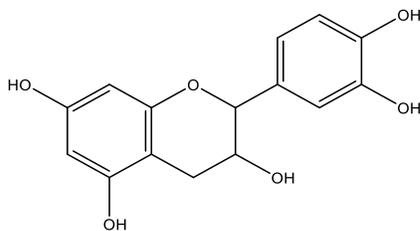
Figura 6. Antioxidantes con diferente tipo de mecanismo de actividad antioxidante. El EDTA, actúa como quelante mientras que la Vitamina C secuestra especies que inician la peroxidación.

4.2.1 Clasificación de antioxidantes

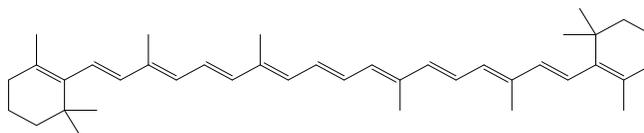
Los antioxidantes se pueden clasificar por su mecanismo de acción, como primarios y secundarios o bien por su origen, en artificiales y naturales.

4.2.1.1 Antioxidantes primarios y secundarios.

Los *antioxidantes primarios* son aquellos que neutralizan radicales libres vía mecanismo donación de átomos de hidrógeno o por simple transferencia de electrón (Figura 7). Mientras que los *antioxidantes secundarios* son aquellos que neutralizan pro-oxidantes (compuestos que no son radicales libres, pero pueden inducir la oxidación). Estos últimos incluyen agentes quelantes de iones metálicos pro-oxidantes (hierro y cobre), entre los más comunes tenemos al EDTA, el ácido cítrico y betacarotenos (Shahidi, 2015).



Catequina



β-caroteno

Figura 7. Ejemplo de un antioxidante primario (izquierda) y un antioxidante secundario (derecha)

4.2.1.2 Antioxidantes artificiales.

Los *antioxidantes artificiales* generalmente son compuestos que consisten de un anillo fenólico y una o más sustituciones de grupos alquilo. Actualmente el hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato y tert-butilhidroquinona (TBHQ) son usados en la industria alimentaria (Shaidi y Chandrasekara, 2015; Badui, 2006). Estos antioxidantes son donadores de radicales hidrógeno a radicales lipídicos e hidroperóxidos, produciendo otros radicales (Badui, 2006), que son estabilizados mediante resonancia (figura 8) lo que ocasiona que la reacción de oxidación de los ácidos grasos sea más lenta (Wiley y Sons, 2003).

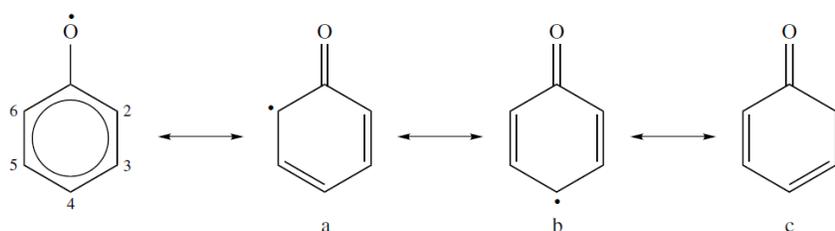
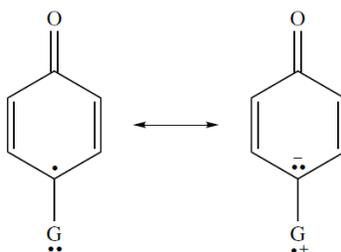


Figura 8. Deslocalización electrónica en el radical fenólico. (Wiley y Sons, 2003)

La rapidez con la cual los fenoles desprenden su hidrogeno depende en gran parte de los sustituyentes en las posiciones *orto* y *para* de la molécula fenólica por ejemplo: la estabilización del radical fenil mediante grupos alquilo se realiza por efectos inductivos e hiperconjugativos mientras que los heteroátomos (figura 9) lo hacen por efecto conjugativo (Wiley y Sons, 2003).



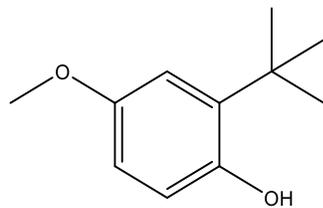
G= grupo donador de electrones

Figura 9. Estabilización del radical arilo por efecto conjugativo de un heteroátomos. (Wiley y Sons, 2003)

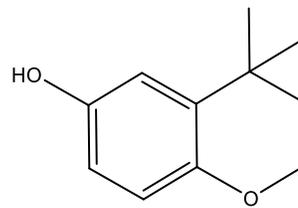
- **BHA (hidroxianisol butilado)**

El BHA es un antioxidante monofenólico. Comercialmente está disponible como una mezcla de dos isómeros (figura 10), 3-tert-butil-4-hidroxianisol (90%) y 2-tert-butil-4-hidroxianisol (10%). El BHA es muy soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Previene el deterioro del sabor, olor y color de los aceites esenciales. Particularmente efectivo en el control de la oxidación ácidos grasos de cadena corta.

El BHA es usado en alimentos horneados y fritos al igual que en cereales secos, productos de papa y bebidas. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) reporta que la ingesta diaria aceptable (ADI) de BHA es de 0 a 0.5 mg/Kg (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).



3-tert-butil-4-hidroxianisol

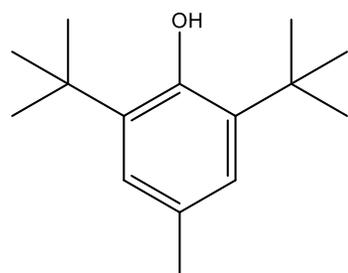


2-tert-butil-4-hidroxianisol

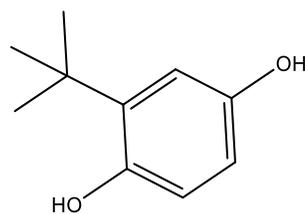
Figura 10. Mezcla de compuestos que conforman al BHA.

- **BHT (hidroxitolueno butilado)**

El BHT también es un antioxidante monofenólico (figura 11), comparado con el BHA no es tan efectivo debido a que el BHT contiene dos grupos tert-butil los cuales proporcionan impedimento estérico a la molécula. El BHT es soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Es más efectivo inhibiendo grasas animales que vegetales (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).



BHT



TBHQ

Figura 11. Ejemplo de antioxidantes artificiales

- **TBHQ (tert-butilhidroquinona)**

El TBHQ es un conservador altamente efectivo para vegetales insaturados, muchas grasas comestibles de origen animal y productos cárnicos. No causa decoloración incluso en presencia de hierro, no cambia el color, olor y sabor de la materia a la cuál es adicionado. El TBHQ se sintetiza mediante la desmetilación del BHA. Los dos grupos *p*-hidroxilo son responsables de la actividad antioxidante (figura 11). El TBHQ reacciona con radicales peroxilo para formar una, semiquinona (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

4.2.1.3 El problema de los antioxidantes artificiales

Comúnmente se utilizan antioxidantes artificiales para preservar los alimentos, sin embargo, el uso de éstos ha sido asociado con efectos tóxicos y algunas investigaciones dan evidencia de que estos compuestos pudieran ser precursores de cáncer (Caleja et al.,2017).

El BHA puede ser referenciado como antioxidante, proantioxidante, un carcinógeno y paradójicamente anticancerígeno. A pesar de ello no hay aún pruebas firmes de ser carcinógeno en humanos (Shahidi y Ambigaipala, 2015).

Respecto al BHT, se reporta que en altas dosis puede causar hemorragias internas y externas suficientemente graves como para causar la muerte a ratones y cobayas. Este efecto es debido a la capacidad del BHT para reducir los niveles de la vitamina K, relacionada con la coagulación sanguínea (Shahidi y Ambigaipala, 2015).

Igualmente, el TBHQ, a dosis altas, tiene algunos efectos negativos a la salud en animales de laboratorio, tales como: precursor de tumores de estómago y daños en el DNA. La posible toxicidad de los antioxidantes artificiales ha llevado a realizar investigaciones con el objetivo de encontrar antioxidantes que se obtengan de productos naturales (Shahidi y Ambigaipala, 2015).

4.2.1.4 Antioxidantes naturales

Los *antioxidantes naturales* son producidos en células vivientes para mantener un delicado balance de oxidación-reducción en los procesos de metabolismo de nutrientes y función inmune. Los antioxidantes pueden reaccionar sobre el estrés oxidativo con especies radicales y no radicales, para iniciar los mecanismos de defensa de los componentes intracelulares y extracelulares.

El reino vegetal es el más abundante recurso de antioxidantes. En este se encuentran las frutas y los vegetales los más representativos como fuente de antioxidantes en la dieta humana.

Algunos minerales y vitaminas que funcionan como cofactores de enzimas antioxidantes, también son considerados como antioxidantes naturales. Asimismo, se pueden encontrar péptidos cortos multifuncionales capaces de neutralizar radicales libres y quelar iones metálicos pro-oxidantes. (Jiang y Xiong, 2016).

Las principales clases de compuestos naturales con actividad antioxidantes son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos) (Orian y Escriche, 2015; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

- **Polifenoles.**

Los *polifenoles* son una clase de *antioxidantes naturales*. Están clasificados como *antioxidantes primarios*, *estos compuestos* reducen la formación de productos volátiles de descomposición (aldehídos y cetonas) que causan rancidez (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Los compuestos polifenólicos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal, están ubicados en toda la planta, que al ser consumidos por el humano los convierte en una parte integral de su dieta (Orian, 2015).

Más de 8000 estructuras polifenólicas han sido reportadas. El rango de polifenoles va desde moléculas de bajo peso molecular, compuestos de un sólo anillo aromático hasta grandes complejos taninos. Son sintetizados por mecanismos formadores de metabolitos secundarios como las vías del ácido shikímico, policétido y mevalonato. Los principales grupos de polifenoles son los flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos (Orian, 2015).

El potencial antioxidante de los compuestos polifenólicos depende del número y arreglo de los grupos hidroxilo en la molécula de interés. Los antioxidantes fenólicos pueden donar átomos de hidrógeno a radicales lipídicos y producir derivados lipídicos y radicales antioxidantes (reacción 1), los cuales son más estables y menos reactivos para promover la autooxidación. Los radicales libres antioxidantes pueden interferir con las reacciones de propagación en cadena (reacción 2 y 3) (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).



Los efectos de la concentración del antioxidante en la rapidez de auto-oxidación, depende de factores como la estructura de los antioxidantes, condiciones oxidantes y la naturaleza de la muestra.

Los antioxidantes fenólicos son más efectivos durante el periodo de reacciones de radicales libres en la etapa de iniciación, adicionándolos a cualquier aceite que no se ha deteriorado en gran medida. Sin embargo, ellos son inefectivos en retardar la descomposición de lípidos ya deteriorados. Por lo

tanto para desarrollar su mayor potencial deberán ser adicionados tan pronto como sea posible, logrando la máxima protección contra la oxidación del producto. A menudo los antioxidantes polifenólicos pierden su actividad en altas concentraciones y se comportan como prooxidantes debido a su participación en las reacciones de iniciación de oxidación. (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

- **Flavonoides.**

Los flavonoides son difenilpropanos ciclados (figura 12). En general, todos los flavonoides son derivados del 2-fenilcromano compuesto de tres anillos fenólicos, los cuales exhiben varios niveles de hidroxilación y metoxilación (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Algunas fuentes donde se han encontrado flavonoides son: miel, jugo de naranja, vino, cebolla, cáscara de cítricos, limón, bayas y soja. Pueden ser divididos en algunas subclases de las cuales las más representativas son: flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanonoles, antocianinas e isoflavonas. Muchos de los flavonoides son pigmentos de plantas (Orian, 2015).

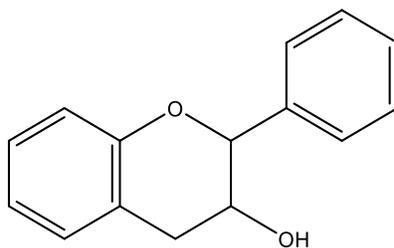
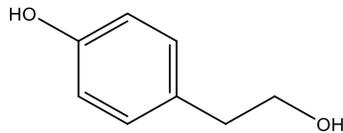


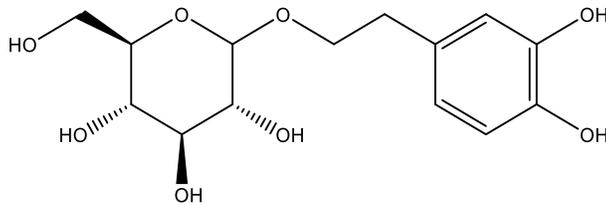
Figura 12. Estructura de flavan-3-ol.

- **Alcoholes fenólicos**

Entre los alcoholes fenólicos naturales más importantes se encuentran el (3,4-dihidroxifenil)-etanol, (p-hidroxifenil)-etanol y (3,4-dihidroxifenil)-etanol-glucósido (figura 13). Los primeros dos se han encontrado en el aceite de oliva (Orian, 2015).



(p-hidroxifenil)-etanol



(3,4-dihidroxifenil)-etanol-glucósido

Figura 13. Estructuras de algunos alcoholes fenólicos.

- **Ácidos fenólicos.**

Los ácidos fenólicos se caracterizan por poseer en su estructura química el anillo aromático, el grupo hidroxilo y una parte con el grupo funcional carbonilo (Castañeda, 2011). Los ácidos fenólicos pueden dividirse en dos categorías dependiendo de su estructura: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Estos compuestos consisten de un anillo de benceno enlazado a un grupo carboxílico (ácido benzoico) o a un ácido propenoico (ácido cinámico). Los ácidos hidroxibenzoicos más importantes incluyen los ácidos: gálico, p-hidroxi-benzoico, protocatéquico, vainillinico y siríngico (Figura 14). Los ácidos hidroxicinámicos son: cafeico,

ferúlico, p-cumárico y sinápico. Entre las fuentes de ácidos fenólicos están los granos de centeno, las especies (como el oregano y el romero) y la mostaza (Orian y Escriche, 2015).

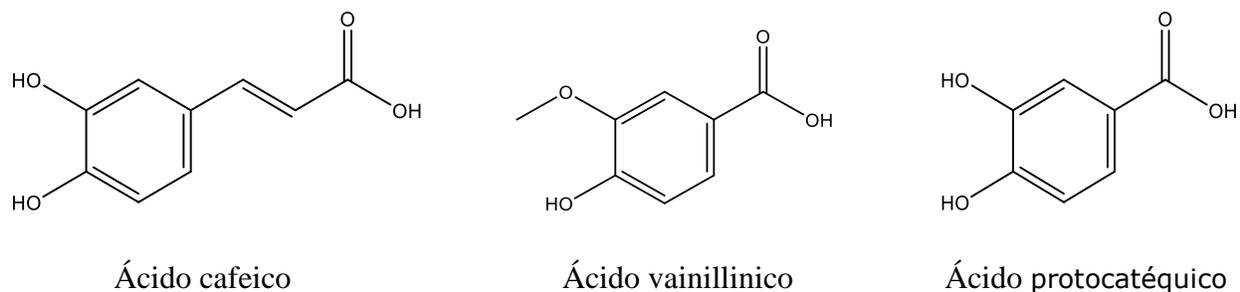
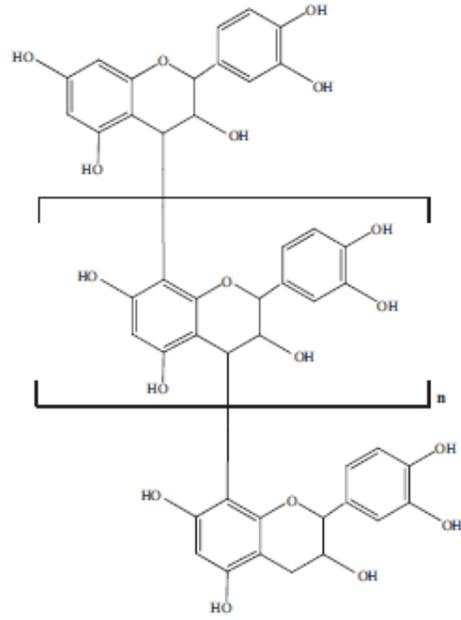


Figura 14. Ejemplos de ácidos fenólicos.

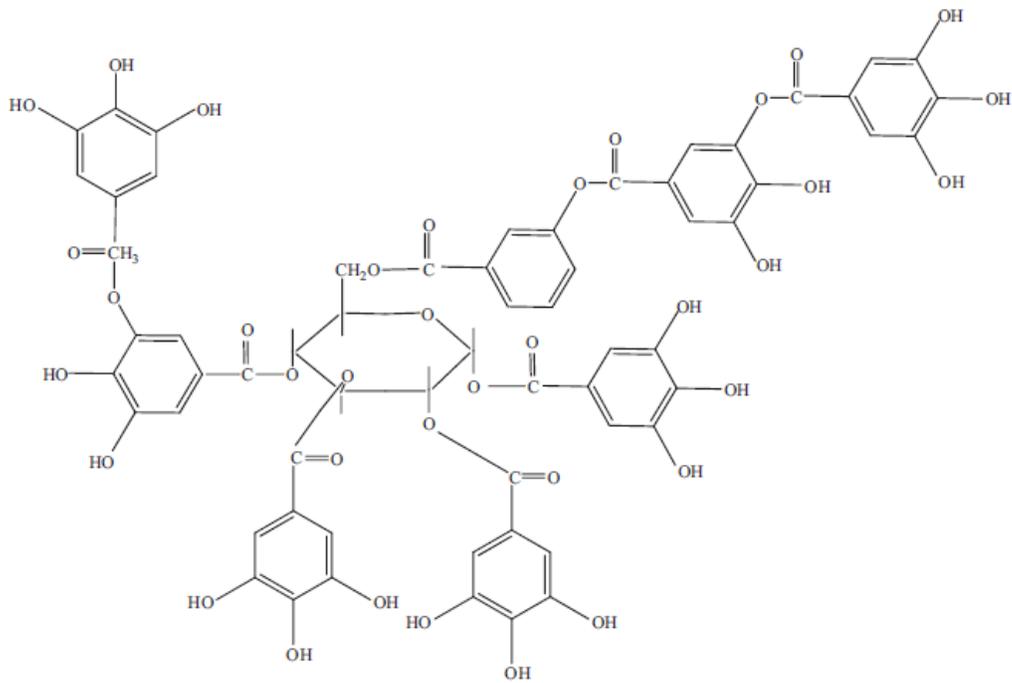
- **Taninos**

Los taninos son metabolitos de plantas y se caracterizan por ser complejos polifenólicos (Haslam, 2007). Los taninos condensados son oligómeros y polímeros de flavonoides, específicamente flavan-3-ol, mientras que los taninos hidrolizables son polímeros de ácido gálico glicosilado (Figura 15). Se han encontrado principalmente en frutas, especialmente en bayas, cocoa y algunas bebidas como vino, cerveza y té (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

La designación de taninos hidrolizables se debe al hecho de que estos compuestos pueden reaccionar con el agua, mediante el tratamiento con ácido diluido, liberando ácido gálico y / o ácido elágico mientras que al tratar a los “taninos condensados” con el ácido no presentan esta reacción (Ky, 2016).



Tanino condensado

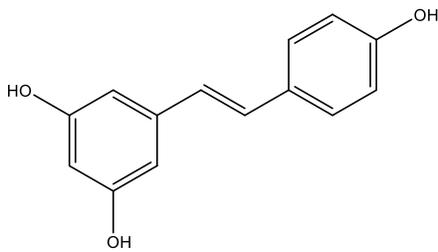


Tanino hidrolizable

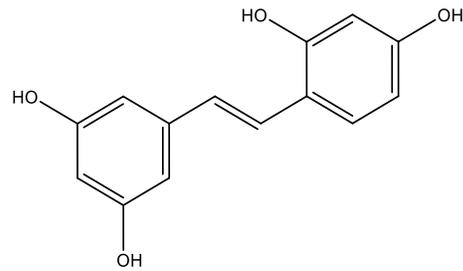
Figura 15. Estructuras químicas de taninos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015)

- **Estilbenos.**

Los estilbenos son compuestos fenólicos, cuya estructura contiene dos anillos aromáticos ligados por un enlace de eteno (figura 16). Existen en forma de monómeros (resveratrol, oxiresveratrol) y oligómeros formados por unidades de estilbenos (Orian y Escriche, 2015). La principal fuente de estilbeno en la dieta es el vino rojo y los cacahuates por su contenido de resveratrol, también se puede encontrar en menor cantidad en pistachos, bayas, col roja y espinacas (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).



Resveratrol.



Oxiresveratrol

Figura 16. Ejemplos de estilbenos.

- **Lignanos**

Son un grupo de compuestos fenólicos presentes en altas concentraciones en semillas, raíces, hojas, frutas y partes leñosas de plantas vasculares. Los lignanos son estructuras construidas por uniones C6-C3 (un esqueleto de propilbenceno) derivados de unidades de cinamilo (figura 17) (Orian y Escriche 2015).

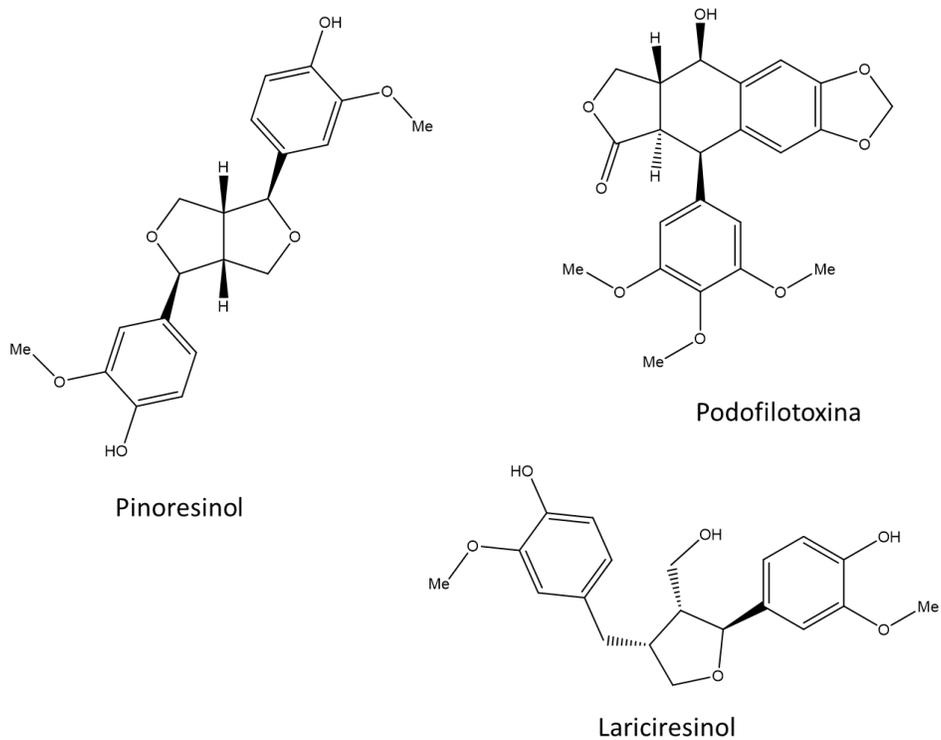


Figura 17. Ejemplos de lignanos.

4.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES.

Hay muchos métodos para extraer antioxidantes y concretamente polifenoles, desde los convencionales, como maceración y Soxhlet, hasta nuevas tecnologías emergentes como: extracción por fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas y extracción por ultrasonido. Estas tecnologías tratan de mejorar los rendimientos, el tiempo de extracción, eliminar o reducir la cantidad de disolvente y en general, ser amigables con el medio ambiente (Orian y Escriche, 2015).

4.3.1 Métodos convencionales de extracción

- **Extracción con disolventes mediante maceración.**

La maceración a pesar de su antigüedad aún es practicada como una técnica simple y económica de extracción (Galloa, et al., 2016; Orian y Escriche, 2015). Sin embargo, cuenta con algunas limitaciones, como el alto consumo de disolvente y largos tiempos de extracción (Da Porto et al., 2013).

El mecanismo de operación requiere que el material se fragmente en partículas pequeñas, posteriormente, el material fragmentado se coloca en un contenedor cerrado con solvente adecuado y agitación en un periodo de 1 a 2 semanas. El proceso puede ser repetido una o dos veces con disolvente nuevo. Finalmente los residuos sólidos del extracto pueden ser prensados o centrifugados para recuperar grandes cantidades de soluciones absorbidas (Upadhyay et al., 2015). El rendimiento y la velocidad de extracción pueden incrementarse con el aumento de la temperatura del sistema y /o aumentar la agitación. (Galloa et al., 2016).

- **Extracción con disolventes mediante Soxhlet.**

Es un método semicontinuo de extracción que utiliza un disolvente orgánico, considerado como referencia para evaluar el rendimiento de métodos de extracción modernos (emergentes). El disolvente es calentado hasta su ebullición y se condensa en forma de gotas sobre la muestra sólida. Este disolvente es nuevamente volatilizado y condensado por un cierto periodo de tiempo (Nielsen, 2010).

Si los compuestos deseables al ser extraídos tienen solubilidad limitada en el disolvente de elección y las impurezas indeseables son insolubles en ese disolvente, entonces la extracción mediante soxhlet es generalmente requerida. Algunas de sus limitaciones son: no hay agitación, existe la posibilidad que ocurra la descomposición de los compuestos de interés por calor y los largos procesos de extracción (Upadhyay et al., 2015).

4.3.2 MÉTODOS EMERGENTES DE EXTRACCIÓN

- **Extracción con fluidos supercríticos**

La extracción con fluidos supercríticos (SCF) es una técnica rápida (10-60 min), selectiva, no requiere limpieza adicional y puede llevarse a cabo con pequeñas cantidades de muestra. Un fluido supercrítico se forma al llevar a una sustancia por encima de su punto crítico al modificar presión y temperatura (Ciani, et al, 2002). Algunas de sus características son:

- Gran poder extractor en sólidos.
- Pueden separarse totalmente de forma sencilla de los extractos, al modificar su presión o temperatura.

El CO_2 es uno de los más utilizados, no es tóxico, no es flamable, y requiere una adición mínima de solvente (5-10mL). (Orian y Escriche, 2015).

- **Extracción asistida con microondas**

El principio básico del método es el uso de microondas que se propagan a través del medio generando energía que al ser absorbida se convierte en energía calorífica. Esta energía lleva a un sobrecalentamiento interno del material de extracción, lo que provoca la destrucción de la célula liberando los componentes de interés (Upadhyay et al., 2015).

- **Extracción por Ultrasonido.**

La extracción por sonicación es inducida principalmente por la “cavitación acústica”, nombre que se le da al fenómeno de creación, expansión y colapso implosivo de microburbujas en líquidos irradiados con ultrasonido. Los cambios de temperatura y presión producto de estas implosiones causan la ruptura de la corteza y adelgazamiento de membranas celulares, produciendo la destrucción de la célula, dando como resultado el mejoramiento de la extracción de los compuestos de interés (Tiwari, 2015).

El proceso de extracción por ultrasonido puede beneficiar el proceso de remoción con respecto al incremento de rendimiento, mejorando la velocidad del proceso, además que ofrece la oportunidad

de usar disolventes alternativos como los de clasificación tipo “GRAS” (Generally Recognized as Safe) permitiendo la extracción de componentes termosensibles (Tiwari, 2015).

- **Extracción asistida por enzimas.**

Este método está ganando importancia por la necesidad de tecnologías de extracción amigables con el medio ambiente. Las enzimas pueden catalizar la degradación de las paredes celulares vegetales, favoreciendo la liberación de los componentes contenidos dentro de las células (Orian y Escriche, 2015).

4.3.3 Factores que afectan la eficiencia de extracción de antioxidantes.

Durante el almacenamiento de la muestra rica en antioxidantes debe evitarse su exposición al calor, la luz y oxígeno ya que puede afectar la composición de los polifenoles. El secado y enfriamiento de la muestra son buenos métodos para la conservación de la mayoría de los polifenoles y su composición (Galili y Hovav 2014).

La elección del disolvente (Méndez et al., 2013) o el uso de mezcla de disolventes (por lo regular mezclas acuosas) puede aumentar la cantidad de polifenoles extraídos (Mraihi, et al., 2013). La acidificación del medio puede facilitar la extracción de polifenoles ya que facilita la ruptura de membranas celulares (Orian y Escriche 2015). Una relación alta sólido:disolvente incrementa el total de sólido extraído. Muchos protocolos de extracción usan relaciones solvente- sólido de 10 a 30. Las relaciones más bajas pueden causar problemas de saturación, mientras que las relaciones más altas pueden requerir una etapa de concentración de soluto por evaporación del disolvente (Galili y Hovav 2014).

Es importante tomar en cuenta el número de extracciones, utilizando más pasos se favorece una mayor interacción entre la materia y disolvente aumentando el rendimiento de extracción (Galili y Hovav 2014). En cuanto a la duración de la extracción se prefiere emplear un tiempo en el cuál se logra la extracción de la mayor cantidad de polifenoles sin llegar a producir oxidación significativa (Dai y Mumper, 2010).

Es importante mencionar que existe una correlación positiva entre el aumento de temperatura y el rendimiento de la extracción, sin embargo, a una temperatura mayor a los 100°C puede causar la degradación los compuestos polifenólicos (Mukhopadhyay et al., 2006).

4.4 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

4.4.1 Cuantificación de polifenoles.

La cantidad de polifenoles puede ser cuantificada por métodos colorimétricos con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo es formado por una mezcla de ácido fosfowolfrámico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), los cuales después de oxidar a los polifenoles y son reducidos a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Esta reacción ocurre bajo condiciones alcalinas, para lograr esta condición, se ocupa carbonato de sodio (Galili, 2014).

El resultado de la coloración azul, se tiene un máximo de absorción en la región de 760 nm, y es proporcional a la cantidad total de compuestos polifenólicos presentes, esta cantidad es comúnmente expresada como equivalentes de ácido gálico o catequina. El rango de linearidad de la curva de calibración es de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.99$) (Galili, 2014).

Existen técnicas donde se miden los polifenoles de interés como flavonoides y antocianinas mediante métodos analíticos tales como HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) y GC (cromatografía de gases). Los polifenoles son cuantificados por comparación con cantidades conocidas de estándares internos (Galili, 2014).

4.4.2 Cuantificación de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante dentro de los organismos es muy importante ya que los protege contra efectos potencialmente dañinos derivados del oxígeno reactivo, y especies de nitrógeno (ROS y RNS respectivamente). Los principales métodos para medir actividad antioxidante son: Capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP, Ferric reducing ability of plasma), Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC en inglés: *oxygen radical absorbance capacity*) y captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (*DPPH*) (Galili, 2014).

4.4.2.1 Captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

La prueba de captación del radical DPPH está entre los métodos más frecuentemente utilizados y ofrece la primera aproximación para evaluar actividad antioxidante. El DPPH es un radical cromógeno estable y con un intenso color purpura. El ensayo de captación de DPPH está basado en la donación de un electrón de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH (figura 18). La reacción es acompañada de un cambio de color del DPPH que puede ser medido a una longitud de onda de 517nm y la decoloración es un indicador de la eficiencia del antioxidante. La actividad antioxidante medida por este método se reporta como IC₅₀ que se define como la concentración efectiva del antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH al 50%. El ensayo de DPPH es una técnica simple y requiere únicamente un espectrómetro UV o un espectrómetro EPR (por sus siglas en inglés electron paramagnetic resonance). Sin embargo, la captación del radical DPPH no es similar al mecanismo de captación de radicales en alimentos reales o sistemas biológicos de verdad por la falta de oxígeno radical en la prueba (Shahidi y Zhong, 2015).

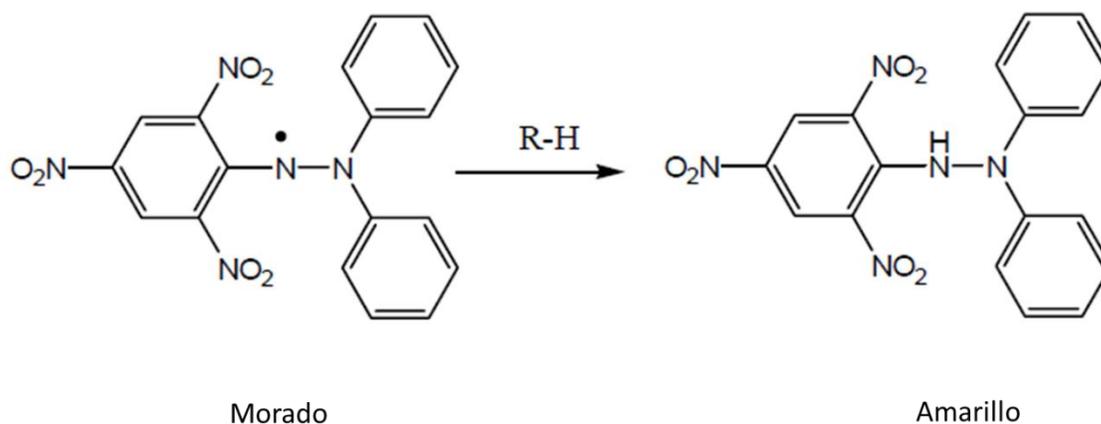


Figura (18). Reacción entre antioxidante un amntioxidante y el reactivo de DPPH.

(Mohammadpour, et al., 2012).

4.5 DETERIORO DE ACEITES Y EL PAPEL CONSERVADOR DE LOS ANTIOXIDANTES.

4.5.1 Oxidación de lípidos y los alimentos.

La oxidación de lípidos es una de las mayores causas del deterioro de la calidad de los alimentos, provocando la generación de malos olores, sabores y colores, disminución de la vida de anaquel, cambios en textura y la reducción del valor nutricional del alimento. Numerosos métodos han sido desarrollados para controlar la velocidad y extensión de la oxidación en alimentos, pero la adición de antioxidantes es la más efectiva. Los antioxidantes son indispensables como un grupo de aditivos que extienden la vida de anaquel sin efectos adversos, modificaciones sensoriales o calidad nutricional (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

Una de las principales rutas de degradación lipídica es la autooxidación. El proceso de autooxidación de lípidos poliinsaturados en alimentos involucra una reacción en cadena de radicales libres que generalmente es iniciada por exposición a la luz, calor, radiación ionizante, iones metálicos, o catálisis de metaloproteínas. La enzima lipoxigenasa puede también iniciar la oxidación. La clásica ruta de autooxidación incluye reacciones de iniciación (producción de radicales libres), propagación y terminación (producción de especies no radicales) (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

En la etapa de iniciación se producen los radicales libres a partir de compuestos no radicales. Los fotones reaccionan en los hidrógenos en las posiciones alílicas ya que estos están activados por la influencia de los dobles enlaces adyacentes, permitiendo la estabilización de los radicales ($R\bullet$) por deslocalización electrónica (Carey, 2006; Badui, 2006).

En la etapa de propagación se forman radicales a partir de otros radicales. El oxígeno triplete puede reaccionar con los radicales alquilo y después sustraer un hidrógeno de otra molécula de ácido graso insaturado (figura 21), formando un hidroperóxido y un nuevo radical alquilo (Lupano, 2013).

En las reacciones de terminación se producen compuestos no radicales a partir de radicales, tal como se muestra en la figura (19).

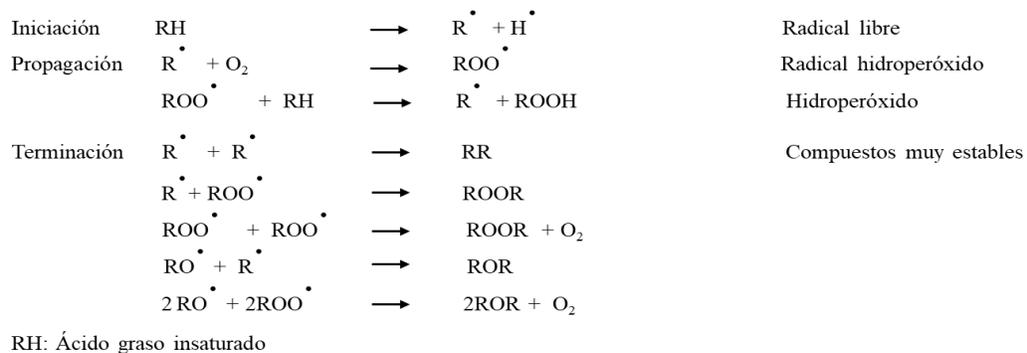


Figura 19. Mecanismo de oxidación de lípidos.

La reacción de autooxidación requiere de una energía de activación de 20-30 Kcal/mol, aunque esta energía es baja, necesita de catalizadores. La descripción de orbitales moleculares del O_2 implica la existencia de un doble enlace; sin embargo, los dos electrones de mayor contenido energético ocupan distintos orbitales π de antienlace con espines paralelos; como resultado de ello, la molécula es paramagnética (Figura 20). Cuando el oxígeno se excita **los spines** son diferentes y hay una repulsión, este tipo de oxígeno se denomina oxígeno singulete (Laing, 1989). Este tipo de oxígeno tiene mayor grado de electrofilia (figura 22) y puede reaccionar directamente con las insaturaciones de los ácidos grasos (Badui, 2006).

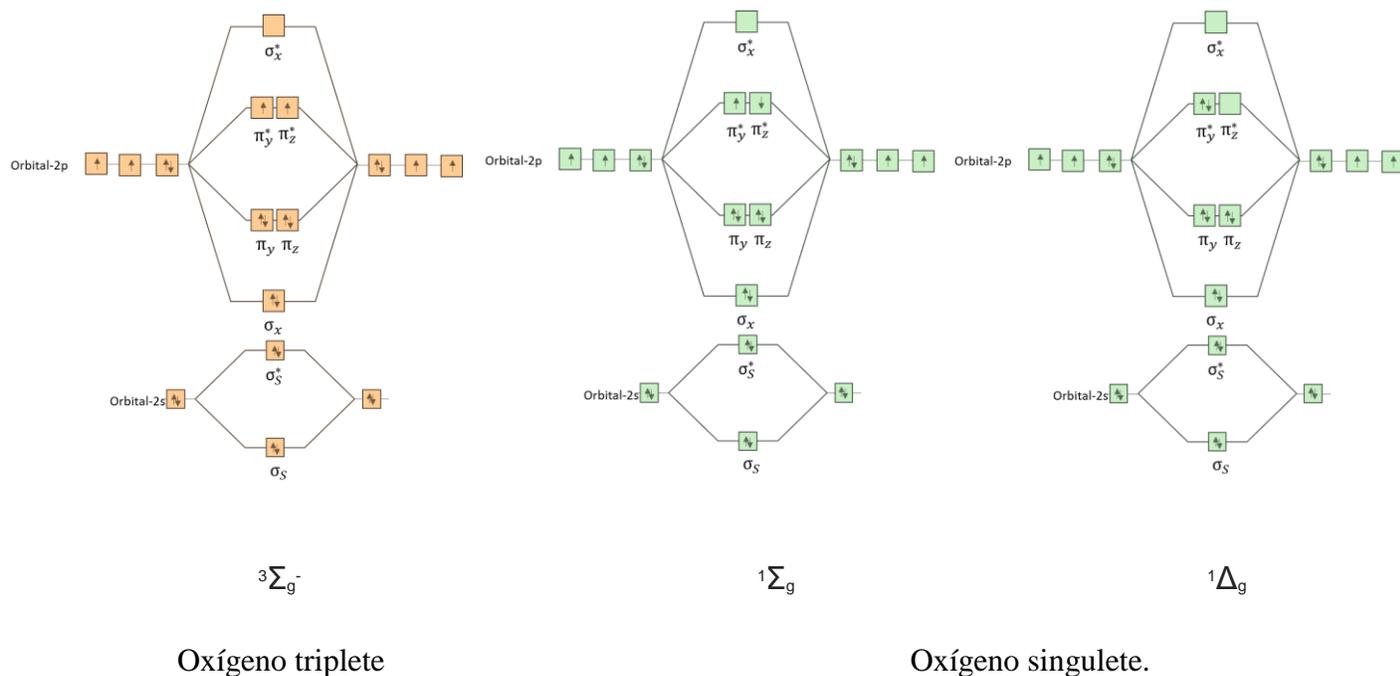


Figura 20. Diagramas de orbital molecular del oxígeno.

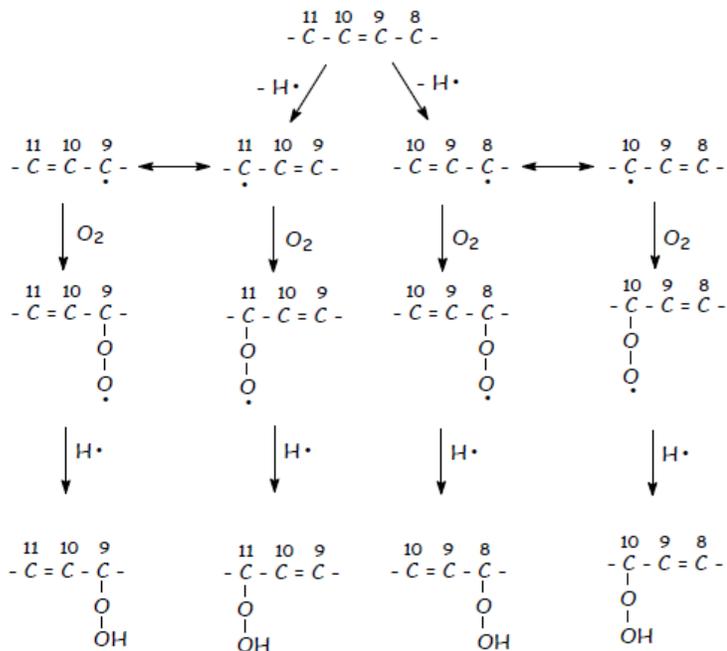


Figura 21. Formación de hidroperóxidos del ácido oleico por oxígeno triplete. En esta reacción el radical ataca al ácido graso permitiendo la interacción con el oxígeno.

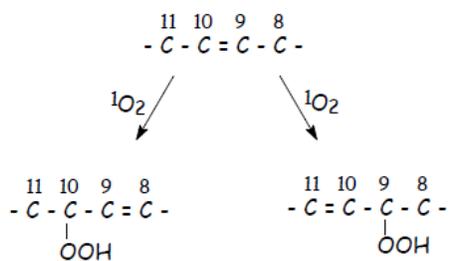


Figura 22. Formación de hidroperóxidos del ácido oleico por oxígeno singulete. En este caso el oxígeno ataca directamente al ácido graso.

Los hidroperóxidos son los productos primarios de la oxidación lipídica, pero a pesar de sus efectos perjudiciales en la salud, no tienen efecto en el color, olor y sabor de los alimentos. Sin embargo, estas moléculas inestables se descomponen rápidamente para formar numerosos productos, tales como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos entre otros; estos imparten colores, sabores y olores desagradables a los alimentos que contienen grasas, aceites y lípidos (Shahidi y Zhong, 2015). Los compuestos fenólicos en bajas concentraciones, actúan como antioxidantes y protectores de la rancidez oxidativa de los alimentos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

4.5.2 Pruebas de la estabilidad oxidativa de un aceite

Las pruebas que se realizan a un aceite para saber el grado de deterioro están basadas en los cambios químicos durante su almacenamiento. Tal como puede verse en la figura 23, conforme pasa el tiempo los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen debido a que son oxidadas sus insaturaciones, generando hidroperóxidos. Estos hidroperóxidos incrementan conforme pasa el tiempo, pero debido a que son inestables se degradan a compuestos volátiles los cuales imparten sabores y olores desagradables a los aceites (Pignitter y Somoza, 2012).

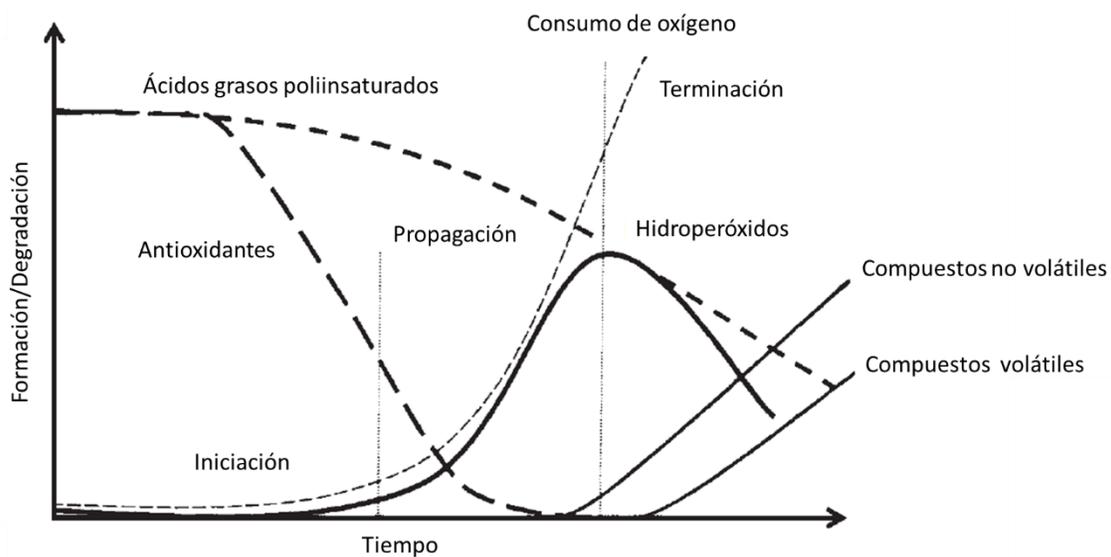


Figura 23. Cambios químicos en el almacenamiento de aceites comestibles.

Son varias las pruebas, tres de ellas serán reseñadas a continuación: índice de acidez, índice de peróxidos e índice de yodo.

- **Índice de acidez**

Su fundamento se basa en la titulación de los ácidos grasos libres con un álcali. Estos ácidos grasos son reflejo de la cantidad de ácidos grasos hidrolizados de los triacilgliceroles (Nielsen 2010) que se puede expresar como índice de acidez o porcentaje de ácidos grasos. El porcentaje de ácidos grasos libres en la mayoría de grasas y aceites son calculados como ácido oleico, sin embargo, en aceites de coco son frecuentemente expresados como ácido laúrico, mientras que en aceite de palma se calcula en términos de ácido palmítico (NMX-F-101-1987).

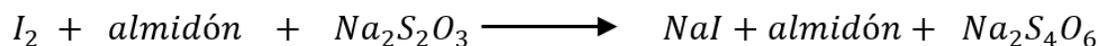
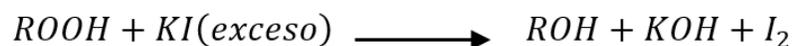
Reacción:



- **Índice de peróxidos.**

Es definido como los miliequivalentes de peróxido de hidrógeno por kilogramo de grasa y se determina la cantidad de peróxidos o grupos de hidroperóxidos por valoración volumétrica. El aceite se coloca en presencia de yoduro de potasio en exceso, este reacciona con los peróxidos presentes produciendo yodo (Hamilton y Hamilton, 1992), el cuál posteriormente es titulado con tiosulfato de sodio estandarizado (Nielsen, 2010).

Reacciones:



- **Índice de yodo.**

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación, definida como los gramos de yodo absorbido por 100 gramos de muestra. En el ensayo, el aceite cuantificado es disuelto en un disolvente, se pone a reaccionar con yodo en exceso u otro halógeno (como el ICl que tiene el reactivo de Wijs), el cual reacciona con las dobles ligaduras carbono-carbono. Después, una solución de yoduro de potasio es adicionada para reducir el exceso de ICl a yodo libre (Hamilton y Hamilton, 1992), este es valorado con tiosulfato de sodio y un indicador de almidón La cantidad calculada de yodo que reaccionó con los dobles enlaces es usada para calcular el índice de yodo (Nielsen, 2010).

Reacciones:



4.5.2 Estabilidad oxidativa de aceites por antioxidantes naturales.

Los antioxidantes naturales han aumentado recientemente su interés debido a la suposición de que ingredientes naturales son mejores y más seguros que los sintéticos. Las fuentes de antioxidantes naturales pueden ser: especias, hierbas, té, aceites, semillas, cereales, cacao cáscara, granos, frutas, verduras, enzimas, proteínas.

Diversos estudios han demostrado su efectividad para inhibir la oxidación de aceites comestibles. Algunos de ellos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estabilidad de aceites comestibles con antioxidantes naturales (Aladedunye et al, 2014; Yanishlieva y Marinova, 2001).

Aceite	Antioxidante natural utilizado en aceite.	Temperatura de almacenamiento	Resultados
Aceite de maíz	2-acetil-1,8-dihidroxi-3-metil naftaleno extraído de <i>Rumex japonicus</i> Houltt al 0.02%.	60°C	Incremento la estabilidad oxidativa 1.8 veces respecto al control.
Aceite de semilla de algodón.	Extracto metanólico de avena al 0.03%.	60°C	Mostró mejor protección que el TBHQ.
Aceite de semilla de algodón.	Extracto de hexano de <i>Origanum onites</i> al 0.1%.	63°C	Incremento la estabilidad oxidativa 1.4 veces respecto al control.
Aceite de pescado	Romero 1% (materia vegetal molida)	40°C	Mostró 2.5 veces mejor estabilidad oxidativa que el BHT (0.03%).
Aceite de oliva	Extracto metanólico de <i>Rosemary</i> 0.02%	63 y 120°C	Mostró mejor estabilidad oxidativa que el BHA (0.02%)
Aceite de girasol	Extracto de <i>Crataegus mordenensis</i> con acetona, agua y ácido acético (70%,29.5%,5%). a 200 mg GAE / g de aceite.	65°C	Mostró inhibir hasta 50% de hidroperóxidos.

4.6 LA SEMILLA DE TEJOCOTE COMO POSIBLE FUENTE DE ANTIOXIDANTES NATURALES *Crataegus*.

Nativo de America del norte, Asia oriental, Asia central y Europa. Su uso terapéutico se remonta a los años de 1800 donde era ocupado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Actualmente hay productos de *Crataegus* como tratamiento alternativo para la hipertensión, angina, arritmia y en la insuficiencia cardiaca congestiva (Edwards, 2012).

4.6.3 Compuestos químicos encontrados en el género *Crataegus*.

Distintos compuestos se han descrito en el género *Crataegus* , algunos de ellos se muestran en la figura 24 (Edwards, 2012).

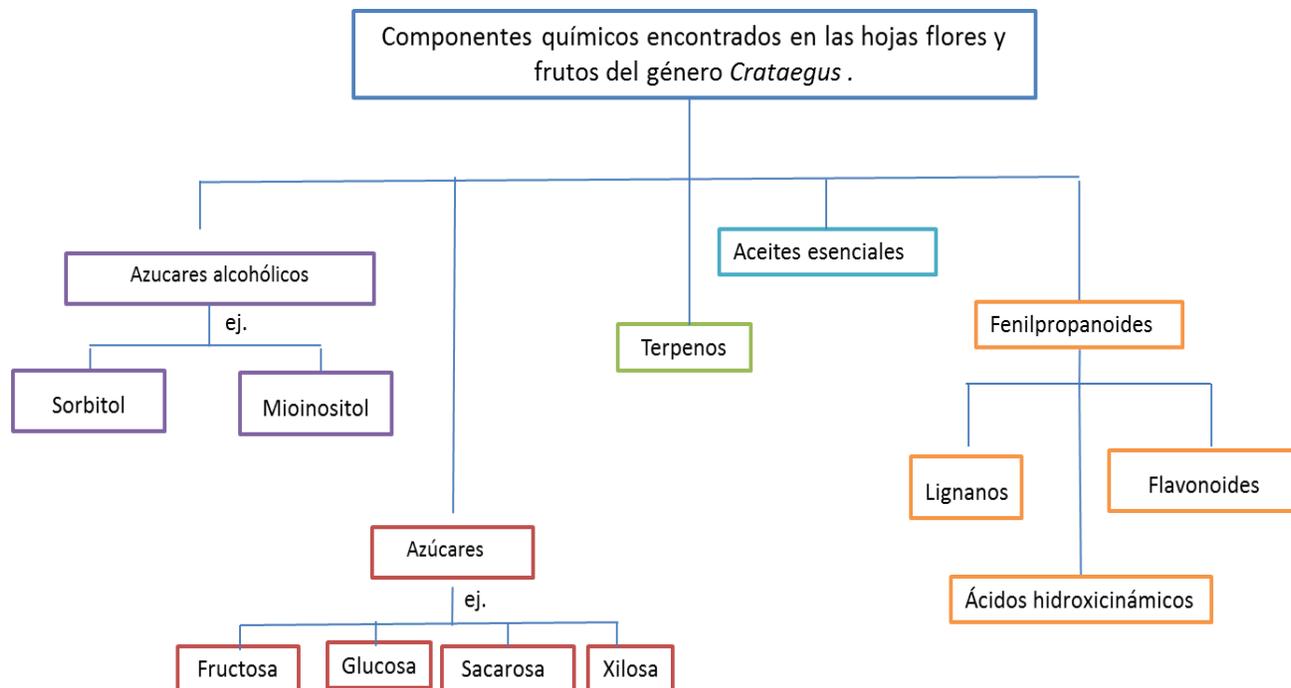
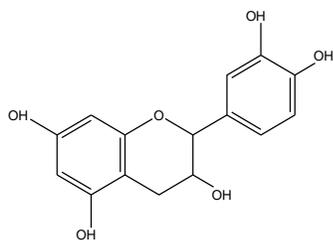


Figura 24. Compuestos químicos encontrados en el género *Crataegus*.

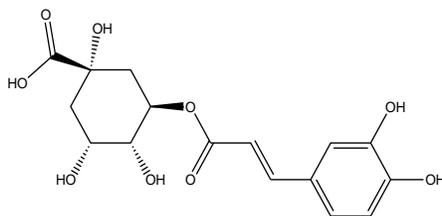
A partir de una fracción de acetato de etilo se logró aislar algunos compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes, en la pulpa de *Crataegus pinnatifida* (figura 25). Siendo la más abundante la catequina, algunos otros compuestos fenólicos se pueden observar en la tabla 2 (Zhang et al., 2001)

Tabla 2. Contenido de algunos compuestos polifenólicos presentes en *Crataegus pinnatifida*

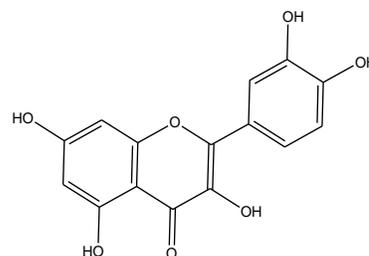
Compuesto fenólico	Contenido (mg/100 g de fruta seca)
Catequina	178.3±6.6
Ácido clorogénico	64.9±2.0
Hiperóxido	24.6±1.1
Isoquercitrina	13.4±0.5
Ácido protocatecu	3.2±0.1
Rutina	2.6±0.1
Quercentina	0.9±0.1



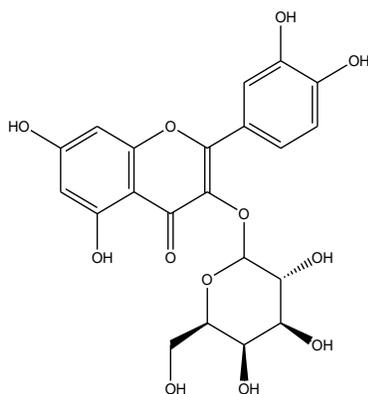
Catequina



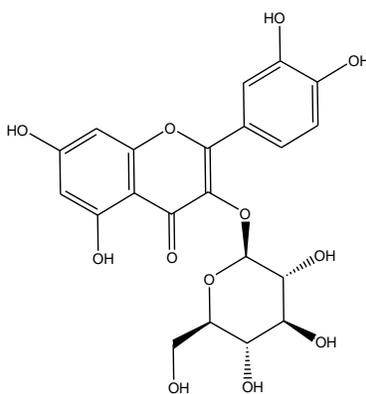
Ácido clorogénico.



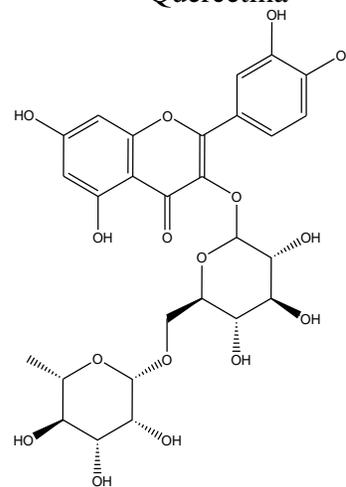
Quercetina



Hiperóxido



Isoquercitrina



Rutina

Figura 25. Compuestos fenólicos identificados en *Crataegus pinnatifida*.

4.6.4 El tejocote mexicano (*Crataegus mexicana*).

En México se hace referencia a este género como *tejocote* (García, 2013), palabra que proviene del nahuatl *texócolt* de *tetl* que significa piedra y *xócolt* que significa fruta (Montemayor, 2007).

A pesar de que existen otras especies de *crataegus* en México como *rosei*, *aurescens*, *tracyi*, *baroussana*, *cuprina*, *gracillior*, *greggiana* (García 2013), *crataegus mexicana* es la más reconocida en el país (Núñez y Sánchez, 2010).

Cratageus mexicana es una especie muy apreciada desde la época prehispánica por la riqueza de su fruto y la calidad de su madera (figura 26). En la Colonia se conservó su cultivo y pasó a formar parte de la fruticultura realizada en las huertas de las casas de campo de la Ciudad de México (SAGARPA, 2016)



Figura 26. Árbol de *Crataegus mexicana*.

4.6.4.1 Clasificación y descripción botánica.

Crataegus pertenece a la familia Rosaceae y a la subfamilia Maloideae. Es un árbol espinoso de hasta 10 m de altura. Las hojas son anchas en la parte media y en los extremos angostas, de color verde oscuro en el haz y verde pálido en el envés y borde dentado. Las flores son solitarias y blancas. Sus frutos son amarillo-anaranjado como pequeñas manzanas y las semillas son lisas y de color café. crece en un clima templado, entre los 1000 y hasta los 3900 msnm (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009)

4.6.4.2 Producción de tejocote en México.

Su cultivo es considerado de importancia económica menor (Franco, 2010). Los principales estados que lo producen son Puebla, México, Jalisco, Chiapas, Ciudad de México y Zacatecas de los cuales Puebla es líder en producción, donde en el año 2016 la producción de tejocote alcanzó 4060 toneladas, de las 4274 toneladas producidas a nivel nacional. (SIAP, 2016). En este mismo estado, en el municipio de Calpan, se celebra la feria del tejocote con el objetivo de difundir la importancia de este, donde se reúnen productores para ofrecer a los asistentes los mejores productos de sus cosechas (MUNICIPIOS ,2013).

4.6.4.3 Usos del tejocote.

El fruto de tejocote se usa tradicionalmente en la decoración de los altares de día de muertos así como como ingrediente principalmente del ponche en la época navideña, también es procesado para elaborar jaleas, mermeladas, jarabes y dulces tradicionales (Nuñez y Sanchez, 2011). Por otro lado, el fruto, la raíz y las hojas del tejocotero han sido empleadas en la medicina tradicional para aliviar diversas enfermedades humanas, como los padecimientos del corazón y afecciones del sistema respiratorio y urinario (Franco, 2010).

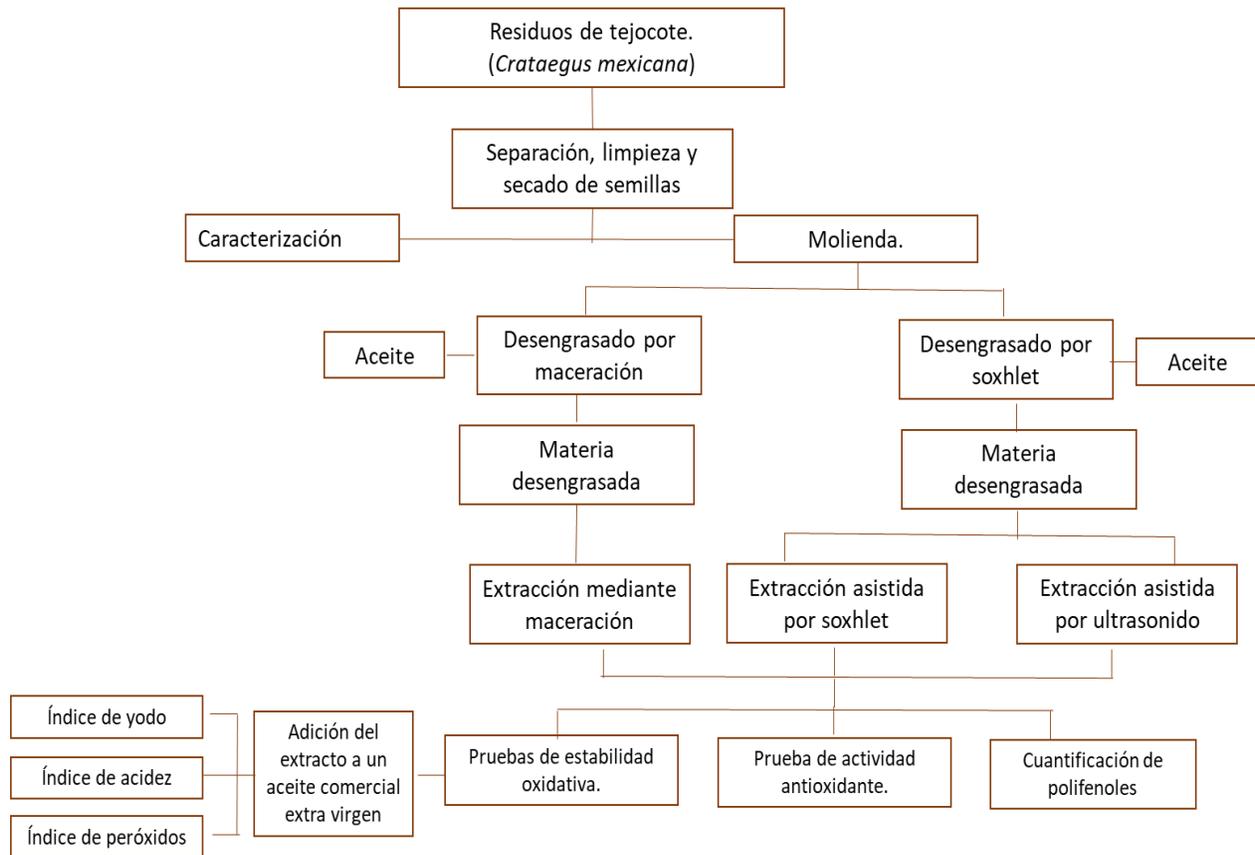
4.6.4.4 Propiedades nutricionales del tejocote

Es un fruto (figura 27) rico en vitaminas A y C, carotenos y sales minerales como hierro, fósforo y calcio (Franco, 2010; Nuñez 2011). En el caso de la flor, se ha logrado la caracterización de glucósidos de flavonoides que proporcionan actividad antioxidante (García, 2012; García 2013; Méndez, 2013).



Figura 27. Fruto de tejocote.

5. METODOLOGÍA.



5.1. Material vegetal

Se partió de una muestra de 9 kilogramos de fruto de tejocote obtenido en el mercado La Merced, lugar ubicado en el extremo oriente del centro histórico de la Ciudad de México.

5.2 Equipos y reactivos.

Equipos:

- Balanza analítica marca Scientech modelo SAT 20
- Lector de microplacas con dispensadores automáticos marca BioTek modelo Synergy 2
- Termobalanza marca Ohaus, modelo MB35
- Licuadora marca Oster, modelo 6640-13

- Parrillas eléctricas
- Rotavapor marca Buchi modelo R124
- Sonicator ultrasonic cleaner marca Sper Scientific modelo 100 004, Frecuencia 42 KHz, 60 W
- Vernier marca Pretul

Reactivos:

- | | |
|---|--|
| • Aceite de girasol | • Etanol |
| • Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) | • Fenolftaleína |
| • Ácido acético | • Hexano |
| • Ácido clorhídrico | • Hidróxido de potasio |
| • Ácido gálico | • Metanol |
| • Almidón para yodimetría | • Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) |
| • Butilhidroxitolueno (BHT) | • Reactivo de Folín-Ciocalteu |
| • Carbonato de sodio | • Reactivo de Wijs |
| • Cloroformo | • Tiosulfato de sodio |
| • Diclorometano | • Yoduro de potasio |

5.3 Limpieza y secado de la semilla de tejocote.

La semilla se separó manualmente del resto del fruto y se retiraron los residuos de pulpa lavando con agua. Después de lo anterior, las semillas se colocaron sobre papel de estraza y se dejaron secar a la sombra a temperatura por un lapso de 30 días.

5.4 Caracterización física de las semillas.

Se tomó una muestra aleatoria de 30 semillas de tejocote (*Crataegus mexicana*). Empleando un Vernier se midió grosor, ancho y altura de cada semilla, mientras que el peso se determinó en una balanza analítica. Además de las características ya mencionadas, se determinó la humedad a 5 gramos de semilla pulverizada empleando una termobalanza a 95 °C.



Figura 28. Semilla de tejocote

5.5 Pretratamiento de la muestra.

Se trituraron las semillas de tejocote en una prensa de tortillas y se molieron en una licuadora hasta obtener un polvo fino. Este polvo se sometió a un proceso de tamizado, obteniendo un tamaño de partícula de 0.84 mm, que equivale al número 20 del tamizador empleado (Tamizador marca Fisher Scientific Co.).



Figura 29. Molienda de la semilla

5.6 Extracción secuencial de los antioxidantes de la semilla de tejacote|

5.6.1 Extracción por maceración.

En un vidrio de reloj se pesaron 30 g de semilla de tejacote pulverizada y se colocaron en un matraz bola de 1 L conteniendo 300mL del disolvente seleccionado, de modo que la relación de sólido-disolvente sea 1/10 (Zhang 2001), en este caso se empezó por hexano. Se tapó el matraz, se cubrió con papel aluminio y se dejó reposar por 24 horas (Zhang 2001). Se repitió el mismo procedimiento con la misma semilla dos veces más pero con hexano nuevo.

Una vez terminadas las extracciones con hexano, la mezcla se filtró empleando papel Whatman del número 4 (Dolatkhani 2013). El líquido resultante fue secado con sulfato de sodio anhidro y se destiló a presión reducida a una temperatura menor a 50°C en un evaporador rotatorio (Zhang 2001). El extracto se almacenó en un frasco sellado y en refrigeración (5°C) hasta su uso (Méndez 2013).

Una vez terminada la extracción con hexano, al residuo sólido resultante se le efectuaron las demás extracciones, siguiendo el procedimiento anterior y empleando sucesivamente los disolventes: acetona, metanol y etanol acuoso al 80% (Méndez 2013).

5.6.2 Extracción por Soxhlet

Se pesaron por triplicado 10 g de semilla de tejacote seca y pulverizada y se colocaron por separado en cartuchos de papel filtro. Se montó el equipo de Soxhlet y se colocaron los cartuchos dentro de este (Ismail 2010, Porto 2013).



Figura 30. Equipo de soxhlet

Se colocaron 300 mL del disolvente seleccionado en los matraces bola de 1 L, en este caso se empezó por hexano, se adaptaron los matraces al equipo de Soxhlet y se ajustó a la temperatura a ebullición del disolvente, dejándose por espacio de 6 horas (Ismail 2010, Porto 2013).

Una vez terminadas las extracciones, la mezcla líquida se filtró empleando papel Whatman del número 4 (Dolatkhani 2013). El líquido fue secado y destilado a presión reducida a menos de 50°C en un evaporador rotatorio (Zhang 2001). Se pesó el extracto y se almacenó en un frasco sellado a 5°C hasta su uso (Méndez 2013).

Después se prosiguió con las siguientes extracciones del sólido resultante del proceso anterior, empleando sucesivamente los disolventes acetona, metanol y etanol al 80%, siguiendo la misma metodología (Méndez 2013).

5.6.3 Extracción empleando la técnica de ultrasonido

Para efectuar la extracción mediante la técnica de ultrasonido se utilizó como disolvente una mezcla de metanol acuoso al 80% acidificada a un pH de 3.5 (Hernández, 2016). En 5 matraces Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 10g de semilla de tejocote pulverizada y desengrasada, después se agregaron 100 mL del disolvente mencionado. Estos matraces se colocaron en un baño de ultrasonido (equipo high powered ultrasonic cleaner con de frecuencia 42,000Hz). Con el propósito de saber el tiempo óptimo de extracción, a cada matraz se le asignó un tiempo de extracción diferente, 16,32, 64, 96 y 128 minutos. La temperatura fue controlada en un intervalo de 24-26 °C. Al finalizar el tiempo de extracción, cada uno de los extractos se filtró a través de un papel Whatman del número 4. La extracción se efectuó dos veces más para cada uno de los tiempos, utilizando la misma muestra de semilla molida y siguiendo el mismo procedimiento.

Finalmente, se evaporó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio, obteniendo un extracto que fue almacenado en refrigeración (5°C) hasta su uso (Méndez 2013).



Figura 31. Equipo de sonicación.

5.7 Cuantificación de fenoles totales.

Se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% y una disolución del reactivo de Folin-Ciocalteu 1:10 v/v (se partió de la solución concentrada 1N). Para preparar la curva de ácido gálico, se pesó un aproximado de 12.5 mg de ácido gálico, se disolvieron con 1 mL de etanol y se aforó en un matraz de 25 mL con agua destilada. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400 y 440 μL y se aforaron a 1000 μL (1mL) con agua destilada.

En una microplaca de 96 pozos se mezclaron las siguientes cantidades de sustancias: 25 μL de las disoluciones de ácido gálico o extracto, 125 μL de H₂O destilada, 20 μL de disolución de disolución de Folin-Ciocalteu , 30 μL de Na₂CO₃ al 20%. También se preparó un blanco usando 150 μL de H₂O destilada, 20 μL de disolución de disolución de Folin-Ciocalteu y 30 μL de Na₂CO₃ al 20%. Se dejó reposar la mezcla de reacción durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido dicho tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 760 nm.



Figura 32. Lector de microplacas con dispensadores automáticos marca BIo Tek modelo Synergy.

Para inyectar la muestra fue necesario haber hecho pruebas a priori para saber si la concentración de extracto inyectada era la correcta, se hizo el mismo procedimiento de inyectar en el pozo y se dejó reposar por 15 minutos, la coloración final fue azul claro, si es azul intenso indica que hay

muchos polifenoles y deben realizarse las diluciones correspondientes, pero si no hay una coloración azul quiere decir que hay muy pocos polifenoles y no podrán ser cuantificados.

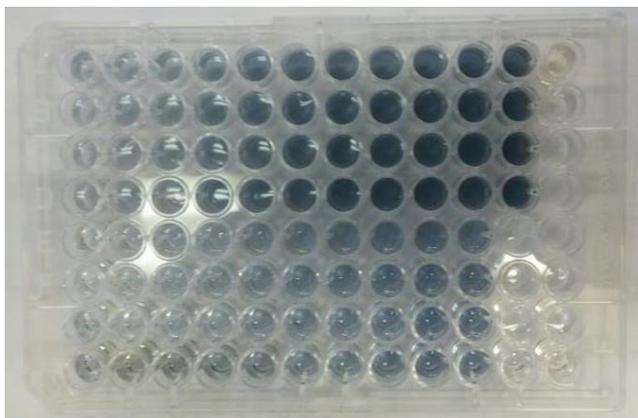


Figura 33. Microplaca con prueba de fenoles totales de un extracto metanólico de la semilla de tejocote.

Una vez que fue seleccionada la dilución del extracto (si la hubo), se prosiguió a preparar diluciones de esta disolución de 100, 200,300,400,500,600,700,800,900 y 1000 μ L y se aforó con agua destilada a 1000 μ L. Se inyectó igual que la curva patrón de ácido gálico y en la misma placa.

El resultado se expresa en mg de equivalente de ácido gálico /g de extracto (para abreviar se usará mg de EAG/g de extracto).

5.8 Cuantificación de actividad antioxidante con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

Se prepararon 100 mL de una disolución 0.499 mM DPPH (0.0197 g) en metanol al 80 % (es importante saber que se disolvió previamente el DPPH con 1 mL de acetona), ésta fue la disolución stock de DPPH.

Se preparó la curva de calibración de Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchomane-2-carboxylic acid), primero se prepararon 50 mL de una disolución 0.998 mM de Trolox (0.0125 g) usando

como disolvente metanol al 80 %, de esta disolución se tomaron 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 μL y se aforó a 10 mL con metanol al 80 %.

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 200 μL de las disoluciones de Trolox o extractos (200 μL). Se realizó un blanco con Metanol al 80% (250 μL) y un control donde se adicionó metanol al 80 % en lugar de la muestra o de la dilución de la curva. A continuación se adicionó, usando los inyectores automáticos del equipo, 50 μL de la disolución stock de DPPH con excepción de los pozos que contenían al blanco.

Para inyectar la muestra fue necesario haber hecho pruebas a priori para saber si la concentración del extracto inyectada era la correcta, se hizo el mismo procedimiento de inyectar en el pozo y se dejó reposar por 15 minutos, la coloración final fue rosa claro, si es muy amarilla indica que hay gran actividad antioxidante y deben realizarse las diluciones correspondientes, pero si la coloración es muy violeta quiere decir que hay muy poca actividad y no podrá ser cuantificada.

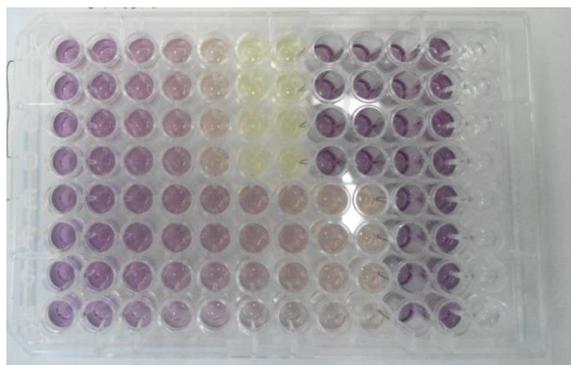


Figura 34. Microplaca con prueba de actividad antioxidante de un extracto acetónico de la semilla de tejacote

Una vez seleccionada la dilución del extracto (si la hubo) se efectuaron diluciones partiendo de esta disolución, siendo de 100, 200,300,400,500,600,700,800,900 y 1000 μL y se aforó con agua destilada a 1000 μL . Se inyectó igual que la curva patrón de ácido gálico y en la misma placa.

Para calcular el porcentaje de DPPH degradado se siguió ésta ecuación:

$$\%DPPH_{Degradado} = \left[1 - \frac{Am-Ab}{Ac-Ab} \right] \times 100$$

Dónde:

Am , Ab y Ac representan las absorbancias de las diferentes concentraciones de la muestra, blanco y control leídas a 517 nm después de 30 minutos de reacción con el DPPH.

El valor de CI_{50} se calculó a partir de la gráfica % de DPPH degradado vs concentración de la muestra. La capacidad antioxidante se expresó como milimol equivalente de Trolox por gramo de extracto, según sea el caso.

5.9 Evaluación de la estabilidad oxidativa de un aceite comercial empleando extractos de semilla de tejacote.

5.9.1 Preparación del aceite con el extracto de semilla de tejacote.

Después de elegir el extracto de semilla de tejacote (*Crataegus mexicana*) que presentó mayor actividad antioxidante, se mezcló el extracto de tejacote a 120 g de aceite de girasol a una concentración de 150 ppm (NMX-f-223-SCFI-2011). Después, este aceite se agitó con una barra magnética por 30 minutos y se dejó reposar 24 horas. A cada uno de 5 frascos ámbar se vertieron 20 g de aceite. Lo mismo se hizo para el antioxidante artificial (BHT) y se hizo un control sin antioxidante para realizar la comparación correspondiente. Todos los viales se colocaron en una incubadora a 55.5 °C y se efectuaron monitoreos cada 7 días de índice de yodo, acidez y de índice de peróxidos, en total fueron 5 monitoreos.

5.9.2 Índice de acidez

A un gramo de muestra de aceite se le adicionaron 20 mL de etanol, tres gotas de fenolftaleína como indicador, se calentó la mezcla hasta llegar a 50°C y una vez alcanzada esta temperatura se tituló con una solución valorada de hidróxido de potasio 0.00788 N y agitación vigorosa hasta alcanzar una coloración rosa pálido que fuera estable por lo menos 30 segundos como se menciona

en la norma NMX-f-101-scfi-2006. Se registró el volumen utilizado de la solución valorada de KOH y se tituló una muestra blanco para estimar el índice de acidez usándose la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(V1 - V2)(\text{Normalidad de KOH})(28.2 \text{ mg KOH})}{(\text{g de muestra})}$$

Dónde: V1 es el volumen de KOH gastado en la muestra, V2 es el volumen de KOH gastado en el blanco. El índice de acidez se expresa en mg de KOH por gramo de aceite, usando como referencia al ácido oleico (Badui, 2006).

5.9.3 Índice de yodo

En un matraz de 125 mL se pesaron 0.05 gramos de muestra aproximadamente, se cubrió con papel aluminio, asegurándose de que no hubiera ningún paso de luz, después se adicionaron 5 mL de diclorometano y 5 mL de reactivo de wijs, el matraz se tapó y se dejó reposar 30 minutos en la obscuridad. Pasando el tiempo de reposo, se adicionaron 5 mL de yoduro de potasio al 10% y 50 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada, para pasar a titular con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.104 N hasta alcanzar una coloración amarilla paja. A continuación se agregó un mililitro de solución de almidón al 1% como indicador y se continuó la titulación hasta que la solución quedó incolora como se indica en la norma NMX-F-152-scfi-2005. Se registró el volumen de tiosulfato de sodio utilizado. Para determinar el valor de índice de yodo, también se efectuó la titulación de un blanco.

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

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V2 - V1)(\text{Normalidad del tiosulfato de sodio})(12.69)}{(\text{g de muestra})}$$

Dónde: V2 es el volumen gastado en la titulación del blanco y V1 es el volumen gastado para la muestra.

5.9.4 Índice de peróxidos.

Se pesaron 3 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se disolvió la muestra en 30 mL de una solución de ácido acético con diclorometano (3:2). Se colocaron en la mezcla anterior 0.5

mL de una solución saturada de yoduro de potasio, después de un minuto de reposo se adicionaron 30 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada. Se tituló la muestra con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.0511 N usando una solución de almidón al 1% como indicador (Rajkumar & Naragarajan, 2011).

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

$$\text{índice de peroxidos} = \frac{(V1 - V2)(\text{Normalidad del tiosulfato de sodio})(1000)}{(\text{g de muestra})}$$

Dónde: V1 es el volumen de tiosulfato de sodio ocupado para la muestra y V2 es el volumen que se ocupó en el blanco. El resultado se expresa en meq de peróxido/kg de aceite.

Una vez terminadas las pruebas de estabilidad oxidativa durante el tiempo propuesto, se realizó un análisis estadístico de ANOVA para comparar si existe diferencia significativa entre el control, extracto de tejocote y el antioxidante sintético (BHT).

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Características físicas de la semilla de tejocote mexicano (*Crataegus mexicana*)

Las semillas de tejocote presentaron una coloración marrón claro, de forma ovalada y lisas. Después de haberlas sometido a un proceso de secado se determinaron sus dimensiones, peso y su humedad (tabla 3).

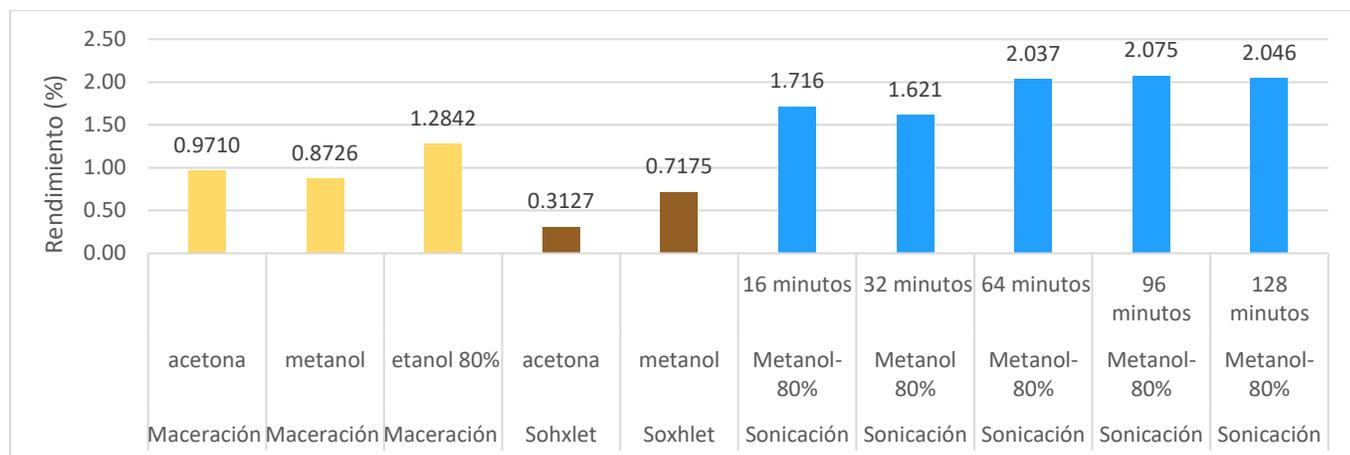
Tabla 3. Caracterización de la semilla de tejocote.

Característica.	ANCHO (cm)	LARGO (cm)	ESPEJOR (cm)	PESO (g)	HUMEDAD %
Promedio	0.75	1.22	0.58	0.3050	6.04
Desviación estándar.	0.12	0.10	0.06	0.0836	0.125

La semilla representó el 5.27% del peso total del tejocote. Mientras el peso promedio del tejocote fue de 24.19 ± 3.29 g, el peso promedio de la semilla fue de 1.29 ± 0.40 g.

6.2 Rendimientos obtenidos en la extracción de semilla de tejocote

La semilla de tejocote pulverizada se sometió a una extracción con hexano, obteniéndose 7.66% de aceite mediante la técnica de maceración, mientras que el método de Soxhlet produjo 2.11%. El polvo desengrasado de semilla de tejocote fue sometido a un proceso de extracción de manera secuencial, empleando las técnicas de maceración, Soxhlet y sonicación. Los rendimientos que se obtuvieron en cada extracción se presentan en la gráfica 1. Como se puede observar, los extractos obtenidos mediante la técnica de ultrasonido tienen los valores más altos. Dentro de estos, los realizados a 64, 96 y 128 minutos son los más altos, obteniéndose valores similares, por lo que extraer por esta técnica más allá de los 64 minutos resulta innecesario. El uso de disolventes orgánicos acuosos puede facilitar las extracciones de compuestos polares por ser solubles en estos disolventes (Orían y Escriche, 2015), tal como sucedió en el presente trabajo, donde las mezclas acuosas de etanol y metanol tuvieron los rendimientos más altos (gráfica 1).



Gráfica 1. Rendimientos de los extractos de la semilla de tejocote, empleando diferentes técnicas y disolventes.

6. 3 Cuantificación de polifenoles por el método de Folín-Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos se encuentran entre los principales compuestos bioactivos en frutos de tejocote y son los responsables de su carácter antioxidante (Liu, 2011). Se ha observado que las semillas de las diferentes variedades de tejocote contienen también este tipo de compuestos. Considerando lo anterior, se determinó la cantidad de fenoles totales en los distintos extractos, utilizando el método de Folín-Ciocalteu. En la tabla 4 se muestran los valores de la prueba de polifenoles totales en los extractos de semilla de tejocote, junto con el análisis estadístico tukey.

Tabla 4. Valores de polifenoles totales presentes en los distintos extractos de semilla de tejocote

Técnica	Fenoles totales (mg de EAG/g de extracto)
Maceración acetona	205.8±14.13 ^b
Maceración metanol	54.99±2.24 ^a
Maceración etanol acuoso 80%	58.42±5.79 ^a
Soxhlet acetona	485.7±66.56 ^c
Soxhlet metanol	2689.52±375.44 ^d
Sonicación metanol acuoso 80% 16 min	109.5±15.87 ^{ab}
Sonicación metanol acuoso 80% 32 min	198.0±27.02 ^b
Sonicación metanol acuoso 80% 64 min	126.1±4.84 ^{ab}
Sonicación metanol acuoso 80% 96 min	129.6±11.00 ^{ab}
Sonicación metanol acuoso 80% 128 min	139.0±8.20 ^{ab}

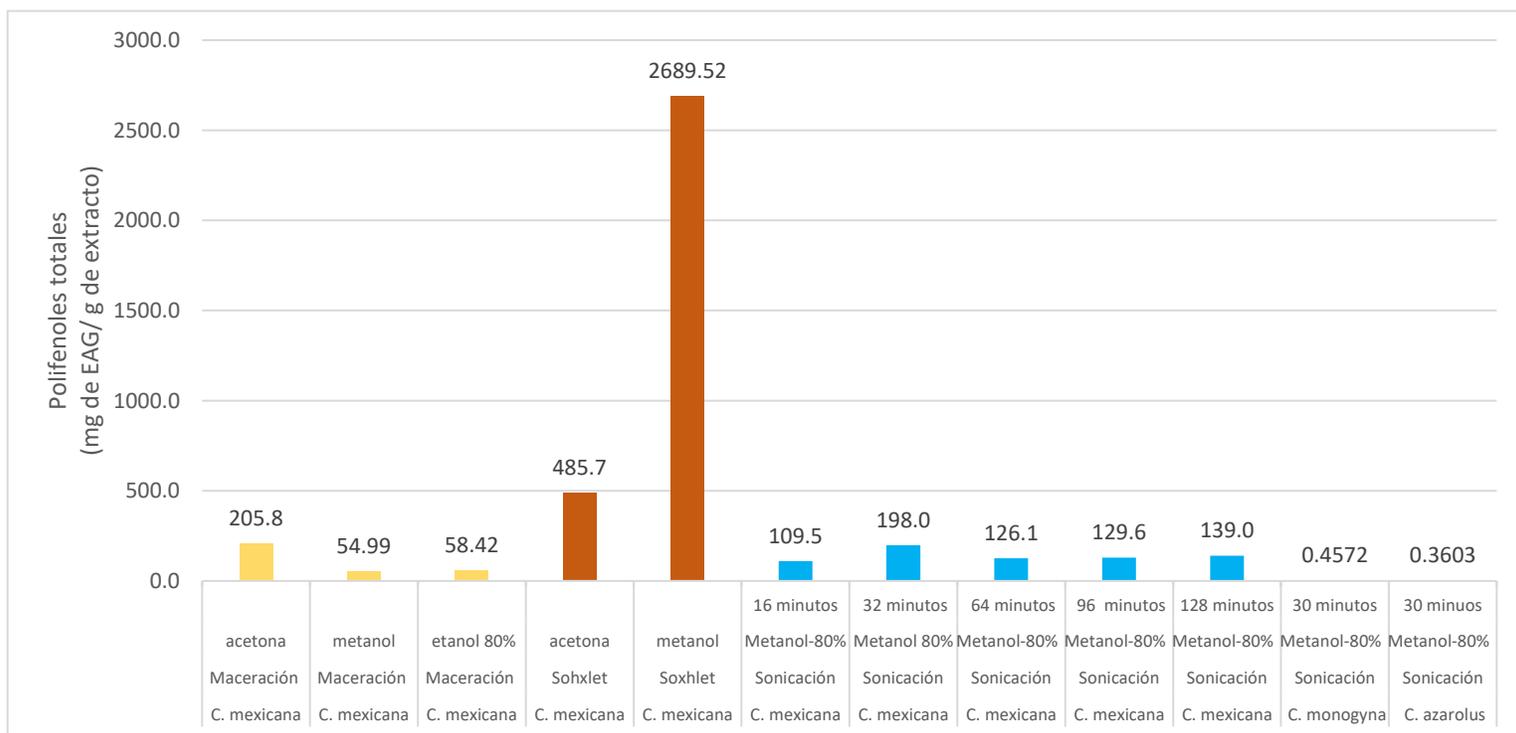
n=8 Promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico por tipo de técnica. Superíndices ^{a-d} significan diferencia significativa ($p < 0.5$), donde a es el valor menor y d es el mayor.

Es posible observar en la tabla 4 mencionada que la técnica que presentó el número más alto para fenoles totales fue la de Soxhlet empleando metanol (2689.52±375.44 mg de EAG/g de extracto). A diferencia de las otras técnicas, ésta utiliza el disolvente en ebullición, por lo que el proceso mejoro la extracción de polifenoles (Galili 2014). Lo mismo ocurrió con acetona utilizando Soxhlet, sin embargo este disolvente no fue tan eficiente como el metanol. De los extractos obtenidos por maceración se puede observar que el extracto con mayor cantidad de polifenoles totales fue el acetónico (205.8±14.13 mg de EAG/g de extracto), pero aún está por debajo de los extractos obtenidos mediante Soxhlet. Debe recordarse que los extractos acetónicos no sólo pueden

arrastrar polifenoles, sino también carotenoides y otro tipo de antioxidantes (Orian y Escriche, 2015). Los extractos obtenidos mediante ultrasonido no tienen diferencia significativa entre ellos y los de maceración. Particularmente hablando de los extractos de ultrasonido podemos observar que a los 32 minutos de extracción hay mayor cantidad de polifenoles sin embargo no existe diferencia significativa. Por lo que 16 minutos es suficiente para lograr la máxima cantidad de polifenoles bajo estas condiciones (109.5 ± 15.87 mg de EAG/g de extracto).

Comparando *Crataegus* (ver gráfica 2), la especie mexicana tiene un valor mayor de polifenoles totales que las especies *monogyna* y *azarolus* utilizando técnicas similares (Mraihi, et al, 2013).



Gráfica 2. Polifenoles totales en los extractos de tejocote mediante técnicas y disolventes diferentes expresados en mg de EAG/g de extracto.

6.4 Evaluación de la actividad antioxidante con el reactivo DPPH.

La prueba de DPPH está basada en una reacción de radicales libres y el valor que se reporta es el IC₅₀, definido como la concentración necesaria del antioxidante para reducir la concentración inicial de DPPH al 50% (Shahidi y Zhong, 2015). Por lo que un IC₅₀ pequeño señala extractos con gran actividad antioxidante.

En la tabla 5 se muestran los valores de IC₅₀ de los extractos de semilla de tejocote, junto con el análisis estadístico Tukey. En esta tabla se puede observar que los extractos con mayor actividad antioxidante son los de maceración acetona, maceración metanol y los de sonicación, sin existir diferencia significativa entre ellos.

Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de semilla de tejocote.

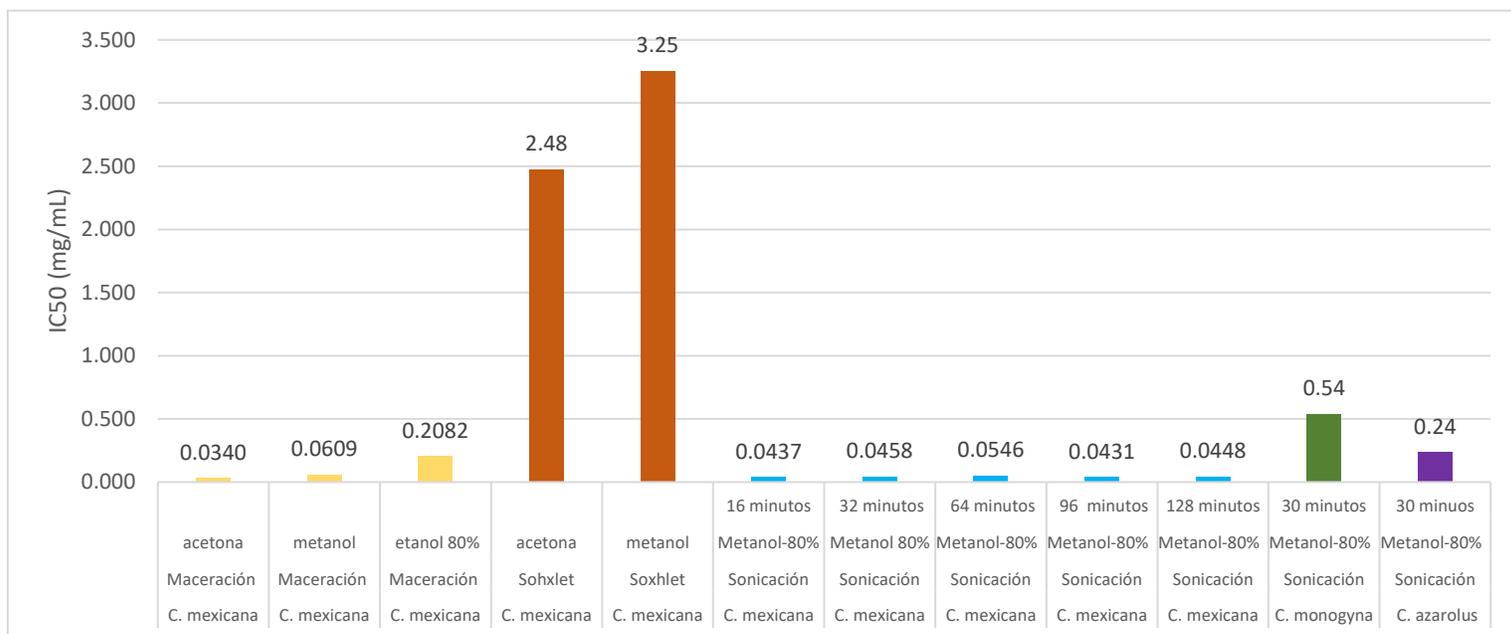
Técnica	IC ₅₀ (mg/mL)
Maceración acetona	0.0340±0.0005 ^a
Maceración metanol	0.0609±0.0012 ^a
Maceración etanol acuoso 80%	0.2082±0.0048 ^b
Soxhlet acetona	2.48±0.024 ^c
Soxhlet metanol	3.25±0.064 ^d
Sonicación metanol acuoso 80% 16 min	0.0437±0.0007 ^a
Sonicación metanol acuoso 80% 32 min	0.0458±0.0011 ^a
Sonicación metanol acuoso 80% 64 min	0.0546±0.0005 ^a
Sonicación metanol acuoso 80% 96 min	0.0431±0.0009 ^a
Sonicación metanol acuoso 80% 128 min	0.0448±0.0015 ^a

n=4, Promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico por tipo de técnica. Superíndices ^{a-d} significan diferencia significativa (p<0.5), donde a es el valor menor y d es el mayor

Los extractos con menor actividad antioxidante fueron los obtenidos mediante la técnica de Soxhlet (ver gráfico 3). Es posible que el efecto de la temperatura más alta empleada en este caso, sea la causa de la degradación de los compuestos fenólicos (Chang 2006). Se ha observado que una alta temperatura degrada los compuestos polifenólicos por el efecto de la hidroxilación y oxidación de éstos, causando una reducción en la capacidad antioxidante del extracto (Galili 2014).

En el caso de la técnica de sonicación, es importante hacer notar que los extractos obtenidos con etanol acuoso al 80% tuvieron valores similares de IC₅₀ a los obtenidos por maceración con acetona y metanol. Considerando la composición de extractos antioxidantes similares de otras especies del género *Crataegus*, algunos compuestos que pueden estar presentes en los extractos obtenidos en este trabajo son: fenoles como ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y o-difenoles (Orian y Escriche, 2015),



Gráfica 3. Actividad antioxidante presente en los extractos de semilla de tejocote residual, empleando diferentes técnicas de extracción y disolventes. El método por cual se determinó fue DPPH.

Analizando los resultados obtenidos en este estudio: rendimiento, polifenoles totales y actividad antioxidante, se puede decir que los extractos por sonicación son los de mayor capacidad antioxidante. Aunque no mostraron grandes cantidades de polifenoles totales como otras técnicas, tuvieron IC₅₀ pequeños sin utilizar demasiado tiempo para su obtención como los otros métodos. Otro punto a su favor fue que estos extractos tuvieron los rendimientos más altos. Estos extractos no tuvieron diferencia significativa para los valores de polifenoles totales y actividad antioxidante. Por lo tanto, la eficiencia de extracción está determinada por el rendimiento y el tiempo. Considerando lo anterior, la técnica más efectiva para la extracción de compuestos fenólicos

(rendimiento de 2.037%), es la de sonicación, empleando metanol acuoso y un tiempo de 64 minutos.

Comparando *Crataegus* (ver gráfica 3), los extractos de la especie *mexicana* tienen un valor inferior de IC₅₀ que las especies *monogyna* y *azarolus*, utilizando técnicas semejantes (Mraihi, et al, 2013).

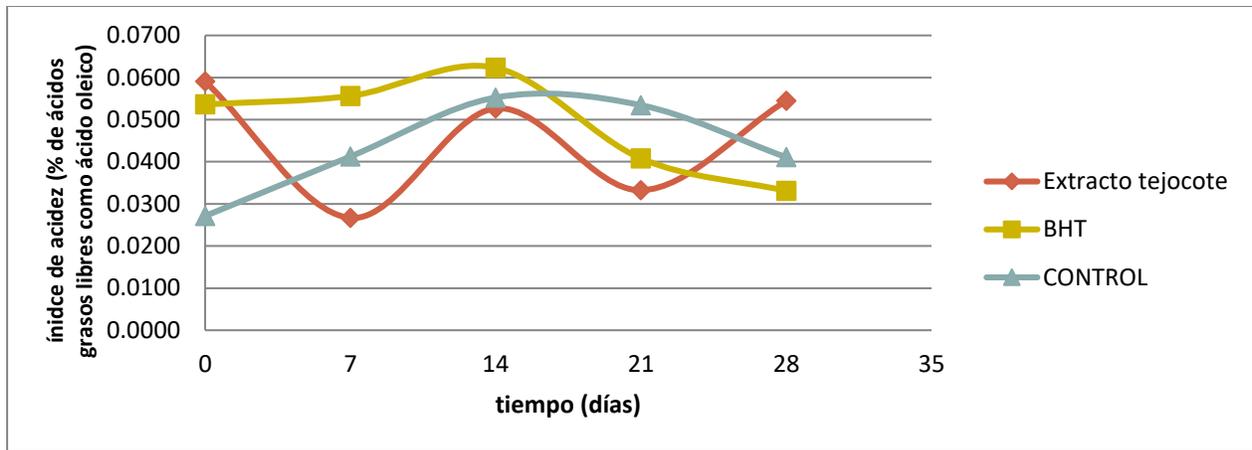
6.5 Estabilidad oxidativa del aceite de girasol con extracto de tejocote como antioxidante.

El aceite de girasol es ampliamente usado en nutrición y es altamente apreciado como un recurso de ácidos grasos esenciales. La composición de ácidos grasos del aceite de girasol (ácido oleico vs ácido linoleico) varía como una consecuencia del clima y el cultivo. El aceite es normalmente reconocido por su alto contenido de ácido linoleico. (Yanishlieva y Marinova, 2001).

El aceite de girasol fue almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C durante 28 días, equivalente a 16 meses a una temperatura ambiente (MatthaËus, 2010). Los cambios oxidativos fueron monitoreados con los índices de acidez, peróxidos y yodo.

6.5.1 Índice de acidez

La ruptura hidrolítica de los triglicéridos en los aceites tiene como resultado la liberación de ácidos grasos libres, que pueden ser monitoreados a través del índice de acidez (Talbot, 2016).



Gráfica 5. Índice de acidez de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol con 150 ppm del extracto de semilla de tejocote y aceite de girasol con BHT a 55°C por 35 días.

En la gráfica 5 se observa que el porcentaje de ácidos grasos para el aceite control aumenta conforme pasa el tiempo hasta el día 14 donde el porcentaje empieza a descender. Al aceite que se le agregó BHT muestra un comportamiento similar al aceite control, pero los valores obtenidos son mayores a los correspondientes de los días 0 a 14, mientras que los valores obtenidos en los días posteriores son menores. Por otro lado se observa que el aceite de tejocote no sigue la misma tendencia, primero el índice de acidez empieza con valores mayores en comparación los otros aceites, después tiene valores menores que los otros dos, finalizando el día 28 con el índice más alto.

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

Días a 55°C	0	7	14	21	28
Extracto tejocote	0.059±0.017 ^a	0.027±0.011 ^a	0.053±0.011 ^a	0.033±0.012 ^a	0.054±0.012 ^a
BHT	0.054±0.011 ^a	0.056±0.012 ^a	0.062±0.021 ^a	0.041±0.021 ^a	0.033±0.011 ^a
CONTROL	0.027±0.012 ^a	0.041±0.020 ^a	0.055±0.012 ^a	0.053±0.013 ^a	0.041±0.012 ^a

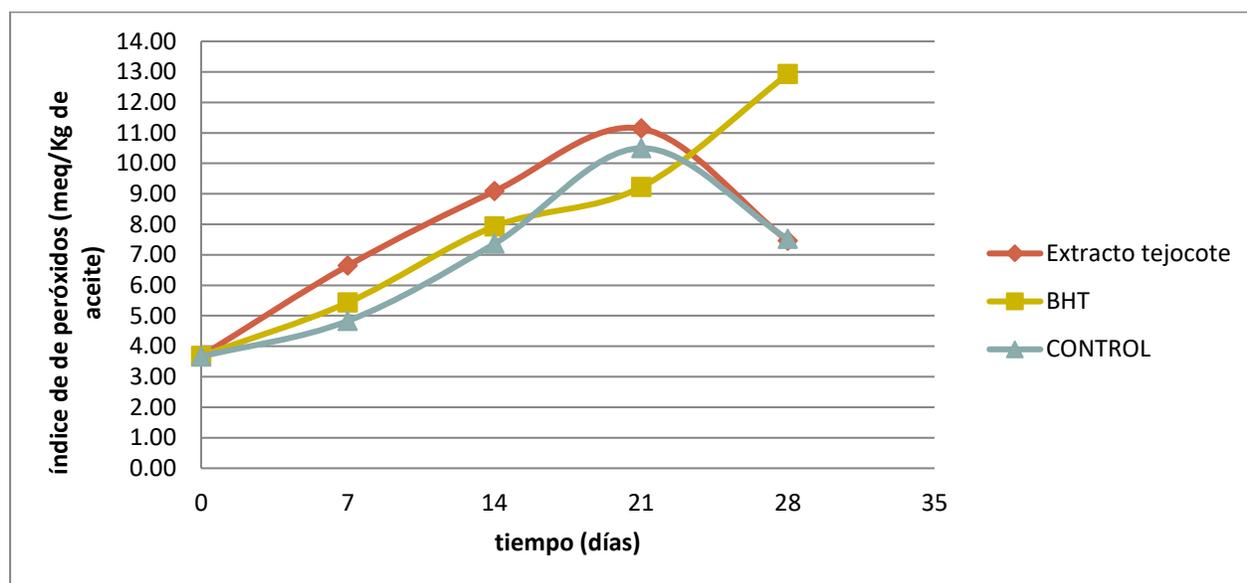
n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de acidez por día. El Superíndice a indica que no hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los valores

En la tabla 6, se muestra el análisis estadístico de los datos del índice de acidez. Los resultados indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos por lo que se puede decir que agregar BHT o extracto de tejocote no afecta la estabilidad del aceite de girasol respecto al índice de acidez.

6.5.2 índice de peróxidos.

La determinación del índice de peróxidos es el método más utilizado para medir los productos primarios de la degradación oxidativa. Mediante este índice se puede seguir la propagación de reacciones en cadena (Matthæus, 2010).



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

En la gráfica 6 puede observarse que el índice de peróxidos para el aceite control sube conforme pasa el tiempo hasta el día 21 y desciende para el día 28. Respecto al aceite con BHT el índice de peróxidos sube conforme pasa el tiempo sin disminuir en ningún momento. El aceite con extracto de tejocote tiene un comportamiento similar al aceite control.

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

Días a 55°C	0	7	14	21	28
Extracto tejocote	3.68±0.04 ^a	6.64±1.01 ^{cd}	9.08±0.17 ^{eg}	11.14±0.15 ^h	7.46±0.08 ^d
BHT	3.68±0.03 ^a	5.43±0.10 ^{bc}	7.93±1.05 ^{def}	9.22±0.09 ^{fg}	12.93±0.27 ⁱ
CONTROL	3.66±0.10 ^a	4.83±1.04 ^{ab}	7.36±0.13 ^d	10.50±0.91 ^{gh}	7.52±0.07 ^{de}

n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de acidez por día. Superíndices ^{a-i} significan diferencia significativa ($p < 0.5$), donde a es menor índice y la letra i es el mayor.

En la tabla 7 se muestra el análisis estadístico de los valores de índice de peróxidos. Se puede apreciar que entre los datos no existe diferencia significativa, excepto para el día 28, donde el valor del índice de peróxidos para el tratamiento del aceite con BHT es significativamente diferente. Por lo anterior puede decirse que agregar BHT o extracto de tejocote al aceite de girasol no afectó la estabilidad oxidativa del aceite de girasol respecto al índice de peróxidos.

El extracto de tejocote no fue capaz de inhibir las reacciones de oxidación a estas condiciones. Sin embargo, en un estudio donde utilizaron un extracto de *Crataegus mordenensis* como antioxidante si mostró inhibir la formación de hidroperóxidos en aceite de girasol a 65°C. Este experimento tomo en cuenta los EAG incorporados en el aceite por el extracto, por lo que el experimento con *Cratageus mexicana* se deberá replantear el protocolo tomando esta consideración (Aladedunye. et al, 2014).

Índice de yodo.

El deterioro de las grasas y aceites comúnmente se lleva acabo mediante el proceso de autoxidación en el cual se realiza la oxidación de las insaturaciones de los ácidos grasos, esto se ve reflejado en el índice de yodo (Badui, 2006).

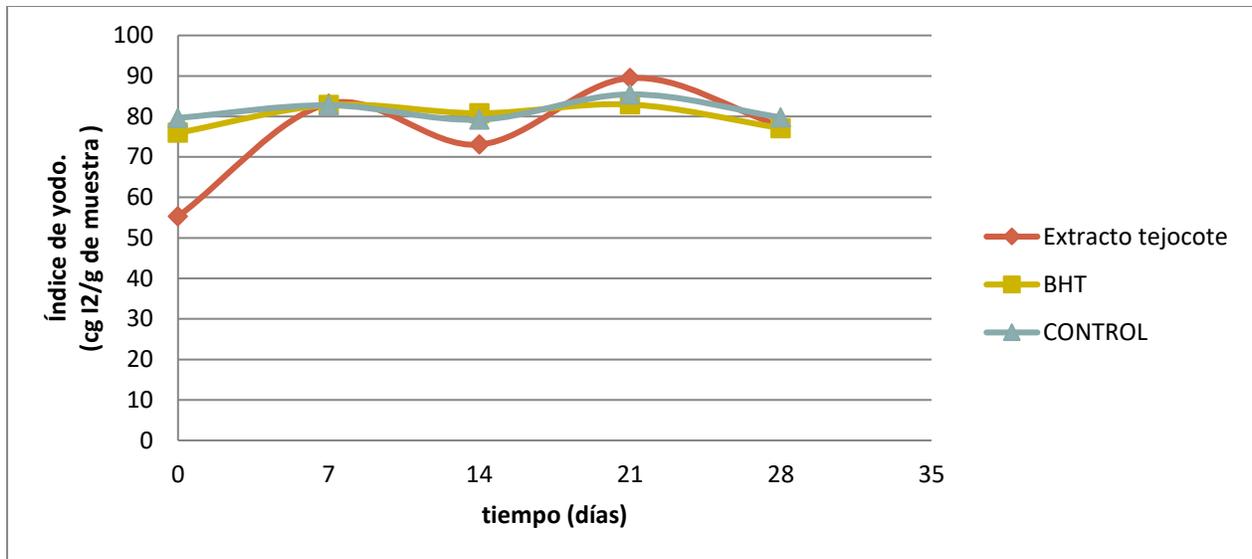


Gráfico 7. Índice de yodo de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de girasol, aceite de girasol adicionado con 150 ppm de extracto de semilla de girasol y aceite de girasol con 150 ppm de BHT a 55°C por 28 días.

En la gráfica 7 se observa que el índice de yodo para el aceite control y para el aceite con BHT permanece relativamente constante conforme pasa el tiempo. Respecto al aceite con el extracto de tejocote el valor del índice al tiempo cero es menor en comparación con los otros tratamientos, conforme avanzan los días los valores del índice se van haciendo similares.

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

Muestra/Tiempo	0	7	14	21	28
Extracto tejocote	79.2±1.7 ^a	83.2±2.1 ^{ab}	73.0±7.2 ^{ab}	89.5±1.8 ^b	77.6±0.7 ^{ab}
BHT	75.9±3.8 ^{ab}	82.8±2.2 ^{ab}	80.8±0.5 ^{ab}	82.9±2.6 ^{ab}	77.1±1.8 ^{ab}
CONTROL	79.6±7.9 ^{ab}	82.8±1.2 ^{ab}	79.2±0.01 ^{ab}	85.5±2.1 ^{ab}	79.8±1.1 ^{ab}

n=8 promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de acidez por día. Superíndices a-b significan diferencia significativa ($p < 0.5$), donde a es menor índice y la letra i es el mayor.

En la tabla 8 puede verse que no existe diferencia significativa entre los valores del índice de yodo, por lo que agregar BHT o extracto de tejocote al aceite de girasol no afecta la estabilidad oxidativa del aceite de girasol.

Por otra parte, es importante mencionar que el aceite control no cumplía con la especificación de la norma NMX-F-265-SCFI-2005, ya que esta norma nos indica que un aceite comestible puro de girasol, debe tener un índice de yodo entre 118-145 cg I₂/g, y el aceite control no se encuentra dentro de este intervalo.

En el estudio aquí realizado se puede apreciar cierta incongruencia en los resultados ya que las insaturaciones parecen nunca cambiar de valor, sin embargo en la prueba de peróxidos se ve claramente que si hay oxidación con la formación de peróxidos. Por lo que se requiere verificar la prueba del índice de yodo o bien realizar una prueba complementaria llamada método del ácido tiobarbitúrico (TBA) basado en la reacción de dos moléculas de TBA con una de dialdehído malónico formado por la oxidación de compuestos poliinsaturados (Badui, 2006)

7. CONCLUSIONES.

- ❖ A partir de la semilla desengrasada de tejocote residual (*Crataegus mexicana*) se obtuvieron extractos empleando la técnica de maceración y los disolventes: acetona, metanol y etanol acuoso al 80%. También se empleó la técnica de Soxhlet empleando los disolventes acetona y metanol.
- ❖ Adicionalmente, se obtuvieron extractos de misma semilla utilizando la técnica de sonicación con metanol acuoso al 80% a pH de 3.5 como disolvente.
- ❖ Se determinaron los polifenoles totales y se evaluó la actividad antioxidante de los extractos mencionados.
- ❖ La técnica más eficaz para la extracción de los compuestos fenólicos fue la de sonicación a 64 minutos. Esto debido a que se tuvieron los rendimientos más altos (2%), buena actividad antioxidante (IC50 de 0.0546 mg/mL) y un tiempo de extracción mucho menor comparado con las otras técnicas.
- ❖ No se mostró diferencia significativa respecto a la estabilidad oxidativa entre el control, el aceite adicionado con BHT y el aceite con extracto de semilla de tejocote. Por lo que en este experimento bajo estas condiciones el extracto de tejocote no demostró ser capaz de actuar como antioxidante en el aceite de girasol.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Aladedunye, F., Przybylski, R., Niehaus, K., Bednarz, H., Matthaus, B. (2014). Phenolic extracts from *Crataegus mordenensis* and *Prunus virginiana*: Composition, antioxidant activity and performance in sunflower oil. *Food Science and Technology*, 59, 308-319.

Badui S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta edición), México: Pearson educación.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (2009). [En línea] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=tejocote&id=7778>
[Último acceso 31/05/2017]

Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P.P., Ferreira, I. C.F.R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346.

Carey, F.A. (2006). *Química Orgánica* (Sexta edición), México: McGraw-Hill.

Casas, L., Sandoval, G. C. (2014). Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Revista digital universitaria*, 15 (12), 1-15.

Castañeda, A. (2011). Propiedades nutricionales y antioxidantes del maíz azul (*Zea mays* L.). *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 5 (2), 75-83.

Castañeda, A., Pacheco, M., Páez, M., Rodríguez, J.A., Galán, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.

Chang, Q., Zuo, Z., Chow, m., Ho, W. (2006). Effect of storage temperatura on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. *Food chemistry*, 98, 426-430.

Cheng, Z., Moore, J., Yu, L. (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7429-7436.

Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food chemistry*, 99, 381-387.

Ciani, G., Chancalay, G., Girotti, A., Glusman, Al., Pacheco, M. L. (2002). Extracción de aceites con fluido supercrítico. *Invenio, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Rosario*, 5, 9, pp. 125-130.

Da Porto, C.; Porretto, E., Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076–1080.

Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, analysis and their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

De Clercq, D., Wena, Z., Gottfrieda, O., Schmidta, F., Feia, F. (2017). A review of global strategies promoting the conversion of food waste to bioenergy via anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 204–221.

DIRECTIVA 2008/98/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 19 de noviembre de 2008 sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. [En línea] Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex:32008L0098> [Último acceso 31/05/2017]

Dequan, D., Pingsheng, L., Yuehua, L., Yan, Z., Yuanxia, S. (2015). Comparative study of antioxidant compounds and antiradical properties of the fruit extracts from three varieties of *Crataegus pinnatifida*. *J Food Sci Technol*. 52(1), 430–436.

Dolatkhani, P., Jameie, R. (2013). Antioxidant and Antiradical Activities Assessment in Two Hawthorn Species Fruit Components. *Current Nutrition & Food Science*, 9, 52-58.

Dou, D., Pingsheng, L., Li, Y., Zeng, Y., Sun, Y. (2015). Comparative study of antioxidant compounds and antiradical properties of the fruit extracts from three varieties of *Crataegus pinnatifida*. *J Food Sci Technol*, 52(1), 430–436.

CODEX STAN 19-1981. (2015).

García, G. (jueves, Noviembre 17, 2016). e-consulta.com. REFERENCIA OBLIGADA. Periódico digital. [En línea] Disponible en: <http://www.e-consulta.com/nota/2016-11-17/cultura/feria-del-tejocote-en-calpan-espera-10-mil-visitantes-el-domingo> [Último acceso 05/06/2017]

Edwards, J. E., Brown, P.N., Talent, N., Dickinso, T. A., Shipley, P.R. (2012). A review of the chemistry of the *crataegus*. *Phytochemistry*, 79, 5-26.

Fereidoon, S., Ying, Z. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 930–940.

Ferrer, R., Hernández, J.M., Rivas J. C., Escribano M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *Food science and technology*, 44, 847-853.

Franco, O., Aguirre, S., Morales, E.J., González, A., Gutiérrez, F. (2010). Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) de Lerma y Ocoyoacac. *Ciencia Ergo Sum*, 17 (1), 61-66.

Galanakis, C.M. (2012). Recovery of highadded-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 68-87.

Galili, S., Hovav, R. (2014). Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds. *Polyphenols in Plants*, Capítulo 16, 305–323.

Galloa, M., Formato, A., Ianniello, D., Andolfic, A., Contec, E., Ciaravoloc, M., Varchettac, V., Naviglioc, D. (2016). Supercritical fluid extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariifolium*) compared to traditional maceration and cyclic pressurization extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 104–112

García, R., Ibarra, E., Nieto, R. (2013). Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 1298-1304.

García, R., Aguilar, L., Soto, M., Nieto, R., Kite, G. (2012). Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *crataegus* spp. from México. *Agrociencia*, 46, 651-662.

Hamilton, R., Hamilton, S., (1992). *Lipid Analysis: A Practical Approach*, EUA: IRL PRESS.

Haslam, E. (2007). *Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime*.

Hernández, G., Espinosa, T., Hernández, G., Villa, M., Reyes, B., Guerra, D. (2016). Influence of Polar Solutions on the extraction of phenolic compounds from Capulin fruits (*Prunus serótina*). *J Mex. Chem. Soc*, 60 (2), 73-78.

Ismail, M., Mariod, A., Bagalkotkara, G., Lingb, H. (2010). Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of Cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. *Grasas y aceites*, 61 (1), 37-44.

Jeong, S.H., Kim, B.Y., Kang, H.G., Ku, H.O., Cho, J.H. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208 (1), 49–62.

Jiang, J., Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120 ,107–117.

Ky I., Le Floch A., Zeng L., Pechamat L., Jourdes M., Teissedre P.L. (2016). Tannins. *Encyclopedia of Food and Health* 247–255.

Ki Lin, C. S., Pfaltzgraff, L.A., Herrero L., Mubofu, E.B., Abderrahim, S., Clark, J.H., Koutinas, A. A., Kopsahelis, N., Stamatelatou, K., Dickson, F., Thankappan, S., Mohamed, Z., Brocklesby, R., Luque, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective, *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 426–464.

Ki Lin, C. S., Koutinas, A. A., Stamatelatou, K., Mubofu E. B., Matharu, A. S., Kopsahelis N., Pfaltzgraff L. A., Clark, J. H., Papanikolaou, S., Kwan T. H., Luque R., (2014). Current and future trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: a global perspective, *Biofuels Bioproducts Biorefining* 8, 686-715.

Maqueda, M. R., Carbonell, M. Vi., Martínez, E., Flórez, M. (2005). Fuentes de emisión de gases de efecto invernadero en la agricultura. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 2 (4),14-18.

Matthæus, B. (2010). Oxidation of edible oils, editorial: Woodhead Publishing Limited, Capítulo 6:183–238.

Méndez, D., Banderas, J. A., Nieto, A., Rojas, A., García, M., (2013). Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. *Academicjournals*, 7 (6), 150-158.

Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.

Montemayor C. (2007). *Diccionario del náhuatl en el español de México*, UNAM, México, p 112.

Mukhopadhyay, S., Luthria, D. L., Robbins, R. J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction, Journal of the Science of Food and Agriculture, 86,156–162.

Jaramillo, M. (2013). MUNICIPIOS, periódico digital. [En línea] <http://municipiospuebla.mx/nota/2013-11-07/san-andr%C3%A9s-cholula/calpan-primer-lugar-nacional-en-producci%C3%B3n-de-tejocote>. [Último acceso 05/06/2017].

Mohammadpour M., Sadeghi A., Fassihi A., Saghaei L., Movahedian A., Rostami M. (2012). Synthesis and antioxidant evaluation of some novel orthohydroxypyridine-4-one iron chelators, Research in Pharmaceutical Sciences, 7(3), 171-179.

Mraihi, F., Journi, M., Chérif, J.K., Spkme, M., Sokmen, A., Trabelsi, M. (2013). Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Crataegus Fruits Grown in Tunisia as Determined by DPPH, FRAP, and β -Carotene/Linoleic Acid Assay. Journal of Chemistry, 2013, 1-6.

Neugebauer, M., Sołowiej, P., (2017). The use of green waste to overcome the difficulty in small-scale composting of organic household waste. Journal of Cleaner Production, 156, 865-875.

Nielsen, S. (2010). Food Analysis Laboratory Manual Second Edition, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.

Núñez, C.A., Sánchez, D.I. (2011). Ethnobotanical, cultural, and agricultural uses of tejocote (crataegus species) in Mexico, International Society for Horticultural Science. Acta Horticulturae 918.

NMX-F-101-1987. Alimentos - aceites y grasas vegetales o animales - Determinación del índice de acidez- Método de prueba.

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

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

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

NMX-F-265-SCFI-2005. Alimentos – Aceite comestible puro de girasol –Especificaciones.

Laing, M. (1989). The three Forms of Molecular Oxygen. *Journal of Chemical Education*, 66 (6), 453-455.

Liu, P., Kallio, H., Yang, B. (2011). Phenolic Compounds in Hawthorn (*Crataegus grayana*) Fruits and Leaves and Changes during Fruit Ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 11141–11149.

Lupano, C. E. (2013). Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento. Buenos Aires, Argentina, Primera edición: Editorial de la Universidad de La Plata. Capítulo 2: 66-103.

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

Página de Escuela Nacional de Estudios Superiores Unida León, UNAM. [En línea] http://enes.unam.mx/?lang=es_MX&cat=sostenibilidad&pl=el-problema-creciente-de-los-residuos-en-mexico. [Último acceso 20/06/2017]

Pan, G., Yu, G., Zhu, C., Qiao, J. (2012). Ultrasonics, Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS), *Sonochemistry*, 19, 486–490.

Periódico en línea, Clarín Economía. [En línea] https://www.clarin.com/ieco/economia/tercio-alimentos-van-parar-basura_0_S1lbo7hpl.html [Último acceso 20/06/2017].

Pignitter, M., and Somoza, V. (2012). Critical Evaluation of Methods for the Measurement of Oxidative Rancidity in Vegetable Oils, *Journal of Food and Drug Analysis*, 20 (4), 772-777.

Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165, 638– 647.

Porto C., Porretto. E., Decorti. D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076–1080.

Rajkumar, G., Naragarajan, A. (2011). Antioxidant activity of lettuce tree (*Pisoniamorindifolia*) and tamarind tree (*Tamarindusindica* L.) and their efficacy in peanut oil stability. *Food sci. Biotechnol*, 20,1669-1677.

Ramírez, A. H. (2017). Dirección General de Comunicación Social (DGCS). [En línea] http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2017_462.html. [Último acceso 31/03/2018].

Ranken M.D. (1993). *Manual de industrias de los alimentos* Editorial ACRIBA, 2da edición, S.A., Zaragoza (España).

SAGARPA. (2016). [En línea] Disponible en: <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/el-tejocote-un-invitado-muy-especial-en-navidad>. [Último acceso 05/06/2017].

Sallucaabc, T. G., Peñarrietaabc, J. M., J. Alvaradoa, A., Bergenståhlc, B., (2008). Determination of total phenolic compounds content and the antioxidant capacity of Andean tubers and roots (isaño, oca, ulluco and arracacha). *Revista boliviana de química*, 25, 58-61.

Sáez, A.; Urdaneta G.; Joheni A. (2014). Manejo de residuos sólidos en América Latina y el Caribe. *Omnia*, vol. 20, núm. 3, 121-135.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro, revista de Biotecnología. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 16(2), p.p. 14-46.

Sedema. (2017). Inventario de Residuos Sólidos Ciudad de México 2015. [En línea] Disponible en: <http://www.sedema.cdmx.gob.mx/storage/app/media/IRS-2015-14-dic-2016.compressed.pdf> [Último acceso 07/07/2017].

Shahidi, F. (2015). Antioxidants: principles and applications, Handbook of Antioxidants for Food Preservation, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition, Capítulo 1, Pages 1–14.

Shahidi, F., Ambigaipala, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. Journal of functional foods, 18, 820–897.

Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2015). The use of antioxidants in the preservation of cereals and low-moisture foods, Handbook of Antioxidants for Food Preservation, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition Capítulo 17, Pages 413–432.

Shahidi F., Zhong Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. Journal of functional foods, 18, 757–781.

Sharmilaa, G., Nikithaa, V.S., Ilaiyarasi, S., Dhivyaa, K., Rajasekar, V., Kumar, N., Muthukumaranc, K., Muthukumarana, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from Cassia auriculata leaves and evaluation of its antioxidant activities. Industrial Crops and Products, 84, 13–21.

SIAP. (2016). [En línea] Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp [Último acceso 05/06/2017].

Sumaya, M. T., Suárez, T., Cruz, N., Alanís, E., Sampedro, J. G. (2010). Innovación de productos de alto valor agregado a partir de la tuna mexicana. Revista Mexicana de Agronegocios, núm. 27, pp. 435-441.

Tabasso, S., Carnaroglio, D., Gaudinob E., Cravotto., G. (2015). Microwave, ultrasound and ball mill procedures for bio-waste valorisation. *Green Chemistry*, 17, 684–693.

Talbot, G. (2016). *The Stability and Shelf Life of Food*. Editorial Woodhead Publishing, Segunda edición, Capítulo 24: 461–503.

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 71, Pages 100–109.

Trapala, J. (2015). Tesis Aislamiento, cuantificación y evaluación de posibles antioxidantes presentes en la semilla de tamarindo mexicano residual (*tamarindus indica*), México, Ciudad de México.

Upadhyay, A., Kaur, J., Kaur Bhulla H. (2015). Extraction Methods for Downstream Processing of Bioactive Compounds From Natural Sources. *Current Biochemical Engineering*, 2, 181-197.

Wang, H., Cao G., Prior, R. L. (1996). Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Agric. Food Chem*, 44, 701-705.

Willfor, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R. (2006). Chromatographic analysis of lignans, *Journal of Chromatography A*, 1112, 64–77.

Yanishlieva, N., Marinova, E. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 103, 752–767.

Zhang, Z., Chang, Q., Zhu, M., Huang, Y., Ho, W., Chen, Z., (2001). Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 144–152.