



Universidad Veracruzana



Universidad Veracruzana

**Instituto de Ciencias Básicas
Maestría en Ciencias Alimentarias**

**Evaluación de las propiedades fisicoquímicas,
antioxidantes e identificación de compuestos
fenólicos bioactivos de crucetillo (*Randia
monantha* Benth).**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Alimentarias

Presenta:

I. A. Naida Juárez Trujillo

Director:

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Co-director:

Dr. José Antonio Guerrero Analco

Xalapa de Enríquez, Ver. Agosto 2017.



La presente tesis titulada

"Evaluación de las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes e identificación de compuestos fenólicos bioactivos de crucetillo (*Randia monantha* Benth)".

Realizada por la

I.A. NAIDA JUÁREZ TRUJILLO

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 07 de agosto de 2017.

Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara

Dr. Oscar Garcia Barradas

Dr. José Enrique Meza Alvarado



Universidad Veracruzana



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADÓ EN EL LABORATORIO DE ALIMENTOS DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO DE QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE ECOLOGÍA A. C., CLÚSTER CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO BIOMIMIC[®], BAJO LA CO-DIRECCIÓN DE LA DRA. MARIBEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ Y EL DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ANALCO.

Dedicatoria

- A Dios por darme vida y fuerza para continuar mis estudios día con día.
- A mis padres, **Eulalia y Guillermo**, a quienes amo, por su apoyo incondicional en todo momento a pesar de los obstáculos que se me presentaban. Por ser mi ejemplo a seguir y enseñarme a nunca darme por vencida.
- A mis hermanos **Valentín y Guillermo** porque siempre estuvieron presentes en mis pensamientos.
- A mi hermano **Álvaro** y hermana **Rubicela** por apoyarme siempre y en cada momento.
- A mis tíos **Juan, Claudia, Dora y Ángel**, en especial a mi primo **Ángel de Jesús**.
- A mi abuelito **Amadeo** por el cuidado y apoyo brindado, a mi Abuelita **Práxedes** (+) que desde donde quiera que este me está apoyando y cuidando.
- A mi tía **Paula** (+) que siempre me cuida y lo seguirá haciendo desde donde este.
- A todos los miembros de mi familia que siempre estuvieron cuando los necesite.
- A mi pequeña, **Sarah** la hermana que escogí por estar siempre apoyándome desde que la conocí, por soportarme siempre.
- A **Lupita** mi hermana y amiga incondicional, por apoyarme a pesar de la distancia.
- A mis amigos **Nallely, Jesús, Rosaelena, Juan, Uriel, Martín, Diego, Anna, Arsenio, Dulce, Janeth, Gaby y Anahí**.
- A mis compañeros de generación **Montse, Anita, Paola, Alejandra, Ana Lilia, Liliana y Jesús**.
- A mis compañeros de laboratorio de Química de Productos Naturales **Sahid, Fredy, Djaheli, Cristi y Juan**.
- A la **Dra. Maribel** y al **Dr. José Antonio** por el apoyo y paciencia que siempre me tuvieron.
- A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a este proyecto.

CAER ESTÁ PERMITIDO, LEVANTARSE ES OBLIGATORIO.

MIL GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al **CONACyT** por el apoyo brindado a través de la beca otorgada.

Al personal del laboratorio de alimentos del **Instituto de Ciencias Básicas** perteneciente a la Universidad Veracruzana

Al personal del Laboratorio de Química de Productos Naturales del **Clúster Científico y Tecnológico BIOMIMIC[®]** perteneciente al **Instituto de Ecología A. C. (INECOL A. C.)**.

A la **Dra. Maribel Jiménez Fernández** por el apoyo y conocimiento brindado a lo largo de todo este tiempo.

Al **Dr. José Antonio Guerrero Analco** por el conocimiento brindado para la elaboración de esta tesis.

AL **Dr. Juan Luis Monrribot Villanueva** técnico del laboratorio de Química de Productos Naturales por la realización de los análisis mediante UPLC y el conocimiento que compartió conmigo.

M. en C. Israel Bonilla Landa técnico del laboratorio de Química Orgánica del INECOL A. C.

Biólogo Carlos Manuel Durán Espinosa por la identificación del ejemplar.

A mis sinodales el **Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara**, **Dr. Oscar García Barradas** y **Dr. José Enrique Meza Alvarado** por el conocimiento y tiempo para la revisión de esta tesis.

1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT.....	9
3 INTRODUCCIÓN	10
4. MARCO TEÓRICO.....	11
4.1 <i>Rubiaceae</i>	11
4.3 Descripción	11
4.3.1 Descripción botánica.....	11
4.2 Descripción taxonómica	11
4.3.2 Distribución	12
4.3.3 Usos.....	12
4.3.4 Otros estudios realizados en plantas del género <i>Randia</i> de relevancia para esta tesis.....	13
4.4 Actividad antioxidante	16
4.4.1 Fenóles	18
4.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos	19
4.4.3 Determinación de actividad antioxidante.	20
4.5. Parámetros de calidad en aceites	23
4.5.1 Ácidos grasos en aceites y grasas.....	25
4.6 Actividad antimicrobiana	27
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
6 OBJETIVOS	29
6.1 Objetivo general	29
6.2 Objetivos específicos	29
7. HIPÓTESIS	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Reactivos	31
8.2 Equipo.....	33
8.3 Métodos generales.....	34
8.3.1 Diagrama de trabajo. Análisis del fruto completo, pulpa y semilla de <i>R. monantha</i>	34
8.4 Muestra	35
8.4 Caracterización física del fruto de <i>R. monantha</i>	35
8.4.1 Determinación de las dimensiones, peso y número de semillas.....	35
8.4.2 Determinación de color	35
8.4.3 Determinación del porcentaje de humedad	36

8.4.4 Determinación de índice de redondez	36
8.5 Caracterización física de las semillas del fruto de <i>R. monantha</i>	37
8.5.1 Determinación de las dimensiones, peso y color	37
8.5.2 Determinación del contenido de grasa cruda.....	37
8.5.3 Determinación del contenido de almidón	37
8.5.4 Determinación del contenido de proteínas.....	38
8.5.6 Determinación del contenido de cenizas	38
8.5.7 Determinación del contenido de fibra.....	39
8.6 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la pulpa del fruto de <i>R. monantha</i>	39
8.6.1. Determinación de color e índice de oscurecimiento (IO)	39
8.6.2 Determinación de azúcares reductores	40
8.6.3 Determinación de pH	40
8.6.4 Determinación de acidez titulable	41
8.6.5 Determinación de grasa cruda, proteínas, fibra, cenizas y humedad	41
8.6.6 Determinación del contenido de calcio	41
8.6.7 Determinación del contenido de hierro	42
8.6.8 Determinación de fósforo	43
8.6.9 Determinación del contenido de vitamina C.....	43
8.7 Análisis preliminar de propiedades fitoquímicas. Identificación de metabolitos secundarios.....	44
8.7.1 Determinación de alcaloides	44
8.7.2 Determinación de esteroides	44
8.7.3 Determinación de saponinas	44
8.7.4 Determinación de flavonoides.....	44
8.7.5 Determinación de quinonas	45
8.7.6 Determinación de cumarinas	45
8.8 Determinación da actividad antimicrobiana.....	45
8.9 Evaluación de actividad antioxidante e identificación de compuestos fenólicos bioactivos de diferentes extractos de pulpa y semilla de <i>R. monantha</i>	46
8.9.1 Determinación del contenido de polifenoles totales	47
8.9.2 Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH	47
8.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante por el método FRAP (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina).....	48
8.9.4. Actividad antioxidante ABTS (ácido 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	48

8.9.5 Determinación del poder reductor.....	48
8.10 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos bioactivos.....	49
8.10.1 Condiciones cromatográficas.....	49
8.11 Caracterización fisicoquímica del aceite de semillas y perfil de ácidos grasos...51	
8.11.1 Determinación de índice de peróxidos.....	52
8.11.2 Determinación de Wijs.....	52
8.11.3 Porcentaje de ácidos grasos libres e índice de acidez	53
8.11.4 Índice de saponificación.....	53
8.11.5 Determinación de color, humedad y viscosidad.....	54
8.11.4 Determinación de densidad	54
8.11.5 Determinación de índice de refracción.....	54
8.11.6 Determinación del contenido de β -caroteno	54
8.11.7 Determinación de coeficientes de extinción K_{232} y K_{270}	55
8.11.8 Determinación de perfil de ácidos grasos	55
9. ANALISIS ESTADÍSTICO	56
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
10.1 Caracterización física del fruto.....	57
10.2 Caracterización de la pulpa seca	59
10.2.1 Caracterización fisicoquímica de la pulpa seca.....	59
10.1.2 Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos acuoso, etanólico y metanólico	61
10.1.3 Evaluación de actividad antioxidante y determinación de fenoles totales	62
10.1.4 Determinación de compuestos bioactivos.....	64
10.1.5 Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa.	69
10.2 Caracterización de las semillas secas	71
10.2.1 Caracterización física.....	71
10.2.2 Evaluación actividad antioxidante de diferentes extractos de semillas.	72
10.2.3 Identificación de compuestos fenólicos bioactivos de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la semilla de <i>R. monantha</i>	74
10.2.4 Evaluación propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas.....	77
10.2.5 Perfil de ácidos grasos.....	79
11 CONCLUSIONES	81
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
13. APÉNDICES	97

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Ensayos utilizados en esta tesis para determinar actividad antioxidante.	20
Cuadro 2. Nombre común (vulgar), el nombre químico sistemático y la abreviatura de ácidos grasos más abundantes en grasas y aceites.	26
Cuadro 3. Métodos para el estudio de la susceptibilidad microbiana	27
Cuadro 4. Lista de compuestos con los que se realizaron las curvas de calibración para la determinación de compuestos fenólicos bioactivos.	49
Cuadro 5. Gradiente de elución utilizado para la identificación de compuestos fenólicos bioactivos.	50
Cuadro 6. Propiedades físicas del fruto de <i>R. monantha</i>	58
Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de pulpa seca de <i>R. monantha</i>	60
Cuadro 8. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa del fruto de <i>R. monantha</i>	62
Cuadro 9. Actividad antioxidante y polifenoles totales de extractos acuoso, etanólico y metanólico de pulpa seca de crucetillo.	64
Cuadro 10. Concentración y linealidad de las curvas de calibración realizadas.	65
Cuadro 11. Estructuras de los compuestos encontrados en los diferentes extractos de pulpa y semilla respectivamente	66
Cuadro 12. Compuestos bioactivos identificados y cuantificados en diferentes extractos de pulpa seca.	68
Cuadro 13. Evaluación de actividad antimicrobiana en <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> de extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa del fruto de <i>R. monantha</i>	70
Cuadro 14. Caracterización fisicoquímica de las semillas secas.	72
Cuadro 15. Propiedades antioxidantes y polifenoles totales de extracto acuoso, etanólico y metanólico de semilla.	73
Cuadro 16. Compuestos fenólicos bioactivos identificados en diferentes extractos de semilla de crucetillo.	75
Cuadro 17. Análisis de componentes principales entre actividad antioxidante y compuestos fenólicos bioactivos identificados.	76

Cuadro 18. Propiedades fisicoquímicas del aceite extraído de la semilla.	78
Cuadro 19. Perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de crucetillo.	80
Cuadro 20. Subdivisión de los ácidos grasos presentes en el aceite de las semillas de crucetillo.	80
Cuadro 21. Absorbancias de la curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.	98
Cuadro 22. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.	99
Cuadro 23. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.	100
Cuadro 24. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.	101
Cuadro 25. Absorbancias de la curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.	102
Cuadro 26. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de vitamina C.	103
Cuadro 27. Matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos	106
Cuadro 28. Continuación matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos.	107
Cuadro 29. Continuación matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos	108

Índice de Figuras

Figura 1. Planta de <i>R. monantha</i>	11
Figura 2. Frecuencia de uso de <i>Randia aculeata</i> (Adaptada de Estudio etnobotánico de <i>Randia aculeata</i> en Jamapa, Veracruz, México y su efecto en ratas contra veneno de serpientes).....	13
Figura 3. Corte transversal del fruto de <i>R. monantha</i>	57
Figura 4. Dimensiones del fruto de <i>R monantha</i>	57
Figura 5. Dimensiones de semilla seca de <i>R. monantha</i>	71
Figura 6. Efecto de la concentración en el porcentaje de Inhibición de la captura del radical de DPPH en extracto acuoso, etanólico y metanólico de semilla.....	97
Figura 7. Efecto de la concentración en el porcentaje de Inhibición de la captura del radical de DPPH en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de pulpa.....	97
Figura 8. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.....	98
Figura 9. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.....	99
Figura 10. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.	100
Figura 11. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.	101
Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.....	102
Figura 13. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de vitamina C.	103
Figura 14. Curva de calibración de albumina para la determinación de proteínas por el método Biuret.	104
Figura 15. Cromatograma de perfil de ácidos grasos de aceite.	105
Figura 16. Constancia de presentación en congreso	109

Durante el desarrollo del presente trabajo fue presentado en el siguiente congreso:

Segundo Congreso Internacional Red Nacional de Investigación, Innovación y Desarrollo Tecnológico en Alimentos Funcionales y Nutraceuticos realizado por la Universidad Autónoma de Querétaro.

Junio 22-24, 2016, Querétaro, México.

Memorias en libro de resúmenes, página 61.

Ver Anexos Fig. 16

Disponible en línea en: <http://ciafn.uaq.mx/index.php/memorias>

1. RESUMEN

En la actualidad se ha incrementado el consumo de los licores elaborados a partir de frutos silvestres tal es el caso del licor producido a partir del fruto de crucetillo (*Randia monantha*, *Rubiaceae*) que se sabe tiene efectos benéficos contra picaduras de serpientes, problemas inflamatorios, cáncer, dolor y la diabetes. Sin embargo, esta información es empírica, por lo que el objetivo principal de este trabajo de tesis fue evaluar las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes e identificar los compuestos bioactivos de pulpa y semilla seca de los frutos de *R. monantha*. Para lo cual, se realizó la caracterización física del fruto, la caracterización fisicoquímica de pulpa y semilla, así como la evaluación antioxidante e identificación de compuestos fenólicos bioactivos por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución y espectrometría de masas (UPLC-MS) de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de pulpa y semilla seca. Como resultados, se encontró que crucetillo es un fruto ovoide con pulpa de color negro con la característica de presentar 53.60% de semillas del peso total del fruto, la pulpa seca se caracterizó por presentar un alto contenido de vitamina C 491.76 mg ácido ascórbico/g de muestra seca y azúcares reductores 62.10%. En general, el extracto acuoso presentó la mayor actividad antioxidante en los diferentes extractos evaluados (DPPH, ABTS, Poder Reductor, polifenoles totales, IC₅₀ DPPH). Los análisis fitoquímicos permitieron identificar y cuantificar como compuestos mayoritarios a la escopolina, ácido clorogénico, escopoletina, rutina y ácido-4-cumárico, todos ellos presentes en los diferentes extractos. Adicionalmente el aceite extraído de las semillas de *R. monantha* presentó un color amarillo brillante debido al alto contenido de β-caroteno de 224.32 mg/100 g, además este aceite es rico en ácido linoléico 46.60% y excelentes propiedades de calidad que se encuentran dentro de los rangos permitidos por la norma general Codex Stan 19-1981, índice de peróxidos (0.08 ± 0.01 meq O₂/kg de grasa), índice de acidez (1.99 ± 0.03 mg de KOH/ g) e índice de Wijs (112.45 ± 0.72 g/100 g). Los resultados obtenidos indican que este fruto puede tener potencial como nutracéutico y su consumo puede ser benéfico para la salud humana, además de que con la información física y fisicoquímica obtenida se podrían establecer parámetros de calidad para cuando se decida explotar de manera sostenible la producción de esta planta.

Palabras claves: *R. monantha*, actividad antioxidante, compuesto bioactivo.

2. ABSTRACT

Currently the consumption of liquors made from wild fruits is increased, as is the case of liquor produced from the fruit of crucetillo (*Randia monantha*, Rubiaceae) known to have beneficial effects against snake bites, inflammatory problems, cancer, pain and diabetes. However this information is empirical so the main objective of this work was to evaluate the physicochemical and antioxidant properties and to identify the bioactive compounds of pulp and dry seed of the fruits of *R. monantha*. For that, we conducted the physical characterization of the fruit, the physicochemical characterization of pulp and seed, as well as the antioxidant evaluation and identification of bioactive phenolic compounds by ultra-high resolution liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of pulp and seed dry. As a result, it was found that “crucetillo” is an ovoid fruit with black pulp with the characteristic of presenting 53.60% seeds of the total weight of the fruit, the dry pulp was characterized by a high vitamin C content 491.76 mg ascorbic acid/g dry sample and reducing sugars 62.10%. In general, the aqueous extract had the highest antioxidant activity in the different extracts evaluated (DPPH, ABTS, Reducing Power, total polyphenols and IC₅₀ DPPH). Phytochemical analysis allowed the identification and quantification of scopolin, chlorogenic acid, scopoletin, rutin and 4-coumaric acid, all of which were present in the different extracts. In addition, the oil extracted from the seeds of *R. monantha* presented a bright yellow color due to the high content of β -carotene 224.32mg/100 g, also this oil is rich in linoleic acid 46.60%. Along with it, the oil had excellent quality properties that are within the ranges allowed by the general rule Codex Stan, 19-1981, peroxide index (0.08 meq O₂/kg of fat), acid value (1.99 mg KOH/g) and Wijs index (112.45 g/100 g). The results obtained indicate that this fruit may have potential as a nutraceutical and its consumption may be beneficial to human health, also to the physical and physicochemical information obtained, quality parameters could be established when deciding to exploit in a sustainable way the production of this plant.

Key words: *R. monantha*, antioxidant activity, bioactive compound.

3 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) causan la muerte de 40 millones de personas cada año, lo que equivale al 70% de las muertes que se producen en el mundo. De estas defunciones 17.7 millones son ocasionadas por las enfermedades cardiovasculares, seguidas de 8.8 millones por cáncer, 3.9 millones por enfermedades respiratorias y 1.6 millones por diabetes, sumando así un 81% de las muertes ocasionadas por las ENT. Las ENT son un problema de salud pública que cada año requieren de millones de dólares para combatirlas. El uso de medicamentos que además de ser caros tienen efectos secundarios dañinos para quien los consume ha provocado que las personas busquen alternativas para tratar dichas enfermedades, y así poder aumentar su tiempo de vida, como consecuencia de esto ha habido un aumento en el consumo de frutos silvestres en sus diferentes derivados como son los licores. Por otro lado, en México las rubiáceas se encuentran entre las 5 familias de plantas vasculares más diversas con 92 géneros. El género *Randia L.* es muy abundantemente representado en la flora de México, contando con 40 especies entre las que destaca *R. monantha*. En Veracruz *R. monantha* es una de las 140 especies de frutos silvestres comestibles endémicos del estado que comúnmente se conocen como de campo, de monte o cimarronas. El fruto de *R. monantha* es conocido comúnmente como crucetillo en varias localidades del estado donde es consumido en forma de licor, el cual es preparado con aguardiente, para contrarrestar el efecto de mordeduras de animales ponzoñosos como la serpiente nauyaca (*Bothrops asper*), además de otras propiedades medicinales tales como: antidiabéticas, analgésicas, antiinflamatorias y contra el cáncer. Sin embargo, a la fecha existe muy poca información sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, antioxidantes y sobre la identidad de los compuestos bioactivos de éste fruto, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar el fruto y determinar las propiedades antioxidantes y fisicoquímicas de los extractos acuoso, metanólico y etanólico preparados a partir de la pulpa y las semillas de crucetillo.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Rubiaceae*

La familia *Rubiaceae* se estima que incluye aproximadamente 13,100 especies en 611 géneros, con mayor diversidad en zonas tropicales y subtropicales. En México las rubiáceas se encuentran entre las 5 familias de plantas vasculares más diversas con 92 géneros (Martínez *et al.*, 2015). El género *Randia L.* está muy abundantemente representada en la flora de México, contando con 40 especies (Borhidi y Pérez, 2004) entre las que destaca *R. monantha*.

4.3 Descripción

4.3.1 Descripción botánica

R. monantha es un árbol de hasta 6 m o más de alto, generalmente armado con espinas en grupos de 4, posee hojas del mismo tamaño agrupadas en espolones, de forma elíptica a oblanceolada, de 6 a 12 cm de largo y 2 a 5 cm de ancho, delgadas; con flores en las puntas de las ramitas o espolones, solitarias, de 3 a 5 cm de largo, en forma de trompeta (Grupo Mesófilo, 2006). El tronco tiene cáscaras estriadas en pequeñas secciones deleitándose con una corteza interna verde (fotosintética). La estructura puede ser muy similar a la de la vid, a menudo tiene una expansión sobre la vegetación baja. Los frutos son de forma globosa de aproximadamente 4 a 7 cm de diámetro, con unos pequeños 'mechones' del cáliz en su parte superior (Enquist *et al.*, 2001). Tiene una cáscara gruesa y dura, al secarse se torna oscuro, con muchas semillas. Florea de mayo a junio y fructifica enero a marzo (Grupo Mesófilo, 2006).

4.2 Descripción taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rubiales

Familia: *Rubiaceae*



Figura 1. Planta de *R. monantha*.

Género: *Randia*

Epíteto específico: *monantha*

Nombre Científico: *Randia monantha* Benth (Kalacskaa *et al.*, 2004), o *R. subcordata* Stanl (Enquist *et al.*, 2001).

Autor del nombre: Benth (Instituto de Biología, 2010).

4.3.2 Distribución

La especie se encuentra distribuida desde el sur de México a Panamá. Zona pacífica (Grupo Mesofilo, 2006). Área de Conservación Guanacaste de Costa Rica (Kalacskaa *et al.*, 2004), Guatemala, Belice, Nicaragua, Honduras, El Salvador (Tropics.org, 2017.). En México en los estados de Veracruz, Oaxaca, Michoacán y (Suárez *et al.*, 2012). Poco común en Bosques de galería, Bosques húmedos y cañadas. Alrededor de 1500 msnm (Grupo Mesofilo, 2006).

4.3.3 Usos

R. monantha se conoce popularmente como crucetillo, tiene un alto uso en la herbolaria medicinal ya que con su fruto se elabora un licor (ron) que se emplea como antídoto contra las mordeduras de serpientes, escorpiones, avispas y arañas, tanto para seres humanos como para animales domésticos, además, de servir como alimento para pájaros como el loro y la calandria (Suárez *et al.*, 2012).

En un estudio etnobotánico previo sobre la especie relacionada de *R. aculeata* en Jamapa, Veracruz, México, se evaluaron las propiedades cito protectoras contra veneno de *Crotalus simus* y *Bothrops asper* en un modelo *in vivo* en ratas, de extractos de hoja, fruto y tallo y se encontró que los extractos protegen contra la trombocitopenia causada por el veneno de *Brothops asper* y que inhibió parcialmente la necrocrosis en músculos esqueléticos y de miocardio (Gallardo *et al.*, 2012). Así mismo, un estudio de frecuencia de uso en el cual se realizaron encuestas a 100 pobladores de esta comunidad para saber la frecuencia de uso del fruto en diferentes enfermedades arrojó resultados que se muestran en la Figura. 2.

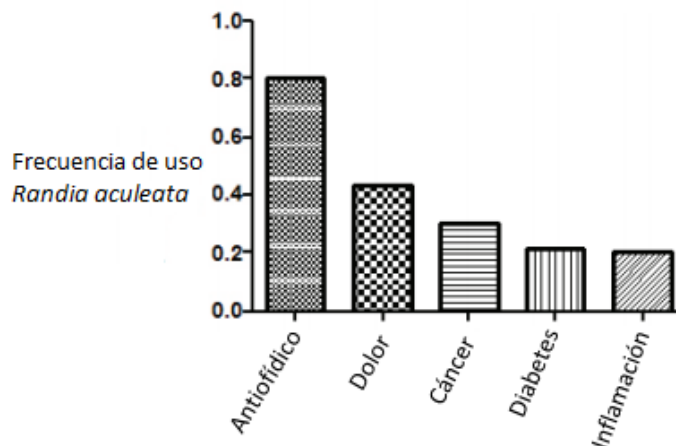


Figura 2. Frecuencia de uso de *Randia aculeata* (Adaptada de Estudio etnobotánico de *Randia aculeata* en Jamapa, Veracruz, México y su efecto en ratas contra veneno de serpientes (Gallardo *et al.*, 2012).

Por otro lado se evaluó la toxicidad de la bebida de *R. monantha* que consumen los lugareños como antídoto, así como de extractos alcohólicos de fruto, hoja y tallo preparados en el laboratorio. Obteniendo como resultados del bioensayo de *Artemia salina* L. un % de mortandad igual a cero y, por tanto, no fue posible obtener un valor de DL₅₀ reportada para esta especie. Los análisis cromatográficos en capa delgada de estos extractos mostraron varias manchas características de compuestos de estructura triterpénicas o esteroidal, así como de glucósidos (Méndez y Hernández, 2009).

4.3.4 Otros estudios realizados en plantas del género *Randia* de relevancia para esta tesis

Las plantas y partes de estas son utilizadas tradicionalmente desde épocas ancestrales sólo basado en conocimiento empírico de diferentes comunidades que ha sido transmitido de generación en generación; es así como se encuentran plantas y partes de estas con usos variados desde el punto de vista gastronómico, industrial y farmacéutico, este conjunto de conocimientos forma parte de lo que hoy se conoce como medicina tradicional y ha contribuido enormemente a las salud humana. Se estima que

cerca del 70% de la población mundial recurre a la medicina tradicional en particular al empleo de plantas para atender sus problemas de salud. Así por ejemplo especies del género *Randia* son ampliamente utilizadas en la herbolaria medicinal ya que poseen diversas actividades farmacológicas, tal es el caso de *R. dumetorum* que es utilizada por algunas tribus de Assam y Maniper del noreste de la India para el tratamiento de enfermedades del hígado (Kandimalla *et al.*, 2016), así como por poseer propiedad antiespasmódica (Ghante *et al.*, 2012); decocciones de *R. nilotica* Stapf se han utilizado en la medicina tradicional de Nigeria para el tratamiento de epilepsia, ansiedad, depresión y psicosis (Danjuma, 2014), *R. echinocarpa* es utilizada contra el cáncer, diabetes, y contra dolores de riñón (Cano-Campos *et al.*, 2011). Algunos estudios biológicos realizados con el género *R.* se describen brevemente a continuación:

Kandimalla *et al.*, (2016), evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de extractos metanólicos de hojas y corteza de *R. dumetorum* exhibiendo una buena actividad antioxidante en el ensayo de captación de radicales libres de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Además determinaron el contenido de polifenoles totales encontrando 112 ± 3.24 mg y 138 ± 2.46 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto y el contenido de flavonoides fue de 2.6 ± 0.26 mg y 3.34 ± 0.31 mg equivalentes de rutina/g extracto de hoja y corteza respectivamente.

Cruz-Silva *et al.*, (2016), evaluaron la actividad antifúngica de extracto de metanol y diferentes fracciones (diclorometano, acetato de etilo y hexano) de hojas de *R. nítida* (Kunth) DC contra hongos fitopatógenos tales como *Collettrichum truncatum* (Andrus & Moore, *Rhizoctanias solani* Kuhn y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, encontrando que las fracciones más eficientes fueron las de acetato de etilo, diclorometano y hexano respectivamente, todos ellos activas a la concentración más alta (160 mg/mL). La tasa más alta de inhibición se observó contra *S. sclerotiorum*, alcanzando el 93.75%. La conclusión de este trabajo fue que todas las fracciones tienen actividad antifúngica sobre los patógenos utilizados, siendo la fracción de hexano la más activa contra *S. sclerotiorum*, y que el efecto observado puede deberse a la presencia de esteroides y triterpenos.

Kandimalla *et al.*, (2016), evaluaron la actividad hepatoprotectora de extractos metanólicos de hojas y corteza de *R. dumetorum* *in vivo* frente a daño hepático inducido

por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas Wistar macho. Obteniéndose como resultado que el pretratamiento con los extractos exhibió protección contra la hepatotoxicidad inducida con CCl₄ mediante la inversión de todos los parámetros anormales a niveles significativos. Lo anterior se pudo observar en los resultados histopatológicos que revelaron que las hojas y corteza de los extractos a 400 mg/kg protegen el hígado del daño inducido por CCl₄. Así pues en este estudio se validó científicamente el uso tradicional de hojas y corteza de *R. dumetorum* para el tratamiento de enfermedades de hígado.

Cuevas-Juárez *et al.*, (2014), realizaron el primer informe sobre melaninas solubles extraídas de *R. echinocarpa* contra actividades inhibitorias antioxidantes sobre α -glucosidasa. Analizaron melaninas solubles impuras y parcialmente purificadas obtenidas a temperatura ambiente y ebullición, les determinaron polifenoles totales, actividad antioxidante, inhibición de α -glucosidasa (α Gi) y características espectroscópicas (UV-Vis e IR). Los resultados obtenidos mostraron un contenido de polifenoles totales de 4.84 y 6.28 mg EAG/g, una actividad antioxidante ABTS de 53.59 y 76.06 μ mol ET/g, FRAP 23.65 y 37.90 μ mol ET/g y una a actividad α Gi IC₅₀ de 14.07 y 10.22 mg/mL respectivamente para melaninas solubles impuras y parcialmente puras. Los análisis sugieren que la solubilidad acuosa de las melaninas obtenidas podría deberse a la presencia de complejos melanina-carbohidratos y que estos pueden utilizarse como ingredientes nutracéuticos para las industrias alimentaria y farmacéutica. Por ejemplo su uso puede impedir el estrés oxidativo y evitar el aumento de la glucosa postprandial, lo que ayuda en la prevención de la diabetes mellitus tipo II.

Ghante *et al.*, (2012), evaluaron actividad broncorelajante, anti-inflamatoria y actividad antioxidante de extractos de metanol y acetato de etilo de *R. dumetorum*. Estos extractos exhibieron un porcentaje de inhibición de 68.75 y 57.39% a una concentración de 1 mg/mL respectivamente. A la misma concentración contra histamina inducida se obtuvo un porcentaje de inhibición de 100 y 78.13% respectivamente. Además los extractos tuvieron un porcentaje de inhibición de 41.62 para RD-ME y 30.36 RD-EA de la inflamación inducida a 200 mg/kg en un modelo de carragenina. En el modelo de albumina exhibió un 48.31 y 33.75% de inhibición respectivamente. Se observó actividad antioxidante en DPPH, poder reductor y quelación de metales.

Noorani *et al.*, (2012), evaluaron el efecto protector de extracto metanólico de frutas de *R. dumetorum* (L.) sobre daño inducido por alcohol en hígado de ratas. Se encontró que la actividad de alanina transferasa sérica (ALT), aspartato amino transferasa (AST), triglicéridos (TG), bilirrubina directa (DB), bilirrubina total (TB) y peroxidación lipídica se incrementó de manera estadísticamente significativa en las ratas administradas con alcohol mientras que la proteína total y glutatión disminuyeron comparado con las ratas control. El tratamiento con *R. dumetorum* disminuyó significativamente los niveles de ALT, AST, TG, DB, TB y peroxidación lipídica comparado con el grupo expuesto solo a alcohol. Así mismo, se disminuyó los niveles de proteína total y redujo glutatión. La histología de los cortes de hígado de las ratas tratadas con *R. dumetorum* mostraron que la hepatotoxicidad causada por alcohol disminuyó, llegando a la conclusión que *R. dumetorum* tiene potencial actividad hepatoprotectora.

4.4 Actividad antioxidante

En las sociedades tradicionales la nutrición y cuidado de la salud están muy relacionados y muchas plantas se han consumido en forma de licor con fines alimenticios y fines medicinales (Pieroni, 2000). Por lo cual, actualmente se ha incrementado el interés por el estudio de estas plantas como fuentes de antioxidantes naturales debido a numerosos estudios epidemiológicos que han demostrado que el consumo de frutas y vegetales está asociado con la reducción del riesgo a desarrollar enfermedades crónicas tales como cáncer, desordenes cardiovasculares y diabetes. Las plantas tienen un potencial enorme como fuente de compuestos con actividad antioxidante que pueden ser utilizados como medicina preventiva y al mismo tiempo logren reemplazar a los antioxidantes sintéticos convencionales como el rojo allura, tartrazina y azul brillante (Dastmalchi *et al.*, 2008; Bozin *et al.*, 2007).

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres (Suwalsky y Avello, 2006). Dichos compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir la oxidación de moléculas y por lo tanto actuar como protectores de moléculas biológicas contra especies reactivas de oxígeno o

radicales libres. Muchos antioxidantes pueden ser sintetizados en el cuerpo (antioxidantes endógenos) como enzimas antioxidantes, glutatión, albumina, transferrina, ácido úrico y bilirrubina; otros se obtienen a través de la dieta mediante el consumo de frutos y sus derivados (vitamina C, compuestos fenólicos).

Los antioxidantes presentes en frutas y verduras protegen al organismo disminuyendo los efectos de ROS (por sus siglas en inglés reactive oxygen species), mediante la prevención del ataque de los radicales libres a las macromoléculas, ya que tienen capacidad preferencial de oxidación. Estos compuestos antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres (primarios) o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres (secundarios).

Los antioxidantes pueden actuar:

- Previendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS (Medina, 2010).

Entre los compuestos que pueden actuar como antioxidantes se encuentran la vitamina C y E, carotenoides, antocianinas, flavonoides, saponinas y otros compuestos fenólicos. Muchos de estos antioxidantes son lipofílicos y particularmente importantes en la oxidación de lípidos en todos los sistemas, así como en otros radicales que son muy activos fisiológicamente. A través de efectos aditivos y de sinergia entre los compuestos con actividad antioxidante presentes en frutas y verduras pueden proporcionar mejor protección contra ROS que un solo compuesto (Correa *et al.*, 2012).

4.4.1 Fenóles

La síntesis y almacenamiento de metabolitos secundarios puede considerarse una estrategia de las plantas para la defensa y la comunicación. Con el fin de defenderse contra herbívoros, plantas y patógenos competidores, las plantas han desarrollado una diversidad de metabolitos secundarios, con una amplia gama de propiedades farmacológicas y toxicológicas, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos (Wink, 2013). Además, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas que desempeñan un papel importante en la determinación de la calidad sensorial y potencial nutracéutico de una planta (Alasalvar *et al.*, 2001). Los compuestos fenólicos están altamente correlacionados con la actividad antioxidante de la planta y por lo tanto se pueden utilizar como las principales determinantes en la evaluación del potencial antioxidante de los alimentos (Chan *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2010). Además de exhibir una amplia gama de propiedades fisiológicas como cardioprotector, anti-cáncer, y las actividades neuroprotectoras. Los compuestos fenólicos son conservadores de alimentos naturales eficaces contra el deterioro oxidativo y la contaminación microbiana (Crozier *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica en fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenilacéticos; ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles; lignanos y neolignanos; 10 grupos de flavonoides; taninos; benzofenonas; xantonas y estilbenos; quinonas y betacianinas, otra clasificación de los polifenoles es de acuerdo a su origen biosintético (Harbone, 1989). Los grupos de mayor importancia para este trabajo se describen brevemente a continuación:

Los ácidos fenólicos son moléculas con un anillo de fenol unido a uno o más grupos hidroxilo, se encuentran en frutas hortalizas y productos derivados de estos. Estos pueden dividirse en dos grandes grupos: derivados de ácidos hidroxibenzoicos y derivados de ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzoicos son componentes de estructuras complejas de taninos y ligninas y son menos abundantes en las plantas consumidas por los seres humanos, sus derivados incluyen ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, vainillina. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos son la clase más grande

de compuestos fenólicos representada por ácido cafeico, *p*-cumárico y ferúlico (Dalbem *et al.*, 2012).

Flavonoides

Más de 4000 flavonoides que fueron identificados y el número sigue creciendo, los flavonoides se pueden clasificar en antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavonoles y flavanoles. Estos son compuestos de bajo peso molecular, que constan de 15 átomos de carbono, dispuestos en una configuración de C6-C3-C6. Esencialmente la estructura consta de dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un puente de 3 carbonos, usualmente en forma de un anillo heterocíclico, C. Las variaciones en los patrones de sustitución del anillo C dan como resultado las principales clases de flavonoides de las cuales flavonas y flavonoles son las que presentan la mayor diversidad estructural. Estas sustituciones pueden incluir la oxigenación, alquilación, glucosilación, acilación y sulfonación (Ignat *et al.*, 2011). Los flavonoides son antioxidantes especialmente importantes debido a su alto potencial redox, que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores de oxígeno singulete. Además de un potencial quelante de metales (Tsao y Yang, 2003).

4.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

La identificación y cuantificación de los componentes fenólicos de la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día se desarrollen más las técnicas que se utilizan para este fin. Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Entre los diferentes métodos disponibles, HPLC es el preferido para la separación y cuantificación de los fenoles en frutos. Las condiciones cromatográficas de los métodos de HPLC incluyen el uso de una columna, casi exclusivamente, una fase reversa C18; arreglo de diodos UV-Vis y un sistema de disolventes binario que contiene agua acidificada (solvente A) y un disolvente orgánico polar (solvente B). La fase inversa se ha convertido en una herramienta analítica dominante para la separación y determinación de polifenoles con diferentes sistemas de

detección, tales como detector de arreglo de diodos (DAD), masas y espectrofotometría de masas en tándem (Ignat *et al.*, 2011).

4.4.3 Determinación de actividad antioxidante.

En la actualidad existe un gran número ensayos desarrollados para determinar actividad antioxidante total. Sin embargo, estos a menudo son adaptados para su utilización, esto hace que no sea aceptada una sola prueba para la evaluación de la actividad antioxidante. Por lo cual es necesario utilizar diferentes metodologías para determinar dicha actividad, entre los más utilizados se encuentran porcentaje de inhibición del radical DPPH (DPPH), reducción del complejo férrico-tripiridiltriazina a la forma ferrosa-tripiridiltriazina (FRAP), captación del radical ABTS (ABTS) y poder reductor debido a que son reproducibles y fáciles de realizar, en el Cuadro 1 se describen los fundamentos de dichas pruebas.

Cuadro 1. Ensayos utilizados en esta tesis para determinar actividad antioxidante.

Prueba	Radical u oxidante	Medida principal	Equipo	Fundamento
DPPH	DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	Absorbancia	Microplaca / lector de microplaca	DPPH es un radical estable de color purpura que al reaccionar con electrones o átomos de hidrógeno produce la pérdida del color, esta pérdida de color puede ser medida a 517 nm (Schaich <i>et al.</i> , 2015). DPPH se utiliza para evaluar el efecto antioxidante de compuestos o extractos específicos, (Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995).

Cuadro 1. Ensayos utilizados en esta tesis para determinar actividad antioxidante (continuación).

FRAP	Fe ³⁺	Absorbancia	Microplaca / lector de microplaca	La reducción del complejo férrico-tripiridiltriazina a la forma ferrosa-tripiridiltriazina a un pH bajo da un color azul intenso con absorbancia máxima a 593 nm (Benzie y Strain, 1996).
ABTS	ABTS ^{•+} (2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico))	Absorbancia	Microplaca / lector de microplaca	El ensayo ABTS [ácido-2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónica)] mide la capacidad relativa de los antioxidantes para captar el radical ABTS ^{•+} generado en fase acuosa, en comparación con un estándar de TROLOX (soluble en agua, análogo de la vitamina E), este radical se genera por reacción con un oxidante fuerte (por ejemplo, permanganato de potasio o persulfato de potasio) con la sal de ABTS. La reducción de radicales azul-verde ABTS por donación de hidrógenos se mide por la supresión de su espectro de absorción de onda larga característica (Awika <i>et al.</i> , 2003) entre 400 y 750 nm (Arnao <i>et al.</i> , 2001).

Cuadro 1. Ensayos utilizados en esta tesis para determinar actividad antioxidante (continuación).

Fenóles totales	Reactivo Folin-Ciocalteu	Absorbancia	Microplaca / lector de microplaca	Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Esta reacción es característica para compuestos que tienen un grupo hidroxilo unido a un benceno. La intensidad del color se mide a 765 nm y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (Morillas-Ruiz y Delgado-Alarcón, 2012; Folin Ciocalteu, 1927).
-----------------	--------------------------	-------------	-----------------------------------	---

Obtenido de: Methods of measurements and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) (Apak *et al.*, 2013).

4.5. Parámetros de calidad en aceites

Los aceites vegetales comestibles constituyen un componente importante en nuestra alimentación, cuya variedad y consumo depende de la disponibilidad de la materia prima en cada país y región. No obstante la variedad de especies oleaginosas y el mayor consumo está representado por los aceites de palma, soja, colza y girasol. Actualmente, es reconocido el aporte de los lípidos a la salud y bienestar, lo cual está determinado fundamentalmente por su composición. Así, se ha demostrado que tanto el perfil de ácidos grasos, especialmente los niveles relativos de ácidos grasos ω -9, ω -6 y ω -3, así como la presencia de algunos componentes minoritarios, pueden ejercer una influencia positiva en las funciones fisiológicas de nuestro organismo. En los últimos años, se ha registrado un incremento en la búsqueda de fuentes vegetales subutilizadas, a partir de las cuales puedan obtenerse aceites con una elevada proporción de ácidos grasos de alto valor nutricional. Para lograr esto es necesario estudiar las propiedades fisicoquímicas, el comportamiento térmico y composición de un aceite. Esto se logra mediante la evaluación de distintos parámetros como son índice de peróxidos, índice de Wijs, índice de saponificación, índice de acidez, coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} y perfil de ácidos grasos. A continuación se describen brevemente los fundamentos de las pruebas realizadas en esta tesis, de acuerdo al Codex Alimentarius, en su norma general para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales (Codex Stan, 19-1981).

Índice de peróxido: El índice de peróxido en una grasa es una medida de su contenido de oxígeno reactivo, expresada en términos de miliequivalentes de oxígeno por 100 g de grasa. El método volumétrico se basa en la reacción del yoduro de potasio en solución ácida con el oxígeno seguida por la titulación del yodo liberado con tiosulfato de sodio. La cantidad de yodo tiene correlación con el grado de oxidación ya experimentado por la grasa y su tendencia probable a la rancidez oxidativa subsecuente (Mehlenbacher, 1970).

Índice de acidez y ácidos grasos libres: Estas determinaciones indican la condición y comestibilidad de las grasa, ya que la rancidez va acompañada de la formación de ácidos grasos libres dando lugar a reacciones de deterioro, produciendo compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables y que reducen el valor alimenticio.

Se basan en la neutralización de los ácidos grasos libres contenidos en la muestra, con una base fuerte. El índice de acidez se define como el número de mg de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar un gramo de grasa (Less, 1994; Hart y Fisher, 1991).

Índice de Wijs: enlaces aislados, se basa en la absorción del halógeno bajo condiciones elegidas, para provocar resultados estequiométricos. El índice de Wijs define como la cantidad de yodo en gramos que puede ser fijada por 100 g de grasa o aceite. El valor obtenido es una medida del grado de insaturación de los ácidos grasos de una grasa o aceite. El procedimiento general implica la adición de un exceso de halógeno a la muestra, reducción de este exceso con yoduro de potasio, y por último, valoración con solución estándar de tiosulfato de sodio empleando almidón como indicador (Potter, 1995; Egan, 1993; Davidsohn y Henry, 1990; Woods 1977 y Ayres, 1970; Dutcher *et al.*, 1954).

Índice de saponificación: Esta determinación es importante ya que el peso molecular medio de los ácidos grasos en una grasa es expresado por este índice, el cual influye en la dureza y las propiedades de sabor y olor en la grasa. El peso molecular de los ácidos grasos se expresa por el índice de saponificación. El índice de saponificación se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos provenientes de hidrólisis de 1 g de grasa o aceite. Los ésteres de los ácidos grasos de bajo peso molecular requieren de más álcali para la saponificación, así el índice de saponificación es inversamente proporcional al peso molecular promedio de los ácidos grasos presentes en la grasa. El método se basa en que los ácidos grasos son monobásicos, por tanto cada molécula de ácido se une con un solo átomo de potasio para formar el jabón correspondiente (Less, 1994; Egan *et al.*, 1993; Hart y Fisher, 1991; Horwitz, 1980; Meloan y Pomeranzs 1978 y Mehlenbacher, 1970).

Coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} : Dichos coeficientes ayudan al estudio de la estabilidad termooxidativa de los aceites y por tanto de su calidad, es decir, estos coeficientes nos permiten conocer el grado de alteración sufrido por el aceite durante el proceso al que ha sido sometido (extracción y/o refinación). Esto se debe a que los compuestos de oxidación primarios (peróxidos e hidroperóxidos), formados durante la oxidación del aceite, absorben a 232 nm, mientras que los productos de oxidación

secundaria (aldehídos, cetonas, ácidos y otros) lo hacen a las longitudes de onda más altas (270 nm). Por otro lado, los dienos y trienos conjugados formados durante el refinó del aceite, también absorben a 270 nm (Paz y Molero, 2000).

4.5.1 Ácidos grasos en aceites y grasas

Los ácidos grasos más abundantes presentan cadenas hidrocarbonadas lineales con un número par de átomos de carbono (Cuadro 2). Existe un amplio espectro de longitudes de cadena, que varían entre un ácido graso de la leche con cuatro átomos de carbono, y los ácidos grasos de algunos aceites de pescado, con 30 átomos de carbono. Son frecuentes los ácidos grasos con 18 átomos de carbono. Los dobles enlaces situados en la cadena de carbonos o los sustituyentes de la misma se designan químicamente asignando al carbono del grupo carboxilo la posición 1. Así, los dobles enlaces del ácido linoléico le proporcionan el nombre químico sistemático de ácido 9,12-octadecadienoico. Una abreviatura taquigráfica para designar el ácido linoléico sería 18:2 (18 átomos de carbono: dos dobles enlaces). Su último doble enlace se encuentra a seis átomos de carbono del metilo terminal, siendo una característica importante para algunas enzimas. Este ácido se considera un ácido graso n-6 o w-6. En este informe se utilizará la nomenclatura n-6 (FAO/OMS, 1997).

El análisis de ácidos grasos procedentes de muestras biológicas o alimentos implica generalmente la consecución de tres pasos: extracción de lípidos, conversión de los lípidos extraídos a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) y análisis de los EMAG mediante cromatografía de gas (CG) para la determinación del perfil de los ácidos grasos. En la actualidad existen métodos muy buenos para la extracción de grasas y aceites. Los procedimientos de extracción simple mediante disolventes orgánicos no polares pueden emplearse para muestras ricas en triglicéridos. Se suelen preparar los EMAG mediante transesterificación con ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o trifluoruro de boro en metanol. Sin embargo, los reactivos de la metilación ácida no deberían utilizarse en mezclas que contengan isómeros del ácido linoléico conjugado (ALC). En estos casos se recomienda utilizar la metilación con metóxido de sodio (Christie, 2008; Christie 2003; Bligh y Dayer, 1959).

Cuadro 2. Nombre común (vulgar), el nombre químico sistemático y la abreviatura de ácidos grasos más abundantes en grasas y aceites (FAO/OMS, 1997).

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Familia de ácido graso
Cáprico	decanoico	10:0	
Láurico	dodecanoico	12:0	
Mirístico	tetradecanoico	14:0	
Palmítico	hexadecanoico	16:0	
Esteárico	octadecanoico	18:0	
Araquídico	eicosanoico	20:0	
Behénico	docosanoico	22:0	
Lignocérico	tetracosanoico	24:0	
Palmitoleico	9-hexadecenoico	16:1	n-7
Oleico	9-octadecenoico	18:1	n-9
Gadoleico	11-eicosaenoico	20:1	n-9
Cetoleico	11-docasaenoico	22:1	n-11
Erúcido	13-docasaenoico	22:1	n-9
Nervónico	15-tetracosanoico	24:1	n-9
Linoleico	9,12-octadecadienoico	18:2	n-6
α -linolénico	9,12,15-octadecatrienoico	18:3	n-3
γ -linolénico	6,9,12-octadecatrienoico	18:3	n-6
Dihomo- γ -linolénico	8,11,14-eicosatrienoico	20:3	n-6
	5,8,11-eicosatrienoico	20:3	n-9
Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4	n-6
AEP	5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5	n-3
adrénico	7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4	n-6
	7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5	n-3
ADP	4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5	n-6
ADH	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6	n-3

El análisis del perfil de los ácidos grasos se realiza mucho mejor si se utilizan CG con un detector de ionización de llama (DIL). Para los análisis de mezclas de EMAG que no contienen ácidos grasos *trans* se recomiendan columnas capilares ligadas y polares de 30 m x 0.32 (o 0.25 mm) preparadas por Carbowax-20m. Para el análisis de muestras que contienen isómeros *cis* y *trans* se recomiendan columnas para extracción por fluidos supercríticos de 100 m recubiertas con fases estacionarias de cianopolisiloxano muy polar (Ackman, 2008b).

4.6 Actividad antimicrobiana

La mayoría de las especies vegetales poseen propiedades bactericidas, insecticidas y fungicidas. Estas propiedades se explican por la presencia de metabolitos secundarios tales como taninos, terpenoides, alcaloides y fenoles (Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

Los métodos de detección disponibles para la detección de la actividad antimicrobiana de los productos naturales se dividen en tres grupos, incluyendo bioautografía, difusión y los métodos de dilución (Vanden y Vlietinck, 1991). Un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Sawai y Maekawa, 2002). En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Stella y Marin, 2009).

Cuadro 3. Métodos para el estudio de la susceptibilidad microbiana (Stella y Marin, 2009).

Método	Categoría	CMI (g/mL)
Difusión en agar (discos)	S, I, R	No
Dilución en agar	S, I, R	Si
Dilución en caldo	S, I, R	Si
Métodos automatizados	S, I, R	Si
E-test	S, I, R	Si

Abreviaciones: S, susceptibilidad; I, Intermedio; R, Resistente; CIM, concentración inhibitoria mínima.

Uno de los métodos más utilizados en la actualidad es el método de microdilución en caldo por ser un método fácil de realizar y reproducible. A continuación se describe brevemente. El método de microdilución en caldo es un método útil para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un gran número de muestras. CMI se define como la mínima concentración de agentes antimicrobianos (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas a 37 °C (Horna, Q. G.; Silva D. M.; Vicente T. W y Tamariz O. J., 2005)

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se ha incrementado el consumo de productos elaborados a base de frutos endémicos comestibles silvestres para prevenir y tratar enfermedades, tal es el caso de los licores producidos a partir del fruto de *R. monantha* que tienen efectos benéficos contra diversos problemas de salud como son las mordeduras de serpientes, así como problemas inflamatorios, dolor, cáncer y la diabetes, sin embargo, esta información es empírica que se ha heredado de generación en generación en las diversas comunidades que los utilizan. Por lo cual es necesario identificar los principios activos en la planta que le proporcionan los beneficios para poder difundir información verídica con base en pruebas científicas que corroboren sus efectos. De tal manera que este trabajo tiene como objetivo realizar una caracterización completa del fruto de *R. monantha* y determinar la actividad antioxidante e identificar y cuantificar los compuestos fenólicos activos presentes en los extractos acuoso, etanólico y metanólico.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar las propiedades fisicoquímicas, químicas y antioxidantes de extractos crudos obtenidos a partir de pulpa y semilla de *R. monantha*.

6.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar físicamente el fruto completo de *R. monantha*.
- ✓ Determinar las propiedades fisicoquímicas de la pulpa y semilla seca de *R. monantha*.
- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa y semilla seca de *R. monantha*.
- ✓ Identificar mediante métodos cromatográficos los compuestos fenólicos bioactivos presentes en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa y semilla de *R. monantha*.
- ✓ Determinar las propiedades fisicoquímicas del aceite de la semilla de *R. monantha*.

7. HIPÓTESIS

Los extractos crudos preparados a partir del fruto de crucetillo (*R. monantha*) poseerán una actividad antioxidante significativa debido a la presencia de compuestos fenólicos de importancia medicinal.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Reactivos

- Acetato de sodio marca Reproquifin
- Acetato de zinc marca Reproquifin
- Ácido clorhídrico marca Reproquifin
- Ácido gálico marca Sigma-Aldrich®
- Ácido sulfúrico marca Sigma 1410
- Ácido tricloroacético marca Merck
- Buffer pH 4 marca Hycel 2206
- Buffer pH 7 marca Golden Bell 50120
- Carbonato de sodio marca JTBaker 3506
- Cloruro de potasio marca JTBaker 3040
- Cloruro férrico marca Técnica química C1450
- DPPH marca Sigma D9132-1G
- Etanol marca Reproquifin
- Fenoltaleína marca JTBaker
- Ferrocianuro de potasio marca Técnica química F1126
- Folin-Ciocalteu marca Sigma
- Hidróxido de sodio marca Reproquifin R-104
- Metanol marca High purity HA1760
- Sacarosa marca Meyer
- Sulfato de cobre pentahidratado marca Reproquifin
- Sulfato de sodio anhidro marca Técnica química
- Tartrato de sodio y potasio marca Reproquifin
- ABTS marca Sigma-Aldrich®
- Feling A marca Sigma-Aldrich®
- Feling B marca Sigma-Aldrich®
- (+) catequina marca Sigma-Aldrich®
- Ácido 4-hidroxibenzoico marca Extrasynthese®
- Ácido cafeico marca Extrasynthese®

- Ácido gálico donado por el doctor
- Ácido ferúlico marca Extrasynthese®
- Ácido *trans*-cinámico marca Extrasynthese®
- Ácido vainillínico marca Extrasynthese®
- Escopoletina marca Extrasynthese®
- Kaempferol-3-O-glucósido marca Extrasynthese®
- Quercetin-3-glucósido marca Fluka®
- Quercetina marca Sigma-Aldrich®
- Rutina marca Sigma-Aldrich®
- Vainillina marca Extrasynthese®
- Umbeliferona marca Extrasynthese®
- Escopolina aislada en el laboratorio de Química de Productos Naturales
- Ácido clorogénico marca Extrasynthese®
- (-)-epicatequina marca Sigma-Aldrich®
- Mangiferina marca Extrasynthese®
- Ácido-4-cumárico Extrasynthese®
- Quercetina 3,4-di-O-glucósido Extrasynthese®
- Quercetina 3-D-galactosido marca Sigma-Aldrich®
- Luteolina 7-O-glucósido marca Extrasynthese®
- Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico
- Trans-resveratrol marca Sigma-Aldrich®
- Cirsimarina donación Centro de Investigaciones Científica de Yucatán (CICY)
- Luteolina marca Extrasynthese®
- Angelicina marca Sigma-Aldrich®
- Apigenina marca Extrasynthese®
- Kaempferida marca Extrasynthese®
- Piperina marca Sigma-Aldrich®

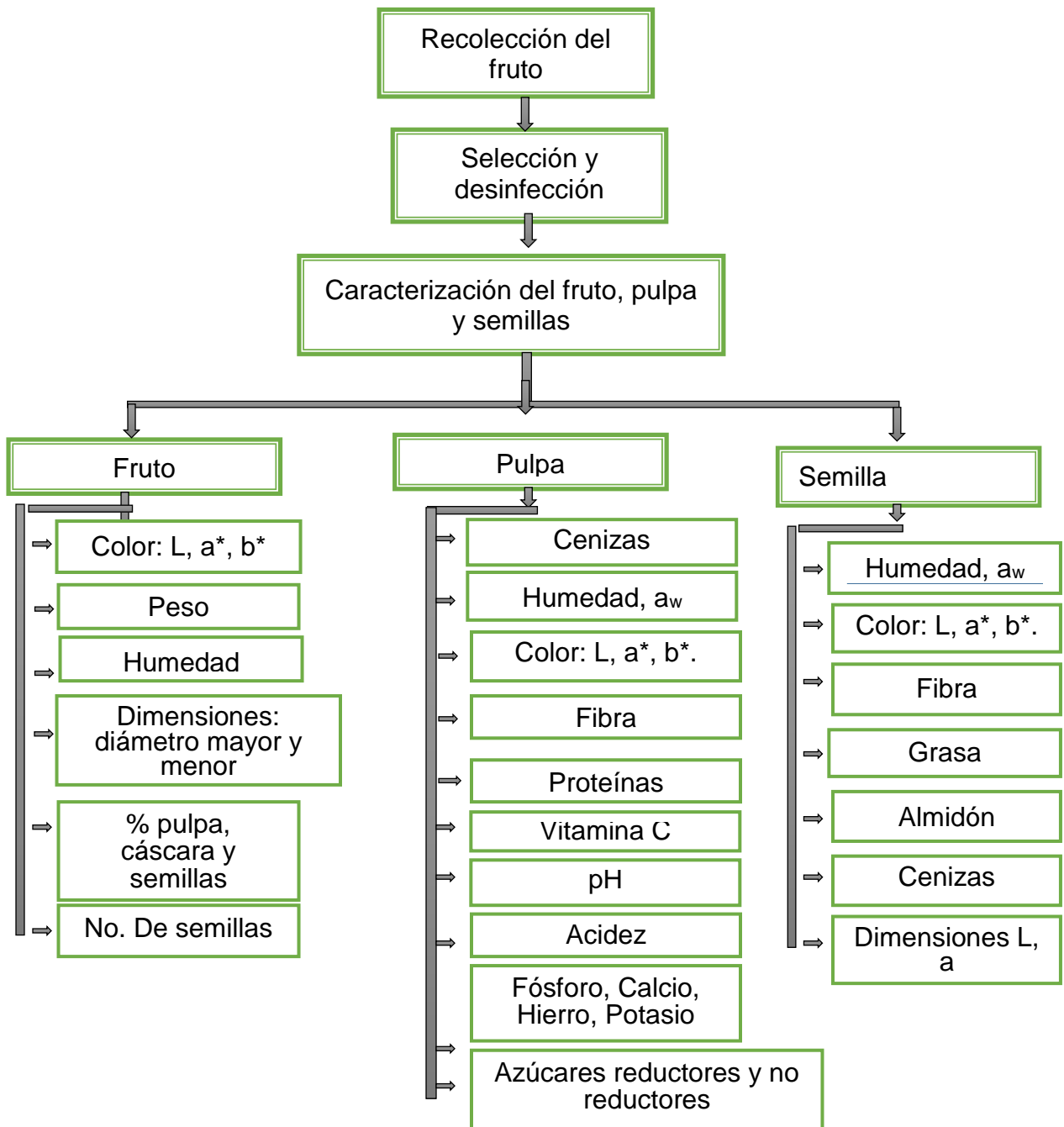
8.2 Equipo

- Rota vapor marca HAHNVAPOR, HAHNSHIN SCIENTIFIC CO, modelo HS-2000NS
- Vernier digital marca Fowler, modelo IP54
- Balanza analítica marca VELAB modelo LA 204
- Colorímetro Color Flex V1-72SNHCX 1115 s/n: Cx1115 Hunter Lab
- Estufa de vacío marca Shel LAB Modelo 1410, Estados Unidos
- Potenciómetro marca HANNA Instrumets
- Mufla Felisa, Modelo FE-340, México
- Microplaca marca Multiskan FC modelo IVD
- Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Alta Resolución (modelo 1290 infinity, marca Agilent) acoplado a un espectrofotómetro de masas de triple cuádrupolo (Modelo 6460, marca Agilent)
- Espectrofotómetro UV marca JENWAY, modelo 6305, Japón
- Viscosímetro Analógico Brookfield modelo RVT, Estados Unidos.
- Vortex Genie 2, Scientific Industries modelo G560, Estados Unidos.
- Pipeta automática de 1 mL, Finlandia
- Parrilla eléctrica de agitación con calentamiento, MIDSCI, SH-1500, E.U.A.
- Baño Oakton, modelo 12501-00, Vernon Hills, E.U.A.

8.3 Métodos generales

8.3.1 Diagrama de trabajo. Análisis del fruto completo, pulpa y semilla de *R. monantha*.

Este trabajo se dividió en 3 etapas. En la primera se realizó la recolección del fruto. Después se realizó la caracterización física del fruto. Por último, se procedió a obtener cada una de las partes y se realizó la caracterización fisicoquímica de la semilla y la pulpa. Las pruebas empleadas para esto se muestran en el siguiente diagrama.



8.4 Muestra

Se utilizó un lote de 100 frutos (5.73 kg) seleccionados al azar con un índice de madurez de 26.60. Estos fueron recolectados en el periodo enero-marzo 2016 en la localidad de Actopan, Veracruz ubicada en las coordenadas latitud: 19.5, longitud: -96.617 19° 30' 0" norte, 96° 37' 1" oeste. Se lavaron y desinfectaron (hipoclorito de sodio 0.01%) para proceder a obtener cada una de las partes del fruto, obteniendo 3.00 kg semilla, 1.61 kg cáscara y 1.04 kg pulpa. Un ejemplar de referencia, con No. de ejemplar de herbario: NJuárezT2 (XAL), se depositó en el herbario de Xalapa (XAL) del Instituto de Ecología A. C. ubicado en el campus 3, edificio B de esta institución.

Los extractos acuoso, etanólico y metanólico se obtuvieron mediante extracción acelerada con disolventes en un sistema Dionex ASE 350 Estados Unidos. Para la preparación de los extractos se pesaron 3 g de muestra y un gramo de tierra de diatomeas, que posteriormente fueron colocados en una celda de extracción para finalmente proceder a extraer con los diferentes solventes.

8.4 Caracterización física del fruto de *R. monantha*.

8.4.1 Determinación de las dimensiones, peso y número de semillas

Se tomó la medida de 30 frutos en sus dos ejes principales diámetro mayor (cm) y diámetro menor (cm), se utilizó un Vernier (marca Fowler, modelo IP54), (Zozio *et al.*, 2014). Cada uno de los 30 frutos se pesó en una balanza analítica (marca VELAB, modelo LA 204), a continuación se calculó su peso promedio (Zhou *et al.*, 2016). Por último, se les determinó el número de semillas y se calculó el promedio de las mismas (Yuan, 2000).

8.4.2 Determinación de color

Para la determinación de color se utilizó un colorímetro (Color Flex V1-72SNHCX 1115 s/n: Cx1115 Hunter Lab, Estados Unidos) que provee valores CIE L*, a*, b*. Los valores L*, a*, b* obtenidos fueron utilizados para calcular el ángulo de matiz utilizando la Ecuación. (1) (Tiwari, 2008).

$$\text{Ángulo matiz} = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

La cromaticidad o saturación indica la pureza de un color y se calculó con la Ecuación (2).

$$\text{Saturación} = (\sqrt{a^{*2} + b^{*2}}) \quad (2)$$

8.4.3 Determinación del porcentaje de humedad

La determinación del porcentaje de humedad se realizó pesando en una charola de aluminio previamente tarada 1 g de muestra, se colocó la charola en una estufa (Shel LAB Modelo 1410, Estados Unidos) manteniendo una temperatura de 45 °C durante 24 horas, comenzando las veinticuatro horas cuando se alcanzó la temperatura deseada, una vez transcurrido el tiempo se transfirió la charola al desecador para reducir la temperatura hasta alcanzar temperatura ambiente (aproximadamente 20 minutos). Una vez alcanzada esta temperatura se pesó la muestra en una balanza analítica. Se volvió a colocar la muestra en la estufa durante 30 minutos, al terminar el tiempo se enfrió y peso nuevamente, este proceso se realizó hasta obtener peso constante. El contenido de humedad se calculó con la Ecuación (3) (Lees, 1994).

$$\% \text{ de humedad} = (M1 - M2 * 100)/M \quad (3)$$

Dónde: M1= Peso del crisol más muestra húmeda, M2= Peso del crisol más muestra seca, M= peso de la muestra

8.4.4 Determinación de índice de redondez

El índice de redondez (IR) se obtuvo proyectando sobre papel milimétrico las secciones longitudinal y transversal del fruto y calculando el área del fruto de *R. monantha* con respecto al círculo circunscrito (Mohsenin, 1978) (Ec.4)

$$\text{IR} = \text{Área del fruto} / \text{Área del círculo circunscrito} \quad (4)$$

Área del círculo circunscrito = $\pi * a^2 / 4$

8.5 Caracterización física de las semillas del fruto de *R. monantha*.

8.5.1 Determinación de las dimensiones, peso y color

Se tomó la medida de 100 semillas en sus dos ejes principales Longitud (L, mm) y Ancho (a, mm), se utilizó un Vernier (marca Fowler, modelo IP54). Posteriormente a cada una de las semillas se pesaron en una balanza analítica (marca VELAB, modelo LA 204), después se calculó su peso promedio. Por último, se les determinó color mediante la metodología del apartado 7.4.2 Determinación de color.

8.5.2 Determinación del contenido de grasa cruda

La determinación del contenido de grasa se realizó mediante extracción continua vía Soxhelt. Para esto se colocó 1 g de muestra libre de humedad en un cartucho de extracción, se montó el equipo Soxhelt, utilizando 100 mL de hexano como disolvente, se dejó reflujar durante 6 horas para extraer la grasa. Transcurrido el tiempo se eliminó el hexano colocando el matraz en un rotavapor, la grasa obtenida se introdujo en estufa de vacío a 100 °C hasta peso constante (AOAC, 1995).

Se calculó el porcentaje de grasa cruda con la Ecuación (5).

$$\% \text{ de grasa cruda} = ((M1 - M2)/M) * 100 \quad (5)$$

Dónde: M1= peso del matraz con grasa, M2= peso del matraz, M= peso de la muestra

8.5.3 Determinación del contenido de almidón

La determinación del contenido de almidón se realizó mediante el método de hidrólisis ácida. Para lo cual se tomó 1 g de muestra a la cual se le agregaron 10 mL de agua fría durante 30 minutos, posteriormente se transfirió a un filtro y se lavó con 50 mL de agua fría. El residuo insoluble del filtró se transfirió a un matraz que contenía 40 mL de agua y 4 mL de HCl concentrado y se puso a reflujo durante 2 h. Se enfrió y neutralizó con NaOH al 40%. Se transfirió a un matraz y aforó a 100 mL, se filtró y se determinó azúcares reductores por el método de Lane-Eynon (Lees, R. 1994).

$$\% \text{ de almidón} = \frac{F \times A \times 0.90 \times 100}{V \times M} \quad (6)$$

F=Factor de Fehling, A =Aforos (100 mL), V=Volumen de muestra gastado, M=Peso de la muestra en miligramos, Factor para convertir glucosa en almidón.

8.5.4 Determinación del contenido de proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó mediante el método de Biuret. Se pesó 1 g de muestra homogénea, se añadieron 20 mL de agua y se mezcló. Posteriormente se añadieron 9.5 mL de sulfato de sodio al 26.6%, se mezcló, aforó a 50 mL y se dejó reposar durante 10 minutos. Se tomaron 2 mL y se les agregaron 8 mL de reactivo de Biuret, se mezcló por inversión y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y cubierta de la luz. Por último se midió la absorbancia a 540 nm. Se realizó una curva estándar utilizando albumina como estándar (Meloan y Pomeranzs, 1978; Lynch, 1987).

8.5.6 Determinación del contenido de cenizas

La determinación del contenido de cenizas se realizó mediante el método de calcinación directa. Para esto se pesó 1 g de muestra en un crisol previamente tarado para proceder a calcinar en mechero hasta ya no observar desprendimiento de humo. Posteriormente se llevó el crisol a una mufla (Felisa, Modelo FE-340, México) a 500 °C durante 1 hora o hasta observar cenizas blancas o grises, finalmente se enfrió en desecador a temperatura ambiente y se pesó. El porcentaje de cenizas se calculó con la Ecuación 7 (Hart y Fisher, 1991).

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{W} \quad (7)$$

Dónde: W_2 = Peso del crisol más muestra calcinada, W_1 =Peso del crisol, W = Peso de la muestra.

8.5.7 Determinación del contenido de fibra

Se pesaron 0.5 g de muestra que se transfirieron aun matraz balón fondo plano para poder realizar la digestión con 50 mL de ácido sulfúrico al 1.25% durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se filtró a través de un embudo buchanner realizando 3 lavados con 25 mL de agua hirviendo. Posteriormente se transvaso el residuo del papel filtro al matraz para reflujar durante 30 minutos con 50 mL de hidróxido de sodio al 1.25 % despues se procedió a filtrar realizando un lavado con ácido sulfúrico, tres lavados con 10 mL de agua destilada y 1 lavado con 10 mL de etanol. Se transfirió el residuo a un crisol de peso conocido para secarlo durante 2 horas a 130 °C, se enfrió en desecador y se tomó el peso del crisol. Se carbonizó la muestra en mechero, por último se calcinó por 30 minutos a 600 °C en una mufla (Felisa, Modelo FE-340 México), se dejó enfriar en un desecador y se tomó el peso (AOAC, 1990).

El porcentaje de fibra se determinó con la Ecuación (8).

$$\% \text{ de fibra} = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M} \quad (8)$$

Donde M es peso de la muestra, M1 es peso de la muestra seca y M2 peso de las cenizas.

8.6 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de la pulpa del fruto de *R. monantha*.

8.6.1. Determinación de color e índice de oscurecimiento (IO)

Se determinó color mediante la metodología del apartado 7.4.3 Determinación de color, posteriormente se determinó el índice de oscurecimiento de acuerdo a la Ecuación. (9) (Buera *et al.*, 1986).

$$IO = ((X - 0.31)/0.172) * 100 \quad \text{Ecuación (9)}$$

Donde:

$$x = \frac{x}{x + y + z} \quad \text{Ecuación (10)}$$

8.6.2 Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó mediante el método de Kirk, *et al.* (1996) con algunas modificaciones. Se determinó el factor mediante una titulación indirecta en la cual se agregó a un matraz Erlenmeyer 1 mL de reactivo de Fehling A, 1 mL de reactivo de Fehling B y 50 mL de agua destilada, posteriormente se agregó sacarosa invertida a una bureta para proceder a titular. Se midió el volumen gastado de sacarosa invertida y se obtuvo el factor.

Se tomó 1 g de pulpa de *R. monantha* que fue macerado en un mortero con un pistilo, una vez hecho esto se agregaron 50 mL de agua destilada y se homogeneizó perfectamente para así poder aforar a 100 mL con agua caliente, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se procedió a titular colocando en la bureta un volumen suficiente de muestra, en un matraz Erlenmeyer. Se agregó 1 mL de reactivo de Fehling A, 1 mL de reactivo de Fehling B y 50 mL de agua destilada, esta mezcla se llevó a fuego hasta ebullición, se agregó 1 mL de azul de metileno para titular. Se midió el volumen de muestra gastado y se calculó azúcares reductores mediante la Ecuación (11).

$$\% \text{ de reductores directos} = (100 * 100 * F)/(V * M) \quad (11)$$

Dónde: F: Factor de Fehling, V: mL gastados de la muestra, M: peso de la muestra en mg.

$$\% \text{ de reductores totales} = \frac{(100 \times 100 \times 100 \times F)}{(V \times a \times M)} \quad (12)$$

Dónde: a= alícuota (50 mL)

$$\% \text{ de reductores no directos} = \% \text{ de reductores totales} - \% \text{ de reductores directos} \quad (13).$$

8.6.3 Determinación de pH

Se realizó una mezcla homogénea con 1 g de muestra y 10 mL de agua destilada, se filtró y finalmente se midió el pH sumergiendo el electrodo del potenciómetro (HI 9811-5 HANNA Instrumets, USA). La prueba se realizó por triplicado a temperatura de 25 °C (AOAC 1990).

8.6.4 Determinación de acidez titulable

Para determinar acidez se pesó 1 g de muestra y se agregaron 20 mL de agua fría y hervida, se filtró y se agregaron 3 gotas de indicador de fenolftaleína, para proceder a titular con hidróxido de sodio 0.01 N hasta el cambio de vire a rosa ligero que perduro por 30 segundos. Se tomó el volumen gastado y se calculó la acidez mediante la Ecuación (14). Se realizó por triplicado (Hart y Fisher, 1991).

$$\% \text{ Acidez} = (N \times V \times 100 \times \text{meq})/M \quad (14)$$

Dónde: N= Normalidad, V= Volumen gastado, meq= 0.0067 miliequivalentes de ácido málico, M= peso de la muestra.

8.6.5 Determinación de grasa cruda, proteínas, fibra, cenizas y humedad

La determinación del contenido de grasa cruda se realizó mediante el método oficial vía Soxhlet, ver sección 8.5.2 Determinación del contenido de grasa cruda. Así mismo, la determinación del contenido de proteínas se realizó mediante el método de Biuret, ver apartado 8.5.4 Determinación del contenido de proteínas. La determinación del contenido de cenizas se realizó mediante calcinación directa ver apartado 8.5.6 Determinación del contenido de cenizas. Por último, la determinación del contenido de humedad se realizó mediante la metodología del apartado 8.4.3 Determinación del porcentaje de humedad.

8.6.6 Determinación del contenido de calcio

La determinación del contenido de calcio se realizó mediante el método por titulación con permanganato de potasio. Para esto se incineró 1 g de muestra hasta obtener cenizas grises, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico y evaporó a sequedad. Se calentó con 5 mL de ácido clorhídrico 1 N posteriormente se filtró en un matraz de 25 mL y se aforó con ácido clorhídrico 1 N, se tomaron 20 mL del filtrado para agregar 2 mL de solución de oxalato de amonio al 5% y unas gotas de indicador rojo de metilo, se alcalinizó con amoniaco concentrado y se adicionó ácido acético glacial hasta coloración rosa (pH 5). Se reposó y centrifugó para poder decantar el sobrenadante líquido. Se lavó 2 veces

con 2 mL de amoníaco diluido en ácido sulfúrico centrifugando en cada lavado, en la decantación final se adicionaron 2 mL de ácido sulfúrico diluido, se dispersó el precipitado y calentó a 85 °C para finalmente titular con permanganato de potasio 0.05 N. El porcentaje de calcio se obtuvo con la Ecuación (15).

1 mL de permanganato de potasio 1N = 0.02 g de calcio

$$\% \text{ de calcio} = \frac{V \times N \times \text{meq} \times 100 \times A}{M \times a} \quad (15)$$

Dónde: V: Volumen gastado de solución de permanganato de potasio, N: Normalidad de la solución de calcio, meq: Miliequivalentes de calcio (0.02), A: Aforo, M: Peso de la muestra y a: Alícuota para el ensayo.

8.6.7 Determinación del contenido de hierro

La determinación del contenido de hierro se realizó mediante la metodología de la norma NMX-F-503-SCFI-2011. Para esto se incineró 1 g de muestra a 600 °C en una mufla (Felisa, Modelo FE-340, México) hasta obtener cenizas, se adicionaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se añadieron 100 mL de agua destilada y se colocó la muestra en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, pasados los 15 minutos se aforó a 50 mL. Se tomaron 25 mL y se llevaron a pH 1.5 con acetato de sodio 2 M, se añadió 1 mL de la solución de ácido ascórbico y 1 mL de solución de 1,10-fenantrolina, se mezcló y dejó reposar 5 minutos. Finalmente se llevó la solución a un pH 3.5 con acetato de sodio 0.2 M, se aforó a 50 mL con agua destilada para dejar reposar durante 20 minutos, transcurrido el tiempo se tomó la absorbancia a $\lambda = 490 \text{ nm}$. Se determinaron los mg de la muestra con la Ecuación (16).

$$\text{mg de hierro} / \text{Kg} = N / 2.5 \quad (16)$$

Donde N: Concentración leída en la curva

8.6.8 Determinación de fósforo

La determinación del contenido de fósforo se realizó mediante el método por colorimetría con azul de molibdeno de la Norma Oficial Mexicana (NOM-131-SSA 1-1995). Para lo cual, se adicionó 1 mL de nitrato magnésico a 1 g de muestra en un crisol, se colocó en una parrilla para evaporar a sequedad. A continuación se quemó en mechero e incineró en una mufla a 500 °C durante 2 horas hasta obtener cenizas grises. Se dejó enfriar y disolvió el contenido del crisol en 10 mL de ácido clorhídrico 1+4, se adicionaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado y evaporó a sequedad. Posteriormente se humedeció el residuo con 2 mL de ácido clorhídrico y 50 mL de agua destilada para calentar unos minutos en baño maría, transcurrido el tiempo se dejó enfriar y aforó a 100 mL. Se filtró y se realizaron las soluciones con 1 mL de molibdato amónico, 1 mL de filtrado, se mezcló y dejó reposar 30 segundos para así agregar 1 mL de hidroquinona y 1 mL de sulfito de sodio finalmente se dejó reposar 30 minutos y se leyó la absorbancia en un espectro a $\lambda = 650 \text{ nm}$. Se realizó una curva de calibración de fósforo. El contenido de fósforo se determinó con la Ecuación (17).

$$\text{Contenido de fósforo (mg/100g)} = C \times D \times V \times 100 / m \times A \quad (17)$$

Dónde: C: Contenido de fósforo en la solución de la toma de ensayo leído en la curva de calibración, D: Factor de dilución si es necesario, m: Gramos de muestra, A: Parte de la alícuota de la solución de la toma de ensayo para la determinación (1 mL) y V: Volumen de aforo (100 mL).

8.6.9 Determinación del contenido de vitamina C

La concentración de vitamina C en las muestras se determinó utilizando la técnica propuesta por Jagota y Dani (1982), para cuya finalidad se midió 0.1 mL de pulpa de *Randia monantha* Benth, 0.5 mL de ácido tricloroacético al 10%, 0.2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y agua en cantidad suficiente para un volumen de 2 mL. Se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Se preparó el blanco correspondiente, así mismo se realizó una curva estándar utilizando diversas concentraciones de ácido ascórbico.

8.7 Análisis preliminar de propiedades fitoquímicas. Identificación de metabolitos secundarios

8.7.1 Determinación de alcaloides

Se tomaron 0.1 g de los diferentes extractos, se adicionó el volumen suficiente de ácido clorhídrico al 5%, se calentó a baño maría durante 10 minutos, se enfrió y filtró. Posteriormente se colocaron 0.5 mL filtrado ácido en tubos de ensayo, se agregaron 2 gotas del reactivo de Dragendorff a uno de los tubos y al otro se le agregaron dos gotas de reactivo de Mayer. Si se observa turbidez o precipitado la prueba es positiva (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

8.7.2 Determinación de esteroides

Se tomaron 0.1 g de los diferentes extractos, se adicionó el volumen suficiente de diclorometano para cubrir la muestra, se agitó con varilla de vidrio para una mejor extracción, posteriormente se filtró y se tomó 1 mL del filtrado orgánico que se colocó en tubos de ensayo para agregar por la pared 1 mL de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de coloraciones verdes, azules, rojas o violetas indica prueba positiva para esteroides en la muestra (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

8.7.3 Determinación de saponinas

Se tomaron 0.1 g de los diferentes extractos, se adicionó el volumen suficiente de agua para cubrir la muestra, se filtró y pasaron 4 mL del filtrado a un tubo de ensayo, se agitó vigorosamente durante un minuto. La formación de abundante espuma que permanezca estable durante 5 minutos es indicativo de una prueba positiva para saponinas (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

8.7.4 Determinación de flavonoides

Se tomaron 0.1 g de los diferentes extractos, se adicionó el volumen suficiente de etanol para cubrir la muestra para después calentar a baño maría durante 5 minutos, se enfrió y filtró el extracto. Posteriormente se tomó 1 mL del filtrado etanólico que se colocó

en un tubo de ensaye, se agregaron varias limaduras de magnesio y se dejó caer lentamente por la pared del tubo ácido clorhídrico concentrado (37%). La aparición de colores: naranja, rojo, violeta o rosado indican presencia de flavonoides (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

8.7.5 Determinación de quinonas

Se tomaron 0.1 g de los diferentes extractos se les agregaron 20 mL de etanol al 95%, se calentó a baño maría durante 5 minutos hasta ebullición transcurridos los 5 minutos se filtró en caliente. Se tomaron 5 mL del filtrado y se adicionaron 3 mL de H₂SO₄ al 10%, se calentó a baño maría durante 5 minutos a ebullición, se dejó enfriar la muestra para poder adicionar 5 mL de tolueno y se agitó sin emulsionar. Por último, se tomaron 2 mL de la fase orgánica a los cuales se les adicionó 1 mL de solución de hidróxido de sodio al 5% preparada en amoníaco al 2%. La aparición de rojo cereza en la capa acuosa indica presencia de quinonas (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

8.7.6 Determinación de cumarinas

En un tubo de ensaye se colocaron 0.1 g de los diferentes extractos a las cuales se les adicionó cantidad suficiente de etanol para que cubriera por completo la muestra, al tubo de ensaye se le colocó en la boca un papel filtro que fue sujetado con una liga para posteriormente agregarle al papel filtro unas gotas de NaOH diluido, se calentó a ebullición en baño maría durante 5 minutos. Finalmente se observó el papel filtro bajo luz ultravioleta a $\lambda=365 \text{ nm}$. La aparición de coloración fluorescente que puede ser: verde, amarilla o roja indica presencia de cumarinas (Mora *et al.*, 2012; Domínguez, 1973).

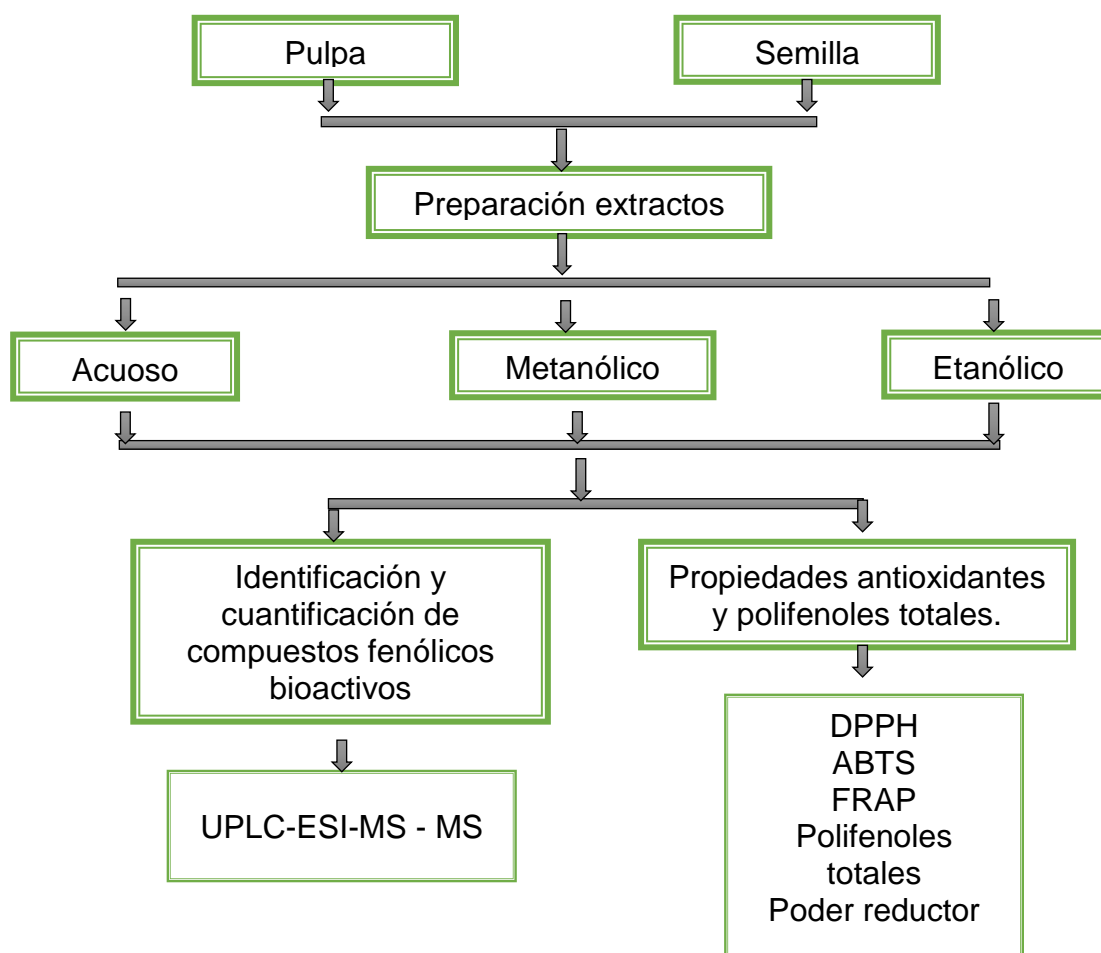
8.8 Determinación da actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa de crucetillo utilizando el método de dilución en caldo propuesto por Balouri *et al.*, (2016). Se evaluó a cepas patógenas Gram (-): *Salmonella entérica* (ATCC 14028) y *Escherichia coli* (ATCC 43895) y dos bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

Para lo anterior se prepararon diluciones a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL en un medio de crecimiento líquido distribuido en tubos que contenían un volumen de 2 mL. Posteriormente se inoculó cada tubo con un inóculo microbiano preparado en el mismo medio, que fue previamente estandarizado ajustándolo a la escala de Mcfarland 0.5. Después se agitó cada tubo y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C. Transcurridas las 24 horas se procedió a leer la absorbancia $\lambda = 600 \text{ nm}$.

8.9 Evaluación de actividad antioxidante e identificación de compuestos fenólicos bioactivos de diferentes extractos de pulpa y semilla de *R. monantha*.

En la segunda etapa se realizaron los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la semilla y la pulpa, respectivamente, para posteriormente realizar la determinación de actividad antioxidante e identificación de compuestos fenólicos bioactivos como se observa en el posterior diagrama.



8.9.1 Determinación del contenido de polifenoles totales

Se determinó el contenido de polifenoles totales con la metodología Singleton y Rossi, (1965) con modificaciones. Se agregaron 30 μL de extracto y 30 μL de Folin Ciocalteu al pocillo de la microplaca, se dejó incubar por dos minutos a 40 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se agregaron 240 μL de Na_2CO_3 5%, se agitó e incubó durante 20 minutos a 40 $^{\circ}\text{C}$ transcurrido el tiempo se leyó la absorbancia a $\lambda=765 \text{ nm}$. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico a distintas concentraciones.

8.9.2 Determinación del porcentaje de inhibición del radical DPPH

La determinación de inhibición del radical DPPH se realizó según la metodología sugerida por Brand-Williams (1995) con algunas modificaciones para poder realizarla en microplaca. Se agregaron 10, 20, 30, 40, 50 μL del extracto acuoso, etanólico y metanólico a los pocillos para posteriormente agregar reactivo de DPPH para obtener un volumen final de 300 μL . Se dejó reposar a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Al mismo tiempo de prepararon controles y blancos para cada extracto. Se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro a $\lambda=517 \text{ nm}$, así mismo se determinó IC_{50} utilizando diferentes concentraciones de la muestra. Las pruebas se realizaron por triplicado. Para obtener el porcentaje de inhibición del radical libre se utilizó la Ecuación (18).

$$\text{Inhibición del radical DPPH (\%)} = [1 - ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})/\text{Abs control})] \times 100$$

(18)

Dónde: Abs muestra= Absorbancia de la muestra, Abs blanco= Absorbancia del blanco y Abs control=absorbancia control.

8.9.3 Evaluación de la actividad antioxidante por el método FRAP (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina)

Se determinó la capacidad para reducir el hierro férrico (FRAP) con la metodología de Benzie y Strain (1996) con modificaciones para poder realizar la prueba en microplaca (Multiskan FC modelo IVD, Finlandia). Se agregaron 30 μL de extracto y 270 μL de reactivo de FRAP, posteriormente se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a $\lambda = 593 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro (Multiskan FC modelo IVD, Finlandia). Se utilizó como blanco 300 μL de reactivo de FRAP. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución preparada disolviendo 10 mg de Trolox en 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada, posteriormente se realizaron diluciones a concentraciones conocidas de entre 0.1 hasta 1 mg/mL. Los resultados se expresan en mg equivalentes de Trolox.

8.9.4. Actividad antioxidante ABTS (ácido 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Se determinó actividad antioxidante por el método ABTS Re *et al.*, (1998) con modificaciones para poder realizar la prueba en microplaca (Multiskan FC modelo IVD, Finlandia). Se agregaron 30 μL de extracto y 270 μL de reactivo de ABTS para posteriormente se incubó a 25 °C durante 30 minutos finalmente se leyó absorbancia a $\lambda = 734 \text{ nm}$ (Multiskan FC modelo IVD, Finlandia). Se utilizó como blanco 300 μL de reactivo de ABTS. Se realizó una curva de calibración utilizando una solución preparada disolviendo 10 mg de Trolox en 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada, posteriormente se realizaron diluciones a concentraciones conocidas de entre 0.1 hasta 1 mg/mL. Los resultados se expresan en mg equivalentes de Trolox.

8.9.5 Determinación del poder reductor

A 0.25 mL de muestra se le añadieron 2.5 mL de buffer de fosfato de sodio pH 6.6, 2.5 mL de ferrocianuro de potasio al 1% se mezclaron e incubaron durante 20 minutos en baño maría a 50 °C. Transcurrido el tiempo se le agregó 2.5 mL de ácido tricloroacético

al 10%. Se tomaron 5 mL de la mezcla y se le añadieron 5 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico, inmediatamente se leyó a $\lambda=700 \text{ nm}$ en un espectrofotómetro UV (JENWAY, modelo 6305, Japón) (Yen y Chen, 1995).

8.10 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos bioactivos

8.10.1 Condiciones cromatográficas

El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Alta Resolución (marca Agilent, modelo 1290 infinity Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (marca Agilent, Modelo 6460 Alemania). Los compuestos fenólicos se identificaron de forma inequívoca por coelución con compuestos de referencia a las condiciones que se describen más adelante. Los compuestos fenólicos se muestran en el Cuadro 4. Para la cuantificación de cada compuesto se realizó una curva de calibración, con valor de linealidad 0.99, en un rango de concentración de 1 a 9 μM .

Cuadro 4. Lista de compuestos con los que se realizaron las curvas de calibración para la determinación de compuestos fenólicos bioactivos.

Compuesto	Compuesto
Ácido gálico	Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico
Ácido 4-hidroxibenzoico	<i>Trans</i> -resveratrol
(+)-catequina	Ácido <i>trans</i> -cinámico
Ácido vanílico	Cirsimarina
Escopolina	Quercetina
Ácido clorogénico	Luteolina
Ácido cafeico	Angelicina
(-)-Epicatequina	Apigenina
Mangiferina	Kaempferida
Vainillina	Piperina
Ácido- <i>p</i> -cumárico	Quercetina 3-D-galactósido
Umbeliferona	Quercetina 3-glucósido
Quercetina 3,4-di- <i>O</i> -glucósido	Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido
Escopoletina	Kaemferol 3- <i>O</i> -glucósido
Rutina	

Para el análisis cromatográfico las fases móviles utilizadas fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico (B), ambos en grado MS. El gradiente de elución se muestra en el Cuadro 5. La velocidad de flujo fue 0.1 mL/min. El volumen de inyección fue 0.5 mL. Se utilizó una columna Agilent, Zorbax SB-C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 Microns a temperatura de 40 °C.

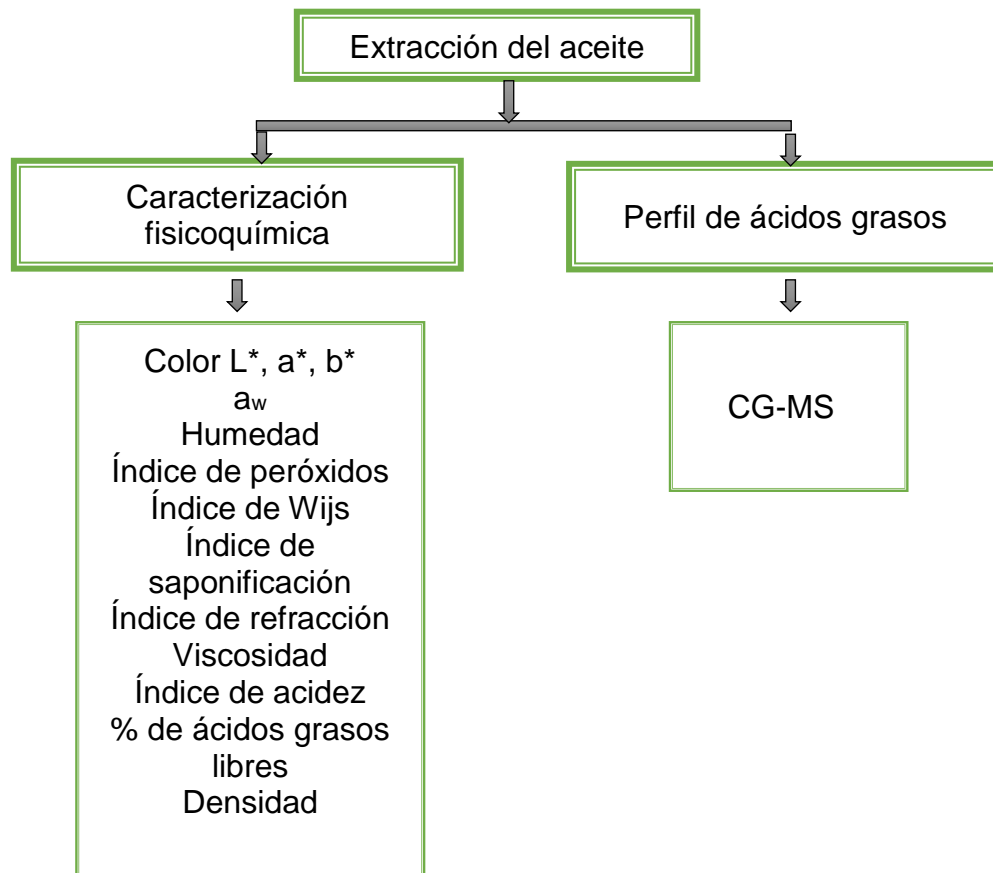
Cuadro 5. Gradiente de elución utilizado para la identificación de compuestos fenólicos bioactivos.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	99	1
40	60	40
42	10	90
44	10	90
46	99	1
47	99	1

Para el análisis espectrométrico se empleó una fuente de ionización por electrospray en modo positivo y negativo. En cuanto a las condiciones de la misma, el voltaje del capilar y del inyector, ambos en modo positivo y negativo, fue 3.5 kV y 500 V, respectivamente; la temperatura de desolvatación fue 300 °C; el flujo del gas de cono (N₂) se utilizó a 5 L/min; el nebulizador tuvo una presión de 45 psi; el gas envolvente (N₂) se usó a 250°C en un flujo de 11 L/min; el voltaje del fragmentador se ajustó a 100 V y el del gas colisionador (He) a 10 V. El detector de masas operó en un método de monitoreo dinámico de reacciones múltiples (por sus siglas en inglés Multiple Reaction Monitoring). La cuantificación de los compuestos se realizó con la aplicación MassHunter Workstation (versión B.06.00) de Agilent Technologies.

8.11 Caracterización fisicoquímica del aceite de semillas y perfil de ácidos grasos

En esta tercera etapa se extrajo el aceite de la semilla y posteriormente se procedió a realizar la caracterización fisicoquímica y la determinación de perfil de ácidos grasos como se observa en el siguiente esquema.



8.11.1 Determinación de índice de peróxidos

El índice de peróxidos se realizó de acuerdo al método de la American Oil Chemist's Society (AOACS). Para lo cual, se pesaron 0.5 g de muestra de grasa y se añadió una solución de ácido-acético 3:2, se añadieron 0.5 mL de solución saturada de KI, se dejó reposar 1 minuto y se agregaron 30 mL de agua destilada para finalmente proceder a titular con una solución de Tiosulfato de sodio 0.001 N, utilizando como indicador 1 mL de solución de almidón. Se calculó el índice de peróxidos con la Ecuación (19)

$$\text{Índice de peróxidos } \left(\frac{\text{meq O}_2}{100 \text{ g}} \right) = (V - C) \times N \times 1000 / M \quad (19)$$

Dónde: V: Volumen gastado en la titulación de la muestra, N: Normalidad del tiosulfato, C: volumen de tiosulfato gastado en la titulación del blanco, M: Peso de la muestra (AOCS, 1998).

8.11.2 Determinación de Wijs.

La determinación del índice de Wijs se realizó mediante la metodología de la norma NMX-F-152-SCFI-2011. Para esto, se pesaron 0.02 g de grasa a la que se le adicionaron 20 mL de ciclohexano y 25 mL del reactivo de Wijs, para dejar reposar durante 120 minutos en oscuridad, posteriormente se le adicionó 20 mL de KI al 15%, 100 mL de agua. Se valoró con tiosulfato de sodio 0.01 N utilizando como indicador 1 mL de almidón. Se calculó el índice de yodo con la Ecuación (20)

$$\text{Índice de yodo (\%)} = ((B - S) * N * 12.69) / M * 100 \quad (20)$$

Dónde: B: Título del blanco, S: Título de la muestra, N: Normalidad de la solución de tiosulfato, M: Peso de la muestra, 12.69= Peso equivalente del yodo en la solución 0.001 N.

8.11.3 Porcentaje de ácidos grasos libres e índice de acidez

Se pesó 0.1 g de muestra para posteriormente añadir 20 mL de alcohol neutralizado y 0.5 mL de fenolftaleína. Se procedió a titular con álcali agitando hasta la aparición del primer color rosa permanente en la misma intensidad que la del alcohol neutralizado antes de la adición de la muestra. El color debe persistir durante 30 segundos. El porcentaje de ácidos grasos libres como ácido oleico y el índice de acidez se calcularon con las Ecuaciones (21) y (22).

$$\text{Porcentaje de ácidos grasos libres como ácido oleico} = (V * N * 2.82)/M \dots (21)$$

$$\text{Índice de acidez} \left(\text{mg de } \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \text{ de muestra} \right) = (V * N * 0.561)/M \quad (22)$$

Dónde: V= Volumen gastado de solución de KOH; N=Normalidad de la solución de KOH; M=Peso de la muestra; 0.561= Peso del equivalente de KOH en una solución 0.01 N.

8.11.4 Índice de saponificación

Se pesó 1 g de muestra en un matraz Erlenmeyer al cual se le añadieron 5 mL de solución alcohólica de KOH 0.1 N y dos perlas de vidrio, se dejó reflujar durante 1 h. Posteriormente se enfrió para proceder a titular con HCl 0.1 N. Se realizó un blanco y el índice de saponificación se determinó con la Ecuación (23).

$$\text{Índice de saponificación (mg /g)} = ((B - S) * N * 0.561)/M \quad (23)$$

Dónde: B = Título del blanco; S =Título de la muestra; M = Peso de la muestra; N = Normalidad del álcali (0.1); 0.561 = Peso en equivalentes del KOH en una solución 0.1 N.

8.11.5 Determinación de color, humedad y viscosidad

La determinación del contenido de humedad se realizó mediante la metodología del apartado 8.4.3 Determinación del porcentaje de humedad. Se determinó color mediante la metodología del apartado 7.4.3 Determinación de color. Posteriormente se determinó viscosidad a una temperatura de 25 °C, utilizando un viscosímetro (marca BrookField modelo RBT, Estados Unidos) (Okechukwu *et al.*, 2016).

8.11.4 Determinación de densidad

Se determinó densidad de acuerdo a la metodología propuesta por Payal *et al.*, (2015). Para esto, se pesó 1 g de grasa de la semilla de *R. monantha* para verterlo a un matraz aforado, se anotó el volumen. La densidad se determinó a 25 °C y se calculó con la Ecuación (24)

$$d \text{ (g/mL)} = m/V \quad (24)$$

Dónde: d = densidad, m = masa, V = volumen.

8.11.5 Determinación de índice de refracción

La determinación de índice de refracción se realizó mediante la metodología propuesta por Domínguez, (1997). Para realizar esto se colocó la muestra entre los prismas rectangulares del refractómetro (ATAGO, Modelo NART-1T), previamente calibrado. Se cerró la tapa y leyó en la escala, en la intersección de los campos. Se realizó a temperatura de 25 °C.

8.11.6 Determinación del contenido de β-caroteno

Se determinó el contenido de β-caroteno mediante la metodología propuesta por Siger *et al.*, (2017). Para lo cual, se preparó una solución al 3% en *n*-hexano del aceite de la semilla de crucetillo y se leyó su absorbancia a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Se realizó una curva de calibración del estándar, β-caroteno, a concentraciones desde 0.1 a 0.5 mg/mL disuelto

en *n*-hexano, realizando la lectura de la absorbancia a la longitud de onda antes mencionada.

8.11.7 Determinación de coeficientes de extinción K_{232} y K_{270}

Se determinaron los coeficientes de extinción específica K_{232} y K_{270} mediante la metodología propuesta por Paz y Molero, (2000). La determinación se realizó a temperatura ambiente (25 °C), para ello se preparó una solución al 1% en *n*-hexano, se agitó durante 5 minutos y se registró su espectro de absorción. Posteriormente se calcularon los coeficientes a partir de la Ecuación (25).

$$K_{\lambda} = D_{\lambda}/C \quad (25)$$

Dónde: K_{λ} : Coeficiente de extinción específica; D_{λ} : Absorción leída en el espectrofotómetro y C: Concentración de la disolución en g/mL

8.11.8 Determinación de perfil de ácidos grasos

Esterificación de los ácidos grasos. Se prepararon los ésteres metílicos mediante la técnica propuesta por Egan *et al.*, (1981), utilizando BF_3 en metanol al 14%. Se realizó la extracción de los ésteres metílicos utilizando 1.0 mL de hexano grado HPLC, el extracto hexánico fue secado con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y filtrado para su posterior inyección al cromatógrafo de gases.

Análisis de los ésteres metílicos mediante CG-MS. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 150 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 210 °C usando una rampa de calentamiento de 30 °C/min. De 210 °C pasó a 213 °C a una velocidad de 1 °C/min; finalmente, de esta temperatura pasó a 225 °C a una velocidad de 20 °C /min, durante 40 min haciendo un total de 50.6 min por corrida para cada muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fué 250 °C, inyección

split, con una relación de split de 50:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (FAME mix, C8:C22, No. de catálogo 18920-1AMP, Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones.

9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de los resultados de actividad antioxidante, compuestos fenólicos bioactivos encontrados en los diferentes extractos de pulpa y semilla y actividad antimicrobiana de los extractos de pulpa se realizó un análisis de varianza de una vía y posteriormente se evaluaron las diferencias significativas mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$, utilizando el programa SigmaPlot versión 10, Estados Unidos.

Se realizó un análisis de componentes principales para saber si había relación entre los compuestos fenólicos encontrados en los diferentes extractos y la actividad antioxidante, utilizando Excel versión 2013, Estados Unidos.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Caracterización física del fruto.

Se realizó la caracterización física del fruto completo de *R. monantha*, en la Figura 3 se puede observar el corte transversal del fruto en donde se ve que es un fruto ovoide con abundantes semillas y pulpa de color negro. En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica, el fruto presentó un peso promedio de 57.33 g, un diámetro mayor de 6.05 cm y un diámetro menor de 4.49 cm, como se muestra en la Figura 4, el diámetro se encuentra dentro del rango reportado para el mismo fruto (4 a 7 cm de diámetro) por Enquist y Sullivan, (2001).



Figura 3. Corte trasversal del fruto de *R. monantha*.

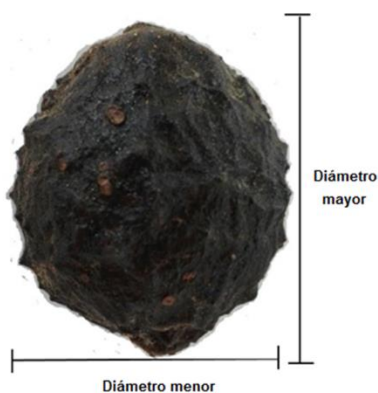


Figura 4. Dimensiones del fruto de *R. monantha*.

El fruto se desecó durante 24 horas a 45 °C alcanzando al final una humedad de 9.06% al cabo de este proceso, ya que permitió conservarlo mejor, dado que es un fruto muy susceptible al crecimiento de mohos. Este parámetro es importante cuando se considera la calidad de frutos debido a que tiene efectos significantes en la textura, vida de anaquel, peso, sabor y crecimiento microbiano (Mohammed *et al.*, 2016).

Su determinación es importante ya que así se podría estandarizar el fruto para poder comercializarse en un futuro. Una característica importante del fruto es su color negro que se ve reflejado en el parámetro L de color (26.10), encontrando que el valor obtenido fue más cercano a cero. Según el espacio de color L* a* b* establecido por la CIE (Commission Internationale de l'Éclairag). L es la Luminosidad que va de 0 a 100 donde valores cercanos a 0 tienden al negro y valores cercanos al 100 tienden al blanco (Gómez- Polo *et al.*, 2015), esto se ve reflejado en el índice de oscurecimiento que fue de 42.86%.

Este fruto presento un índice de redondez de 0.82 lo cual indica que es ovoide y tiene la particularidad de poseer un mayor porcentaje de semillas 53.59% (240 semillas) que de pulpa y cascara lo cual lleva a pensar que posiblemente la semilla posea algún compuesto con actividad biológica, un ejemplo de esto es que Cano-Campos *et al.*, (2011), encontraron que el extracto hexánico del fruto completo de *R. echinocarpa* presentó la mayor actividad antioxidante, además de identificar ácidos grasos en dicho extracto.

Cuadro 6. Propiedades físicas del fruto de *R. monantha*.

Propiedad (B. s.)	
Humedad (%)	9.06 ± 0.23
Peso (g)	57.33 ± 12.10
Dimensiones	
Diámetro mayor (cm)	6.05 ± 0.38
Diámetro menor(cm)	4.49 ± 0.32
Índice de redondez	0.82 ± 0.10
Color	
L*	26.10 ± 1.36
a*	1.67 ± 0.91
b*	5.98 ± 2.08
Ángulo matiz	20.45 ± 0.90
Saturación	7.47 ± 0.11
Índice de oscurecimiento (%)	42.86 ± 9.58
Semillas (%)	53.59 ± 0.27 (240 semillas)
Cascara (%)	28.10 ± 0.09
Pulpa (%)	18.33 ± 0.30

Media ± DS, n=3.

10.2 Caracterización de la pulpa seca

10.2.1 Caracterización fisicoquímica de la pulpa seca.

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la pulpa seca de *R. monantha*, los resultados se pueden observar en el Cuadro 7. La pulpa presentó una humedad de 8.05% después del proceso de secado, ya que esto permitiría conservarla. En la a_w se obtuvo un valor de 0.451. Este parámetro es importante ya que es una medida de la cantidad de agua disponible para las reacciones químicas, así como el crecimiento microbiano en alimentos, de acuerdo a lo antes mencionado este es un producto susceptible al oscurecimiento no enzimático que se puede dar por reacción de Maillard debido principalmente a azúcares reductores (Badui, 2006). El contenido total de azúcares reductores en la pulpa fue de 62.06%. La pulpa presentó un valor de 3.53 en el parámetro L de color indicando que presenta un color negro característico que puede corroborarse con el índice de oscurecimiento 42.86%. El color podría deberse a la composición química y la estructura del material (Bello, 2008), así como a distintos compuestos orgánicos presentes algunos que se producen en el procesamiento y almacenamiento y otros que son pigmentos naturales (Badui, 2006).

Por otro lado el valor del contenido de proteína fue de 0.01% que fue más bajo a lo reportado por Potter, (1995) para frutos (0.7%). También se encontró que el contenido de grasa fue de 0.81% siendo mayor a lo reportado por el mismo autor para frutas en general. Es importante destacar que la pulpa de *R. monantha* mostró un mayor contenido de cenizas que lo reportado para otros frutos (Potter, 1995), esto indica que este fruto podría ser una buena fuente de minerales. La cantidad de cenizas representa el contenido de minerales tales como Na, K, Ca y Mg y elementos traza como son Fe, Zn, Cu en alimentos respectivamente (Gonca *et al.*, 2016).

Además la pulpa presentó un pH de 6.84, y una acidez total titulable de 0.05% de ácido málico, cabe mencionar que la acidez no está correlacionada directamente con el pH. Una fruta no puede ser ácida pero si tener un pH alto y viceversa; esto depende de la capacidad buffer de la pulpa a un pH bajo y de la combinación de ácidos presentes en el fruto (Mendoza *et al.*, 2012). El valor de °Brix fue de 1.34, este valor es una medida rápida de los sólidos solubles, en estudios de frutos se ha reportado que el contenido aumenta a medida que los frutos se acercan al grado de madurez óptimo de su cosecha

debido a que el almidón se degrada y se acumulan azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa principalmente (Arrieta *et al.*, 2006). El índice de madurez fue de 26.6, este es óptimo para la cosecha de dicho fruto según el conocimiento empírico ya que coincide con el color característico del cultivar.

Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de pulpa seca de *R. monantha*.

Propiedad (B. s.)	
Humedad (%)	8.05 ± 0.05
a_w	0.451 ± 0.02
Color	
L*	3.53 ± 0.71
a*	0.86 ± 0.30
b*	1.32 ± 0.66
Ángulo matiz	26.10 ± 0.17
Saturación	1.61 ± 0.62
Índice de oscurecimiento (%)	42.86 ± 0.58
Proteína (%)	0.01 ± 0.00
Grasa (%)	0.81 ± 0.21
Fibra cruda (%)	1.26 ± 0.34
Azúcares reductores totales (%)	62.06 ± 0.37
Azúcares reductores directos (%)	15.51 ± 0.09
Azúcares no reductores (%)	46.54 ± 0.33
Cenizas (%)	3.62 ± 0.24
Calcio (%)	1.01 ± 0.02
Hierro (mg/g)	0.40 ± 1.50
Fósforo (mg/g)	0.02 ± 0.01
°Brix	1.34 ± 0.00
pH	6.84 ± 0.01
Acidez total titulable (% ácido málico)	0.05 ± 0.00
Índice de madurez	26.60 ± 0.03
Vitamina C (mg ácido ascórbico/ g)	491.76 ± 0.22

Media ± DS, n=3.

10.1.2 Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos acuoso, etanólico y metanólico

Se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar (Cuadro 8) para monitorear que tipo de compuestos presentaban los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa seca respectivamente. Los extractos presentaron alcaloides, a los cuales se les podría atribuir el sabor amargo que presenta el fruto. Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno se encuentran habitualmente en las semillas, hojas y corteza de las plantas, estos proporcionan sabor amargo y potentes efectos fisiológicos (Seyhan, 2004). Además, los extractos presentaron un alto contenido de saponinas a lo cual se podrían deber los efectos antiinflamatorios y disminución de colesterol que se le atribuye a crucetillo. Las saponinas son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares al agitarse en agua producen abundante espuma, debido a esta propiedad se utilizan como jabón. Algunas saponinas presentan actividad biológica cardíaca y hemolítica, debido a su propiedad hemolítica se usan como veneno para peces. Otras reducen el colesterol, tienen actividades espermicidas y antiinflamatorias entre otras (Romo, 2006).

Por otro lado se observó la presencia de flavonoides. Los flavonoides son compuestos antioxidantes del tipo fenólicos, se encuentran en diferentes partes de las plantas y su esqueleto básico está formado por estructuras del tipo C6-C3-C6 (Iglesias, 2009).

Como se puede observar, los extractos también exhibieron cumarinas y podría deberse a estos compuestos la actividad antidiabética que las personas le atribuyen a *R. monantha*. Las cumarinas son una clase importante de compuestos fenólicos naturales, pertenecen a la familia de las benzo- α -pironas, se han reportado muchos usos terapéuticos tales como antimicrobiano, antihipertensivo, anticonvulsivo y antidiabético (Guo-Ying, 2016). Los resultados encontrados en los extractos analizados son similares a los reportados para los extractos metanólico y acuoso de *R. echinocarpa* los cuales no reportaron presencia de alcaloides, sin embargo, si presentaron flavonoides, saponinas y cumarinas (Cano-Campos *et al.*, 2011).

Cuadro 8. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa del fruto de *R. monantha*.

Propiedad fitoquímica	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto metanólico
Alcaloides	+	+	+
Saponinas	+++	+++	+++
Flavonoides	++	++	++
Esteroides	---	+++	
Cumarinas	+	+	+
Quinonas	---	---	---

+++ Muy presente, ++ Presente, + Poco presente, --- No presentó.

10.1.3 Evaluación de actividad antioxidante y determinación de fenoles totales

Se determinó la actividad antioxidante utilizando diversos métodos debido a los diferentes mecanismos de acción de los constituyentes de la actividad antioxidante.

Como se muestra en el Cuadro 9 la cantidad de polifenoles varió desde 413.44 a 57.19 mg EAG/g de extracto seco. El extracto acuoso presentó la concentración más alta, además de ser mayor a lo reportado para *R. dumetorum* Lam (Kandimalla *et al.*, 2016) ya que se encontró una concentración de 138.00 mg EAG/g, sin embargo, los contenidos de fenoles totales en los extractos etanólico y metanólico fueron menores a dicha concentración. Los compuestos fenólicos juegan un papel importante como antioxidantes naturales y son capaces de eliminar radicales libres que pueden aumentar en el estrés oxidativo y potencialmente dañar moléculas biológicas tales como lípidos, proteínas y ADN (Sumczynski *et al.*, 2016). Debido al contenido de compuestos fenólicos encontrado en los diferentes extractos de *R. monantha* la pulpa de dicho fruto podría considerarse una buena fuente de antioxidantes.

El porcentaje de inhibición del radical DPPH se encontró en un rango de 92.71 - 23.73%, encontrando que el extracto acuoso fue el que presentó la mayor inhibición de dicho radical (92.71%), esto se puede corroborar mediante el valor de IC₅₀ que presentó este extracto (0.20 mg/mL), lo cual indica que su capacidad para reducir el 50% del radical DPPH es buena. Un valor bajo de IC₅₀ significa una mayor potencia o mejor actividad

como agente antioxidante (Echavarría *et al.*, 2009). Sin embargo el IC₅₀ fue mayor a lo reportado por Arlorio *et al.*, (2008) para extractos etanólicos de *Theobroma cacao* L que presentaron valores de IC₅₀ de 14.98 - 30.10 µg/mL.

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos para actividad antioxidante total mediante el método de FRAP para los diferentes extractos crudos preparados con la pulpa de *R. monantha*, encontrando el siguiente orden descendente de actividad: extracto acuoso > etanólico > metanólico, el extracto que tuvo mayor actividad fue el acuoso. Por otro lado también se determinó actividad antioxidante mediante el método ABTS hallando que el extracto con mayor actividad fue el etanólico con 569.71 mg ET/g, seguido de extracto metanólico 205.28 mg ET/g y por último se encontró el extracto acuoso 72.57 mg ET/g. Las diferencias observadas en los resultados de la actividad antioxidante podrían deberse a que el método de FRAP determina la capacidad reductora de los compuestos que posee un extracto mientras que el ensayo de ABTS mide la capacidad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos para reducir el radical preformado del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) mediante la donación de hidrógenos (Re *et al.*, 1999).

Las diferencias en la capacidad antioxidante podrían deberse a las diferencias en los tipos de compuestos y concentraciones de los compuestos fenólicos bioactivos identificados en los diferentes extractos pues esto depende del disolvente utilizado para la extracción (Cuadro 13), así como el contenido de polifenoles ya que de acuerdo a la literatura los compuestos fenólicos están directamente asociados con la actividad antioxidante (Lazze *et al.*, 2013) debido a la capacidad que tienen de estabilizar los radicales libres, la quelación de iones metálicos y la inhibición de la oxidación de lipoproteínas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes extractos en todas las pruebas realizadas ($p < 0.05$).

Cuadro 9. Actividad antioxidante y polifenoles totales de extractos acuoso, etanólico y metanólico de pulpa seca de crucetillo.

Propiedad (B. s.)	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto metanólico
IC ₅₀ Radical DPPH (mg/mL)	0.20 ± 0.38 ^{ad}	0.42 ± 0.29 ^{cd}	1.00 ± 0.10 ^{bc}
FRAP (mg ET/g)	166.68 ± 1.00 ^a	55.29 ± 0.63 ^{ac}	54.72 ± 0.88 ^b
Polifenoles (mg EAG /g)	413.44 ± 0.61 ^a	57.19 ± 0.70 ^b	125.14 ± 0.63 ^c
ABTS (mg ET/g)	72.57 ± 0.38 ^a	569.71 ± 0.12 ^b	205.28 ± 0.03 ^c
Poder Reductor (UDO)	0.111 ± 0.00 ^a	0.104 ± 0.00 ^b	0.087 ± 0.00 ^c
% Inhibición DPPH	92.71 ± 0.04 ^a	23.73 ± 0.06 ^b	68.35 ± 0.03 ^c

Media ± DS; n=3

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

10.1.4 Determinación de compuestos bioactivos.

La cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) es ampliamente utilizada debido a la gran velocidad de separación y análisis en comparación con otras técnicas como el HPLC tradicional. Además de la alta sensibilidad y alto rendimiento que puede obtenerse mediante el uso de un detector de masas del tipo triple cuadrupolo y el monitoreo de múltiples reacciones (por sus siglas en inglés Multiple Reaction Monitoring) (Pan *et al.*, 2017). En esta tesis se estableció un método de análisis UPLC-MS-MS rápido y altamente sensible para la detección de 30 compuestos bioactivos en los diferentes extractos de pulpa y semilla de *R. monantha*.

Para lo anterior se realizaron las correspondientes curvas para determinar el rango de linealidad de los compuestos fenólicos bioactivos de referencia. En el Cuadro 10 se muestran las concentraciones utilizadas y la linealidad de las curvas. Como se puede observar en todos los casos las curvas presentaron valores de correlación por arriba de

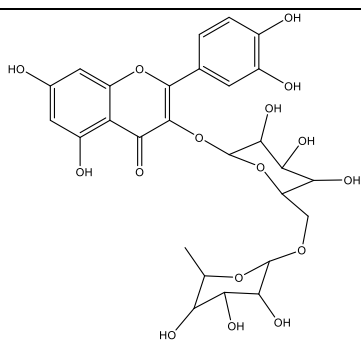
0.900 lo cual indica que la relación lineal entre la concentración y la variable de respuesta es directamente proporcional en el intervalo de concentración.

Cuadro 10. Concentración y linealidad de las curvas de calibración realizadas.

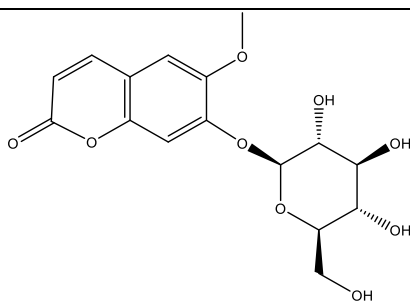
Compuesto	Rango (mM)	r ²
Ácido gálico	0.30 – 24.00	0.996
Ácido 4-hidroxibenzoico	0.30 – 24.00	0.997
(+)-catequina	0.30 – 12.00	0.971
Ácido vanílico	0.30 – 12.00	0.998
Escopolina	0.30 – 12.00	0.998
Ácido clorogénico	0.30 – 12.00	0.998
Ácido cafeico	0.30 – 12.00	0.999
(-)-Epicatequina	0.30 – 12.00	0.998
Mangiferina	0.30 – 12.00	0.999
Vainillina	0.30 – 12.00	0.998
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.30 – 12.00	0.996
Umbeliferona	0.30 – 12.00	0.989
Quercetina 3,4-di- <i>O</i> -glucósido	0.30 – 12.00	0.997
Escopoletina	0.30 – 12.00	0.995
Ácido ferúlico	0.30 – 12.00	0.998
Rutina	0.03 – 12.00	0.994
Quercetina 3- <i>D</i> -galactósido	0.30 – 12.00	0.999
Quercetina 3-glucósido	0.03 – 12.00	0.987
Luteolina 7- <i>O</i> -glucósido	0.30 – 12.00	0.993
Kaempferol 3- <i>O</i> -glucósido	0.03 – 12.00	0.986
Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico	0.30 – 12.00	0.992
<i>Trans</i> -resveratrol	0.30 – 24.00	0.999
Ácido <i>trans</i> -cinámico	1.50 – 24.00	0.999
Cirsimarina	0.30 – 12.00	0.997
Quercetina	0.03 – 12.00	0.990
Luteolina	0.30 – 12.00	0.994
Angelicina	0.30 – 12.00	0.997
Apigenina	0.03 – 12.00	0.986
Kaempferida	0.30 – 12.00	0.998
Piperina	0.03 – 12.00	0.981

De los 30 compuestos bioactivos analizados se identificaron un total de 15 compuestos en los diferentes extractos de pulpa y semilla respectivamente. Las estructuras de los compuestos se muestran en el Cuadro 11.

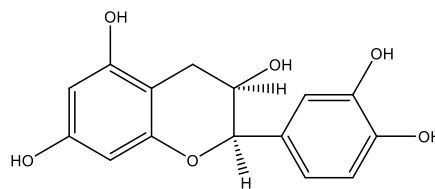
Cuadro 11. Estructuras de los compuestos encontrados en los diferentes extractos de pulpa y semilla respectivamente



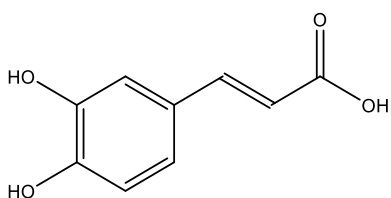
Rutina



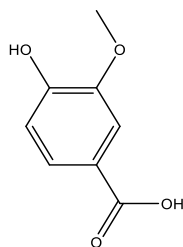
Escopolina



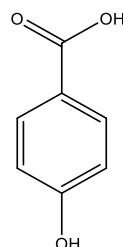
(-)-Epicatequina



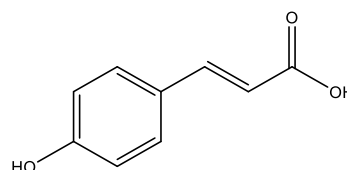
Ácido cafeico



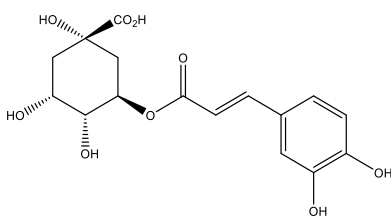
Ácido vanílico



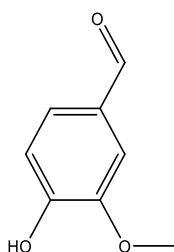
Ácido 4-hidroxibenzoico



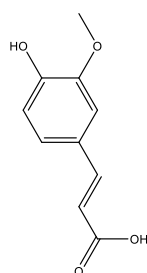
Ácido-p-cumárico



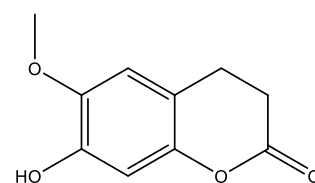
Ácido clorogénico



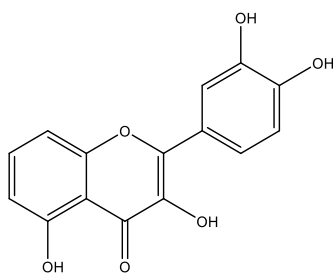
Vainillina



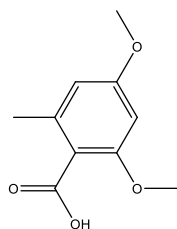
Ácido ferúlico



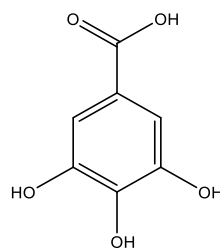
Escopoletina



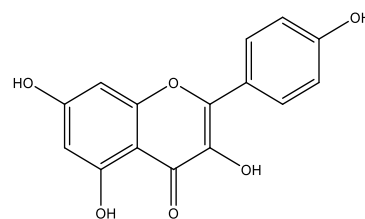
Quercetina



Ácido-2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico



Ácido gálico



Kaemferol

De los 30 compuestos bioactivos analizados se identificaron un total de 10 compuestos en los diferentes extractos de la pulpa (Cuadro 12). Encontrando que el extracto acuoso presentó 5 compuestos entre los cuales destacan en mayor concentración el ácido clorogénico 20.74 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca. El ácido clorogénico es un compuesto polifenólico con actividad antioxidante, efectos antiinflamatorios, propiedades antibacterianas, actividades hipoglucemiantes e hipolipidémicos, efectos contra tumores y efectos antihipertensivos (Zizhen *et al.*, 2015). El ácido vanílico fue el segundo compuesto con mayor concentración 9.83 $\mu\text{g/g}$. Este es un ácido orgánico con efecto antioxidante, antiinflamatorio, antibacterial y antimicrobiano (Noubigh y Akrmí, 2016). En menor concentración se encontró la (-)-epicatequina 2.40 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca.

En el extracto etanólico de la pulpa se identificaron y cuantificaron ocho compuestos entre los que destacan en mayor concentración el ácido clorogénico 39.81 $\mu\text{g/g}$ y la escopoletina 14.03 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca. La escopoletina es una cumarina que tiene efectos analgésico, antiparasitario, anticolinérgico y sobre alteraciones de la memoria (Wang *et al.*, 2016). En menores concentraciones se encontraron: ácido vanílico 2.17 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca, ácido cafeico 3.11 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca, vainillina 1.39 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca, ácido ferúlico 1.22 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca, rutina 4.88 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca y ácido gálico 0.46 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca.

Por último el extracto metanólico presentó 5 compuestos entre los que destacan escopolina 26.46 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca y ácido clorogénico 13.01 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca. En menores concentraciones el extracto presentó ácido clorogénico 3.02 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca y ácido-*p*-cumárico 4.58 $\mu\text{g/g}$ de muestra seca. Como se puede observar en el Cuadro 13 los compuestos encontrados varían de un extracto a otro, esto podría deberse al disolvente utilizado para la elaboración de cada extracto.

Numerosos autores han demostrado que los metabolitos secundarios tales como los que se encontraron en los diferentes extractos de pulpa y semilla de *R. monantha* poseen diferentes actividades biológicas. La escopoletina, el ácido vainilico y la rutina tienen propiedades antiinflamatoria y antidiabética. La escopoletina, rutina, vainillina y ácido clorogénico tienen propiedades anticancerígenas. El ácido vanílico tiene propiedades contra mordeduras de serpientes (Budryn *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016; Yang

et al., 2016; Li *et al.*, 2015). A la presencia de estos compuestos podrían deberse algunos de los beneficios que se le atribuyen a crucetillo tales como su actividad anticrotálica, antidiabética, anticáncer y antiinflamatoria.

Cuadro 12. Compuestos bioactivos identificados y cuantificados en diferentes extractos de pulpa seca.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$ muestra seca)	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto metanólico
Ácido vanílico	9.83 ± 0.28^a	2.17 ± 0.22^b	4.87 ± 0.48^c
Escopolina	----	----	26.46 ± 0.15
Ácido clorogénico	20.74 ± 0.30^a	39.81 ± 5.14^b	13.01 ± 0.49^c
Ácido cafeico	----	3.11 ± 0.09	----
(-)-Epicatequina	2.40 ± 0.84^a	----	0.89 ± 0.24^b
Vainillina	$0.004 \pm 0.00^{*a}$	1.39 ± 0.00^b	2.40 ± 0.03^c
Escopoletina	----	14.03 ± 0.43	----
Ácido ferúlico	----	1.22 ± 0.09	----
Rutina	----	4.88 ± 0.25	----
Ácido gálico	----	0.46 ± 0.02	----

--- no está presente

*se detectó por debajo de los límites de cuantificación

Media \pm DS (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

10.1.5 Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa.

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales como extractos de plantas medicinales y aromáticas. Dentro de estas investigaciones un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la identificación de sustancias naturales eficaces y no tóxicas que tienen poder antimicrobiano. Por lo cual se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de pulpa de *R. monantha*.

Para lo anterior, se determinó la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución en caldo. Este método se realizó en tubos, y en esta prueba se determinó la CMI de acuerdo a la concentración más baja que impida el crecimiento visible del microorganismo, este método es mayormente utilizado en estudios con bacterias (Reyes *et al.*, 2014). Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos acuoso, metanólico y etanólico de la pulpa seca de *R. monantha* contra dos bacteria Gram (-): *Salmonella entérica* (ATCC 14028) y *Escherichia coli* (ATCC 43895) y dos bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115). En el Cuadro 13 se puede observar que los extractos acuoso, etanólico y metanólico no presentaron actividad antimicrobiana dosis-dependiente contra las bacterias gram (+), ni contra las bacterias Gram (-), es decir, al aumentar la concentración del extracto no existe un aumento de la inhibición del crecimiento de la bacteria, esto posiblemente se debió al alto contenido de azúcares presente en la muestra, los cuales son una buena fuente de carbono para las bacterias.

Cuadro 13. Evaluación de actividad antimicrobiana en *Staphylococcus*, *Listeria*, *E. coli* y *Salmonella* de extractos acuoso, etanólico y metanólico de la pulpa del fruto de *R. monantha*.

Concentración (mg/mL)	<i>Staphylococcus</i>			<i>Listeria</i>		
	Metanólico	Etanólico	Acuoso	Metanólico	Etanólico	Acuoso
0.50	0.28 ± 0.04 ^{ca}	0.18 ± 0.02 ^{ba}	0.24 ± 0.05 ^{aA}	0.20 ± 0.09 ^{cA}	0.19 ± 0.06 ^{bA}	0.28 ± 0.04 ^{aA}
1.00	0.36 ± 0.06 ^{cb}	0.20 ± 0.01 ^{bb}	0.23 ± 0.03 ^{aB}	0.24 ± 0.02 ^{cb}	0.23 ± 0.09 ^{b2B}	0.32 ± 0.05 ^{aB}
1.50	0.37 ± 0.04 ^{cc}	0.29 ± 0.06 ^{bc}	0.37 ± 0.02 ^{a3C}	0.39 ± 0.01 ^{cc}	0.34 ± 0.06 ^{bc}	0.42 ± 0.09 ^{aC}
2.00	0.47 ± 0.08 ^{ad}	0.28 ± 0.03 ^{bd}	0.41 ± 0.01 ^{ad}	0.49 ± 0.02 ^{cd}	0.34 ± 0.03 ^{bc}	0.53 ± 0.03 ^{ad}
Control -	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.07	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.02
Control +	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.01

Concentración (mg/mL)	<i>E. Coli</i>			<i>Salmonella</i>		
	Metanólico	Etanólico	Acuoso	Metanólico	Etanólico	Acuoso
0.50	0.25 ± 0.07 ^{ca}	0.21 ± 0.02 ^{ba}	0.30 ± 0.04 ^{aA}	0.23 ± 0.07 ^{cAB}	0.38 ± 0.03 ^{bA}	0.36 ± 0.01 ^{aA}
1.00	0.33 ± 0.03 ^{cb}	0.26 ± 0.05 ^{bb}	0.31 ± 0.06 ^{aB}	0.21 ± 0.06 ^{cbC}	0.35 ± 0.03 ^{bbB}	0.41 ± 0.01 ^{aB}
1.50	0.29 ± 0.05 ^{bc}	0.29 ± 0.03 ^{bc}	0.39 ± 0.03 ^{aC}	0.20 ± 0.04 ^{cAC}	0.36 ± 0.02 ^{bc}	0.44 ± 0.03 ^{aC}
2.00	0.36 ± 0.03 ^{cd}	0.40 ± 0.05 ^{bd}	0.46 ± 0.08 ^{ad}	0.38 ± 0.08 ^{cd}	0.43 ± 0.05 ^{bd}	0.47 ± 0.01 ^{aC}
Control -	0.06 ± 0.07	0.06 ± 0.08	0.06 ± 0.03	0.16 ± 0.09	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.01
Control +	0.21 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.59 ± 0.02

Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas. Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Media ± DS; n=3

10.2 Caracterización de las semillas secas

10.2.1 Caracterización física

Los resultados obtenidos de la caracterización física de las semillas se pueden observar en el Cuadro 14. Estas semillas tienen un peso 0.03 g y las dimensiones promedio fueron largo 6.70 mm, ancho 7.86 mm y un grosor de 0.81 mm. Dicha semilla es pequeña y ovalada como se puede ver en la Figura 5.

Las semillas secas presentaron una baja humedad 5.85% lo cual indica que se puede conservar mejor y por más tiempo. Exhibió una a_w de 0.661 que nos dice que posiblemente podría ser susceptible a actividad enzimática, oscurecimiento no enzimático, reacciones hidrolíticas y oxidación de lípidos (Badui, 2006). Las dos últimas podrían deberse al contenido de grasa que presenta 5.78%. En cuanto al color presentó en el parámetro b^* un valor de 54.70 indicando que tienden de un color amarillo oscuro a café, esto se relaciona con el índice de oscurecimiento que presentó 30.39%. Por otro lado, se obtuvo un contenido de proteínas de 0.10%, un 28.59% de fibra y un 1.51% de cenizas. Según Gil (2010) en general la composición química de las semillas se caracteriza por tener un alto contenido de proteínas e hidratos de carbono en forma de fibra y almidón, lo cual fue similar a lo obtenido para las semillas de *R. monantha*. Estas presentaron un bajo contenido de proteínas y un alto contenido de fibra, pero bajo contenido de almidón concluyendo que podría ser una buena fuente de fibra.



Figura 5. Dimensiones de semilla seca de *R. monantha*.

Cuadro 14. Caracterización fisicoquímica de las semillas secas.

Propiedad	
Humedad (%)	5.85 ± 0.04
a _w	0.661 ± 0.00
Peso (g)	0.03 ± 0.01
Dimensiones	
Largo (mm)	6.70 ± 0.69
Ancho (mm)	7.86 ± 0.60
Grosor (mm)	0.81 ± 0.21
Color	
L*	25.90 ± 0.04
a*	4.53 ± 0.13
b*	3.21 ± 0.03
Ángulo matiz	54.70 ± 0.56
Saturación	5.55 ± 0.12
Índice de oscurecimiento (%)	30.39 ± 0.32
Proteína (%)	0.096 ± 0.00
Fibra cruda (%)	28.59 ± 0.65
Almidón (%)	4.47 ± 0.38
Cenizas (%)	1.51 ± 0.53
Grasa (%)	5.78 ± 0.02

Media ± DS (n=3)

10.2.2 Evaluación actividad antioxidante de diferentes extractos de semillas.

En el Cuadro 15 se muestran los resultados obtenidos de contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los diferentes extractos. Como se puede observar el contenido de polifenoles vario de 57.19 - 413.44 mg EAG /g encontrando un orden descendente de contenido de polifenoles extracto acuoso, metanólico y etanólico. También se evaluó la actividad antioxidante total mediante distintos métodos encontrando que para FRAP el extracto con mayor actividad fue el acuoso 92.70 mg ET/g, seguido del etanólico 67.80 mg ET/g y por último el metanólico 11.42 mg ET/g. Por otro lado se evaluó también por el método de ABTS encontrándose que el extracto metanólico fue el que presentó la mayor actividad 641.57 mg ET/g, seguido por el extracto acuoso 39.08 mg ET/g y por último el etanólico 37.03 mg ET/g. Las diferencias en los resultados obtenidos de los diferentes métodos se deben a que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto.

Los compuestos interactúan entre si pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski *et al.*, 2005).

En cuanto a los resultados del ensayo del radical de DPPH el extracto acuoso fue el que presentó un mayor porcentaje de inhibición de dicho radical 69.80%, posteriormente el extracto etanólico 40.10% y por último el metanólico 5.00%. Los resultados obtenidos se ven reflejados en el IC₅₀ (concentración de extracto necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH) ya que el IC₅₀ 0.03 mg/mL del extracto acuoso fue menor que para los demás extractos. Estos resultados podrían deberse a que en el ensayo de DPPH los antioxidantes se caracterizan típicamente por su valor de IC₅₀ o su estequiometría (número de moléculas de DPPH reducida por una molécula antioxidante) (Goupy *et al.*, 2003) y esto depende del tipo y las concentraciones de antioxidantes que presentó cada extracto (Cuadro 18).

Cuadro 15. Propiedades antioxidantes y polifenoles totales de extracto acuoso, etanólico y metanólico de semilla.

Propiedad	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto metanólico
IC 50 Radical DPPH	0.03 ± 0.34 ^a	0.25± 0.29 ^b	0.64 ± 0.06 ^c
FRAP (mg ET/g)	92.70± 0.80 ^a	67.80± 0.71 ^b	11.42 ± 0.09 ^c
Polifenoles (mg EAG /g)	413.44 ± 0.61 ^a	57.19 ± 0.70 ^b	146.58 ± 1.76 ^c
ABTS (mg ET/g)	39.08± 0.03 ^a	37.03 ± 0.6 ^b	641.57 ± 6.20 ^c
Poder Reductor (UDO)	0.134 ± 0.00 ^a	0.266 ± 0.00 ^b	0.233 ± 0.00 ^c
% Inhibición DPPH	69.80 ± 1.32 ^a	40.10 ± 0.07 ^b	5.00± 0.45 ^c

Media ± DS (n=3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

10.2.3 Identificación de compuestos fenólicos bioactivos de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de la semilla de *R. monantha*.

De los 30 compuestos analizados se identificaron y cuantificaron 13 compuestos fenólicos bioactivos, los resultados se muestran en el Cuadro 16. Entre los compuestos con mayor concentración para el extracto acuoso se encontró el ácido clorogénico 81.11 µg/g de muestra seca y rutina 51.61 µg/g de muestra seca. La rutina es un flavonoide conocido por tener actividades biológicas como analérgico, antiinflamatorio, anti proliferativo y propiedades anticancerígenas (Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2017). En menor concentración se encontraron: ácido cafeico 21.95 µg/g de muestra seca, ácido-*p*-cumárico 30.29 µg/g de muestra seca, ácido 4-hidroxibenzoico 0.63 µg/g de muestra seca, ácido vanílico 1.64 µg/g de muestra seca, quercetina 1.61 µg/g de muestra seca, ácido ferúlico 6.22 µg/g de muestra seca y kaempferol 1.14 µg/g de muestra seca.

El extracto metanólico exhibió en mayor concentración a la rutina 29.02 µg/g y ácido-*p*-cumárico 14.41 µg/g de muestra seca. El ácido-*p*-cumárico es un ácido hidroxicinámico que tiene propiedades como quimioprotector, anti-cáncer, cardioprotector, neuroprotector, anti-ulceras (Mustafa *et al.*, 2015), antiinflamatorio (Luceri *et al.*, 2004) y antioxidante (Zang *et al.*, 2000). Se encontraron en menor concentración: ácido clorogénico 0.87 µg/g de muestra seca, vainillina 0.87 µg/g de muestra seca y escopoletina 1.73 µg/g de muestra seca.

Por último en el extracto etanólico se encontró en mayor concentración la rutina 22.88 µg/g, seguido de ácido-*p*-cumárico 4.58 µg/g de muestra seca, ácido clorogénico 3.02 µg/g de muestra seca y ácido ferúlico 0.76 µg/g de muestra seca.

Flavonoides encontrados en los diferentes extractos como quercetina, rutina, (-)-epicatequina poseen diferentes mecanismos antioxidantes como son sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradores de radicales libres, así como la inhibición de oxidasas como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (Pérez, 2003). Debido a estos diferentes mecanismos de acción y a las diferentes concentraciones de los compuestos encontrados podrían deberse las diferencias entre la actividad antioxidante de los diferentes extractos. Otro factor importante que influye en la

diferencia de compuestos identificados y cuantificados es el tipo de solvente utilizado para la extracción ya que dependiendo de qué tipos de compuestos hidrofílicos o lipofílicos se quieran extraer se utilizarán solventes polares como metanol o apolares como hexano (Pérez *et al.*, 2006).

Cuadro 16. Compuestos fenólicos bioactivos identificados en diferentes extractos de semilla de crucetillo.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$ muestra seca)	Extracto acuoso	Extracto metanólico	Extracto etanólico
Ácido 4-hidroxibenzoico	0.63 ± 0.03	----	---
Ácido vanílico	1.64 ± 0.12	----	---
Quercetina	1.61 ± 0.03	----	---
Ácido clorogénico	81.11 ± 1.94^a	0.87 ± 0.0^b	3.02 ± 0.07^c
Ácido cafeico	21.95 ± 0.25	----	---
(-)-Epicatequina	---	0.01 ± 0.00	---
Vainillina	---	0.87 ± 0.18	---
Ácido- <i>p</i> -cumárico	30.29 ± 0.06^a	14.41 ± 0.43^b	4.58 ± 0.23^c
Escopoletina	---	1.73 ± 0.05	---
Ácido ferúlico	6.22 ± 0.17^a	$0.01 \pm 0.01^{*b}$	0.76 ± 0.16^c
Rutina	51.61 ± 3.12^a	29.02 ± 0.95^b	22.88 ± 1.50^c
Kaempferol	1.14 ± 0.01	----	---
Ácido-2,4-Dimetoxi-6-metilbenzoico	---	1.11 ± 0.11	---

--- no está presente; *se detectó por debajo de los límites de cuantificación; Media \pm DS (n=3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se realizó un análisis de componentes principales entre los compuestos analizados y la actividad antioxidante para saber la correlación que existía entre dichos parámetros, los resultados se observan en el Cuadro 17 (ver anexos). Los valores cercanos a 1 indican que hay una alta correlación entre dichos parámetros, tal es el caso de DPPH que tuvo una buena correlación con el ácido vanílico 0.9409, ácido cafeico 0.9370, Escopoletina 0.9370, rutina 0.9364 y ácido-2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico 0.9374. FRAP tuvo una alta correlación con ácido vanílico 0.9333, ácido 4-hidroxibenzoico 0.9999, (-)-epicatequina 0.9104, kaempferol 0.9999, ácido-*p*-cumárico y quercetina 0.9999. ABTS presentó una

alta correlación con ácido vanílico 0.9055, ácido cafeico 0.9658, escopoletina 0.9658, ácido ferúlico 0.9658, rutina 0.9651 y ácido-2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico 0.9652. Por otro lado el poder reductor se relacionó con 7 compuestos fenólicos entre los que destaca escopolina 0.9589, (-)-epicatequina 0.9462 y ácido-*p*-cumárico 0.9252. Por último polifenoles totales se correlacionó con el ácido vanílico 0.9900, ácido 4-hidroxibenzoico 0.9701, kaempferol 0.9701 y quercetina 0.9701. Los compuestos presentes en los extractos de pulpa y semilla de crucetillo presentaron una buena correlación con las diferentes pruebas de actividad antioxidante.

Cuadro 17. Análisis de componentes principales entre actividad antioxidante y compuestos fenólicos bioactivos identificados.

	% de Inhibición	FRAP	ABTS	IC ₅₀	Poder reductor	Polifenoles totales
Ácido vanílico	0.94097177	0.93336491	0.90551503	0.42307399	0.43935377	0.99096069
Escopolina	0.16718373	0.50381659	-0.2598582	0.96391531	0.95893707	0.27525331
Ácido clorogénico	0.78876433	0.22935667	0.84078095	0.50349042	0.48812143	0.45794456
Ácido cafeico	0.93709289	0.49598898	0.96585782	0.25136918	0.23380618	0.69469356
Ácido 4-hidroxibenzoico	0.77024348	0.99999023	0.70634307	0.71246841	0.72505942	0.9701999
(-)-Epicatequina	0.43367459	0.91045548	0.34634691	0.94023945	0.94624649	0.78040904
Escopoletina	0.93709706	0.49599119	0.96586212	-0.2513703	0.23380722	0.69469665
Ácido ferúlico	0.93546884	0.49512939	0.96418392	0.25093353	0.23340097	-0.6934896
Rutina	0.93645445	0.49565106	0.96519978	0.25119792	0.23364689	0.69422026
Kaempferol	0.77024348	0.99999023	0.70634307	0.71246841	0.72505942	0.9701999
Ácido- <i>p</i> -cumárico	0.47120603	0.92711921	0.38550354	0.92520479	0.93192522	0.80607474
Ácido-2,4-Dimetoxi-6-metilbenzoico	0.93742939	0.49616708	0.96620465	0.25145944	0.23389013	0.69494301
Quercetina	0.77024348	0.99999023	0.70634307	0.71246841	0.72505942	0.9701999

10.2.4 Evaluación propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas.

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del aceite de la semilla de crucetillo. Los resultados se pueden observar en el Cuadro 18. El aceite extraído fue inodoro y presentó un color amarillo transparente y brillante (Fig. 7) que se puede corroborar con el valor positivo del parámetro b^* de color que fue de 1.88. Este color amarillo intenso se podría deber a el contenido de β -caroteno 224.32 mg/100 g. Los carotenoides son pigmentos beneficiosos para la salud debido principalmente a que actúan como antioxidantes, estos son inactivadores eficientes de oxígeno molecular singlete y eliminadores de radicales libres peroxilo (Aust *et al.*, 2001) además ayudan a prevenir enfermedades como el cáncer, cardiovasculares y otras enfermedades crónicas (Rao y Rao, 2007; Krinsky y Johnson, 2005)

Como se puede observar se obtuvo un índice de peróxidos de 0.08 meq O_2 / kg comparado con lo permitido según la norma para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales Codex Stan 19-1981 que permite un valor de ≥ 10 Miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite (CODEX STAN-19, 1981), el valor obtenido se encuentra dentro del rango de lo permitido. Esto indica que el aceite no ha sufrido oxidación ya que según Heredia (2014) dicho índice nos indica el grado de oxidación del aceite, y por tanto indica su estado de conservación ya que los peróxidos son los primeros productos de la oxidación de las grasas y su formación coincide con la cantidad de oxígeno que se absorbe. Lo antes mencionado se puede corroborar con el índice de acidez obtenido 1.99 mg de KOH/g que se encuentra dentro de lo permitido por el Codex Alimentarius en su norma general para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales que establece un valor de no más de 4 mg de KOH/g de grasa o aceites vírgenes (Codex Stan, 19-1981). El índice de acidez da una medida del grado de descomposición del aceite por acción de lipasas y por ende de la rancidez (Bolaños *et al.*, 2003). El aceite de las semillas de crucetillo no presenta rancidez de acuerdo a los valores antes mencionados.

Se halló un índice de refracción 1.4660 que se encuentra dentro de los valores reportados para aceites comestibles vegetales tales como: aceite de oliva (1.4690) y algodón (1.4670) entre otros (Bailey, 1961). El índice de refracción a menudo se utiliza como criterio en la detección de pureza de aceites extraídos así como de la oxidación de

lípidos. Este índice aumenta a medida que aumenta la longitud de cadena (aunque la relación no es lineal) y el contenido de ácidos grasos no saturados (Malek, 2001)

El índice de Wijs (112.45 g/100 g) indica que es un aceite insaturado ya que este índice es una medida del número de dobles enlaces presentes en un aceite (Gharby *et al.*, 2015) esto se puede observar en el perfil de ácidos grasos en el cual se encontró que este aceite tiene un 73.8% de ácidos grasos insaturados (Cuadro 23).

El método de extracción influye en la estabilidad oxidativa de los aceites (Samaram *et al.*, 2014), el aceite estudiado en el presente trabajo se obtuvo bajo condiciones adecuadas de extracción esto se puede observar en los coeficientes de extinción que presentó K_{232} 0.001 y K_{270} 0.028, ya que dichos coeficientes nos permiten conocer el grado de alteración sufrido por el aceite durante el proceso al que ha sido sometido ya sea de temperatura o refinado (Paz y Molero, 2000).

Cuadro 18. Propiedades fisicoquímicas del aceite extraído de la semilla.

Propiedad	Media \pm DS; n=3.
Color	
L*	37.54 \pm 0.03
a*	-0.62 \pm 0.45
b*	1.41 \pm 0.04
Ángulo matiz	-53.80 \pm 2.81
Saturación	0.77 \pm 0.02
Tristimulus values	
X	1.07 \pm 0.02
Y	0.06 \pm 0.01
Z	1.41 \pm 0.02
Índice de oscurecimiento	-5.21 \pm 0.33
Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg de grasa)	0.08 \pm 0.01
% de ácidos grasos libres como ácido oleico	8.87 \pm 0.50
Índice de acidez (mg de KOH/ g)	1.99 \pm 0.03
Índice de Wijs (g/ 100 g)	112.45 \pm 0.72
Índice de saponificación (mg/ g)	1.44 \pm 0.00
Índice de refracción	1.4660 \pm 0.00
Densidad (25 °C, g/ mL)	0.87 \pm 0.00
Viscosidad (25 °C, cP)	354.00 \pm 36.08
Humedad (%)	3.55 \pm 0.25
Coeficientes de extinción	
K_{232}	0.001 \pm 0.00
K_{270}	0.028 \pm 0.00
β -caroteno (mg/100 g).....	224.32 \pm 0.30

10.2.5 Perfil de ácidos grasos

La composición y distribución de ácidos grasos determina la calidad de un aceite, el valor nutricional, sabor, estabilidad oxidativa, punto de fusión y la forma de cristalización (Yadav., 1996), por lo cual se realizó la determinación del perfil de ácidos grasos, los resultados se muestran en el Cuadro 19. El ácido poliinsaturado predominante fue el ácido linoléico 46.56%. El ácido linoléico es un graso esencial ya que no puede ser sintetizado por el organismo de los mamíferos con funciones tales como ser regulador metabólico en los sistemas cardiovascular, pulmonar, inmune, secretor y reproductor, el ser imprescindible para preservar la funcionalidad de las membranas celulares y porque participa en los procesos de transcripción genética (Carrillo *et al.*, 2011). El segundo ácido más abundante fue el ácido oleico 26.12%, es un ácido no saturado importante que pertenece al grupo omega 9. Los porcentajes de ácido oleico y linoléico del aceite de semilla de crucetillo mostraron un comportamiento inverso a los porcentajes de un aceite de consumo habitual como el aceite de soya que posee un 22.2% ácido linoléico y 52.5% de ácido oleico (Espitia-Baena *et al.*, 2011). Los ácidos grasos saturados tales como ácido palmítico, esteárico, y araquídico representaron el 21.70%, 4.83%, 0.69% de la fracción lipídica respectivamente. El ácido esteárico es un ácido graso que no aumenta el colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL) (FAO/OMS, 1997). Se encontraron en trazas ácido mirístico, palmitoleico y pentadecílico. Los ácidos grasos insaturados exhiben efectos benéficos sobre la salud humana como la prevención de la arterosclerosis, la reducción del colesterol malo en sangre (LDL), disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma y la supresión de procesos inflamatorios (Bahrami, 2009), también ayudan a disminuir el riesgo a desarrollar ciertos tipos de cáncer incluyendo cáncer de colon, mama y próstata (Lunn y Theobald, 2006).

Cuadro 19. Perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de crucetillo.

No.	Tiempo de Retención	Compuesto	No. C: No. Insaturaciones	Area Relativa (%)
1	13.209	Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	C16:0	21.78
2	16.336	Ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoléico)	C18:2	46.56
3	16.419	Ácido (z)-9-octadecenoico (ácido oleico)	C18:1	26.12
4	16.917	Ácido octadecanoico (ácido esteárico)	C18:0	4.83
5	23.185	Ácido eicosanoico (ácido araquídico)	C:20:0	0.69

Los ácidos grasos en la dieta más comunes han sido subdivididos en tres grupos según el grado de insaturación: ácidos grasos saturados (AGS) no poseen dobles enlaces, los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) poseen un doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) poseen dos o más enlaces (FAO/OMS, 1997). El aceite de la semilla de *R. monantha* presentó un 27.31% de AGS, 26.12% de AGMI y 46.56% de AGP (Cuadro 20), encontrando una relación ácidos grasos saturados e insaturados de 3:1

Cuadro 20. Subdivisión de los ácidos grasos presentes en el aceite de las semillas de crucetillo.

Tipo de ácido graso	%
Ácido grasos saturados	27.31
Ácidos grasos monoinsaturados	26.12
Ácidos grasos poliinsaturados	46.56
Total	100

11 CONCLUSIONES

Este trabajo contribuye al conocimiento físico, fisicoquímico, fitoquímico y biológico de una especie vegetal del género *Randia*, la cual es endémica del estado de Veracruz con gran importancia alimentaria y medicinal.

Con base a la exhaustiva revisión bibliográfica realizada sobre la especie vegetal *R. monantha*, este es el primer estudio realizado sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de su fruto.

El fruto contiene en promedio 240 semillas que representan el 53.59% del peso, la pulpa es de color negro brillante y es rica en vitamina C.

La semilla posee un alto contenido de fibra y minerales.

Los extractos acuosos de pulpa y semilla fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante, así como mayor contenido total de fenoles, seguido de los extractos etanólicos y por último los extractos metanólicos, respectivamente.

Se identificaron y cuantificaron 13 compuestos fenólicos de amplia distribución en la naturaleza en los diferentes extractos estudiados.

Los compuestos con mayor concentración en pulpa y semilla fueron ácido clorogénico, escopolina, escopoletina, ácido vanílico y ácido cafeico, ácido-4-cumárico, rutina, respectivamente.

La presencia de los compuestos fenólicos identificados pudiera estar asociada a las propiedades antioxidantes descritas en este trabajo y a las propiedades medicinales que se le atribuyen al crucetillo.

Los extractos acuso, etanólico y metanólico de la pulpa no presentaron actividad antimicrobiana contra *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria* y *Staphylococcus* a las concentraciones utilizadas en este trabajo.

El aceite de la semilla presentó un color amarillo brillante con un alto contenido de carotenos, además este aceite es rico en ácido linoleico y ácido oleico y presentó una proporción de acidos grasos insaturados: ácidos grasos saturados de 3:1.

Debido a su actividad antioxidante y al contenido de fenóles el fruto de crucetillo podría ser considerado un potencial agente nutracéutico.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman R. G., 2008b.** Fatty acids in fish and shellfish. In Chow, C. K. Ed. Fatty in Foods and Their Health Implications, CRC Press, London, UK, 155-185.
- Alasalvar C., J. M. Grigor, D. Zhang, P. C. Quantick y F. Shahidi, 2001.** Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3):1410-1416.
- Arlorio M., M. Locatelli, F. Travaglia, J. D. Coisson, E. Del Grosso, A. Minassi, G. Appendino y A. Martelli, 2008.** Roasting impact on the contents of clovamide (*N*-caffeoil-*L* DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Treobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 106: 967-975.
- AOAC, 1995.** Official Methods of Analysis of a AOAC International, 16 th edition, USA, Association of analytical Communities.
- Arrieta J. A., M. U. Banquero y J. L. Barrera, 2006.** Caracterización fisicoquímica del proceso de maduración del platano Papocho (*Musa ABB Simmonds*). *Agronomía Colombiana*, 24(1): 48-53.
- Aust O., S. H. Sies, W. Stahl y M. C. Polidori, 2001.** Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 936 (1-2): 83-93.
- Apak R., S. Gorinstein, V. Böhm, K.M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, 2013.** Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry*, 85 (2013), pp. 957–998.
- Arnao B. M., A. Cano, M. Acosta, 2001.** The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73:239-244.

- Awika M. J., W.L. Rooney, X Wu, L. R. Prior, L. Cisneros-Zevallos, 2003.** Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 (23): 6657-6662.
- Ayres G., 1970.** Análisis químico cuantitativo 2ª edición, Ed. Harla, México gr. 740 p.
- Badui D. S., 2006.** Química de alimentos. Cuarta edición. Ed. Pearson Educación, México v. gr. 736 p.
- Bahrami g., 2009.** Trans and other fatty effects acids: effects on endothelial functions. In In: Watsosn R (ed) Fatty acids in health promotion and disease causation. AOCS Press, Urbana: 3-43.
- Bailey A. E., 1961.** Aceites y grasas industriales. España, Edición Barcelona 1961, v. gr. 746 p.
- Balouri M., Sadiki M., Koraichi I.S., 2016.** Methods for in vitro evaluation antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79.
- Bello J. G., 2006.** Ciencia Bromatológica; Principios Generales de los Alimentos, Edit Díaz de Santos S. A. Madrid, v. gr. 596.
- Benzie I. I. F. y J.J. Strain, 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1): 70-76.
- Bligh E. G. y W. J. Dyer, 1959.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.
- Bozin B. N., I. Mimica-Dukic, I. Samojik y E. Jovi, 2007.** Antimicrobial and antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinales L. and Salvia oficinales L. Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55: 7879-7885.

- Bolaños de la Torre S. A. A., T Henderson, N. P. Singh y K. R. Owusu-Apenten R, 2015.** A universal calibrated microplate ferric Reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food chemistry* 174:119- 123.
- Borhidi A. y P. N. Diego, 2004.** El género *Randia L. (Rubiaceae, Gardenieae)* en la flora del estado de Guerrero (México). *Acta Botánica Hungría*, 46 (1-2): 41-53.
- Brand-Williams W., M. E. Cuvelier y C. Berset, 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28 (1): 25-30.
- Budryn G., D. Zaczynska y J. Oracz, 2016.** Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. *LWT-Food Science and Technology*, (73) 197-204.
- Buera M. P., R. D. Lozano y C. Petriella, 1986.** Definition of color in the non enzymatic browning process. *Die. Farbe*, 32: 318-322.
- Cano-Campos M. C., S. P. Díaz-Camacho, M. J. Uribe-Beltrán, G. López-Angulo, J. Montes-Ávila, O. Paredes-López y F. Delgado-Vargas, 2011.** Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extract from the fruit of *Randia echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene. *Food Research International*, (44) 2087-3093.
- Carrillo F. L., S. J. Dalmau, Á. J.R. Martínez, A. R. Sola y J. F Pérez, 2011.** Grasas de la dieta y salud cardiovascular. *Atención Primaria*, 43(3): 157e1- 157e16.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica, 2017.** PubChem Base de Datos de Compuesto, (Disponible en línea en: CID=5280805, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805>) (visitada Abr 12, 2017)
- Chan K.W., S. Iqbal, N. M. H. Khong y A. S. Babji, 2011.** Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (25): 6067-6075.

- Christie, W. W. 2003.** Lipid analysis. Isolation, separation, Identification and structural analysis of lipids. 3 Edition, The Oily Press, Bridgwater, U. K.
- Christie, W. W. 2008.** Preparation of lipid extracts from tissues. In The Lipid Library (Accessed on May 7, 2015 as: <http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/extract2/index.htm>).
- Codex Alimentarius. Norma general Del Codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales Codex Stam 19-1981,** disponible en: www.fao.org/input/download/standards/74/CXS_019s_2015.pdf
- Correa G. J., D. Ortiz, E. J. Larrahondo, M. M. Sánchez y H. Pachón, 2012.** Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.) una revisión bibliográfica. Boletín Latinoamericano y del Criba de Plantas Medicinales y Aromáticas, 11: 111-126.
- Cuevas- Juárez E., Y. K. Yuriar-Arredondo, F. J. Pío León, J. Montes-Ávila, G. López-Angulo, P. S. Díaz- Camacho y F. Delgado-Vargas, 2014.** Antioxidant and a-glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. Journal of Functional Foods, (9) 78-88.
- Crozier A., I.B. Jaganath y N. M. Clifford, 2009.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural Product Reports, 8: 10001-1043.
- Cruz-Silva B. da S. C., M. Romero, B. J. A. Maior, S. K. Santos y J. Ludwig, 2016.** Antifungal potential of extracts and fractions of *Randia nítida* leaves on soybean pathogens and their phytochemistry. Revista Caatinga, v. 29, n. 3 p. 594-602.
- Danjuma N. M., B. A. Chindo, I. Abdu-Aguye, J. A. Anuka y I. M. Hussaini, 2014.** Psychopharmacological properties of saponins from *Randia nilotica* stem bark. Pharmaceutical Biology, 52(1):1-7.
- Dastmalchi K., H. J. G. Dormán, P. P. Oinonen, Y. Darwis, I. Laakso y R. Hiltunen, 2008.** Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT-Food Science and Technology 41: 391-400.

Davidsohn Y. y J. B. Henry, 1990. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat, Barcelona, España *v gr.* 445-490.

Diario oficial de la federación. Norma Mexicana, NMX-F-503-SCFI-2011 Industria azucarera y alcoholera. Determinación de fierro en muestras de azúcares, 18 de Junio de 2012.

Diario oficial de la federación. Norma Oficial Mexicana. NOM-131-SSA 1-1995. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca disposiciones y especificaciones sanitarias, 21 de febrero de 1996.

Domínguez, X. A., 1973. Métodos de investigación fitoquímica. México. Edit. Limusa, *v. gr.*, 181 p.

Durand-Hulak M., A. Dugrand, T. Duval, L. P.R Bidel, C. Jay-Allemand, Y. Froelicher; F. Bourgaud y A. L. Fanciullino, 2015. Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in citrus species using a UPLC–MS approach. *Annals of Botany.* 115: 861–877.

Dutcher R.A., C.O. Jensen y P. M. Althouse, 1954. Fundamentos de bioquímica agrícola Ed. Salvat, Barcelona, España, *v. gr.* 475.

Echavarría Z. B., S. A. Francos y M. A. Martínez, 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macro algas del caribe colombiano. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica,* (16):126-131.

Egan H., RS Kirk y R. Sawyer, 1981. *Pearson's chemical analysis of foods.* 8ª Edit., Churchill Livingstone, Edimburgo, Reino Unido, *v. gr* 591 p.

Egan H. Egan, H. RS Kirk y R. Sawyer, 1993. Análisis químico de alimentos de Pearson Ed. Compañía Editorial Continental, México, *v. gr* 586 p.

- Enquist J., J. Brian y J. J. Sullivan, 2001.** Vegetative key and descriptions of tree species of the tropical dry forests of upland. Sector Santa Rosa, Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica. Edit. JJS. Costa Rica, v. gr. 68 p
- Espitia-Baena E.J, H. R. Duran-Sandoval, J. Fandiño-Franky, F. Dáz-Castillo y H. A. Gómez-Estrada, 2011.** Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16 (4)
- FAO / OMS. CODEX Stan 19-1981, 1999.** Norma del Codex para Grasas y Aceites Comestibles No Regulados por Normas Individuales, Codex Alimentarius Official Standards, Canadá.
- FAO/OMS, 1997.** Gasas y aceites en la nutrición humana: Consulta FAO/OMS de expertos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Organización Mundial de la Salud, v. gr 168.
- Folin C. y V. Ciocalteu, 1927.** Tyrosine and tryptofhan determination in proteins. Journal Biology Chemistry, 73: 627-650.
- Gallardo C. C., B. G. Guevara, R. E. Morales, Y. T. Jiménez, F. O. Gutiérrez y S. N. Jiménez, 2012.** Estudio etnobotánico de *Randia aculeata* en Jamapa, Veracruz, México y su efecto en ratas contra veneno de serpientes. El Diario de Animales Venenosos y las Toxinas Incluyendo Enfermedades Tropicales 3(18): 287-294.
- Ghante H. M., P. K. Bhushari, J. N. Duragkar, S. N. Jain, S. A. Warokar, D. N. M. Bronch, B. A. Chindo, I. Abdu-Aguye, J. A. Anuka; I. M. Y Hussaini, 2014.,** Psychopharmacological properties of saponins from *Randia nilotica* stem bark. Pharmaceutical Biology, (1): 1-7.
- Gharby S., H. Harnar, D. Guillaume, D. Raudini, A. Boulbaroud, S. Ibrahimi, M. Ahmad, M. Sultana, S. Ben Hadda, T. Chafchaouni-Moussaoui y Z. Charrouf, 2015.** Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed Oil Prouced in Morocco J. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 14(2): 172-177.

- Gil H. A., 2010.** Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos, 2ª edición. Ed Médica Panamericana. España, v. gr. 812.
- Goupy P., C. Dufour, M. Loonis y O. Dangles, 2003.** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary Polyphenols to the DPPH radical. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(3):615-622.
- Gómez-Polo C., M. M. Portillo, L. M. C Lorenzo, V. Purificación, G. Purificación y C. A. M. Martín, 2016.** Comparison of the CIELab and CIEDE2000 color difference formulas. The Journal of Prosthetic Dentistry, 65-70.
- Gonca B., E. E. Kemal, B. Halil, K. Hamit y H. B. Ismail, 2016.** Ash analysis of fluor simple by using- induced breakdoen spectroscopy. Spectrochimica Acta Part B, 124:74-78.
- Grupo Mesófilo A. C, 2006.** Subproyecto: Delimitación e Inventarios para Conservación de Vegetación de Bosques Mesófilo y de Encino. México v. gr. 59.
- Guil –guerrero J. L., L. Ramos, C. Moreno, J. C. Zúñiga-Paredes, M. Carlosama-Yopez, P. Ruales, 2016.** Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the Tropics. Livestock Science, 189:32-49.
- Guo-Ying Z., W. Chun-Juan, H. Jun, L. Yu-Qing y W. Gen-Chun, 2016.** Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Phytomedicine, 23:1814-1820.
- Harbone J. B., 1989.** General procedures and measurements of total phenolics. In: Harbone J. B. Edit. Plants phenolics, vol. 1, from Methods in plan Biochemistry series: Academic Press, London: 1-28.
- Horwitz W., 1980.** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13ª ed., Ed. Publishing by the AOAC. Washington, D. C.
- Hart F. y H. Fisher, 1991.** *Análisis moderno de los alimentos*. Edit. Acribia; Zaragoza, España.

Ignat I., I. Volf y I. V. Popa, 2011. A critical review of Methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126 (4): 1821-1835.

Instituto de Biología. "Randia monantha Benth. - IBUNAM: MEXU: PV1256742". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2015-8-3. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV1256742>

Ismail H. I., K. W. Chan, A. A. Mariod y M. Ismail, 2010. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119 (2): 643-647.

Jacobo I. N., 2009. Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca, Ed. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, v. gr. 312.

Jacota S. K. y H. M. Dani, 1982. A new colorimetric technique for the stimation of vitamin C using Folin Fhenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 127 (1): 178-182.

Kalacskaa M., G.A. Sanchez-Azofeifaa, J.C. Calvo-Alvaradob, M. Quesadac, B. Rivarda y D.H. Janzend, 2004. Species composition, similarity and diversity in three successional stages of a seasonally dry tropical forest. *Forest Ecology and Management*, 200: 227–247.-

Kandimalla R., S. Kalita, B. Saikia, B. Choudhury, P. Y. Singh, K. Kalita, S. Dash y J. Kotoky, 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentiality of *Randia dumetorum* Lam. Leaf and Bark via inhibition of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Frontiers in pharmacology*, (7).

Kirk R. S. y R. Sawyer, 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson. Segunda edición. Editorial CECSA. México, v. gr. 777 p.

Krinsky I. N. y J. E. Johnson, 2005. Carotenoid actions and their relation to health and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6): 459-516.

- Kuskoski E. M., G. A. Asuero y M. A. Troncoso, 2005.** Determinación de capacidad antioxidante de pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Campinas, 25(4):726-732).
- Lazze M. C., R. Pizzala, M. Savio, L. A. Stivala, E. Prospero y L. Bianchi, 2013.** Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 535: 103-115.
- Lees R., 1994.** Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad, 3 ed. Edit. Acirbia Zaragoza, España v. gr 287.
- Li L., P. H. J. Zhao, J. Liu, Y. Li, Z. Wang, Y. Xia, Y. Dai y L. Chen, 2016.** Simultaneous determination of umbelliferone and scopoletin in Tibetan medicine *Saussurea laniceps* and traditional Chinese medicine *Radix angelicae pubescentis* using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (93) 300-307.
- Lu N., Y. Ding, Z. Yang y P. Gao, 2016.** Effects of rutin on the redox reactions of hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, (89) 175-180.
- Luceri C, F. Guglielmi, M. Lodovici, L. Giannini, L. Messerini y P. Dolara, 2004.** Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39 (11):1128-1133.
- Lunn J. y H. E. Theobald, 2006.** The health effects of dietary unsaturated fatty acids. British Nutrition Foundation *Nutrition Bulletin*, 31: 178-224
- Lynch M. L., 1987.** Métodos de laboratorio 2a. edición., Ed. Nueva Editorial Interamericana. México, v. gr. 415-417 p.
- Malek F., 2001.** Characteristics and processing of edible vegetable oil and fats. Farhang & Qalam Publications, Tehran-Iran.

- Martínez C. D., T. Terrazas, H. Ochoterena y M. A. Torres, 2015.** Madera y corteza de algunas *Rubiaceae* en México: similitud estructural. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86: 59-71.
- Martínez-Valverde. I., P. M. Jesús y G. Ros, 2000.** Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50 (1): 5-19.
- Medina L. A. 2010.** Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta*, 27-34.
- Meloan C. E. y Y. Pomeranzs, 1978.** *Food analysis: Theory and practice*. Edit. AVI. Inc. Westport. Connecticut. v. gr.778 p.
- Méndez V. L. M. y M. del R. M. Hernández, 2009.** Evaluación de la toxicidad del fruto de *Randia monantha* Benth. *Revista Médica UV*, 9 (1): 42-45.
- Mendoza H. J., De S. A. Rodríguez y C. P. Millán, 2012.** Caracterización fisicoquímica de la Uchuva (*Physalis peruviana*) en la región de Silvia Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2); 188-196.
- Mohammed A. Y. A., M. Haile, C. Zhou, A. Y. Abu El Gasim, O. A. Ali, E. T. Haroon, W. Asif, 2016.** Postharvest physicochemical properties of the pulp and oil from *Annona squamosa* L. (Gishta) fruit grown in Darfur region, Sudan. *Arabian Journal of Chemistry*. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.07.008>.
- Mohsenin N., 1978.** *Physical properties of plant animal material*. Ed. Gordon and Breach Science Publishers. New York v. gr. 790 p
- Morillas-Ruíz J. M. y J. M. Delgado-Alarcón, 2012.** Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutrición Clínica Dietética y Hospitalaria*, 32(2): 8-20.
- NMX-F-152-SCFI-2011.** Alimentos-aceites y grasas vegetales o animales- Determinación de índice de yodo por el método ciclohexano método de prueba. Disponible en:

<http://aniame.com/mx/wp-content/uploads/Normatividad/CTNNIAGS/NMX-F-152-SCFI-2011.pdf>.

Mehlenbacher V. C., 1970. Análisis de grasas y aceites. Enciclopedia de la química industrial. Tomo VI Ed. Urmo, Bilbao, España v. gr. 637 p.

Mora C. A., E. Galeano y E. Osorio, 2012. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia I. Univesidad de Antioquia, Medellín Colombia.

Mustafa G., B. A. Adem, A. Tark, M. S. Halil, O. Adile, S. Osman, S. Ibrahim, K. Yildiray, S., Coskun, D. Mustafa y C. Murat, 2015. Neuroprotective effect of p-cumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 18(4):356-363.

Noorani A. A. y K. K. Mohan, 2012. Pretreatment of Albino rats with methanolic fruit extract of *Randia dumetorum* (L.) protects against alcohol induced liver damage. Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 16: 125-130.

Noubigh A. y A. Akrmí, 2016. Temperature dependent solubility of vanillic acid in aqueous methanol mixtures: Measurements and thermodynamic modeling. Journal of Molecular Liquids, 220: 277-282.

Okechukwu O. D., E. L. Nwanneka, U. C. Nonso, A. S. Ogechukwu y M. M. Chukwudi, 2016. Optimization of biodiesel production from refined cotton seed oil and its characterization. Egyptian Journal of Petroleum, 26: 103-110.

Pan X., L. Du, J. Tao, S. Jinhua, D. Qian, D. Jinao, 2017. Dynamic changes of flavonoids in *Abelmoschus manihot* different organs at different growth periods by UPLC-MS-MS. Journal of Chromatography B, 1059 (1): 21-26.

Payal R. B, J. J Ananda, D. V. Pinjari, P. R. Nemade y R. D. Jain, 2015. Solvent assisted of oil from *Moringa oleifera* Lam seeds. Industrial Crops Products, 82:74-80.

- Paz I. A. y M. M. Molero, 2000.** Aplicación de la espectrofotometría UV-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. *Grasas y Aceites* 51(6): 424-428.
- Pérez, T. G., 2003.** Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana Investigaciones Biomédicas*, 22(1): 48-57.
- Pérez J. J. y Saura C. F., 2006.** Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39:791-800.
- Pieroni A., 2000.** Medicinal Plants and Food medicines in the folk traditions of the upper Lucca province. *Italy Journal Ethnopharmacol.* 20: 235- 273.
- Potter N. N., 1995.** La ciencia de los alimentos Ed. Harla, v. gr. 487-508 p.
- Rao A. V. y L. G. Rao, 2001.** Carotenoids and human health. *Faharmacological Research*, 55 (3): 207-216.
- Re R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M Yang y C. Rice-Evans, 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1231-1237.
- Reyes-Jurado F., E. Palou y A. López-Malo, 2014.** Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8 (1): 68-78.
- Romo de Vivar A., 2006.** Química de la flora mexicana. UNAM, México pp 146- 158.
- Samaram S., H. Mirhosseini, C. P. Tan y G. H. Mohd, 2014.** Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and therma behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Industrial Crops and Products*, 52: 702-708.
- Sawai J. y Y Maekawa, 2002.** Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 29: 296.

- Seynan E., 2004.** Química orgánica estructura y reactividad, Ed. Reverte S. A España, v. gr, 1104-1124 p.
- Siger A., K. Dwiecki, W. Borsyszkowski, M. Turski., M. Rudzinska. y M. Nogala-Kaluca, 2017.** Physicochemical characteristics of the cold-pressed oil obtained from seed of *Fagus sylvatica* L. Food Chemistry, 225: 239-245.
- Singleton V. y J. Rossi, 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture; 144-58.
- Stella R. L y C. D. Marin, 2009.** Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica. 42: 263-268.
- Suárez Alfonso G., Williams-Linera, C. Trejo, J. I. Valdez-Hernández, V. M. Cetina-Alcalá y H. Vibrans, 2012.** Local knowledge helps select species for forest restoration in a tropical dry forest of central Veracruz, Mexico Agroforestry Systems, 85 (1): 35–55.
- Sumczynki D., H. Kotásková y M. Jirí, 2006.** Determination of contents and antioxidant activity of free and bound phenolics compounds and “*in vitro*” digestibility of commercial black and red rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Food Chemistry, 211: 339-346
- Suwalsky M. y M. Avello, 2006.** *Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección.* Atenea Concepción Universidad de Chile, 494: 161-172.
- Tiwari B. Mathukumarappan K. O., 2008.** Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (7): 2423-2428.
- Torres R., J. E. Montes, A. O. Pérez y D. R. Andrade, 2013.** Relación del color y del estado de madurez con las propiedades fisicoquímicas de frutas tropicales. Información Tecnológica 24(3): 51-56.
- Tropics.org. Missouri Botanical Garden, 19 January 2017.** Saint Louis, Missouri (Disponible en línea en: <http://www.tropics.org/Name/27906056>).

- Tsao R. y R. Yang, 2003.** Optimization of new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018: 29-40.
- Vanden B. D. A. y A. J. Vlietinck, 1991.** Screening for antibacterial and antiviral agents in Hostettmann. Ed. *Methods in Plant Biochemistry Assay for Bioactivity Academic*. London, vgr 47.
- Wang L., W. Hai-Long, Y. Xiao-Li; H. Yong, G. Hui-Wen y Y. Ru-Qin, 2016.** Simultaneous determination of umbelliferone and scopoletin in Tibetan medicine *Saussurea laniceps* and traditional Chinese medicine *Radix angelicae pubescentis* using excitation emission matrix fluorescence coupled with second order calibration method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 170: 104-110.
- Wink M., 2013.** Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae*). *South African Journal of Botany*, (89)164-175.
- Woods A. E. y L. W. Aurand, 1997.** Laboratory manual in food chemistry Ed. AVI. Inc. Westport, Connecticut, vgr, 27.
- Yadan N., 1996.** Genetic modification of soybean oil quality. In: Verma D, Shoemaker R (eds) *Soybean genetics, molecular Biology, and Biotechnology*. CAB International, Wallingford, vgr, 165-188.
- Yang Z, Z. Tan, F. Li y X. Li, 2016.** An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) Leaves using acidic ionic liquids. *Industrial Crops and Products*, 89: 78-86.
- Yen G. y H. Chen, 1995.** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural of Food Chemistry*; 43: 27-32.
- Yuan R. y W. D. Greene, 2000.** McIntosh apple fruit thinning by benzyladenine in relation to seed number and endogenous cytokinin levels in fruit and leaves. *Scientia Horticulturae*, 86:127-134.

- Zang L., C. Greg, G. Henry, S. Xianglin, C. Vince y V. Val, 2000.** Effect of antioxidant protection by p-cumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 279: C954-C960.
- Zhou H., X. Wang, Z. Huang, J. Gao, Y. Guo, Y. Du, H. Hu, 2016.** Identification of quantitative trait loci for fruit weight, soluble solids content, and plant morphology using an introgression line population of *Solanum pennellii* in a fresh market tomato inbred line. *Horticultural Plant Journal*: 26-34.
- Zizhen Y., T. Zhijian, L. Fenfag y L. Xiangdong, 2016.** An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaves using acidic ionic liquids. *Industrial Crops and Products*; 89: 78-86.
- Zozio S., A. Servent, O. Hubert, A. Hiol, D. Pallet, Mbéguíe-A-Mbéguíe, 2014.** Physicochemical and biochemical characterization of ripening in jujube (*Ziziphus mauritiana Lamk*) fruits from two accessions grown in Guadeloupe. *Scientia Horticulturae*, 175: 290-297.

13. APÉNDICES

Figura 6. Efecto de la concentración en el porcentaje de Inhibición de la captura del radical de DPPH en extracto acuoso, etanólico y metanólico de semilla.

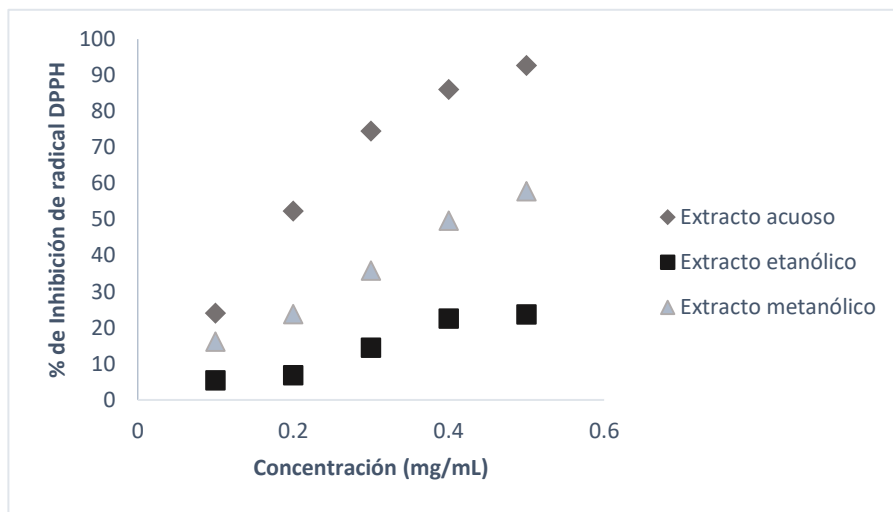
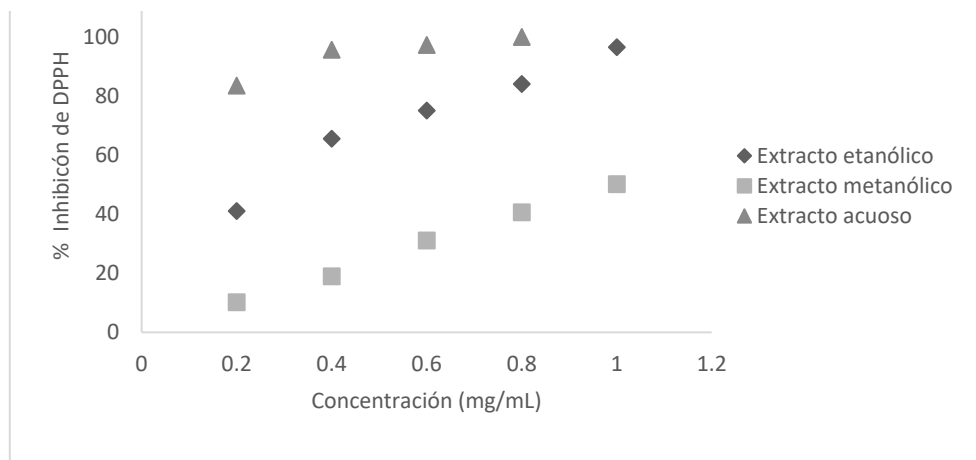


Figura 7. Efecto de la concentración en el porcentaje de Inhibición de la captura del radical de DPPH en los extractos acuoso, etanólico y metanólico de pulpa.



Cuadro 21. Absorbancias de la curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.

[] mg ET/mL	Absorbancia
0.0010	0.1932
0.0009	0.2490
0.0008	0.2837
0.0007	0.3512
0.0006	0.3980
0.0005	0.4451
0.0004	0.4984
0.0003	0.5626
0.0002	0.6232
0.0001	0.6707

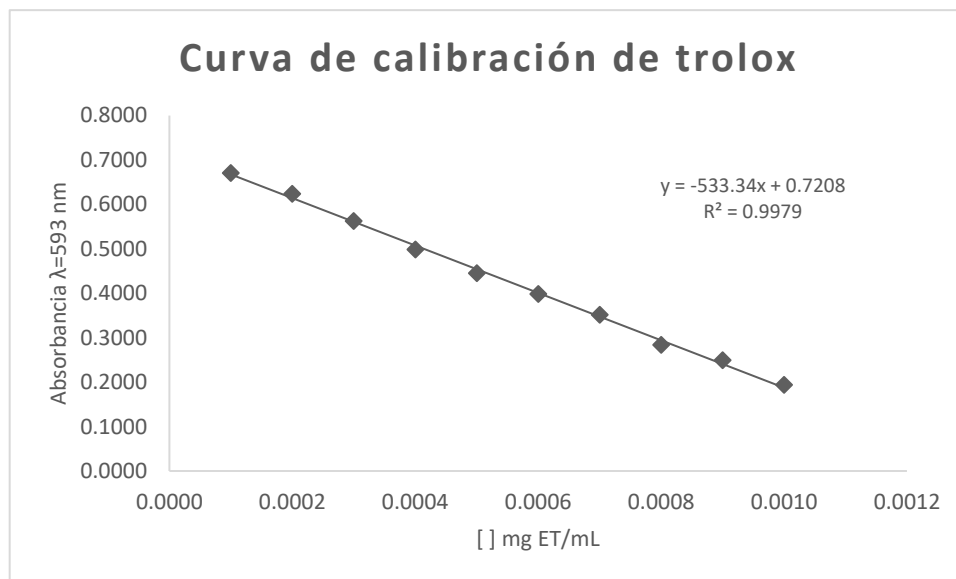


Figura 8. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.

Cuadro 22. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.

[] mg ET/mL	Absorbancia
0.0100	0.0501
0.0300	0.0495
0.0500	0.0489
0.0700	0.0481
0.0900	0.0477

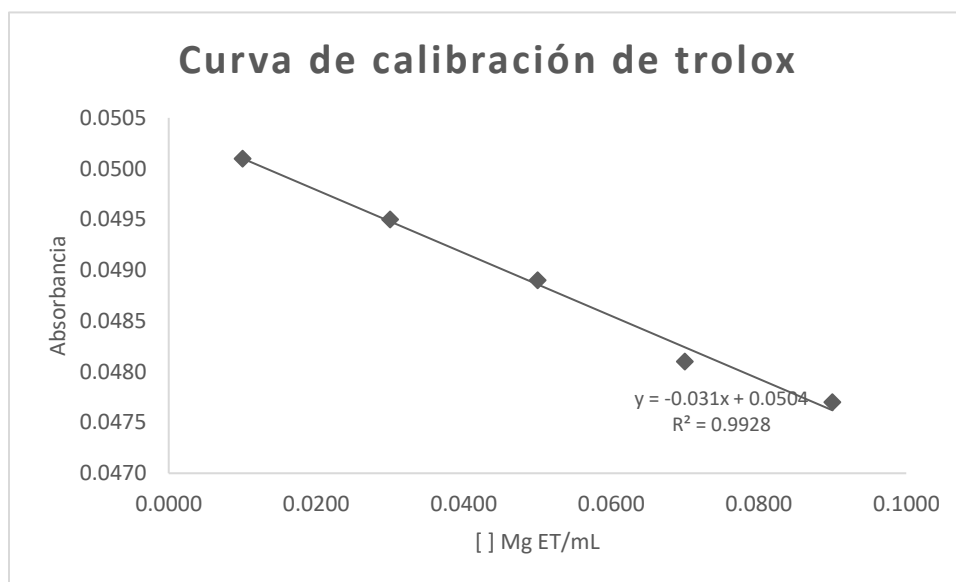


Figura 9. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método ABTS.

Cuadro 23. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.

[] mg ET/mL	Absorbancia
0.0002	0.34265
0.0004	0.43205
0.0006	0.48005
0.0008	0.55375
0.001	0.61145

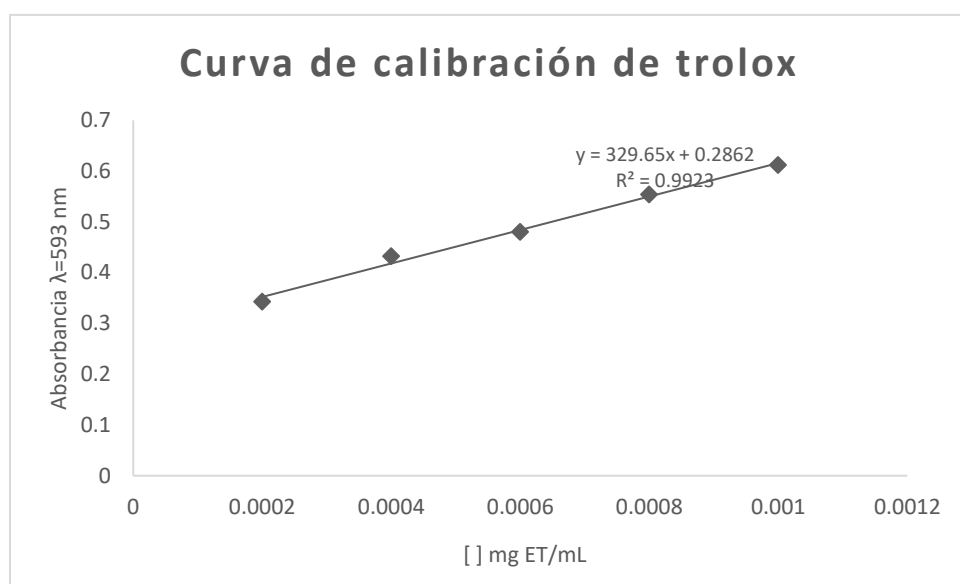


Figura 10. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.

Cuadro 24. Absorbancias curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.

[] mg ET/mL	Absorbancia
0.002	1.01005
0.004	1.68855
0.006	2.3762
0.008	2.98685
0.01	3.3453

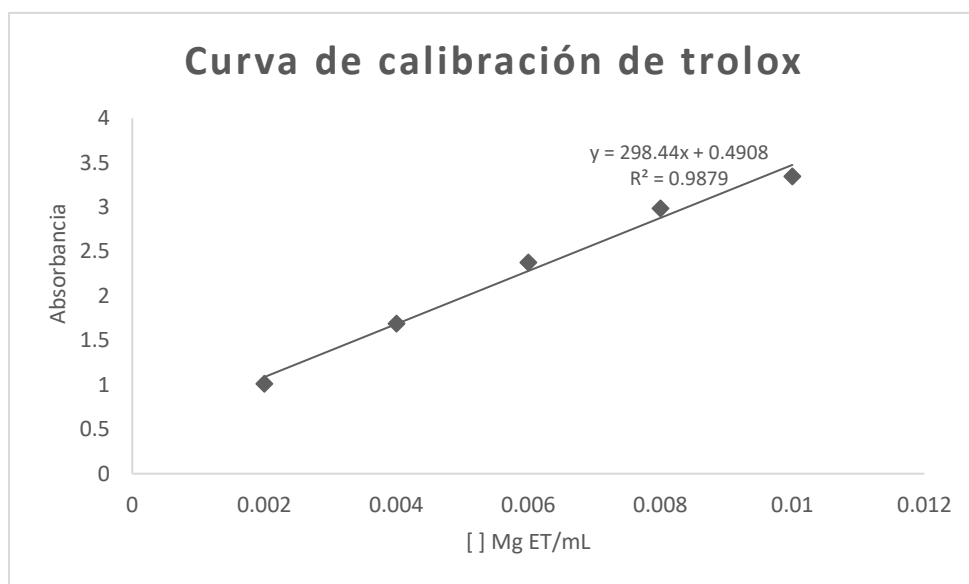


Figura 11. Curva de calibración de Trolox para la determinación de actividad antioxidante mediante el método FRAP.

Cuadro 25. Absorbancias de la curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.

[] mg EQ ácido gálico/mL	Absorbancia
0.003	0.0268
0.009	0.0876
0.015	0.1248
0.018	0.1735
0.021	0.2523
0.03	0.3778
0.09	0.9377
0.15	1.6951
0.18	1.9675
0.21	2.2292

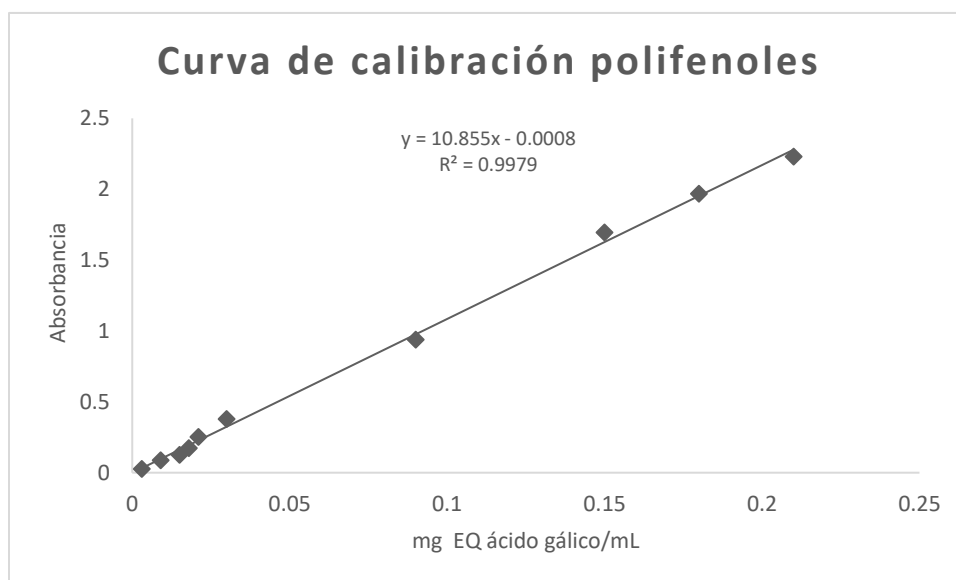


Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles totales.

Cuadro 26. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de vitamina C.

Concentración de ácido ascórbico (mg/mL)	Absorbancia a 760 nm
1	0.0072
2	0.0393
3	0.064
4	0.093
5	0.1354

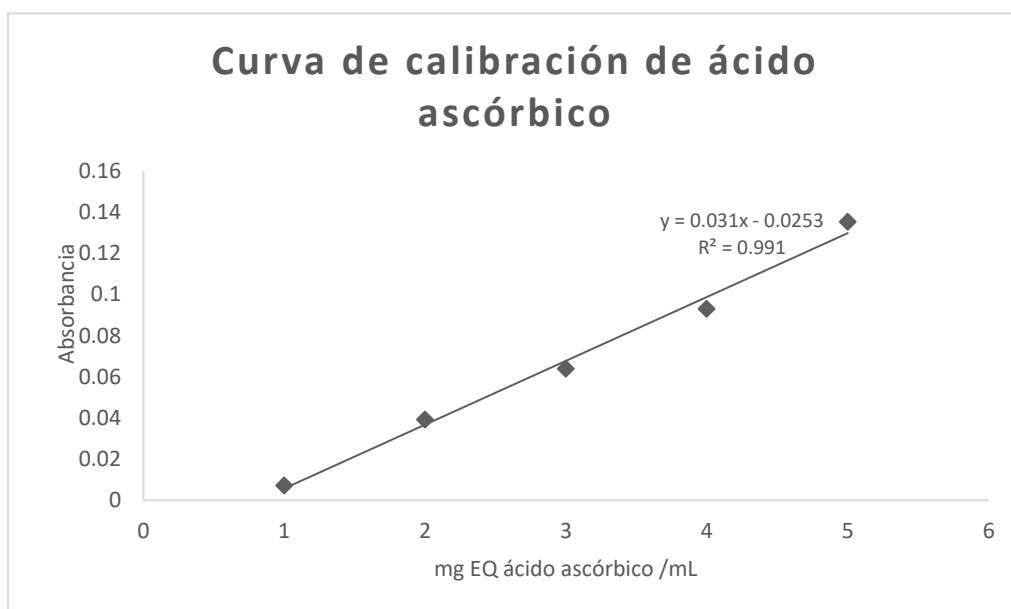


Figura 13. Curva de calibración de ácido ascórbico para la determinación de vitamina C.

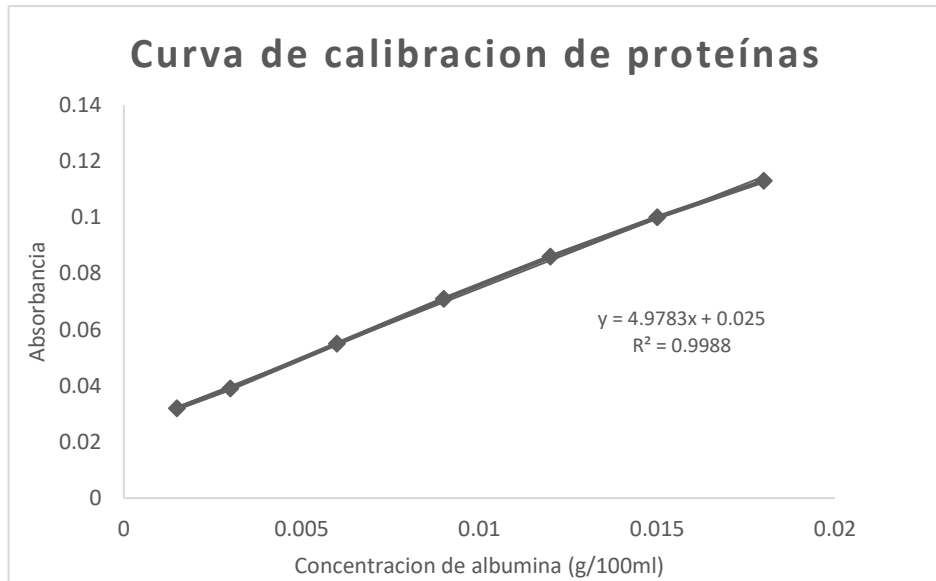


Figura 14. Curva de calibración de albumina para la determinación de proteínas por el método Biuret.

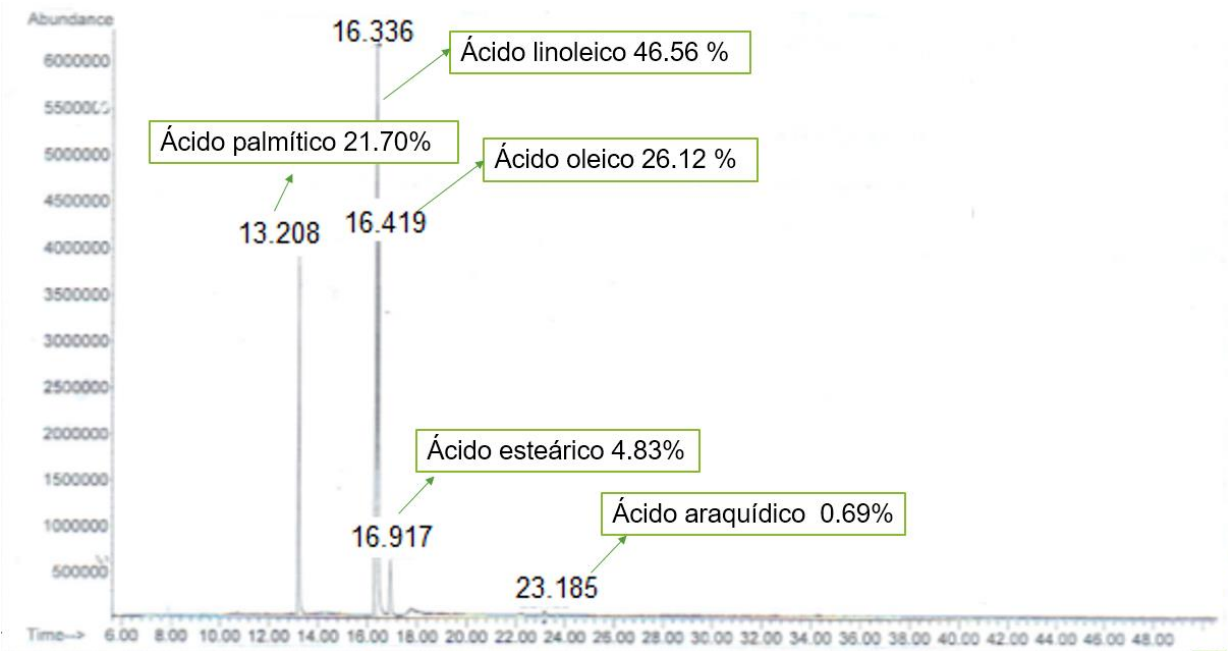


Figura 15. Cromatograma de perfil de ácidos grasos de aceite.

Cuadro 27. Matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos

	Compuesto Ácido vanílico	Compuesto Escopolina	Compuesto Ácido clorogénico	Compuesto Ácido cafeico	Compuesto Ácido 4- hidroxibenzoico	Compuesto (-)- Epicatequina	Compuesto Escopoletina
Compuesto Ácido vanílico	1	-0.16721	-0.54218	-0.76632	0.934905	-0.70419	-0.767886
Compuesto Escopolina	-0.16721	1	-0.7099	-0.49981	-0.49999	0.81583	-0.499816
Compuesto Ácido clorogénico	-0.542179	-0.7099	1	0.948146	-0.23358	-0.18673	0.938357
Compuesto Ácido cafeico	-0.766316	-0.49981	0.94815	1	-0.49982	0.092708	0.998573
Compuesto Ácido 4- hidroxibenzoico	0.934905	-0.49999	-0.23358	-0.49982	1	-0.90862	-0.499823
Compuesto (-)-Epicatequina	-0.704191	0.81583	-0.18673	0.092708	-0.90862	1	0.092922
Compuesto Escopoletina	-0.767886	-0.49982	0.93836	0.998573	-0.49982	0.092922	1
Compuesto Ácido ferúlico	-0.767668	-0.49895	0.92975	0.995819	-0.49895	0.092914	0.999276
Compuesto Rutina	-0.767916	-0.49947	0.93423	0.99738	-0.49948	0.092935	0.99982
Compuesto Kaempferol	0.934905	-0.49999	-0.23358	-0.49982	1	-0.90862	-0.499823
Compuesto Ácido-4-cumarico	0.734003	-0.79082	0.14553	-0.13458	0.925454	-0.99901	-0.134576
Compuesto Ácido-2,4- Dimetoxi-6-metilbenzoico	-0.767377	-0.49999	0.94357	0.999641	-0.5	0.092849	0.999645
Compuesto Quercetina	0.934905	-0.49999	-0.23358	-0.49982	1	-0.90862	-0.499823
Actividad antioxidante Porcentaje de Inhibición	0.940972	0.16718	-0.78876	-0.93709	0.770243	-0.43367	-0.937097
Actividad antioxidante FRAP	0.933365	-0.50382	-0.22936	-0.49599	0.99999	-0.91046	-0.495991
Actividad antioxidante ABTS	-0.905515	-0.25986	0.84078	0.965858	-0.70634	0.346347	0.965862
Actividad antioxidante IC 50	-0.423074	0.96392	-0.50349	-0.25137	-0.71247	0.940239	-0.25137
Actividad antioxidante poder reductor	0.439354	-0.95894	0.48812	0.233806	0.725059	-0.94625	0.233807
Actividad antioxidante Polifenoles totales	0.990961	-0.27525	-0.45794	-0.69469	0.9702	-0.78041	-0.694697

Cuadro 28. Continuación matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos.

	Compuesto Ácido ferúlico	Compuesto Rutina	Compuesto Kaempferol	Compuesto Ácido-4- cumarico	Compuesto Ácido- 2,4-Dimetoxi-6- metilbenzoico	Compuesto Quercetina
Compuesto Ácido vanílico	-0.7676679	-0.7679161	0.93490487	0.73400286	-0.76737683	0.93490487
Compuesto Escopolina	-0.4989478	-0.49947349	-0.49999349	-0.79081974	-0.49999349	-0.49999349
Compuesto Ácido clorogénico	0.92974949	0.93423296	-0.2335789	0.14552729	0.94357282	-0.2335789
Compuesto Ácido cafeico	0.99581855	0.99737982	-0.49982052	-0.13457525	0.99964104	-0.49982052
Compuesto Ácido 4- hidroxibenzoico	-0.49895429	-0.49947999	1	0.9254536	-0.5	1
Compuesto (-)-Epicatequina	0.09291362	0.09293489	-0.90861945	-0.99901386	0.09284866	-0.90861945
Compuesto Escopoletina	0.99927588	0.99981982	-0.49982275	-0.13457584	0.99964549	-0.49982275
Compuesto Ácido ferúlico	1	0.99981808	-0.49895429	-0.13434202	0.99790859	-0.49895429
Compuesto Rutina	0.99981808	1	-0.49947999	-0.13448356	0.99895998	-0.49947999
Compuesto Kaempferol	-0.49895429	-0.49947999	1	0.9254536	-0.5	1
Compuesto Ácido-4-cumarico	-0.13434202	-0.13448356	0.9254536	1	-0.13462357	0.9254536
Compuesto Ácido-2,4- Dimetoxi-6-metilbenzoico	0.99790859	0.99895998	-0.5	-0.13462357	1	-0.5
Compuesto Quercetina	-0.49895429	-0.49947999	1	0.9254536	-0.5	1
Actividad antioxidante						
Porcentaje de Inhibición	-0.93546884	-0.93645445	0.77024348	0.47120603	-0.93742939	0.77024348
Actividad antioxidante FRAP	-0.49512939	-0.49565106	0.99999023	0.92711921	-0.49616708	0.99999023
Actividad antioxidante ABTS	0.96418392	0.96519978	-0.70634307	-0.38550354	0.96620465	-0.70634307
Actividad antioxidante IC 50	-0.25093353	-0.25119792	-0.71246841	-0.92520479	-0.25145944	-0.71246841
Actividad antioxidante poder reductor	0.23340097	0.23364689	0.72505942	0.93192522	0.23389013	0.72505942
Actividad antioxidante						
Polifenoles totales	-0.6934896	-0.69422026	0.9701999	0.80607474	-0.69494301	0.9701999

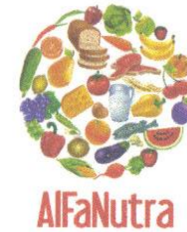
Cuadro 29. Continuación matriz del análisis de componentes principales de los diferentes compuestos y actividad antioxidante de los diferentes extractos

	Actividad antioxidante Porcentaje de Inhibición	Actividad antioxidante FRAP	Actividad antioxidante ABTS	Actividad antioxidante IC ₅₀	Actividad antioxidante poder reductor	Actividad antioxidante Polifenoles totales
Compuesto Ácido vanílico	0.94097177	0.93336491	-0.90551503	-0.42307399	0.43935377	0.99096069
Compuesto Escopolina	0.16718373	-0.50381659	-0.2598582	0.96391531	-0.95893707	-0.27525331
Compuesto Ácido clorogénico	-0.78876433	-0.22935667	0.84078095	-0.50349042	0.48812143	-0.45794456
Compuesto Ácido cafeico	-0.93709289	-0.49598898	0.96585782	-0.25136918	0.23380618	-0.69469356
Compuesto Ácido 4- hidroxibenzoico	0.77024348	0.99999023	-0.70634307	-0.71246841	0.72505942	0.9701999
Compuesto (-)-Epicatequina	-0.43367459	-0.91045548	0.34634691	0.94023945	-0.94624649	-0.78040904
Compuesto Escopoletina	-0.93709706	-0.49599119	0.96586212	-0.2513703	0.23380722	-0.69469665
Compuesto Ácido ferúlico	-0.93546884	-0.49512939	0.96418392	-0.25093353	0.23340097	-0.6934896
Compuesto Rutina	-0.93645445	-0.49565106	0.96519978	-0.25119792	0.23364689	-0.69422026
Compuesto Kaempferol	0.77024348	0.99999023	-0.70634307	-0.71246841	0.72505942	0.9701999
Compuesto Ácido-4-cumarico	0.47120603	0.92711921	-0.38550354	-0.92520479	0.93192522	0.80607474
Compuesto Ácido-2,4- Dimetoxi-6-metilbenzoico	-0.93742939	-0.49616708	0.96620465	-0.25145944	0.23389013	-0.69494301
Compuesto Quercetina	0.77024348	0.99999023	-0.70634307	-0.71246841	0.72505942	0.9701999
Actividad antioxidnte Porcentaje de Inhibición	1	0.76741695	-0.99549998	-0.10126235	0.11926263	0.90182072
Actividad antioxidante FRAP	0.76741695	1	-0.70320722	-0.71556315	0.72809649	0.96911938
Actividad antioxidante ABTS	-0.99549998	-0.70320722	1	0.00653202	-0.02464054	-0.85681497
Actividad antioxidante IC ₅₀	-0.10126235	-0.71556315	0.00653202	1	-0.999836	-0.52120972
Actividad antioxidante poder reductor	0.11926263	0.72809649	-0.02464054	-0.999836	1	0.53657982
Actividad antioxidante Polifenoles totales	0.90182072	0.96911938	-0.85681497	-0.52120972	0.53657982	1



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO

La Red ALFaNutra
A través de la Universidad Autónoma de Querétaro



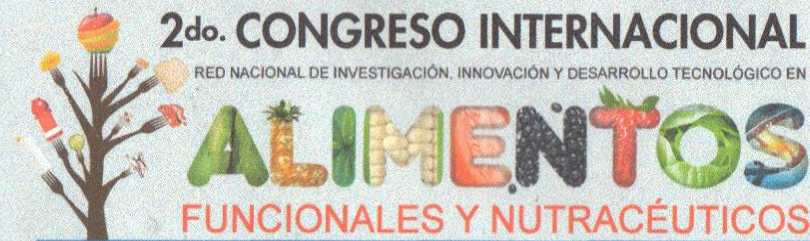
Otorga la presente constancia a:
Naida Juárez Trujillo

Por su Ponencia de Cartel :
Propiedades funcionales del fruto de *Randia Monantha* Benth

Co-autores:

Ángel Ramos Ligorio, Maribel Jiménez Fernández

Dentro del:



Realizado el 22 al 24 de junio de 2016 en las Instalaciones del Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Comité Organizador

Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Presidente de la Red-ALFaNutra

Figura 16. Constancia de presentación en congreso