



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE FLORES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) EN LA ESTABILIZACIÓN DEL COLOR Y VIDA ÚTIL EN PULPA DE FRUTAS**

**LADY ELIZABETH DOMÍNGUEZ MARIN**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA INTERFACULTADES  
BOGOTÁ, COLOMBIA  
2012**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE  
FLORES DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) EN LA ESTABILIZACIÓN  
DEL COLOR Y VIDA ÚTIL EN PULPA DE FRUTAS**

**LADY ELIZABETH DOMÍNGUEZ MARIN**

**Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Director:  
NESTOR ARIEL ALGECIRA ENCISO  
Ingeniero Químico**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
PROGRAMA INTERFACULTADES  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
BOGOTÁ, COLOMBIA  
2012**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

Jurado

---

Jurado

---

Director

---

Codirector

# Agradecimientos

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir y poder compartir con tantas personas maravillosas.

A mis padres por su apoyo, confianza e infinito amor, gracias por que siempre han creído en mí y han estado orgullosos de mis logros los cuales siempre serán de ustedes.

A mis hermanos por su ayuda y por el ánimo que me dieron en todo este proceso, son las personas con las que siempre podre contar.

A mi esposo quien fue la voz de aliento en los momentos difíciles y la mano de apoyo que siempre se extendió. Por recordarme constantemente mis sueños y convertirlos en los suyos. Por amarme tanto y construir cada segundo una vida a mi lado.

A Juliana Cardona por su infinita colaboración, apoyo, paciencia, esmero y sobre todo por su gran amistad.

Al profesor Néstor Ariel Algecira y la profesora María Soledad Hernández por hacer parte de este proyecto, por su dedicación, empeño, y consejos académicos.

A la profesora Patricia Restrepo por ayudarme en momentos cruciales, brindarme su tiempo, asesoramiento, colaboración y amistad; aspectos que fueron vitales para el desarrollo de este sueño.

A la profesora Norma Constanza López por su gran ayuda y valiosos consejos académicos.

Al SINCHI y su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de este maravilloso centro de conocimiento.

Al ICTA y su equipo de trabajo, el profesor Aníbal Herrera, don Gregorio, don Álvaro, Tatiana y Diana, por su ayuda, tiempo y colaboración.

A los panelistas del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia y a Odilia por su colaboración, apoyo y participación en el análisis sensorial.

## Resumen

Esta investigación se basó en la obtención y evaluación del extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula (*Calendula officinalis* L.), empleándolo en la estabilización de la pulpa de arazá, como antioxidante y conservante natural. Este estudio surgió debido a que la flor de caléndula tiene importantes propiedades que pueden ser empleadas en la industria de alimentos. Entre los compuestos de la caléndula con mayor interés se encuentran los antioxidantes, compuestos que previenen el deterioro de los alimentos, adicionalmente se han encontrado sustancias con una alta actividad antibacteriana. Por esta razón se pretendió aplicar estas propiedades en beneficio de la industria de alimentos, buscando un remplazo para los antioxidantes y conservantes químicos que han sido utilizados tradicionalmente. El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante extracción por maceración con un rendimiento en base seca del 29,80%. La caracterización química del extracto mediante ensayo fitoquímico preliminar dio idea de la posible presencia metabólitos como; taninos, quinonas, carotenoides y cumarinas. Posteriormente a través del espectro infrarrojo se determinaron frecuencias características que pueden relacionarse con grupos funcionales y enlaces químicos específicos que tienen algunos de los compuestos antioxidantes y antifúngicos presentes en la flor de caléndula. En la cuantificación de carotenos se encontró un contenido de luteína de  $1,81 \cdot 10^{-3}$  mg luteína/mg de extracto y de  $\beta$ -caroteno de  $5,68 \cdot 10^{-3}$  mg  $\beta$ -caroteno/mg de extracto, mostrando un alto contenido de compuestos antioxidantes. La determinación de la capacidad antioxidante del extracto dio como resultado un 74,33% en porcentaje de decoloración DPPH y 142,8mmol de trolox/g extracto por ABTS. De esta manera los resultados de caracterización señalan al extracto de caléndula como un posible antioxidante natural que como gran valor agregado presenta propiedades terapéuticas beneficiosas para la salud humana. Después de obtener y caracterizar el extracto se procedió a emplearlo en una matriz alimenticia, que en este caso fue la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*), la cual normalmente presenta problemas por pardeamiento enzimático y pérdida de calidad microbiológica por hongos y levaduras. La evaluación del extracto como conservante y antioxidante en la pulpa, se realizó mediante el control de los parámetros: pardeamiento enzimático, calidad microbiológica y calidad sensorial, durante un periodo de 2 meses a 2 temperaturas de almacenamiento. El extracto fue incluido en dos concentraciones,

el umbral de detección ([1]) y el umbral de identificación ([2]);  $8.26 \times 10^{-3}$  y  $1,90 \times 10^{-2}$  g de extracto en 100g de pulpa respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que el pardeamiento enzimático no se vio modificado por la adición del extracto en las concentraciones evaluadas. Las variaciones en el cambio de color solo se vieron influenciadas por la temperatura de almacenamiento, con menores cambios es el almacenamiento a temperatura ambiente. En cuanto a la evaluación microbiológica se concluye que la combinación entre la adición del extracto y el almacenamiento en refrigeración es una buena opción para la conservación de la pulpa de arazá en términos de hongos y levaduras, en este caso los recuentos muestran que la pulpa permanece con una buena calidad durante todo el periodo de almacenamiento. Por otra parte la evaluación sensorial mostró que la adición del extracto disminuye la calidad en los parámetros sabor y aroma, sin verse modificados los parámetros de color y textura. Concluyéndose de esta manera que aunque el extracto presenta importantes propiedades para la industria de alimentos debe emplearse algún tratamiento previo que disminuya el sabor amargo del mismo, posibilitando el uso de concentraciones más altas y así poder aprovechar el poder antioxidante y antifúngico de manera más efectiva.

**Palabras clave:** Pardeamiento enzimático – hongos y levaduras – Antioxidantes - Arazá (*Eugenia stipitata*) – Calidad sensorial.

## Abstract

This research was based on the collection and evaluation of the hydroalcoholic extract of calendula flower (*Calendula officinalis* L.) used in the stabilization of the pulp arazá, as an antioxidant and natural preservative. This research arose because marigold flower has important properties that can be used in the food industry. Among the compounds of this flower with greater interest is the antioxidants, these compounds prevent food spoilage, in addition it has been found that essential oils have antibacterial activity. For this reason we tried to apply these properties to benefit the food industry, in search of a replacement for antioxidants and chemical preservatives that have been used traditionally. The extract was obtained by maceration with a yield of 29.80% dry basis. The chemical characterization of the extract by preliminary phytochemical testing study showed the possible presence as metabolites tannins, quinones, carotenes and coumarins. Subsequent to the spectrum infrared were determined characteristics frequencies that may relate to specific chemical groups and links with some of the antioxidant and antifungal compounds present in marigolds. In the quantification of carotenes found to contain lutein of  $1.81 \cdot 10^{-3}$  mg lutein/mg of extract and  $5.68 \cdot 10^{-3}$  mg  $\beta$ -carotene/mg of extract, thus found the content of antioxidant compounds in significant proportions. The determination of the antioxidant capacity of the extract was 74.33% in percentage of discoloration DPPH and 142.8 mmol of trolox/g extract by ABTS. The characterization results point to the marigold extract as a potential natural antioxidant with therapeutic properties beneficial to health, such as value added. After obtaining and characterizing the extract proceeded to use it in a food matrix, which in this case was arazá pulp (*Eugenia stipitata*), this usually presents problems for enzymatic browning and loss of microbial quality of fungal and yeast. The evaluation of the extract as a preservative and antioxidant in the pulp was carried out by controlling the parameters: enzymatic browning, microbiological quality and sensory quality during a period of 2 months to 2 storage temperatures. The extract was included in two concentrations, the detection threshold ([1]) and the identification threshold ([2]);  $8.26 \cdot 10^{-3}$  y  $1,90 \cdot 10^{-2}$  g of extract in 100g of pulp respectively. The results showed that enzymatic browning was not modified by the addition of extract in the concentrations tested. Variations in the color change alone were influenced by storage temperature; the color changes were smaller in storage at 18°C. Moreover, microbiological evaluation reveals that

the combination of adding the extract and refrigeration storage is a good option for conservation arazá pulp in term of fungi and yeast, counts in this case show that the pulp remains a good quality throughout the storage period, parameters unchanged color and texture. Thus concluded that although the extract has important properties for the food industry, should be used some treatment to decreased the bitter taste, enabling the use of higher concentrations and harness the antioxidant power and more effective antifungal.

**Key words:** Enzymatic browning – Fungi and yeasts – Antioxidants – Arazá (*Eugenia stipitata*) – Sensory quality.

# Contenido

	Pág.
Resumen.....	5
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	11
Lista de anexos.....	12
Introducción.....	13
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
1. Capítulo 1.....	19
Caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.) ingrediente potencial en la industria alimenticia.	
2. Capítulo 2.....	48
Análisis químico de la flor de caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.)	
3. Capítulo 3.....	68
Generalidades sobre la fruta y pulpa de arazá ( <i>Eugenia stipitata</i> )	
4. Capítulo 4.....	91
Evaluación del extracto de flores de caléndula como antioxidante y conservante en la pulpa de arazá	
5. Conclusiones.....	113
Recomendaciones.....	115
Bibliografía.....	116
Anexos.....	120

# Lista de figuras

	Pág.
Capítulo 1	
1.1 Flor de caléndula, variedades cultivadas en Colombia.....	21
1.2 Flores de Caléndula.....	22
1.3 Constituyentes del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> L.	37
Capítulo 2	
2.1 Espectro infrarrojo extracto de Caléndula.....	55
2.2 Cuantificación de carotenos.....	57
2.3 Perfil cinético actividad antioxidante total por DPPH.....	59
2.4 Capacidad de secuestro del radical DPPH.....	60
2.5 Perfil cinético actividad antioxidante por ABTS.....	62
Capítulo 3	
3.1 Cambios colorimétricos durante el desarrollo y la maduración del Arazá.....	71
3.2 Etapas de la reacción del pardeamiento enzimático.....	80
3.3 Reacción de pardeamiento enzimático.....	80
Capítulo 4	
4.1 Proceso de elaboración de pulpa de fruta.....	94
4.2 Índice CIRG durante el almacenamiento de las muestras.....	102
4.3 Crecimiento de hongos y levaduras en muestras almacenadas a temperatura ambiente.....	103
4.4 Crecimiento de hongos y levaduras en muestras almacenadas a temperatura de refrigeración.....	103
4.5 Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable apariencia y color.....	105
4.6 Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable sabor.....	105
4.7 Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable textura.....	106
4.8 Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable aroma.....	106

# Lista de tablas

	Pág.
Capítulo 1	
1.1 Clasificación taxonómica de la caléndula.....	23
1.2 Composición de carotenoides en pétalos, polen, hojas, y tallos de Caléndula ( <i>Calendula officinalis</i> L.).....	28
1.3 Contenido en mg/mL de flavonoides identificados en las tinturas de Caléndula (60% y 40% v/v solución hidroetanólica).....	30
1.4 Compuestos identificados en el aceite esencial de caléndula.....	32
1.5 Contenido de luteína y esteres de luteína en extractos de hexano y muestras saponificadas.....	33
1.6 Composición de oleoresina de flor de caléndula obtenida mediante extracción con solventes orgánicos y fluidos supercriticos CO <sub>2</sub> a 40°C a diferentes presiones (120, 150, 180 bares).....	38
Capítulo 2	
2.1 Proceso de extracción flores de caléndula.....	53
2.2 Marcha fitoquímica.....	54
2.3 Ecuaciones de las curvas de calibración para la cuantificación de carotenos.....	57
Capítulo 3	
3.1 Taxonomía de arazá.....	70
3.2 Escala de color durante el desarrollo y maduración del Arazá.....	72
3.3 Caracterización química del fruto fresco de arazá (base húmeda).....	73
3.4 Caracterización química de la pulpa de fruto de arazá del piedemonte amazónico en estado maduro.....	74
3.5 Contenido de aminoácidos de la pulpa de arazá.....	75
3.6 Componentes químicos y nutricionales de pulpa de arazá.....	78
3.7 Principales sustratos del pardeamiento enzimático.....	81
Capítulo 4	
4.1 Resultados prueba determinación de umbrales detección e identificación.....	97

## Lista de anexos

A	Instrucciones para los autores revista VITAE.....	120
B	Instrucciones para los autores revista Universidad del cauca.....	126
C	Constancia de envió revista VITAE.....	134
D	Constancia de envió revista Universidad del cauca.....	135

# Introducción

La ubicación geográfica de Colombia y su diversidad de climas permite el cultivo de una amplia variedad de frutas tropicales, algunas de ellas consideradas como innovadoras y promisorias para el desarrollo del país. Estos frutos son vistos como productos potencialmente atractivos en los mercados internacionales, con nuevas propiedades organolépticas y nutricionales, con una gran potencialidad de demanda y con altas posibilidades comerciales en el mediano y largo plazo. Sin embargo el desempeño de estos frutales ha sido lento, y con altos requerimientos tecnológicos, con bajos volúmenes y con poca continuidad, revelando la falta de núcleos productivos regionales tanto en el cultivo como en el procesamiento, que permitan el desarrollo de economías a escala y el aprovechamiento mercados internacionales. De ahí la importancia de concentrar esfuerzos en desarrollar procesos que permitan el crecimiento, mejoramiento y consolidación del sector frutícola y la cadena comercial en Colombia.

Entre los frutos promisorios se encuentra el arazá (*Eugenia stipitata*) es una fruta cultivada principalmente en la Amazonia colombiana norte y sur y en menor proporción en los Llanos orientales, Santander, Eje cafetero y Valle del cauca. Dicha fruta constituye una oferta natural que ha sido vista por propios y extraños como una alternativa productiva, promisoriosa y como elemento fundamental del desarrollo sostenible de estas regiones (Hernández y Barrera, 2000). Es una fruta con agradable aroma y sabor ácido característico, con un contenido de fibra del 12% en base seca, vitamina C (27 mg/100g de pulpa), vitamina A (0,4 mg/100g de pulpa) (Aguilar, 1983). En el Primer Simposio Colombiano sobre Producción, Agroindustria y Comercialización de Frutas Tropicales, realizado en noviembre del 2007, se reportan 48 especies frutales entre perennes mayores, transitorios y perennes menores, de importancia económica, comercial y social para el país. Entre ellas se encuentra el fruto de arazá (*Eugenia stipitata*) ocupando el puesto 18 entre 21 especies perennes menores con 75 hectáreas de cultivo que corresponde al 0,034% del total del área cultivada por frutas en Colombia, esta clasificación corresponde a frutas con una menor importancia desde el punto de vista de su impacto económico y social. Sin embargo es de resaltar que 23 especies frutales reportadas como perennes mayores corresponden a frutales introducidos que no son nativos en Colombia, es decir que provienen de otros países, como la naranja, mango, banano, mandarina, coco, lima Tahití, maracuyá, bananito, vid, melón y fresa entre otros, estas especies representan el 56% del

área nacional de cultivo 124.324 hectáreas. Esto refleja la importancia de apoyar el desarrollo de los frutales propios de Colombia, como el cultivo de arazá, y que aunque en el momento se considere como una especie perenne menor, puede representar una nueva oportunidad económica para el desarrollo del sector frutícola tanto en el mercado nacional como en el internacional (Corpoica y CVR, 2007).

El fruto de Arazá debido a sus características; elevada humedad y ausencia de tejido esclerenquimático y colenquimático de sostén, evidencia una gran susceptibilidad al deterioro, con una duración entre 3 y 5 días sin ningún tratamiento (Hernández y Fernández, 2004), 15 días como máximo, almacenado a temperatura de 12°C y humedad relativa del 85% con una previa labor de enfriamiento (Hernández *et al.*, 2009; Orduz y León, 2001) y 15 días con tratamiento de choque térmico entre calentamiento a 50°C por 30 minutos y refrigeración a 7°C (Narváez, 2003), razón por la cual ha tomado gran importancia y factibilidad económica su procesamiento y transformación para prolongar su vida útil.

El proceso de transformación más importante para este tipo de frutos es la elaboración de pulpas las cuales pueden tener destino industrial o doméstico, siendo el principal producto procesado indispensable en la elaboración de otros subproductos como jugos, néctares, refrescos, mermeladas, bocadillos etc. Según el boletín del perfil de producto, bebidas a base de frutas del 2001, el 40.6% de la demanda industrial de frutas frescas se destina a la industria de pulpa de frutas. La evolución comercial de la pulpa de fruta en términos generales, muestra durante los últimos años reportados hasta el 2000, una tendencia desfavorable para Colombia evidenciado en la caída de las exportaciones; cerca de un 16% anualmente, constituyéndose Estados Unidos, Brasil y Chile como los principales productores y exportadores de pulpa de frutas. Teniendo en cuenta estos hechos es necesario generar nuevas alternativas de producción e innovación que impulsen el crecimiento comercial de Colombia en la industria frutícola, una de estas alternativas es indudablemente el procesamiento de frutas tropicales colombianas, aprovechando su carácter exótico y novedoso, ofreciendo nuevos productos que pueden llegar a ser muy atractivos para los demás países.

En las pulpas de fruta se presentan problemas de estabilidad causados por un desequilibrio en los procesos químicos y biológicos ocasionados entre otras cosas por microorganismos y enzimas. Uno de los principales problemas de estabilidad en la pulpa es el pardeamiento enzimático reacción bioquímica que va en

detrimento de la calidad sensorial, afectando de manera directa el color de la pulpa. Adicionalmente se presentan problemas de calidad por microorganismos principalmente hongos y bacterias constituyéndose de esta forma en parámetros críticos a controlar (Quiñones M, 2005).

La calidad de un alimento está definida, por el cumplimiento de las normas, así como por la percepción que tenga el consumidor de él. En este punto, las características sensoriales son de gran importancia como reflejo de condiciones microbiológicas, físicas y químicas, siendo una herramienta valiosa en el diagnóstico de la calidad de un producto alimenticio (Mejía *et al.*, 2006). El color una de las primeras características sensoriales de un alimento que percibe el consumidor, y una buena parte de su aceptación depende de esta primera impresión, incidiendo de esta manera directamente en su valor comercial (Remacha *et al.*, 2002).

En la producción de pulpas de fruta las mejores son aquellas en las que se logra que cambien lo menos posible las características sensoriales, sanitarias y nutricionales, es decir que sean lo más parecidas a las pulpas recién obtenidas de las frutas frescas. El pardeamiento enzimático es el proceso causante del cambio en el color de este tipo de productos y la aparición de hongos y levaduras causa en general cambios en todos los aspectos sensoriales de la pulpa; olor, sabor, color y textura. Por consiguiente el desarrollo del pardeamiento enzimático y la presencia de hongos y levaduras son indicativos de una mala calidad de la pulpa. Estos procesos son evitados o minimizados agregando sustancias químicas antioxidantes y conservantes, en la industria alimentaria estas sustancias son ampliamente utilizadas sin embargo, debido a la toxicidad y efectos cancerígenos de algunas de ellas, se ha restringido legalmente su uso y en muchos casos son evitadas directamente por los consumidores. De allí depende el gran interés en la búsqueda de conservantes naturales que sustituyan dichos compuestos, sin efectos secundarios indeseables (Barreira *et al.*, 2008) y que sean benéficos en la calidad del producto final y la salud de los consumidores.

Existen múltiples estudios en donde se ha probado productos naturales como antioxidantes y conservantes en productos alimenticios. Algunos de los antioxidantes naturales más conocidos son los tocoferoles, el ácido ascórbico, los carotenos, algunos flavonoides y extractos de plantas (Valenzuela, 2003) como: romero (Ramalho, 2008), salvia, cacao, ajo, jengibre, cebolla roja, orégano y tomillo, entre otros. Los antioxidantes naturales pueden, además, reforzar la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos aportando una protección extra

para el estrés oxidativo. Los alimentos adicionados de antioxidantes naturales pueden ser considerados como alimentos funcionales ya que proveerían de una mejor condición de salud al consumidor (Valenzuela, 2003).

Existen investigaciones en donde se han evaluado los productos naturales como conservantes, por ejemplo el efecto antioxidante y antimicrobiano de algunos extractos de plantas naturales como: jojoba, jatropha, ginseng y jengibre, fueron evaluados al agregarse al pastel de cordero, determinando que la adición de estos extractos naturales fue efectiva como agente antioxidante y antimicrobiano en la mejora de las propiedades del pastel de cordero (Hayam, 2011). En otro se evaluó el efecto del extracto de aceite de salvia en embutidos de búfalo, indicando a dicho extracto como un antioxidante natural, obteniendo un producto final con unos niveles de aminos biogénicas y de oxidación lipídica aceptable, así como con una calidad sensorial mejorada (Ferial, 2010). Por otra parte han sido desarrolladas investigaciones en donde se han empleado productos naturales en recubrimientos comestibles para la conservación de los alimentos, aprovechando básicamente su actividad antimicrobiana y antifúngica, para mejorar las propiedades fisicoquímicas y sensoriales, prolongar la vida útil, y retener vitaminas (Sánchez, 2008). Recientemente los agentes antimicrobianos naturales han sido empleados en la conservación de frutas y hortalizas descubriendo cada vez mas plantas o partes de estas que contienen antimicrobianos naturales, por ejemplo los que incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, que no solo se mejoraría la seguridad, sino también la calidad de los alimentos ya que este tipo de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras (Rodríguez, 2011).

Según estudios preliminares, la flor de caléndula presenta importantes propiedades funcionales derivadas de su composición, como el alto contenido de antioxidantes (carotenos, flavonoides y compuestos fenólicos) (Lastra y Piquet, 1999; Fuentes *et al.*, 2000; Abdullabekova y Tulaganov, 2001; Bilia *et al.*, 2001; Schmid y Zulli, 2003; Abril, 2008; Domínguez, 2009), la capacidad fotoestabilizante de los extractos hidroalcohólicos (Guzmán *et al.*, 2009), la actividad fungistática de los aceites esenciales (Solimán y Badeaa, 2002; Szakiel *et al.*, 2005] y la actividad antibacterial del extracto hidroacetónico (Pires, 2003) y del extracto etanólico (Águila *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2001; Deineka *et al.*, 2007), propiedades funcionales que pueden ser aprovechables en su conjunto para la estabilización de pulpas de fruta.

Adicionalmente esta flor tiene amplias propiedades terapéuticas, entre las cuales se pueden destacar la actividades antiinflamatoria, antiséptica y cicatrizante, su acción antiespasmódica y antiulcerosa, y las actividades colerética, hepática, antitumoral y citotóxica (Acosta, 2001), también resulta eficaz para malestares gástricos, tratamiento de la hipertensión, taquicardia, arritmia, enfermedades del sistema urinario y del sistema nervioso central y periférico (Lastra, 1999; García, 1996; Szakiel, 2005; Balch, 2002). En la actualidad, hay muchos productos médicos derivados de la caléndula, para tratamiento de tumores de la piel, lesiones dermatológicas, úlceras e hinchazones (Szakiel, 2005). Además del uso medicinal se refiere su empleo en cosméticos, así como en la industria alimentaria, en la fabricación de galletas, caramelos, licores, como colorante natural de la manteca o como sucedáneo del azafrán (Acosta, 2001).

Al reunir todas estas propiedades benéficas de la flor de caléndula y centrándose básicamente en su capacidad antioxidante, fotoestabilizante, antifúngica y antibacteriana surgió la presente investigación en donde se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de flores de Caléndula como aditivo natural en la mitigación del pardeamiento enzimático y la obtención de una calidad microbiológica satisfactoria en la pulpa de Arazá (*Eugenia stipitata*), producto promisorio para la economía colombiana, por su origen exótico, propiedades nutricionales y organolépticas, buscando de esta manera obtener una pulpa natural, de buena calidad y con posibles propiedades benéficas para la salud del ser humano, que represente para los productores y comercializadores mejores ingresos con un valor agregado en el producto y una nueva oportunidad competitiva en el sector frutícola. Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones y con la colaboración y asesoramiento de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos I.C.T.A y El Instituto Amazónico de Investigación Científica SINCHI.

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula (*Calendula officinalis* L.) en la mitigación del pardeamiento enzimático y la calidad microbiológica de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*).

## Objetivos específicos

Evaluar la obtención y calidad del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula

Establecer a través de métodos sensoriales la concentración del extracto hidroalcohólico de caléndula en la pulpa de Arazá aceptada por el consumidor.

Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula en el pardeamiento enzimático, calidad microbiológica y sensorial de la pulpa de Arazá almacenada a 18°C y 5 °C durante dos meses.

# 1.Capítulo 1

## CALENDULA (*Calendula officinalis* L.) INGREDIENTE POTENCIAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

## CALENDULA (*Calendula officinalis* L.) POTENTIAL INGREDIENT IN THE FOOD INDUSTRY

Lady Elizabeth Domínguez Marín, Néstor Ariel Algecira Enciso, María Soledad Hernández

### 1.1 Resumen

La flor de caléndula (*Calendula officinalis* L.) tiene propiedades funcionales importantes para la industria alimenticia derivadas de su composición química. Entre los compuestos con mayor interés se encuentran los antioxidantes (Carotenos, flavonoides y compuestos fenólicos). El uso de los antioxidantes naturales previene o disminuye el desarrollo de las enfermedades degenerativas y la formación de colores y olores desagradables en los alimentos, derivados de la peroxidación lipídica. Entre los antioxidantes identificados en la caléndula se encuentran flavoxantina, luteoxantina,  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\alpha$ -caroteno, rutinósido, isorhamnetina, narcisina. Adicionalmente esta flor presenta otros compuestos de interés, como aceites esenciales, luteína, ésteres de luteína, xantofilas, alcoholes triterpenicos, ácidos fenólicos y taninos entre otros. Los aceites esenciales de la caléndula evidencian actividad antibacteriana frente a la bacteria gram negativa *Escherichia coli* y antifúngica especialmente contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y cepas de hongos patógenos y toxigénicos. Por otra parte la caléndula presenta actividad fotoestabilizante lo que puede ser aprovechado en la estabilización del color de alimentos. Este conjunto de propiedades puede ser utilizado en la industria alimenticia como remplazo natural de los preservantes sintéticos. Esta revisión presenta los aspectos más importantes de la flor de caléndula; composición química, propiedades, actividad antioxidante, acción antibacteriana y fungicida.

## **Palabras clave**

Caléndula (*Calendula officinalis* L.), carotenos, flavonoides, actividad antioxidante, propiedades antibacteriales y antifúngicas, fotoprotección.

## **Abstract**

The flower *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) has many important functional properties for the food and cosmetic industry due to its chemical composition. Principal compounds extracted are antioxidants (carotenes, flavonoids and phenolic compounds). Previous results indicated that natural antioxidants contained in some part of calendula plant prevents or reduces the development of degenerative diseases and the formation of food's colors and flavors coming from lipid peroxidation. The antioxidants identified in calendula, are flavoxantina, luteoxantina,  $\beta$ -carotene, lycopene,  $\alpha$ -carotene, rutinósido, isorhamnetin, narcisina. Additionally, this flower has other valuable compounds like essential oils, lutein, lutein esters, xanthophylls, triterpene alcohols, phenolic acids, tannins, among others. The essential oils of calendula show antibacterial activity against the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and antifungal especially against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and pathogens and toxigenic fungi's strains. Moreover, the calendula has photostabilizer activity which can be used to stabilize food's color. These properties can be taken in to account as a natural replacement of synthetics additives in food industry. This review presents the most important aspects of the calendulas' flowers, chemical composition, properties, antioxidant, antibacterial and fungicide activity.

## **Key words**

*Calendula* (*Calendula officinalis* L.), carotenoid, flavonoids, antioxidant activity, antifungal and antibacterial activity, photoprotection.

## **1.2 Introducción**

En Colombia existe una gran diversidad de plantas medicinales y comestibles, entre las más cultivadas y utilizadas en la industria farmacéutica del país se encuentra la caléndula, considerada como la que presenta mayor volumen de venta en el mercado nacional. Las partes utilizadas para fines industriales son las flores y las hojas. Los cultivos están ubicados principalmente en la Vega, Alban,

Tenjo y otros municipios del departamento de Cundinamarca-Colombia con una temperatura entre 12 y 24°C y una altitud entre 1000 y 2800 metros sobre el nivel del mar. Las variedades cultivadas en Colombia son caléndula naranja fiesta, caléndula naranja reina, caléndula doble mezcla, caléndula doble naranja, caléndula doble amarillo oro, algunas de estas variedades se observan en la Figura 1.1.

**Figura 1.1** Flor de caléndula, variedades cultivadas en Colombia



Esta planta se utiliza tradicionalmente en cosmetología como antiséptico y antiinflamatorio. En el campo culinario también es utilizada dando un sabor penetrante a algunas comidas, como decoración o como tinte natural en productos lácteos y pasteles. Existen diversos estudios que se han realizado en torno a esta planta, principalmente estudiando su composición y acción química, a continuación se presenta una revisión respecto a estos temas, enfatizando en las aplicaciones de la flor en la industria alimenticia.

### **1.3 Caléndula (*Calendula officinalis* L.)**

#### **Descripción de la planta**

La caléndula es una planta herbácea, anual, su floración dura casi todo el año, tiene una altura media entre los 30-50 cm., su tallo es semi-erecto, angular y

ramificado y sus hojas son alternas, oblongas o lanceoladas y sensibles. Presenta flores tubulares amarillas o anaranjadas, con una corona de 15-20 lígulas, y frutos encorvados, provistos casi todos de alas membranosas o púas dorsales [1] como se muestran en la Figura 1.2. La caléndula pertenece a la familia de las Asteraceae (compuestas) que incluye alrededor de 20.000 especies, entre las que se encuentran árboles, arbustos y plantas herbáceas. Se usa como planta ornamental, medicinal y cosmética debido a sus cualidades terapéuticas [2], en países como Cuba la *Calendula officinalis* L. es una de las especies de origen vegetal aprobadas por el Ministerio de Salud Pública para su utilización como materia prima en la confección de fitofármacos [3] El cultivo de esta planta es conocido por sus beneficios medicinales en diversos países [4], las partes más utilizadas para estos propósitos y para fines industriales son las flores y las hojas [5].

**Figura 1.2** Flores de Caléndula



La planta tiene un gusto amargo en algunas especies los pétalos florales y hojas tiernas son comestibles, estas partes son utilizadas para decorar ensaladas y otros platos por su intenso color, también para aromatizar bebidas, elaborar dulces y postres. Otra de sus aplicaciones es como tinte natural en la industria avícola para pigmentar pollos de engorde y huevos. En Estados Unidos el uso de *Calendula officinalis* L. está contemplado y monitoreado por la FDA (Food and Drug Administration), donde se encuentra clasificado como suplemento dietario y

es reconocido como ingrediente alimenticio seguro [6, 7]. Su clasificación taxonómica se puede observar en la Tabla 1.1.

### **Clasificación taxonómica**

**Tabla 1.1** Clasificación taxonómica de la caléndula

REINO	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Asteridae
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
SUBFAMILIA	Asteroideae
TRIBU	Calenduleae
GENERO	Caléndula
ESPECIE	<i>Calendula officinalis</i> L.

Fuente: [5, 8, 9]

### **Principales componentes**

La flor de caléndula tiene una composición química compleja, con un amplio número de familias lo cual concuerda con sus innumerables propiedades farmacológicas y antioxidantes. Los compuestos antioxidantes de esta planta que han tomado un mayor interés son los carotenoides y los flavonoides.

#### **1.4 Antioxidantes**

El oxígeno forma, en los organismos aerobios intermediarios, compuestos conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”), como un proceso natural, constante, inevitable y beneficioso para la supervivencia; no obstante, si las especies reactivas se encuentran en exceso serán perjudiciales para el organismo. Así pues, son necesarias defensas antioxidantes que neutralicen estos compuestos, manteniendo un equilibrio entre las especies reactivas y los antioxidantes [10, 11], estos sistemas o procesos de defensa comprenden procesos enzimáticos y no enzimáticos [12].

La excesiva oxidación de biomoléculas da lugar a diversos daños en el organismo, y a procesos fisiológicos y patológicos que limitan la calidad y expectativa de vida, [10, 11, 13, 14] debido a una mayor incidencia de diversas enfermedades degenerativas como cáncer [15] Alzheimer, Parkinson [12] enfermedades

cardiacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral, accidentes cerebrovasculares, enfermedades coronarias, aceleración del envejecimiento [15, 16, 17] transformaciones moleculares y mutaciones de genes en muchos tipos de organismos. Los radicales libres también se consideran responsables de la peroxidación lipídica y el pardeamiento enzimático causando el deterioro de los alimentos [12, 14, 16].

Los antioxidantes son compuestos que al retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, previenen la formación de colores y olores desagradables en los alimentos y la aparición de enfermedades degenerativas en el ser humano. Los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético, pero la mayoría de los utilizados comercialmente son de origen sintético, sin embargo algunos de estos compuestos, son altamente inestables, ocasionando efectos adversos sobre la salud. Es por ello que muchas investigaciones se han centrado en encontrar antioxidantes naturales, más estables, eficaces, versátiles y/o menos tóxicos. Por ejemplo, entre los compuestos antioxidantes de origen natural se encuentran carotenoides, vitamina C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos [14, 18, 19, 20] estos antirradicales actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres, impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrogeno de forma que se neutralizan los radicales libres [15].

El uso de antioxidantes naturales en la inhibición del pardeamiento enzimático de frutas y vegetales, se ha convertido en un área de investigación importante debido a su relevancia en la industria alimentaria. El oscurecimiento enzimático se presenta en la superficie de la pulpa de fruta y es causado por la acción de la enzima polifenoloxidasas, esta enzima, al ocurrir la ruptura de las células, se pone en contacto con los sustratos fenólicos y en presencia de oxígeno inicia la reacción que conduce a la formación de quinonas, las que reaccionan entre sí con otros compuestos formando melaninas, que son complejos macromoleculares de color oscuro. El mecanismo de los antioxidantes en la inhibición del pardeamiento enzimático se basa en la reducción de las quinonas a sus formas fenólicas originales, evitando, por lo tanto, las reacciones secundarias que dan lugar a los compuestos poliméricos de colores oscuros. De esta manera el uso de compuestos naturales, presentan una alternativa en la conservación de productos a base de frutas que son susceptibles al oscurecimiento [21].

Respecto a la capacidad antioxidante de la flor de caléndula (*Calendula officinalis* L.) Montoya y sus colaboradores (2003) [13] realizaron una selección de plantas

medicinales, utilizando como criterio la habilidad de los extractos vegetales para desactivar al radical libre estable DPPH. La capacidad antioxidativa de la caléndula fue determinada a los 30 minutos (1µg extracto inicial en 1 mL del medio metanólico con 35 µM DPPH) encontrando un porcentaje de decoloración del DPPH de 16.67%, porcentaje ubicado en un rango medio comparado con las otras especies vegetales que fueron evaluadas.

Las flores de caléndula también han sido utilizadas en salsa para carnes con el fin de incluir las propiedades de la flor como antioxidante natural en un producto alimenticio. En este estudio se determinó la actividad antioxidante de la flor de caléndula, la salsa estándar para carnes y la salsa para carnes con adición de flores de caléndula (pétalos) 1%p/p. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la actividad antioxidante entre la salsa para carnes y la salsa para carnes con adición de flores de caléndula, aunque no fue estadísticamente significativo. En el contenido de fenoles se encontró un aumento significativo entre la salsa para carnes y la salsa para carnes con adición de caléndula. Sensorialmente se determinó la concentración en la cual se puede incluir la flor sin que su sabor amargo sea percibido siendo de 3,57 g de caléndula en 100 g de salsa por lo cual el aumento en la actividad antioxidante puede ser mucho mayor que con la concentración con la cual se hicieron los análisis químicos [22].

### **Carotenos**

Los carotenoides son tetraterpenos, compuestos de 40 átomos de carbono, simétrico y lineal, formados a partir de 8 unidades isoprenoides de 5 carbonos unidos de manera tal que el orden se invierte en el centro, estos compuestos generalmente son derivados del fitoeno [23] y pueden ser de dos clases: los carotenos, compuestos hidrocarbonados, y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos [24].

Los carotenoides son pigmentos que proporcionan colores amarillos, anaranjados y rojizos a las frutas, verduras y flores. Colores que son característicos de la flor de caléndula, puede cambiar el tono o intensidad de acuerdo a factores como la variedad y las condiciones climáticas. Los carotenoides están presentes en todos los tejidos fotosintéticos, junto con las clorofilas, así como en tejidos vegetales no fotosintéticos como componentes de cromoplastos. El contenido de carotenoides en las frutas y flores aumenta durante los procesos de desarrollo o maduración. Los carotenoides también se pueden encontrar en algas, hongos, bacterias y en

animales, sin embargo estos últimos no pueden sintetizarlos. Entre los principales carotenoides se encuentran  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\beta$  caroteno, luteína, zeaxantina.

Estos compuestos también son de gran importancia a nivel fisiológico y dietético, ya que algunos de ellos tienen actividad como provitamina A, esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sana la piel y los tejidos superficiales. Puede aportarse como vitamina, llamada retinol, también como algunos análogos menos activos, o como sus precursores los carotenoides.

Sin embargo, el hecho de que los carotenoides estén suscitando últimamente un gran interés se debe a una serie de estudios que demuestran su actividad antioxidante. La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración cis o trans, etc.), su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E. En un principio estos estudios se llevaron a cabo basándose principalmente en el  $\beta$ -caroteno; el mecanismo de la actividad antioxidante de este compuesto está relacionado con su carácter hidrofóbico y con su capacidad para "retirar" el oxígeno singlete (principal agente oxidante en sistemas biológicos) y desactivar radicales libres [24, 25, 26, 27].

La cadena poliénica de los carotenoides es altamente reactiva y rica en electrones, consecuentemente, en presencia de oxidantes forma fácilmente radicales libres de vida corta, ejerciendo una protección contra el daño fotooxidativo [25].

Los extractos de plantas son usados como fuentes de carotenoides, en especial de  $\beta$  caroteno y xantofilas, tradicionalmente se usan como aditivos en alimentos, bebidas y forrajes, ya sea en forma de extractos naturales o como compuestos puros [25] en reemplazo de los aditivos sintéticos [28]. Los carotenoides se encuentran en las partes verdes, amarillas y colores semejantes de las plantas y frutos, las frutas y las flores tienen mayor diversidad de carotenoides de los que se derivan por sus colores atractivos. Por el momento se considera que quizá los carotenoides y retinoides pueden tener un efecto fisiológico en los humanos [26].

Fuentes y sus colaboradores (2000) realizaron una investigación en donde muestran que la caléndula presenta una humedad del 10,8% y de 10,7% en la variedad fiesta gitana y radio respectivamente; variedades que se presentan en México [3]. Se encontró un contenido de 0,078 y 0,017% de carotenoides totales

(familia C40 pigmentos isoprenoides) en las flores y en los receptáculos, identificando algunos compuestos como lo son; a, b, y g-caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentioxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, b-zeacaroteno, mutatoxantina y luteína epóxido [2], aunque han sido identificadas cerca de 600 estructuras diferentes de carotenoides. Según Moehs y sus colaboradores las flores de caléndula acumulan una cantidad de estos compuestos 20 veces superior que en sus hojas, presentándose variedades que van desde el blanco con amarillo claro hasta el naranja oscuro dependiendo del contenido de carotenoides. Estos compuestos son de gran interés en la alimentación humana debido a que ellos son precursores de la vitamina A y su deficiencia en el cuerpo causa ceguera y mortalidad precoz [29].

Bako y sus colaboradores (2002) identificaron los carotenoides presentes en pétalos, polen, hojas y tallos en cinco diferentes tés de caléndula cultivada en el sur de Hungría, dichos compuestos fueron extraídos con metanol y dietileter, identificando los compuestos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [30]. Los resultados se muestran en la Tabla 1.2.

Algunos carotenoides presentan un papel protector contra la cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, fotoprotección, degradación de cataratas, respuesta inmune, envejecimiento y cáncer. La actividad protectora de los carotenoides de la caléndula se deriva de su actividad antioxidante, el componente principal responsable de la coloración en esta flor es la luteína, un carotenoide soluble en grasa. Comercialmente los pigmentos de la caléndula son extraídos mediante prensado, secado, molienda y extracción con hexano, los cuales se destinan principalmente para la coloración de la piel del pollo. Sin embargo este proceso tiene pérdidas de cerca del 50% de los carotenoides y genera grandes pérdidas de hexano que difundido en el aire causa problemas en la salud. Por esta razón Delgado y Paredes (1997) en su trabajo realizaron un estudio acerca de la extracción de carotenoides en la caléndula utilizando enzimas que degradan la pared celular (hemicelulasa, celulasa, pectinasa, proteasa, glucosidasa) con miras a una mejora en el rendimiento [31].

**Tabla 1.2** Composición de carotenoides en pétalos, polen, hojas, y tallos de Caléndula (*Calendula officinalis* L.)

Carotenoide	Pétalos %	Polen %	Hojas %	Tallos%
36 Neoxantina	1,22	0,93	0,65	1,41
9Z-Neozantina	0,52	0,51	1,61	0,76
Violaxantina	0,32	0,36	10,02	1,58
(33) Luteoxantina	11,81	2,23	1,97	2,83
(27) Auroxantina	9,54	4,48	0	0
9Z-Violaxantina	2,56	2,03	0	0,52
Flavoxantina	21,09	32,45	0	0
Mutatoxantina epimero 1	0	0	0	1,33
Mutatoxantina epimero 2	0	0	0	1,58
(35) Mutatoxantina	3,03	0	0	0
(26) Anteraxantina	0	0	2,9	1,29
9Z-Anteraxantina	5,14	10,51	0	0
(30) Luteína	5,69	11,78	34,93	28,08
9/9Z – Luteína	2,64	6,44	2,57	5,42
13/13Z – Luteína	1,79	2,41	2,07	2,35
(31) $\alpha$ -Criptoxantina	5,51	2,14	1,17	2,01
(31) $\beta$ -Criptoxantina	2,11	2,45	0,47	0,73
Z-Criptoxantina	0	0,52	0	0
(34) Licopeno	7,37	0,41	0	0
(28) $\alpha$ -Caroteno	5,67	5	0	0
(29) $\beta$ -Caroteno	6,46	6,54	26,7	20,82
Total carotenoides (mg/g peso seco)	7,71	1,61	0,85	0,18

Fuente: [5]

La enzima utilizada fue de origen fúngico, el contenido de carotenoides fue determinado usando dos métodos espectrofotométricos de la AOAC, para las muestras tratadas con enzima y las no tratadas. Los resultados de esta investigación muestran que la enzima (Econase-cep) tiene un efecto en el contenido total de carotenoides extraídos, ya que a medida que aumentaba la concentración de la enzima aumentaba la cantidad de carotenoides extraídos. Cuando no se usaba la enzima, el total de carotenoides extraídos era de 13.5 g por kg de muestra seca (flor de caléndula) y al usar la enzima la cantidad de carotenoides extraídos aumentaba, al utilizar una concentración de 0,2% de la

enzima el total de carotenoides extraídos fue de 20,5 g por kg de muestra seca. También se determinó que el rendimiento en la extracción aumentaba cuando se eliminaban las sustancias solubles en agua de la muestra. Adicionalmente los autores sugieren que mediante el tratamiento enzimático se podría aumentar la digestibilidad de las comidas a base de caléndula que se suministra a los pollos.

## **Flavonoides**

Los flavonoides constituyen uno de los subgrupos de los compuestos fenólicos más importantes debido a su actividad antioxidante, encontrándose ampliamente distribuidos en el reino vegetal localizados en la savia vacuolar de las células como hojas, flores y raíces. Los flavonoides pueden clasificarse según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en seis clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, taninos condensados y las auronas, también pueden sufrir modificaciones y convertirse en isoflavonoides o neoflavonoides [5]. La mayoría se caracteriza por ser hidrosolubles y estables al calor siendo susceptibles a los cambios químicos como la maduración, físicos en el procesamiento de alimentos como picado y trituración (rotura de estructuras, lixiviación y destrucción parcial en contacto con el aire) y térmicos, ya que el calor excesivo altera los pigmentos de los alimentos [32].

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, desempeñando un papel esencial frente a los fenómenos de daño oxidativo [33] constituyéndose en una nueva fuente de antioxidantes naturales para la industria alimenticia. Adicionalmente son capaces de modular la actividad de las enzimas y ejercen actividades importantes como: antiinflamatorio, antialérgico, antiplaquetario, antiulceroso, antiosteoporótico. Sin embargo a pesar de todas las propiedades que presentan los flavonoides su frecuencia de consumo es muy variable de acuerdo a los hábitos alimenticios en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16mg/día [33].

Recientemente se han llevado a cabo estudios acerca del contenido de flavonoides y la actividad quimiopreventiva contra el cáncer en flores de *Paulownia tomentosa*, flores que han sido utilizadas como medicina tradicional en

china para el tratamiento de la enteritis, amigdalitis, bronquitis y disentería [34]. En la flor de caléndula los flavonoides se presentan con un contenido de 0,88 y 0,33% de flavonoides totales en las flores y en los receptáculos, entre los cuales se identifican : Rutinosido, heterósidos de isoramnetina, isoramnetina 3-O glicósido, isoramnetina, neohesperidósido, quercetina glucósido, calendoflosido, calendoflavosido, calendoflavobiosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutosido y kaemferol [2, 3].

Cetkovic y sus colaboradores (2004) realizaron un estudio en donde determinaron las propiedades antioxidantes de los extractos obtenidos de *Calendula arvensis* L. silvestre y *Calendula officinalis* L. siendo la última la que presentó mejor comportamiento por su mayor contenido de metabolitos fenólicos y de flavonoides con una concentración de compuestos fenólicos totales de  $6,6 \pm 0,3$  mg/g extracto de planta, flavonoides totales de  $3,4 \pm 0,1$  mg/g extracto de planta, % de inhibición de DPPH del extracto metanólico  $12,9 \pm 0,8$  [35].

Según Bilia y sus colaboradores (2001), los flavonoides se consideran como los principios activos de los medicamentos a base de hierbas y plantas medicinales, en esta investigación se estudiaron los flavonoides presentes en tinturas agua-etanol de flores de caléndula por HPLC-MS con detección UV a 350nm, identificando siete flavonoides como se muestran en la Tabla 1.3 [36].

**Tabla 1.3** Contenido en mg/mL de flavonoides identificados en las tinturas de Caléndula (60% y 40% v/v solución hidroetanólica)

	Tintura 60% v/v	Tintura 40% v/v
Quercetina-3-rutgle	2.1±0.08	1.8±0.09
Rutina	4. ±0.23	4.0±0.29
Isoramnetina-3-rutgle	16.6±0.52	18.6±0.80
Isorquercitrina	2.0±0.06	1.6±0.10
Isoramnetina-3-glegle	7.1±0.060	9.4±0.64
Narcisina	21.4±0.72	20.4±0.86
Isoramnetina-3-gle	3.2±0.11	2.6±0.13
Flavonoides totales	57.1	58.4

Fuente: [36]

Los flavonoides presentes en la flor de caléndula tienen una gran importancia, por lo cual se han desarrollado métodos específicos para su identificación, por ejemplo

Abdullabekova y Tulaganov (2001) desarrollaron un método cromato-espectrofotométrico para el análisis cuantitativo de isorhamnetina diglicosido, uno de los principales flavonoides responsables de la actividad farmacológica, mediante procesos de extracción, aislamiento y análisis espectrofotométrico, usando como solvente de extracción una solución de butanol, ácido acético, agua, encontrando un contenido final del flavonoide de 0,6% [37].

En un estudio realizado por Osorio y sus colaboradores (2009) en donde caracterizan fitoquímicamente una fracción bioflavonoide (FB) de *Garcinia madruno* (Clusiaceae), destacan la capacidad de los flavonoides para actuar como dadores de electrones o quelantes de iones metálicos, protegiendo a los tejidos frente a las ROS y a la peroxidación lipídica, evidenciando a los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8: morelloflavona y volkensiflavona como los mejores inhibidores de la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mediante esta investigación los autores proponen a la FB de *Garcinia madruno* como un excelente candidato para ser utilizado como antioxidante [10].

## **1.5 Otros componentes**

Crabas y sus colaboradores (2003) realizaron la extracción del aceite de caléndula mediante fluidos supercriticos con CO<sub>2</sub> y su respectiva caracterización encontrando una composición de hexadecanoato de metilo (23.8%), linoleato de metilo (18.6%), 9-12-15-octadecatrienoato de metilo (17,2 %), octadecanoato de metilo (4,8%), tetradecanoato de metilo (4,6%),  $\gamma$ -cadineno y cubenol [4%],  $\alpha$ -cadinol (1.8%), y oplonanona (1.3%) [38].

Los aceites esenciales se presentan en un porcentaje de (0,1-0,4%) en las flores y en los receptáculos [39]. Algunos autores han identificado su composición encontrando los compuestos que se muestran en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4** Compuestos identificados en el aceite esencial de caléndula

COMPUESTO IDENTIFICADO	Fuente
$\alpha$ -cadinol (25%)	[40]
la mentona, isomentona, terpineno, g-muuroleno, a-cadineno, cariofileno, pedunculatina, a y b ionona, dihidroacnidiolido, carvona, geranilacetona, cariofilenocetona, sesquiterpenos (epicubebol, aloaromadendrol), oxido-transcariofileno, b-ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, guaiol y torryol.	[39]
Timol, $\alpha$ -cubebeno, (8) $\alpha$ -copaeno, (-)- $\alpha$ -grujueno, (7) $\beta$ -Cariofileno, $\beta$ -grujueno, $\alpha$ -humuleno, cis-4-muurolo-5-dieno, (5) $\gamma$ -muuroleno, D-germacrene, $\beta$ -ionona, ledeno, $\alpha$ -muuroleno, $\gamma$ -cadineno, cadina-1,4-dieno, $\alpha$ -cadineno, $\alpha$ -calacoreno, ledano, ledol, cubenol, T-cadinol+T-muurolol, $\beta$ -eudesmol, (4) $\alpha$ -cadinol, acido hexadecanioco, 2-pentadecanona, heptadecano, octadecano, nonadecano, n-eicosano.	[41]

Jiang y colaboradores (2005) determinaron por métodos cromatográficos el contenido de luteína y esteres de luteína, inicialmente realizaron un espectro ultravioleta (UV) para la luteína en donde se encontró que la máxima longitud de onda de absorción para este compuesto estaba en 460nm. Posteriormente por HPLC fue determinado el contenido de luteína y los esteres de luteína encontrando diez picos en la grafica que corresponden al mismo número de compuestos [42].

Los picos corresponden a:

1. Luteína libre R1=OH, R2=OH
2. Monomiristato R1 = OH, R2 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>
3. Monopalmitato R1 = OH, R2 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>
4. Monoestearato R1 = OH, R2 =OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>
5. Dimiristato R1 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>, R2 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>
6. Plamitato miristato R1 =OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>CH<sub>3</sub>, R2 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>
7. Dipalmitato R1 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>, R2 = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>

8. Estearato palmitato R1 =  $\text{OCO}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ , R2 =  $\text{OCO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$
9. Diestearato R1 =  $\text{OCO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$ , R2 =  $\text{OCO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$
10. Desconocido

La mayor concentración correspondió a la luteína libre, seguida del monoesterato y el monopalmitato y la menor concentración fue para el monomiristato. Mediante este perfil cromatográfico determinaron que en la flor de caléndula existen ocho tipos de esteres de luteína, que poseen los anillos principales de luteína pero difieren en la esterificación. Los esteres pueden ser divididos en dos grupos, uno tiene un hidroxilo esterificado por el ácido graso y un tiempo de retención más corto y otro tiene dos hidroxilos esterificados y el tiempo de retención es mayor.

El contenido de luteína y esteres de luteína fue cuantificado en extracto de hexano y en muestras saponificadas como se muestra en la Tabla 1.5.

**Tabla 1.5** Contenido de luteína y esteres de luteína en extractos de hexano y muestras saponificadas

Pico No.	Extracto de hexano (%m/m)	Muestras saponificadas (%m/m)
1	18.67	42.01
2	3.44	0.10
3	14.74	4.94
4	17.69	8.70
5	4.91	2.21
6	5.41	5.97
7	11.30	13.17
8	12.04	16.88
9	9.34	4.42
10	2.46	0.65

Fuente: [42]

Respecto a este tema Deineka y sus colaboradores (2007) determinaron el contenido de xantofilas en tres variedades de flores de caléndula (*T. erecta*, *T. patula* y *T. tenuifolia*) mediante espectrofotometría y la composición de diesteres de luteína y antocianinas por HPLC. Dicha investigación es fundamentada en el interés de los últimos años por la luteína, compuesto al que se le atribuye el deterioro en la visión. En muchos países este compuesto se obtiene naturalmente extrayéndolo de los pétalos de las flores de caléndula, los cuales contienen

predominantemente diésteres de luteína. Las xantofilas extraídas de esta planta también se utilizan en la obtención de un material concentrado usado en productos nutritivos [43].

Los resultados obtenidos muestran diferencias entre las variedades de flores de caléndula analizadas, dependiendo del color (naranja-amarillo) y de si los pétalos tenían manchas o no. Por ejemplo las flores naranja con manchas vino tinto se caracterizaron por un alto contenido de antocianinas, siendo el componente principal la cianidina-3-glucosido. En cuanto al contenido de xantofilas en pétalos frescos, los resultados en general variaron entre 5,24 mg/g y 1,47 mg/g y en los pétalos secos alcanzaron hasta 17,0 mg/g en las tres variedades analizadas. También se identificaron los ácidos principales encontrando el ácido mirístico y el palmítico como predominantes y fracciones más pequeñas de ácido esteárico y laurico y se concluyó que las flores de caléndula cultivadas en la región de Belgorod Rusia constituyen una buena fuente de xantofilas naturales.

Por otra parte se ha encontrado un contenido de saponósidos entre 2 y 5%, identificándose los calendulósidos A, D, F y D2 (Derivados del ácido oleanólico).

Los alcoholes triterpénicos de la flor de caléndula también han tenido una gran importancia, entre ellos se encuentran  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, taraxasterol, arnidiol, faradiol, y triterpenoles pentacíclicos, 3,16,21 trihidroxi-ursaeno, ursadiol, heliantriol A0 B1, B2 y C, loliolido, 3,16,28 trihidroxi olean- 12- eno, 3,16,28 trihidroxi lup-20 eno [29], 3,16,22 trihidroxi tarax-20-eno, 3,16,30 trihidroxi tarax-20-eno y calendulosido F [2]. Akihisa y sus colaboradores identificaron que el componente principal de las flores de Caléndula es el Helianol, alcohol triterpénico, con un porcentaje de 26% en flores tubulares y de 33% en flores liguladas [44].

También han sido identificados ácidos fenólicos como el coumárico, gentísico, vainílico, caféico, siríngico, o-hidroxifenilacético, protocatequínico, ferúlico, p hidroxibenzoico, salicílico, clorgénico, verátrico, o-coumárico, sinópico y químico.

Los taninos se encuentran en la caléndula en el 11,2 y 10,4 % para las flores y los receptáculos de tipo catecol y pirogallol. Otros compuestos presentes en las flores de caléndula son: las cumarinas, de las cuales se identifican la escopoletina, umbeliferona, y esculetina; los esteroides, los azúcares y las parafinas.

Por su parte Chushenhko (1988) detectó la presencia de polisacáridos solubles en agua, sustancias pectínicas y hemicelulosas en 14,75; 9,67 y 5,92 % en base seca [2, 9, 45].

Águila y sus colaboradores (2000) mediante un análisis farmacológico preliminar del extracto acuoso de la flor de caléndula, encontró saponinas, polisacáridos, flavonoides, aminoácidos y taninos y una acción antimicótica frente a hongos dermatofitos [46].

La estructura, biosíntesis y actividad biológica de las saponinas de la caléndula fueron investigadas por Szakiel y sus colaboradores (2005) [47]. La caléndula contiene en las flores y en los demás órganos de la planta, dos series de compuestos estructuralmente relacionados denominados como saponinas, derivados del 3-O-monoglucosido del ácido oleanólico (glucósidos) y derivados del 3-O-monoglucoronico (glucoronidos) que se diferencian por su biosíntesis, metabolismo y actividad biológica. Los glucósidos difieren del resto de carbohidratos formados hasta por 10 unidades de monosacáridos, a menudo en forma de cadenas ramificadas. Se determinó que los glucoronidos son producidos en cantidades relativamente grandes, aproximadamente un 2% de la masa seca en las flores y en cantidad considerablemente más baja en las partes verdes de la planta. Los resultados muestran que ambas series de glucósidos son sintetizadas en las raíces jóvenes de la caléndula y sus caminos de biosíntesis son similares pero no idénticos. También se concluye que la biosíntesis del ácido oleanólico en la caléndula depende principalmente de las condiciones de luz y las condiciones hormonales de la planta y que la actividad biológica varía en cuanto al número y tipo de hidratos de carbono presentes.

## **1.6 Procesos de aprovechamiento**

### **Secado de la planta**

El secado de la planta tiene gran importancia en la preservación de los principios activos, por lo cual es necesario el secado de las flores de caléndula lo más inmediato a su cosecha ya que su almacenamiento por 3,5 horas en sacos de polietileno provoca una pérdida del 28-30% de los carotenoides y del 24-26% de los flavonoides, también recomiendan una temperatura de secado de 80°C obteniéndose los mayores rendimientos en el contenido de carotenoides y flavonoides comparados con un secado a 20°C, el menor tiempo de secado se ve reflejado en una menor actuación de las enzimas, por otra parte las temperaturas mayores a 100°C tienden a reducir la cantidad de principios activos [2]. Sin embargo otras investigaciones reflejan que la mejor forma de secado es al sol con una temperatura promedio de 40°C, en donde se obtienen los mayores porcentajes de rendimiento en los extractos [9].

Por otra parte García y sus colaboradores (1996) estudiaron las características organolépticas de la caléndula durante un periodo de almacenamiento en diferentes tipos de recipientes, demostrando que estas se mantienen dentro de los rangos óptimos durante un periodo de seis meses en frascos de cristal y latas compuestas, a partir de este tiempo el contenido de humedad incrementa mientras que los porcentajes de sustancias extractivas en alcohol al 70% y en agua disminuyen considerablemente. Los autores mencionan que la farmacopea Soviética plantea que las sustancias extractivas en alcohol al 70% deben ser mayores al 35% [9].

### **Obtención de extractos**

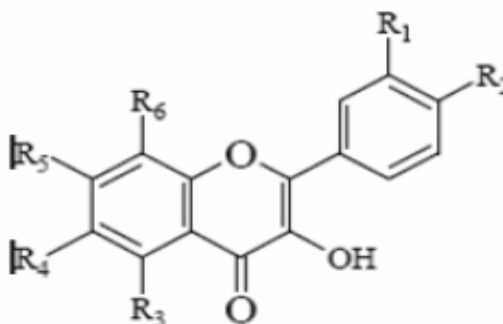
En cuanto a la obtención de extractos de plantas Avramoya y sus colaboradores (1988) plantean la obtención de extractos de caléndula con éter de petróleo, alcohol y propilenglicol, dando ciertas condiciones de preparación y afirmando que los principios activos son los carotenoides y los flavonoides, además demostraron que dichos extractos no presentan propiedades carcinogénicas ni toxicidad crónica en un periodo de 18 meses [48]. Por su parte Montoya y sus colaboradores (2003) estudiaron la actividad antioxidante de varias plantas medicinales, plantearon la obtención de los extractos en muestras vegetales secas y molidas sometiéndolas a extracción por una semana a temperatura ambiente 24-26°C, con etanol al 96% en atmosfera de nitrógeno, utilizando una relación de material : solvente de 1:10. [13].

Por otra parte Lastra y colaboradores (1999) mencionan un estudio en donde se emplean diversos métodos extractivos con solventes hidroglicólicos, concluyendo que el método de percolación es el más adecuado y que los extractos con propilenglicol al 50% presentaron los mejores resultados en términos de extracción de los flavonoides [2].

### **Extracto hidroalcohólico**

El extracto hidroalcohólico de la caléndula contiene saponinas, sesquiterpenos glicosilados y glicósidos de flavonoides. Los principales flavonoides son (14) kaempferol, (15) quercetina y (16) isorhamnetina, presentados en la Figura 1.3.

**Figura 1.3** Constituyentes del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L.



Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(14) Kaempferol	-	OH	OH	-	OH
(15) Quercetina	OH	OH	OH	-	OH
(16) Isorhamnetina	OH	OMe	OH	-	OH

Fuente: [5]

En los extractos metanólico y acuoso de flores de caléndula se encuentran ácidos fenólicos, en forma libre, esterificada y glicosídica como el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vainílico, ácido oleanólico, ácido protocatéquico y ácido siríngico [5].

### Oleoresina

Danielski y colaboradores (2007) obtuvieron oleorresina mediante extracción con fluidos supercríticos y solventes orgánicos, los resultados se muestran en la Tabla 1.6. Inicialmente la extracción con solventes se realizó con metanol por 5 días luego este compuesto fue evaporado a presión reducida evitando la descomposición de compuestos termolábiles hasta el 10-20% del volumen inicial, después de esto el extracto fue tratado con diclorometano y n-hexano, luego mediante cromatografía de gases se identificaron los componentes presentes en cada caso [49].

**Tabla 1.6** Composición de oleorresina de flor de caléndula obtenida mediante extracción con solventes orgánicos y fluidos supercriticos CO2 a 40°C a diferentes presiones (120, 150, 180 bares)

Componente	% Porcentaje área del pico				
	diclorometano	n-Hexano	Fluidos supercriticos		
			120 bar	150 bar	180 bar
Acetil eugenol					7,44
4-octil fenol					1,07
Guaiol					5,07
Cedrol					1,94
Octadecano	0,62	1,81			4,14
acido tetradecanoico	1,15	2,38	0,76		0,95
Nonadecano	1,41		0,4	0,32	0,48
Eicosano		20,43	0,56	3,43	3,06
Heneicosano				0,32	0,21
Docosano			0,6		4,88
Tricosano	2,78		0,5		0,5
Tetracosano	21,8	8,79	0,11	9,76	10,47
Pentacosano					1,04
Hexacosano			10,7		18,23
Hepcacosano			0,9	0,52	1,44
Octacosano			12,74	11,98	9,95
7-hexil eicosano			2,75	0,18	0,45
9-octil eicosano				1,27	0,61
Canescegenina			0,33	0,13	0,79
14-metil-4-colesten-3-ona			0,37	0,12	0,83
(12) taraxastero			0,21	0,13	1,19
1-octadecanol	11,94				0,15
1,16-hexadecanodiol	31,59	3,76			0,26

Fuente: [49]

El rendimiento por solventes orgánicos fue mucho mayor que con fluidos supercriticos, sin embargo se detectaron mas compuestos con esta ultima técnica. En este estudio enfatizan en que el método de obtención de extractos, así como el tiempo de extracción influye en la composición y la calidad del extracto de caléndula.

## **1.7 Propiedades terapéuticas**

La flor de caléndula tiene amplias propiedades terapéuticas, entre las cuales se pueden destacar la actividad antiinflamatoria, actividad antiséptica y cicatrizante, acción antiespasmódica, emenagoga (estimulante del flujo sanguíneo en el área de la pelvis y el útero fomentando la menstruación), acción emoliente, callicida y antiulcerosa, actividad colerética y hepática. También resulta eficaz para malestares gástricos como gastritis, gastroenteritis, vómitos, hepatitis y otras enfermedades gastrointestinales, en el tratamiento de la hipertensión, taquicardia y arritmia, en el tratamiento de diversas enfermedades del sistema urinario, así como en enfermedades del sistema nervioso central y periférico [2, 9, 47, 50]. En Francia se encuentran reportes acerca de la actividad antitumoral y citotóxica de los extractos de caléndula [4].

En la actualidad, hay muchos productos médicos derivados de la caléndula, para tratamiento de tumores de la piel, lesiones dermatológicas, úlceras e hinchazones. [47]. Además del uso medicinal se refiere su empleo en cosméticos, así como en la industria alimentaria, en la fabricación de galletas, caramelos, licores, como colorante natural de la mantequilla o como sucedáneo del azafrán [4].

## **1.8 Toxicidad**

Su uso tópico de la caléndula está contraindicado en pacientes sensibles a las asteráceas, experimentalmente se ha visto una débil sensibilización de la piel y parece tener (ex vivo) una acción uterotónica, la ESCOP (European Scientific Cooperative On Phytotherapy) no pone objeciones para que se use durante el embarazo y el periodo de lactancia [38]. Sin embargo se recomienda no usarlo durante estos periodos [51]. En los ensayos de toxicidad crónica se ha podido comprobar que no es tóxica y los estudios de mutagenicidad y carcinogenicidad hechos con extractos de la flor de caléndula, han resultado negativos [38].

## **1.9 Aplicaciones**

Guzmán y sus colaboradores realizaron un estudio en donde probaron la actividad fotoestabilizante del extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula en la estabilización de la riboflavina, sustancia altamente sensible a la luz, en ella se buscaron estrategias para disminuir la velocidad de la degradación de la riboflavina, obteniendo los mejores resultados con la utilización de colorantes y compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico de caléndula y el té

verde. El análisis de fotodegradación de la riboflavina se realizó por HPLC a diferentes tiempos, al graficarse los datos de concentración de riboflavina vs tiempo de irradiación, se observó que la concentración de riboflavina permaneció mucho más estable durante todo el tiempo que fue irradiada con la presencia de las sustancias naturales del té verde y el extracto de caléndula, los cuales son ricos en flavonoides y polifenoles, por el contrario la solución testigo (Riboflavina sola) presentó una degradación rápida [52].

Por otra parte estudios farmacológicos experimentales realizados por Dumenil (1980) con extractos etanólicos al 80% mostraron actividad antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* [4, 46, 53].

Cristiane y sus colaboradores (2008) realizaron estudios acerca de la actividad antifúngica del aceite esencial de las flores de caléndula mediante técnicas de difusión en agar en 23 cepas de hongos patógenos y levaduras clínicas aisladas de los seres humanos, por ejemplo las que provocan la enfermedad conocida como candidiasis mucocutánea, dando como resultado que el aceite tiene un buen potencial antifúngico siendo eficaz contra todas las cepas analizadas [54]. En este estudio se reportan que los principales componentes del aceite esencial fueron hidrocarburos sesquiterpénicos en mayor proporción, sesquiterpenos,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -muurolol. En el estudio realizado por Szakiel y sus colaboradores (2005) también se menciona la actividad antifúngica y antibacteriana comprobada del aceite oleanólico y sus derivados en la flor de caléndula contra la bacteria gram negativa *Escherichia coli*, actividades que pueden ser aprovechadas en la protección contra los patógenos [47].

Soliman y sus colaboradores (2002) comprobaron que los aceites esenciales de caléndula presentaron actividad frente a mohos toxigénicos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme* a una concentración de 3000ppm [55].

Lastra y colaboradores (1999) mencionan la propiedad antiinflamatoria comprobada de los extractos de caléndula, así como el poder cicatrizante en animales y humanos [2].

## **Conclusiones**

La flor de caléndula es conocida a nivel mundial por sus propiedades farmacológicas y medicinales, tiene una composición química compleja con un

amplio número de familias lo cual concuerda con sus innumerables propiedades farmacológicas y antioxidantes. Los compuestos antioxidantes más importantes de esta planta son los carotenoides y los flavonoides. Adicionalmente se ha estudiado la composición del aceite esencial y la identificación de compuestos como luteína y esteroides de luteína, xantofilas, calendulosidos, alcoholes triterpénicos, ácidos fenólicos, taninos, polisacáridos y saponinas entre otros.

La flor de caléndula es aceptada, avalada y monitoreada por la FDA, donde se encuentra clasificada como suplemento dietario y es reconocida como ingrediente alimenticio seguro.

La flor de caléndula y sus extractos cuentan con un gran potencial para ser utilizada en la industria alimenticia aprovechando sus propiedades como antioxidante, fotoestabilizante, pigmento natural, antimicrobiano y antifúngico. Esta flor puede constituirse en un aditivo alimenticio de origen natural que potencie la actividad antioxidante de un producto, imparta o intensifique un color específico, mejore su vida útil y reemplace o reduzca parcialmente uso de agentes conservantes de origen sintético.

La obtención de extractos de caléndula se ha realizado a partir de muestras vegetales secas y molidas, mediante el uso de solventes orgánicos como éter de petróleo, etanol al 96%, metanol, diclorometano, hexano, propilenglicol y mezclas hidroalcohólicas o a través de extracción con fluidos supercríticos.

El uso de antioxidantes naturales en la inhibición del pardeamiento enzimático de frutas y vegetales se ha convertido en un área de investigación importante debido a su relevancia en la industria alimentaria. El oscurecimiento enzimático se presenta en la superficie de la pulpa de fruta y es causado por la acción de la enzima polifenoloxidasas.

La flor de caléndula contiene importantes compuestos con acción antioxidante como los carotenos, sin embargo el contenido de este compuesto en la flor cambia entre las variedades dependiendo de la composición química, el color (naranja-amarillo) y de si los pétalos tienen manchas o no.

El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos, por lo cual se plantea la necesidad del secado de las flores de caléndula lo más inmediato a su cosecha, con una temperatura de secado de 80°C evitando pérdidas en el contenido de carotenoides y flavonoides.

## Referencias bibliográficas

1. DERMARDEROSIAN, A. y BEUTER, J. The review of natural products. Segunda Edición. St Louis, Argentina: Elsevier, 2002.
2. LASTRA, H. y PIQUET, R. *Calendula officinalis* L. Artículo de revisión. Revista cubana de farmacia, 1999. 33(3), 188-194p.
3. FUENTES, V.; LEMES, C.; REYES, M.; MENDEZ, G.; ALONZO, J.; RODRIGUEZ, A. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. Revista cubana de plantas medicinales, 2000. 5(1), 14-16p.
4. ACOSTA, L.; RODRÍGUEZ, C.; SÁNCHEZ, E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis* L. Estación experimental de plantas medicinales. Rev Cubana Plant Med, 2001. 1 (23), 23-27p.
5. ABRIL, A. *Calendula officinalis* L.: Composición, propiedades y aplicaciones cosméticas. Monografía especialización en Ciencia y Tecnología en Cosmética. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2008. 3-41p.
6. GAZIM, Z.; MORAES, C.; FRAGA, S.; PRADO, B.; VATARU, C.; GARCIA, D. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* L. growing Brazil using three different extraction procedures. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas RBCF, 2008. 44 (3), 391-395p.
7. FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Subpart A-General provision, 182.1 Substances that are generally recognized as safe. 21CFR.182.10.
8. SILVA, E. Availacao toxicología preclinica do extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. Trabajo de Maestría, 2004.
9. GARCÍA, D.; SÁNCHEZ, E.; CRESPO, M.; CARBALLO, C. Estudio farmacognóstico de la Caléndula (*Calendula officinalis* L). Revista cubana de plantas medicinales, 1996. 1(3), 21-25p.
10. OSORIO, E.; MONTROYA, G.; BASTIDA, G. Caracterización fitoquímica de una fracción de bioflavonoides de *Garcinia madruno*: su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. Vitae, 2009. 16 (3), 369-377p.

11. FERNÁNDEZ, M.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.; GARCÍA M. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y la valoración de sus efectos in vivo. *Alan*, 2006. 56 (2), 1-10p.
12. BARREIRA, J.; FERREIRA, C.; OLIVEIRA, B.; PEREIRA, J. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 2008. April; 107 (3), 1106-1113p.
13. MONTOYA, B.; LEMESHKO, V.; LÓPEZ, J.; PAREJA, A.; URREGO, R.; TORRES, R. Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 2003. 10 (2), 72-79p.
14. JANG, I.; PARK, J.; PARK, E.; PARK, H.; LEE, S. Antioxidative and Antigenotoxic Activity of Extracts from Cosmos (*Cosmos bipinnatus*) Flowers. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2008. 63 (4), 205-210p.
15. RIVERO, A. y BETANCORT J. Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. *Practical Studies for Medicinal Chemistr*, 2006. 1-10p.
16. SHI, J.; GONG, J.; LIU, J.; WU, X.; ZHANG, Y. Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *Food Science and Technology LWT*, 2009. march; 42(2), 477-482p.
17. MAO, L.; PAN, X.; QUE, F.; FANG, X. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and frieze-dried daylily flowers. *Chemistry and Materials Science*, 2005. 222 (3-4), 236-241p.
18. VÁSQUEZ, A.; CALA, M.; MIRANDA, I.; TAFURT, G.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptons* y *Montanoa ovalifoli*. *Scientia Et Tenhnica*, 2007. abril 13(3), 205-207p.
19. HONG, Y.; LIN, S.; JIANG, Y.; ASHRAF, M. Variation in contents of total Phenolics and Flavonoids and Antioxidant activities in the leaves of 11 *Eriobotrya* Species. *Plant Food Hum Nutr*, 2008. December 63 (4), 200-204p.

20. FU, M.; HE, Z.; ZHAO, Y.; YANG, J.; MAO, L. Antioxidant properties and involved compounds of daylily flowers in relation to maturity. *Food chemistry*, 2009. 104 (4), 3-4p.
21. VILLEGAS, M.; AYALA, J.; CRUZ, R.; HERNÁNDEZ, J.; GONZÁLEZ, G. Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana "Red deliciosos". *Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados"* La Habana, Cuba, Marzo 2005.
22. DOMÍNGUEZ, E. Utilización de flores de Caléndula (*Calendulae flos*) en salsa para carnes. [Trabajo final especialización]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia, 2009. 10-86p.
23. CAMACHO, B.; MORENO, M.; ALEMAN, R.; ÁLVAREZ, F. Efecto de la temperatura de secado sobre la degradación de carotenoides en frutos de coroba (*Jessenia polycarpa karst*). *Rev. cienc. Tecnol. Aliment*, 2004. Julio 4 (3), 206-210p.
24. SÁNCHEZ, A.; FLORES, F.; LANGLEY, E.; MARTIN, R.; MALDONADO, G.; SÁNCHEZ, S. Carotenoides: Estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista latinoamericana de microbiología*, 1999. 4, 175-191p.
25. MELÉNDEZ, A.; VICARIO, I.; HEREDIA, F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Alan*, 2004. Junio 54 (2), 149-155p.
26. MUÑOZ, C.; CHÁVEZ, M.; CALVO, A. Necesidades de investigación en carotenoides en América Latina. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 1999. 49 (1), 85-88p.
27. ROBLES, M.; GORINSTEIN, S.; MARTIN, O.; ASTIAZARAN, H.; GONZÁLEZ, G.; CRUZ, R. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, 2007. abril 32 (4), 227-232p.
28. FIGUEROA, I.; MARTÍNEZ, M.; RODRÍGUEZ, E.; COLINAS, M.; VALLE, S.; RAMÍREZ, S.; GALLEGOS, C. Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia ssp.*) de México. *Revista Agrociencia*, 2010. 44 (7), 763-771p.

29. MOEHS, C.; TIAN, L.; OSTERYOUNG, K.; DELLAPENNA, D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant molecular biology*, 2001. 45 (3), 281- 293p.
30. BAKO, E.; DELI, J.; TOTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J Biochem Biophys Methods*, 2002. October – November, 53 (1), 241- 250.
31. DELGADO, F. and PAREDES, O. Enzymatic treatment to enhance carotenoid content in dehydrated marigold flower meal. *Plants foods for human nutrition*, 1997. 50 (2), 153-169p.
32. AGOSTINI, L.; MORÓN, M.; RAMÓN, A.; AYALA, A. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Alan*, 2004. Marzo, 54 (1), 1-5P.
33. MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J.; CULEBRAS, J.; TUÑÓN, M. Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Revista nutrición hospitalaria*, 2002: 17 (6), 271-278p.
34. CHEN, J.; YONG, L.; SHI, Y. Determination of flavonoids in the flowers of *Paulownia tomentosa* by High-Performance Liquid Chromathography. *Journal of Analytical Chemistry*, 2009. 64 (3), 282-288p.
35. CETKOVIC, G.; DIJILAS, S.; CANADANOVIC, J.; TUMBAS, V. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 2004. 37, 643-650p.
36. BILIA, A.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia*, 2001. 53 (3-4), 210-215p.
37. ABDULLABEKOVA, V and TULAGANOV, A. Development of the method of quantitative analysis for pot marigold flowers. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2001. Octubre 35 (10), 25-26 p.
38. CRABAS, N.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PIVETTA, T.; PORCEDDA, S. Extraction, separation and insolation of volatiles and Dyes *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L, her) Britton by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Essential Oil research JEOR*, 2003. Julio-Agosto 15, 350-355p.

39. MUÑOZ, L. Plantas medicinales españolas *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista medicina naturista*, 2004. 5, 37-41p.
40. WICHTL, M. Herbal drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for practice on a scientific basis. Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart, 2004. 101p.
41. PETROVIC, L.; LEPOJEVIC, Z.; SOVILJ, V.; ADAMOVIC, D.; TESEVIC, V. An investigation of CO<sub>2</sub> extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.), *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2007. 72 (4), 407-413p.
42. JIANG, X.; CHEN, L.; ZHOU, C. Lutein and lutein esters in marigold flowers by high performance chromatography. *Journal of Central South University of Technology*, 2005. 12 (3), 306-308p.
43. DEINEKA, V.; SOROKOPUDOV, V.; DEINEKA, L.; YU, M. Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2007. 41 (10), 19-30p.
44. AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 1996. 43, 255-1260 p.
45. CHUSHENHKO, V.; ZHUKOV, G.; KARAMOVA, O.; OBOLENTSEVA, G.; DZYUBA, N. Carbohydrates from the fluorescence of *C. officinalis* L. *Chemistry of Natural Compounds*, 1988. 24 (4), 499-500.
46. AGUILA, B.; MENÉNDEZ, R.; GONZÁLEZ, C.; FERNÁNDEZ, D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis* L., Estudio preliminar de sus propiedades. *Rev Cubana Plant Med*, 2000. 5 (1), 1-2p.
47. SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; JANISZOWSKA, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. –structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews*, 2005. 4(2-3), 151-158p.
48. AVRAMOYA, S.; PORTARSKA, R.; APOSTOLOVA, S. Source of new products for the cosmetic industry. Informe, 1988.
49. DANIELSKI, L.; CAMPOS, M.; BRESCIANI, V.; HENSE, H.; YUNES, R.; FERREIRA, S. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: solubility in CO<sub>2</sub>

and composition profile. *Chemical Engineering and Processing*, 2007. 46 (2), 99-106p.

50. BALCH, P. *Prescription for Herbal Healing*. New York, Estados Unidos: Penguin Putnam Inc, 2002. 40-41p
51. BERNAT, V. y CAÑIGUERAL S. *Fitoterapia vademécum de prescription*. Cuarta edición. Barcelona, España: Elsevier, 2003. 157p.
52. GUZMÁN, C.; LOPERA, S.; GALLARDO, C. *Técnicas para fotoestabilizar la riboflavina*. Trabajo de pregrado. Antioquia, Colombia: Universidad de Antioquia, 2009. 1-3p.
53. DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, C.; GUIRAUD, H.; LALLEMAND, M. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* L. flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* L. and *C. arvensis*. *Ann Pharm Fr*, 1980. 38 (6), 493-499p.
54. CRITIANE, Z.; MORAES, C.; REGINA, S.; ESTIVALETI, T.; GARCIA, D. Antifungal Activity of The Essential Oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) Growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008. January 39, 61-63p.
55. SOLIMAN, K. and BADEAA, R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 2002. Noviembre 40 (11), 1669-1675p.

## 2. Capítulo 2

**ANÁLISIS QUÍMICO DE LA FLOR DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis* L.)**

**CHEMICAL ANALYSIS OF CALENDULA FLOWER (*Calendula officinalis* L.)**

Lady Elizabeth Domínguez M, Néstor Ariel Algecira E, María Soledad Hernández

### 2.1 Resumen

La caléndula es una flor comestible, sin embargo las investigaciones acerca de ella se han centrado principalmente en aspectos farmacológicos, viéndose la necesidad de indagar acerca de su composición química, específicamente respecto a compuestos que puedan presentar propiedades como aditivo natural en alimentos. Esta investigación se centró en la obtención y estudio de calidad del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula. El extracto se obtuvo mediante maceración, se realizó un ensayo fitoquímico preliminar, caracterización estructural por espectro infrarrojo (IR) y caracterización antioxidante como cuantificación de antioxidantes licopeno y  $\beta$ -caroteno y actividad antioxidante DPPH y ABTS. La extracción tuvo un rendimiento en base seca de 29,80%, el ensayo fitoquímico preliminar muestra presencia de taninos, quinonas, carotenoides y cumarinas. El IR refleja bandas características de enlaces y grupos funcionales que pueden relacionarse con la estructura de algunos compuestos antioxidantes y antifúngicos de la flor de caléndula. En carotenos totales se encontró un contenido de luteína de  $1,81 \cdot 10^{-3}$  mg luteína/mg de extracto y de  $\beta$ -caroteno de  $5,68 \cdot 10^{-3}$  mg  $\beta$ -caroteno/mg de extracto. La capacidad antioxidante en porcentaje de decoloración DPPH es de 74,33% en extracto concentrado y 45,44% en diluido y por ABTS es de 142,8mmol de trolox/g extracto. Los resultados indican que el extracto de caléndula tiene un gran potencial para ser utilizado como antioxidante natural.

### Palabras clave

Flor comestible, Extracto, Antioxidantes, Marcha fitoquímica, Carotenos.

## **Abstract**

The flower *Calendula* is an edible flower, however the research has focused primarily on pharmacological aspects, seeing the need to inquire about their chemical composition, specifically with respect to compounds that may present properties as a natural additive in foods. This research focused on the collection and study of quality of hydroalcoholic extract of marigold flower. The extraction was maceration; The extract was analyzed by preliminary phytochemical testing, structural characterization by infrared (IR) and antioxidant characterization through quantification of lycopene and  $\beta$ -carotene and antioxidant activity through DPPH and ABTS methods. The extraction present a performance of 29.80% in dry basis, the preliminary phytochemical testing shows the presence of tannins, quinones, carotenes and coumarins. The IR has bands characteristic of links that may be related to the structure of some antioxidant and antifungal compounds in marigold flower. In total carotenoides found lutein content of  $1.81 \cdot 10^{-3}$ mg lutein/mg of extract and  $\beta$ -carotene content of  $5.68 \cdot 10^{-3}$ mg  $\beta$ -carotene/mg of extract. The antioxidant capacity in percentage of discoloration DPPH is 74.33% in the concentrated extract and 45.44% in diluted and through ABTS is 142.8 mmol of trolox /g extract. The results indicate that the extract of *Calendula* has great potential for use as a natural antioxidant.

## **Key words**

Edible flower, Extract, Antioxidants, Phytochemical study, Carotenes.

## **2.2 Introducción**

La evolución continua de la industria de alimentos y la exigencia de los consumidores han generado grandes esfuerzos por encontrar aditivos de origen natural que sustituyan los sintéticos, ya que muchos de ellos presentan efectos adversos para la salud y en algunos casos se ha llegado a prohibir su uso. Esto ha causado que los consumidores tengan poca confianza en los aditivos sintéticos, apreciándolos como peligrosos e inseguros y prefieran los productos alimenticios que empleen aditivos naturales. En este caso la naturaleza ofrece una amplia variedad de productos con cualidades que pueden ser utilizadas en los alimentos.

La flor de caléndula es tradicionalmente conocida por sus propiedades farmacológicas, medicinales y cosméticas, actualmente es utilizada como suplemento dietario, pigmento para alimentos y fuente de luteína, cuenta con una compleja composición química: antioxidantes como carotenos y flavonoides, luteína, esteroides de luteína, xantofilas, alcoholes triterpénicos, ácidos fenólicos, taninos, polisacáridos y saponinas [1,2,3,4,5,6,7,8]. Por ejemplo el contenido de antioxidantes en la flor varía de acuerdo a su color aumentando gradualmente desde el amarillo claro hasta el naranja oscuro dependiendo del contenido de carotenos, compuesto de gran interés en la alimentación como precursor de la vitamina A y antioxidante natural [4,9]. También se han encontrado propiedades muy importantes en la flor como antibacteriales [10,11,12], fotoestabilizantes y antifúngicas [13,14,15].

Las cualidades químicas presentes en esta flor pueden ser aprovechadas en su conjunto con fines diferentes a los farmacológicos, y de gran importancia como los alimenticios, es por ello que este artículo de investigación se centra en la obtención y caracterización química en términos de antioxidantes en el extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula, con el fin de determinar un posible uso como antioxidante natural que inhiba procesos de deterioro en los alimentos.

## **2.3 Método**

### **Material biológico**

Las flores de caléndula empleadas en el estudio son provenientes de la finca Tierra Grata ubicada en el km 2,5 vía la punta Tenjo Cundinamarca (Colombia), región que presenta una altitud de 2587 m.s.n.m y temperatura promedio de 13°C, las cuales fueron recolectadas en el mes de febrero del año 2011, estas exhibían un color naranja fuerte en los pétalos, pistilo y estambre. La flor se cortó incluyendo el pedúnculo y los sépalos.

### **Obtención del extracto hidroalcohólico de caléndula**

El extracto hidroalcohólico de caléndula fue obtenido por el método de maceración el cual consiste en el lavado, desinfección, y secado de la muestra en estufa a 25°C por dos días. El deshidratado se pulveriza y macera en etanol al 96% por cinco días a temperatura ambiente, posteriormente se filtra y concentra en el rotoevaporador a una temperatura menor de 45 °C hasta separar todo el alcohol y obtener una melaza [16]. El proceso se repite varias veces con el deshidratado,

hasta obtener soluciones poco coloreadas. El extracto se protege de la luz y se guarda en condiciones de congelación.

### **Marcha fitoquímica**

A partir del extracto se realizó la separación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en la flor mediante un ensayo fitoquímico preliminar, basándose en un tratamiento general de extracción y sucesivas separaciones mediante solventes de diferentes polaridades con el fin de agrupar en fracciones los metabolitos estructuralmente semejantes y caracterizarlos por su comportamiento químico mediante ciertas reacciones estandarizadas. Estas reacciones consisten en cambios en la estructura del metabolito, que conduce a una manifestación sensible como cambio o pérdida de color, formación de un precipitado o desprendimiento de un gas [17]. De esta manera se da una idea de los posibles metabolitos presentes en el extracto.

### **Caracterización estructural**

Espectro Infrarrojo: El espectro infrarrojo se tomó en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Paragon 500, las condiciones del equipo son temperatura de 68-80°C y humedad relativa de 20-80%. La muestra se trabajó en disco de cloruro de sodio.

### **Caracterización Antioxidante**

Cuantificación de licopeno y  $\beta$ -caroteno

A partir del extracto concentrado se realizó una extracción de 100 mg de extracto en 1 mL de cloroformo durante 15 min en vortex y 5 min a 5.000 rpm. Finalmente el sobrenadante se filtró y se diluyó nuevamente en cloroformo con relación 1:9 antes de inyectarlo en el HPLC (la concentración final es de 10mg/mL).

La determinación se realizó en un equipo Agilent 1.200 series, acoplado a un detector de UV – Vis a 450nm. La separación se llevó a cabo en una columna Zorbax Elclipse XDB C18 de Agilent technologies con un sistema ternario constituido por A: THF, B:CH<sub>3</sub>CN y C: MEOH en un gradiente de elución de A:B:C así: 0 – 5 min (0:50:50), de 5 – 10min (A de 0 a 10%; B constante y C de 50 a 40%), de 10 a 30 min (10:50:40) de 30 a 35 min (A de 10 a 0%; B constante y C de 40 a 50%) y de 35 a 40 min (0:50:50) Tomado y modificado [18].

## Actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó el método DPPH y el método ABTS con tres repeticiones.

Método de extracción DPPH: Pesar 100mg de muestra en un tubo eppendorf de 2mL y diluir en 1,50 mL de una mezcla de metanol y agua a pH 2 en relación 1:1. Llevar a Vortex durante 1 h y centrifugar a 15.000 rpm durante 10 min. Retirar el sobrenadante, y el residuo llevarlo a extracción con una mezcla de acetona y agua en relación 1:1. Llevar a Vortex durante 1 h y centrifugar a 15.000 rpm durante 10 min. Posteriormente se unen ambos sobrenadantes para la medición de capacidad antioxidante.

Método de cuantificación DPPH: El método de DPPH• (radical estable 2,2'-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil) empleado se basa en una modificación del protocolo planteado por Rufino y colaboradores [19]; 40 µL de muestra se mezclaron con 1.960 µL de una solución metanólica de DPPH• (60µM). La absorbancia a 515nm fue medida mientras la reacción se llevaba a cabo durante 500 s. El blanco usado fue metanol. Se realizó una curva de calibración para calcular el DPPH• remanente. Como método de comparación con un estándar conocido se realizó la determinación de la disminución de la absorbancia del DPPH ante la adición de soluciones metanólicas de Trolox ® en concentraciones de 1mM; 0,90mM; 0,80mM; 0,75mM; 0,60mM y 5 mM. Se establecieron la absorbancia y el tiempo de estabilización de la muestra como parámetros de comparación. El parámetro EC50 que refleja el 50% del consumo del DPPH•, se expresa como gramos de muestra equivalentes de trolox por gramo de DPPH• en el medio [19,20,21]. La actividad antioxidante fue expresada como mmol de trolox/g de extracto.

Método de extracción ABTS: Pesar 100mg de muestra en un tubo eppendorf de 2mL y diluir en 2 mL de una mezcla de metanol y agua a pH 2 en relación 1:1. Llevar a Vortex durante 1 h y centrifugar a 15.000 rpm durante 10 min. Retirar el sobrenadante para la medición de capacidad antioxidante.

Método de cuantificación ABTS: El método de ABTS (2,2'-azido-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) ensayo de decoloración del radical libre empleado se basa en el protocolo planteado por Rufino y colaboradores [19] con algunas modificaciones. El catión radical ABTS\* fue producido al hacer reaccionar una solución madre de ABTS 7mM y persulfato de potasio 2,5mM en agua conservada en la oscuridad a 4°C durante 16 horas. La solución ABTS\* se diluyo

en metanol hasta obtener una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  a 734nm, 1000 $\mu$ L de esta solución se incubaron a 30°C durante 6 minutos y se midió la absorbancia inicial a 734nm. Para la curva de calibración se adicionaron 20 $\mu$ L de soluciones de trolox en metanol entre 0 y 1500  $\mu$ M a 2mL de la solución de ABTS\*, se incubo a 30°C durante 6 minutos y se midió la absorbancia a 734nm, la medida de la actividad antioxidante se realizó de la misma manera que las medidas de la curva de calibración con la diferencia que el extracto para la medida se diluyó al 10% en metanol y las medidas de absorbancia se realizaron cada 3 minutos durante 40 minutos. Todo el proceso fue realizado en la oscuridad. La actividad antioxidante fue expresada como mmol de trolox/g de extracto.

### **Análisis estadístico**

Para la realización del análisis estadístico se aplico un análisis de varianza (ANOVA) cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). El análisis estadístico de los datos se realizo utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.

## **2.4 Resultados**

### **Obtención del extracto hidroalcohólico de caléndula (*Calendula officinalis* L.)**

Las flores de caléndula fueron sometidas al proceso de extracción indicado previamente en el método. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Proceso de extracción flores de caléndula

Material	Peso (g)
Flores frescas	1068,02
Flores secas	168,17
Extracto obtenido	50,12
Rendimiento base húmeda	4,62%
Rendimiento base seca	29,80%

## Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica se realizó sobre el extracto de caléndula, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.2 y muestran algunos de los principales metabolitos secundarios que contiene esta planta.

**Tabla 2.2** Marcha fitoquímica

Metabolito	Prueba	Resultado
Taninos	Cloruro férrico	+++
	Acetato de plomo	+++
	Gelatina-sal	+++
Flavonoides	Shinoda	-
	Rosenhein	-
	Leucoantocianidinas	-
	Antocianina	+++
Quinonas	Acido clorhídrico	+++
	Hidróxido de sodio	++
Carotenoides	Cloroformo	+++
Cumarinas	Fluorescencia	++

+++ Abundante

++ Regular

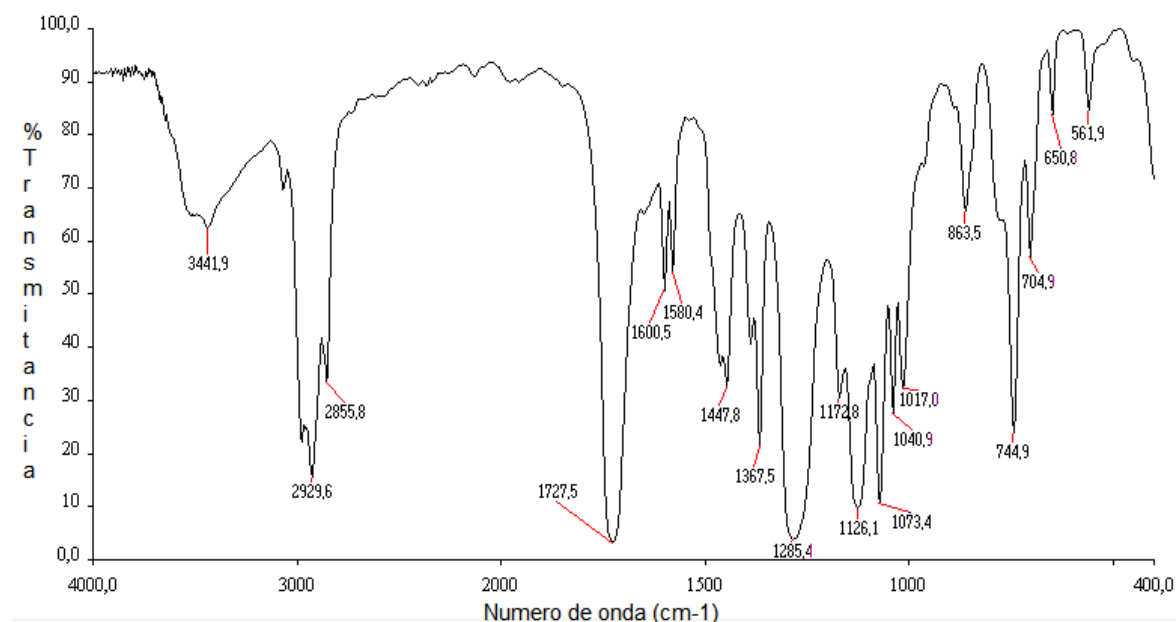
- Negativo

El ensayo fitoquímico preliminar muestra una alta presencia de taninos, quinonas, carotenoides y una presencia moderada de cumarinas. Los taninos y los carotenoides son compuestos que presentan una alta actividad antioxidante [22,23]. Las quinonas presentan actividades farmacológicas, terapéuticas, antibacteriana y antifúngica [24]. Las cumarinas por su parte presentan una acción antioxidante [22], anticoagulante y antibacterial, antibiótica, fotosensibilizadora, e insecticida, dependiendo el tipo de cumarina presente en la planta.

## Caracterización estructural

### Infrarrojo

**Figura 2.1** Espectro infrarrojo extracto de Caléndula



En el espectro infrarrojo (Figura 2.1) se reflejan varias bandas características que pueden relacionarse con enlaces de algunos grupos funcionales de los compuestos antioxidantes y antifúngicos presentes en la flor de caléndula. Según estudios previos algunos de los compuestos antioxidantes identificados en la flor de caléndula son:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína,  $\beta$  criptoxantina, zeoxantina, anteraxantina, flavoxantina, kaempferol, quercetina, isorhamnetina, rutosido, hesperidosido, violaxantina, criptoxantina, zeoxantina, luteoxantina, rutina entre otros [1,2,8,3] las características estructurales de estas sustancias son básicamente enlaces alcanos -C-H, alquenos =C-H, enlaces O-H, aldehídos, cetonas C=O, compuestos aromáticos C=C, sustituyentes metilo H-C-H, enlaces C-O de los alcoholes y éteres, y anillos bencénicos. De la misma forma se han realizado estudios previos en donde identifican sustancias con poder antifúngico y antibacterial en la flor de caléndula como: hidrocarburos sesquiterpenicos en mayor proporción, sesquiterpenos,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -muurolol [14,15] sus características estructurales son básicamente enlaces alcanos -C-H, alquenos =C-H, enlaces O-H, enlaces C=O, compuestos aromáticos C=C, sustituyentes metilo H-C-H, enlaces C-O. Las frecuencias características de estos grupos funcionales y

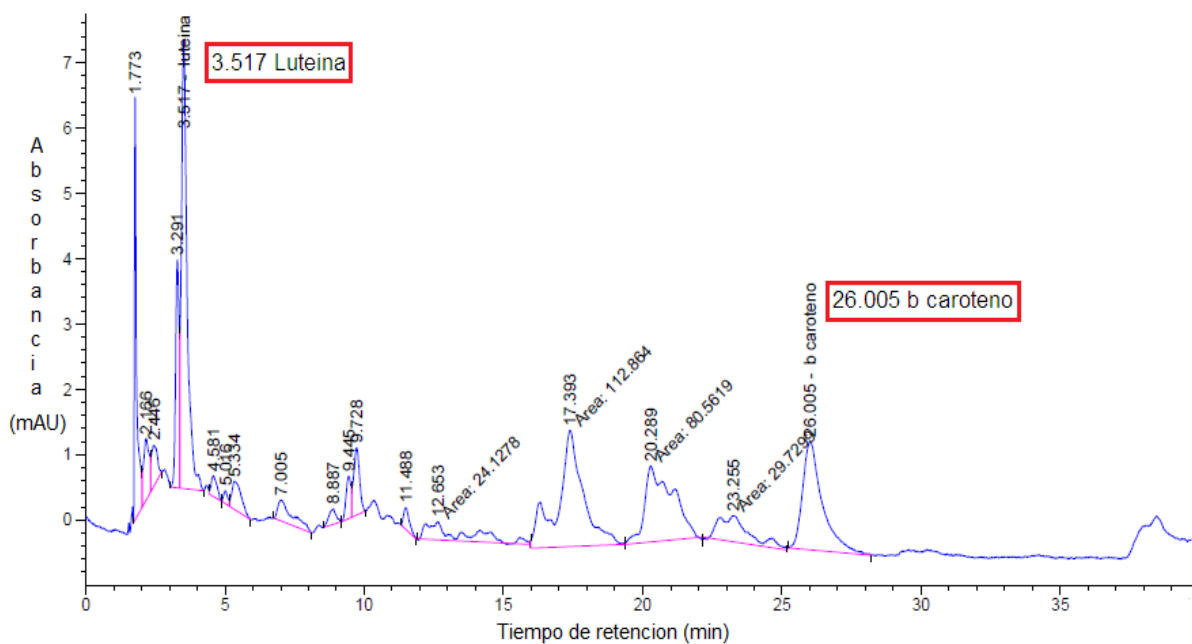
enlaces químicos se ven reflejadas en el espectro infrarrojo tomado al extracto de caléndula, lo que puede dar una idea de la posible presencia de estas sustancias antioxidantes, antibacteriales y antifúngicas. Sin embargo es importante resaltar que el espectro infrarrojo se utilizó como herramienta para obtener información estructural de la muestra, no como una confirmación de la presencia de compuestos específicos ya que para poder identificar compuestos es necesario realizar una separación y purificación de cada uno de ellos y emplear diversas técnicas de análisis.

En el espectro infrarrojo del extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula muestra en la longitud de onda de  $3441,90\text{ cm}^{-1}$  una banda ancha característica del enlace OH asociado, cercano a los  $3000\text{ cm}^{-1}$  se presenta la banda del enlace propio de los alquenos ( $=\text{C-H}$ ), las bandas encontradas en  $2929,60\text{ cm}^{-1}$ ,  $2855,80\text{ cm}^{-1}$  son propias del estiramiento del enlace de los alcanos ( $\text{C-H}$ ), la banda intensa encontrada en  $1727,50\text{ cm}^{-1}$  es causada por el estiramiento propio del enlace  $\text{C=O}$  del grupo carbonilo de las cetonas, en  $1600,50\text{ cm}^{-1}$  y  $1580,40\text{ cm}^{-1}$  se encuentran dos bandas causadas por el estiramiento del enlace  $\text{C=C}$  presente en los compuestos aromáticos, la banda presente en  $1447,80\text{ cm}^{-1}$  se debe a una flexión asimétrica en el plano  $\text{H-C-H}$ , mientras que la banda encontrada  $1367,50\text{ cm}^{-1}$  es característica de la flexión simétrica en el plano propia del metilo ( $-\text{CH}_3$ ), en  $1285,40\text{ cm}^{-1}$  aparece una banda correspondiente al enlace  $\text{C-O}$ , en  $1126,10\text{ cm}^{-1}$  se observa una absorción fuerte característica de la vibración del enlace  $\text{C-O}$  propia de los éteres, en  $1073,40\text{ cm}^{-1}$  esta la banda característica del estiramiento del enlace  $\text{C-O}$  propia de los alcoholes, mientras que los alcoholes secundarios presentan dos bandas intensas entre  $1125\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ , en el espectro se observan estas dos bandas en  $1040,90\text{ cm}^{-1}$  y  $1017,00\text{ cm}^{-1}$ , por último se encuentran dos bandas causadas por compuestos bencénicos en  $863,50\text{ cm}^{-1}$  y en  $704,90\text{ cm}^{-1}$  debido a flexiones fuera del plano y estiramientos [25,26].

## Caracterización Antioxidante

Carotenos totales:

**Figura 2.2** Cuantificación de carotenos



Descripción de la señal : VWD1 A, Wavelength=450 nm

#	Compuesto	Tiempo de Retención	Area	Factor de Respuesta	Cantidad
1	luteína	3.517	100.100	0.018	1.811
2	b caroteno	26.005	81.898	0.069	5.677

**Tabla 2.3** Ecuaciones de las curvas de calibración para la cuantificación de carotenos

Compuesto	Curva de calibración	$r^2$
Luteína	$Y=30,36 \cdot X + 45,13$	0,99
$\beta$ -caroteno	$Y=14,73 \cdot X + (-1,71)$	1

Los extractos de plantas fuente de antioxidantes, tradicionalmente se usan como aditivos en alimentos, bebidas y forrajes, ya sea en forma de extractos naturales o como compuestos puros [27], en reemplazo de los aditivos sintéticos [28], y como fuente de antioxidantes en especial de  $\beta$ -caroteno [27,29]. Los carotenoides se encuentran en las partes verdes, amarillas y colores semejantes de las plantas y frutos. En la flor de caléndula el color característico es el naranja y el amarillo, siendo un indicativo visual de la presencia de carotenoides, el componente principal responsable de la coloración en esta flor es la luteína.

Como se puede ver en la Figura 2.2 al inyectar el extracto de caléndula en el tiempo de 3,517 minutos aparece el pico que representa la concentración de luteína y en el tiempo de 26,005 minutos aparece el pico correspondiente al  $\beta$ -caroteno. Las curvas de calibración se presentan en el Tabla 2.3, siendo X el área bajo la curva y Y la cantidad de compuesto expresado en ppm, obteniendo de esta manera 1,81ppm luteína y 5,68 ppm  $\beta$ -caroteno, teniendo en cuenta la dilución del extracto 10mg/mL la concentración final de luteína es de  $1,81 \cdot 10^{-3}$  mg luteína/mg de extracto o de  $1,81 \cdot 10^{-2}\%$  y la concentración de  $\beta$ -caroteno es de  $5,68 \cdot 10^{-3}$  mg  $\beta$ -caroteno/mg de extracto o de  $5,68 \cdot 10^{-1}\%$ .

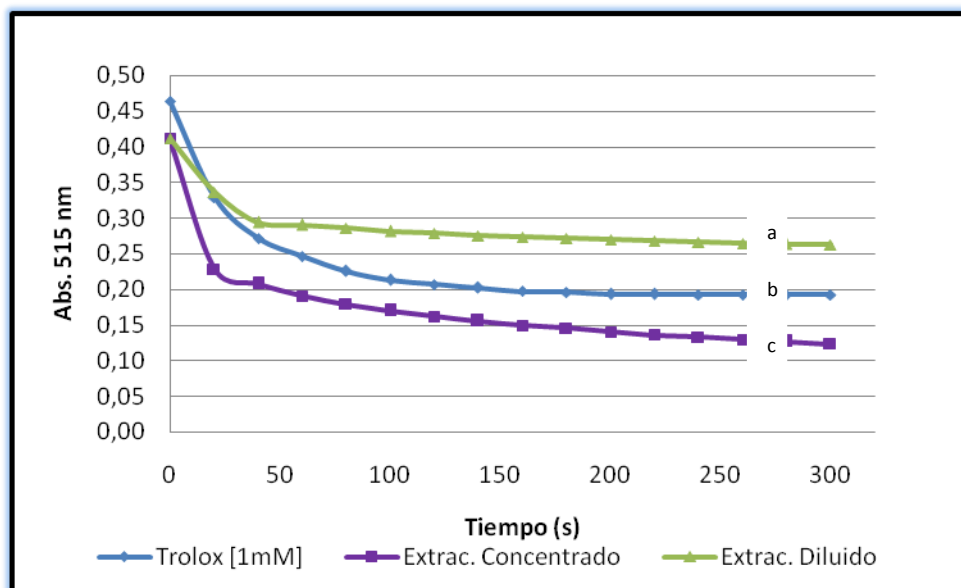
Investigaciones realizadas por Fuentes y sus colaboradores (2000) [2] muestran que la caléndula presenta un contenido de carotenoides totales de  $7,80 \cdot 10^{-2} \%$  y  $1,70 \cdot 10^{-2} \%$  en la variedad fiesta gitana y radio respectivamente en las flores y en los receptáculos. Por otra parte Bako y sus colaboradores (2002) [9] identificaron los carotenoides presentes en pétalos de caléndula cultivada en el sur de Hungría, dichos compuestos fueron extraídos con metanol y dietileter e identificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), las concentraciones halladas fueron luteína 5,69%, 9/9Z – luteína 2,64%, 13/13Z, luteína 1,79% y  $\beta$ -caroteno 6,46% en peso seco.

Como se puede ver la concentración de  $\beta$ -caroteno determinada en el extracto de caléndula es mayor que la concentración de carotenos totales identificada por Fuentes y sus colaboradores (2000), sin embargo la comparación no es muy precisa ya que en el estudio mencionado la determinación se hace sobre las flores y receptáculos frescos y en este caso se realizó sobre el extracto de las flores. En cuanto a los resultados de Bako y colaboradores (2002) no se precisa en que variedades fueron analizadas y los resultados son reportados en fresco, peso seco y no sobre el extracto.

## Actividad antioxidante

En el método DPPH se determina la actividad antioxidante, basándose en la descomposición de un compuesto cromóforo, ocasionado por una reducción del radical estable DPPH\* esta reducción dependerá de la capacidad que tenga el compuesto antioxidante de transferir electrones o donar protones. En este método el extracto de caléndula presentó separación de fases, una concentrada (parte solida del extracto) y una diluida (parte acuosa) fase superior las cuales fueron analizadas por separado (Figura 2.3) Los ANOVA muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras fase concentrada del extracto, fase diluida del extracto y patrón trolox, que permite concluir que el extracto de caléndula concentrado genera una mayor decoloración o reducción de los compuestos cromóforos en comparación con el extracto diluido, indicando una mayor concentración de compuestos antioxidantes o compuestos con una actividad antioxidante mayor que el extracto diluido. Es por ello que para usos como antioxidante se preferirá el uso del extracto concentrado.

**Figura 2.3** Curva absorbancia / tiempo



Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre las muestras ( $p \leq 0,05$ )

La absorbancia se leyó a 515nm a intervalos de tiempos diferentes hasta que la reacción alcanzó un equilibrio. El porcentaje de decoloración de DPPH\* fue calculado mediante la Ec.2.1.

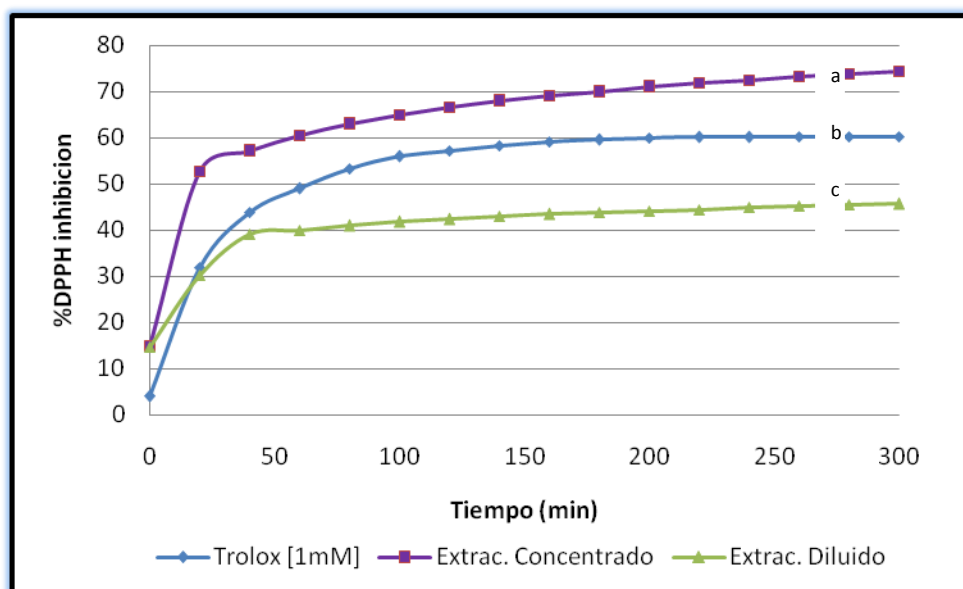
$$\%DPPH = 1 - \left( \frac{Am - Abm}{AbDPPH} \right) * 100$$

[30]

(Ec.2.1)

Donde Am: es la absorbancia de la muestra, Abm: es la absorbancia del blanco de la muestra, AbDPPH: absorbancia del blanco DPPH), la absorbancia para la solución 60 μM de DPPH presentó una absorbancia de 0,48nm y la absorbancia de la muestra dada por el equipo lleva incluida la corrección del blanco. El resultado de este cálculo da un % de DPPH de 74,33% para el extracto de caléndula concentrado y 45,44% para el extracto diluido, comparado con un 60% para el patrón de trolox, esto significa que el extracto de caléndula concentrado tiene una mayor porcentaje de inhibición antioxidante que la solución patrón de trolox de 1Mm (Figura 2.4).

**Figura 2.4** Capacidad de secuestro del radical DPPH



Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre las muestras ( $p < 0,05$ )

La cantidad necesaria para secuestrar el 50% del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) se expresa como concentración efectiva 50 (EC50) equivalente de trolox y se calcula teniendo en cuenta la curva de calibración de trolox en términos de mmol de trolox Ec.2. 2.

$$Y = - 9,592 X + 0,575$$

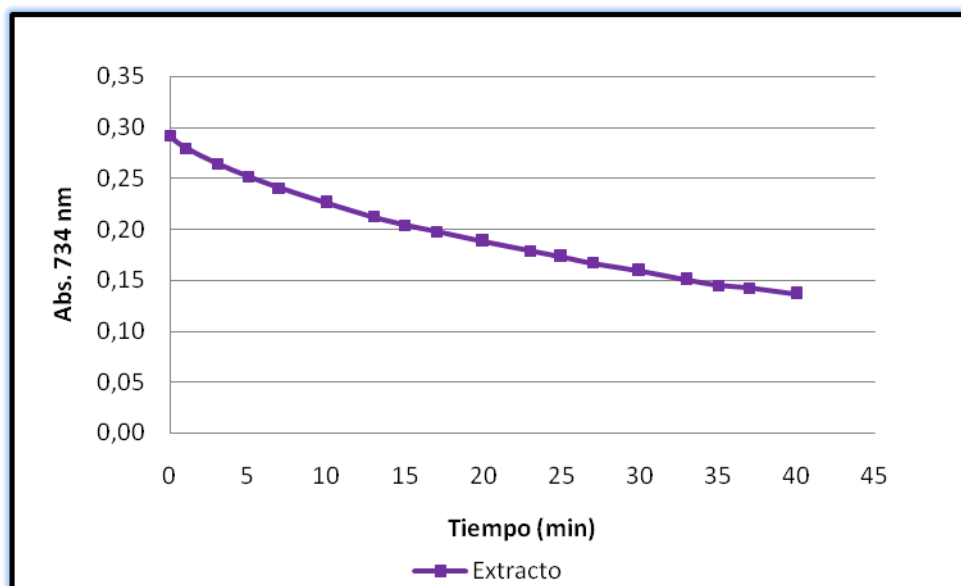
(Ec. 2.2)

Donde Y es la absorbancia de estabilización del extracto, dando como resultado 35,29 mmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto de caléndula concentrado y 24,42 mmol equivalentes de Trolox por gramos de extracto de caléndula diluido.

Montoya y colaboradores (2003) [31] determinaron la capacidad antioxidativa del extracto de caléndula mediante el método DPPH, a un tiempo de 30 minutos (1µg extracto inicial en 1 mL del medio metanólico con 35 µM DPPH) encontrando un porcentaje de inhibición de DPPH de 16,67%. Por otra parte Cetkovic y colaboradores (2004) [32] determinaron las propiedades antioxidantes de los extractos metanólicos obtenidos de *Calendula arvensis* L. silvestre y *Calendula officinalis* L. siendo la última la que presentó mejor comportamiento por su mayor % de inhibición de DPPH del 12,90 ±0,8. Según los resultados obtenidos el extracto de caléndula tanto concentrado como diluido presentan una mayor capacidad antioxidante que la reportada para la caléndula por estos autores, estas diferencias pueden depender de la variedad de la flor estudiada o del método de obtención del extracto.

Como método de comparación se realizó la medición de la actividad antioxidante por el método ABTS en donde el compuesto antioxidante extraído de la flor de caléndula ocasiona una reducción (decoloración) del radical ABTS\*, esta reducción dependerá de la capacidad que tenga el compuesto antioxidante de transferir electrones o donar protones al igual que el método DPPH. La Figura 2.5 muestra el comportamiento cinético de la decoloración del radical ABTS\* con el extracto de la flor de caléndula.

**Figura 2.5** Curva absorbancia / tiempo



El porcentaje de de inhibición del radical ABTS\* ocasionado por el antioxidante fue calculado mediante la Ec.2.3.

$$\%inhibicion = \frac{Abs\ inicial - Abs\ final}{Abs\ inicial} \times 100 \quad (Ec.2.3)$$

Donde A inicial: es la absorbancia de la solución de ABTS\*, A final: es la absorbancia de la muestra a los 7 minutos, según esto el extracto de caléndula presentó un porcentaje de inhibición del 61,80%. La actividad antioxidante se expresa como mmol de trolox/g de extracto y se determina según la curva de calibración (Ec. 2.4).

$$Y = - 14,52X + 0,507 \quad (Ec. 2.4)$$

Siendo Y es la absorbancia del extracto tomada a los 7 minutos de iniciada la reacción, dando como resultado 142,87 mmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto de caléndula, en los estudios anteriores realizados acerca de la flor de caléndula no se encontraron reportes acerca de su actividad antioxidante medida

por el método ABTS, por lo cual no se puede realizar una comparación de resultados.

La flor de caléndula tiene una composición química compleja, con un amplio número de familias y abundancia de compuestos antioxidantes, siendo los carotenoides y flavonoides los más importantes y representativos, estos compuestos al retardar o inhibir la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas, previenen la formación de colores y olores desagradables en los alimentos y la aparición de enfermedades degenerativas en el ser humano. En la actualidad existe un gran interés por producir alimentos que contengan aditivos naturales. Las flores comestibles, como la caléndula, pueden ser útiles dada su actividad antioxidante, incrementando la concentración de antioxidantes de forma natural hasta los niveles que induce los beneficios esperados o añadir los antioxidantes que no están presentes de forma natural en el alimento.

## Conclusiones

El extracto de caléndula fue obtenido mediante maceración, el rendimiento obtenido fue de 4,62% en base húmeda y 29,80% en base seca, a dicho extracto se le realizó una marcha fitoquímica con el fin de identificar algunos metabolitos secundarios presentes, encontrando una alta presencia de taninos, quinonas, carotenoides y una presencia moderada de cumarinas, compuestos conocidos por sus propiedades benéficas, en este caso es de interés la acción antioxidante y antibacteriana que estos presentan. Como herramienta para obtener información estructural de las sustancias presentes en el extracto se empleó el espectro infrarrojo en donde se ven reflejadas varias bandas características de grupos funcionales y enlaces químicos característicos de algunos compuestos antioxidantes encontrados previamente en la flor de caléndula como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno, luteína,  $\beta$  criptoxantina, zeoxantina, anteraxantina, flavoxantina, kaempferol, quercetina, isorhamnetina, rutosido, hesperidosido, violaxantina, criptoxantina, zeoxantina, luteoxantina, rutina entre otros [1,2,8,3] y antifúngicos y antibacteriales como: hidrocarburos sesquiterpénicos en mayor proporción, sesquiterpenos,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -muurolol [14,15]. Las frecuencias características detectadas son básicamente de enlaces alcanos -C-H, alquenos =C-H, enlaces O-H, aldehídos, cetonas C=O, compuestos aromáticos C=C, sustituyentes metilo H-C-H, enlaces C-O de los alcoholes y éteres. En cuanto a la caracterización antioxidante en cuantificación de carotenos se encuentra evidencia de luteína y  $\beta$ -caroteno en concentraciones de  $1,81 \cdot 10^{-3}$  mg luteína/mg de extracto o de  $1,8 \cdot 10^{-3}$

2 % y la concentración de  $\beta$ -caroteno es de  $5,68 \cdot 10^{-3}$  mg  $\beta$ -caroteno/mg de extracto o de  $5,68 \cdot 10^{-1}$ %. Por otra parte la actividad antioxidante por DPPH y ABTS, en DPPH se determinó en dos fases del extracto una concentrada y otra diluida encontrándose que el extracto concentrado contiene mayor concentración de compuestos antioxidantes o compuestos con una actividad antioxidante mayor. Es por ello que para usos como antioxidante se preferirá el uso del extracto concentrado, el porcentaje de decoloración del DPPH para el extracto de caléndula concentrado es de 74,33% y para el diluido es de 45,44%, el método de comparación ABTS dio como resultado 142,87 mmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto de caléndula.

Los resultados encontrados en la investigación sugieren al extracto de la flor de caléndula como una posible sustancia para ser utilizada como antioxidante natural en la industria alimentaria incrementando la concentración de antioxidantes de forma natural hasta los niveles que pueda inducir los beneficios esperados o añadir los antioxidantes que no están presentes de forma natural en el alimento.

## Referencias bibliográficas

1. LASTRA, H. y PIQUET, R. *Calendula officinalis* L. Artículo de revisión. Revista cubana de farmacia, 1999. 33(3), p.188-194.
2. FUENTES, V.; LEMES, C.; REYES, M.; MENDEZ, G.; ALONZO, J.; RODRIGUEZ, A. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. Revista cubana de plantas medicinales, 2000. 5(1), p.14-16.
3. BILIA, A.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. Chromatographia, 2001. 53(3-4), p. 210-215.
4. MOEHS, C.; TIAN, L.; OSTERYOUNG, K.; DELLAPENNA, D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. Plant molecular biology, 2001. 45(3), p. 281- 293.
5. CRABAS, N.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PIVETTA, T.; PORCEDDA, S. Extraction, separation and insolation of volatiles and Dyes *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L, her) Britton by supercritical CO<sub>2</sub>. Journal of Essential Oil research JEOR, 2003. 15, p. 350-355.

6. WICHTL, M. Herbal drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for practice on a scientific basis. Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart, 2004. 101p.
7. JIANG, X.; CHEN, L.; ZHOU, C. Lutein and lutein esters in marigold flowers by high performance chromatography. Journal of Central South University of Technology, 2005. 12(3), p. 306-308.
8. ABRIL, A. *Calendula officinalis* L.: Composición, propiedades y aplicaciones cosméticas. Monografía especialización en Ciencia y Tecnología en Cosmética. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 2008. p. 3-41.
9. BAKO, E.; DELI, J.; TOTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. J Biochem Biophys Methods, 2002. 53 (1), p. 241- 250.
10. DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, C.; GUIRAUD, H.; LALLEMAND M. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* L. flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* L. and *C. arvensis*. Ann Pharm, 1980. Fr., 38(6), p. 493-499.
11. AGUILA, B.; MENENDEZ, R.; GONZALEZ, C.; FERNANDEZ, D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis* L., Estudio preliminar de sus propiedades. Rev Cubana Plant Med, 2000. 5(1), 1-2p.
12. ACOSTA, L.; RODRIGUEZ, C.; SANCHEZ, E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis* L. Estación experimental de plantas medicinales. Rev Cubana Plant Med, 2001. 1(23), p. 23-27.
13. SOLIMAN, K. and BADEAA, R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology, 2002. 40(11), p.1669-1675.
14. SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; JANISZOWSKA, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. –structure, biosynthesis, transport and biological activity. Phytochemistry Reviews, 2005. 4(2-3), p.151-158.
15. CRITIANE, Z.; MORAES, C.; REGINA, S.; ESTIVALETI, T.; GARCIA, D. Antifungal Activity of The Essential Oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) Growing in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 2008. 39, p.61-63.

16. CLAROS, M.; BILBAO, P.; DAMIANI, E.; GONZALEZ, E.; ESTENSORO, M.; ALVAREZ, M. Actividad anti-helicobacter pylori de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* L. y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *Biofarbo*, 2007. 15 (1).
17. BILBAO, M. Análisis fitoquímico preliminar. Química de productos naturales. Universidad del Quindío facultad de ciencias básicas y tecnológicas. Programa de química de productos vegetales, 1997. Colombia.
18. ZAPATA, L.; GERARD, L.; DAVIES, C.; SCHVAB, M. Estudios de los componentes antioxidantes y actividad antioxidantes en tomates. *Ciencia docencia y tecnología*, 2007. 35, p. 175-193.
19. RUFINO, M.; PEREZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, E.; DE BRITO, E.; OLIVEIRA, M.; SAURA, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) [ ]BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, In Press, Accepted Manuscript, 2011.
20. KUBOLA, J. and SIRIAMORNUN, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 2008. 110, p. 881-890.
21. RUFINO, M.; ALVES, E.; DE BRITO, E.; PEREZ, J.; SAURA, F.; MANCINI, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 2010. 121 (4), p. 996-1002.
22. MAESTRO, R. y BORJA, R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Revista grasas y aceites*, 1993. 44 (2), p. 101-105.
23. SOTO, G. Compuestos antioxidantes y tratamientos postcosecha. *Revista horticultura*, 2002. 160, p. 48-54.
24. CARRETERO, M. Compuestos fenólicos: quinonas. *Panorama actual Med*, 2000. 24 (236), p. 778-782.
25. CALDERON, G. Manual para la interpretación de espectros infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de química. Bogotá (Colombia): 1985.

26. PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W.; CASTELLS, J.; CAMPS, F. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. 2 ed. Madrid (España), 1985, Tablas I-5 a I-260.
27. MELENDEZ, A.; VICARIO, I.; HEREDIA, F. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Alan*, 2004. 54 (2), p.149-155.
28. FIGUEROA, I.; MARTINEZ, M.; RODRIGUEZ, E.; COLINAS, M.; VALLE, S.; RAMIREZ, S.; GALLEGOS, C. Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* ssp.) de México. *Revista Agrocienza*, 2010. 44 (7), p. 763-771.
29. SANCHEZ, A.; FLORES, F.; LANGLEY, E.; MARTIN, R.; MALDONADO, G.; SANCHEZ, S. Carotenoides: Estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista latinoamericana de microbiología*, 1999. 4, p. 175-191.
30. JIMENEZ, N.; LONDOÑO, J.; ARANGO, J. Actividad captadora de radicales libres y citotoxicidad de plantas colombianas de la familia Annonaceae. *Acta farm. Bonaerence*, 2005. 24 (3), p. 337-342.
31. MONTOYA, B.; LEMESHKO, V.; LOPEZ, J.; PAREJA, A.; URREGO, R.; TORRES, R. Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 2003. 10 (2), p.72-79.
32. CETKOVIC, G.; DIJILAS, S.; CANADANOVIC, J.; TUMBAS, V. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 2004. 37, p.643-650.

## **3. Capítulo 3**

### **GENERALIDADES SOBRE LA FRUTA Y PULPA DE ARAZÁ (*Eugenia stipitata*)**

#### **GENERALITIES ABOUT FRUIT AND PULP ARAZÁ (*Eugenia stipitata*)**

Lady Elizabeth Domínguez M, Néstor Ariel Algecira E, María Soledad Hernández

### **3.1 Resumen**

En Colombia gracias a la diversidad de climas y tipos de suelos es posible cultivar gran variedad de alimentos desconocidos para otras culturas, entre ellos se encuentran el arazá (*Eugenia stipitata*) fruta exótica originaria de la región amazónica occidental. Por sus propiedades organolépticas y nutricionales es vista como un producto innovador, promisorio para el desarrollo del país y potencialmente atractiva para los mercados internacionales. Es por esta razón que en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en su investigación. En el presente documento se presenta una revisión bibliográfica de dichos trabajos centrados principalmente en las características fisicoquímicas, perecibilidad, forma de almacenamiento y los productos derivados del arazá, principalmente la pulpa de fruta. Las investigaciones acerca del arazá son relativamente nuevas, en ellas se evidencia que el arazá presenta importantes características organolépticas y nutricionales como contenido de vitamina C, A y B1, proteína, fibra, ácido ascórbico. También muestran la alta perecibilidad de la fruta y los grandes esfuerzos para hallar métodos de conservación. Sin embargo, los estudios realizados no han abordado técnicas para evitar los cambios naturales en la pulpa como el pardeamiento enzimático y el crecimiento de hongos y levaduras.

### **Palabras clave**

Características fisicoquímicas, Almacenamiento, Subproductos, Pardeamiento enzimático, Cambios microbiológicos.

## **Abstract**

In Colombia have diversity of climates and soil types may cultivate variety of foods unknown to other cultures, among them is the arazá (*Eugenia stipitata*) exotic fruit native to the western Amazon region. Because organoleptic and nutritional properties is seen as an innovative product, promissory for the development of the country and potentially attractive for international markets. For this reason in last years has made a great effort in the research of this topic. This paper presents a literature review of this research focused primarily on the physicochemical characteristics, perishability, storage form and arazá products, mainly fruit pulp. Research about arazá are relatively new, according to this the arazá presents important organoleptic and nutritional features as vitamin C, A and B1, protein, fiber and ascorbic acid. They also show the high perishability of the fruit and the great efforts to find methods of preservation. However, the studies have not addressed technical to avoid the natural changes in the pulp as enzymatic browning and growth of fungi and yeasts.

## **Key words**

Physico-chemical characteristics, Storage, Secondary products, enzymatic browning.

## **3.2 Introducción**

La región amazónica es inmensamente rica en flora y fauna, presentando especies desconocidas para el resto del mundo, dichas especies constituyen en la actualidad un objetivo de investigación. En el caso de las especies frutales se ha desarrollado un gran interés por su composición nutricional, propiedades benéficas para la salud, sabores y sensaciones nuevas al paladar, tecnificación en los cultivos, manejo poscosecha, transformación y en general todo lo relacionado con la producción y el consumo. Todo esto con el fin de impulsar la industria en la región amazónica a través de sus productos novedosos y así generar una nueva alternativa económica. Entre dichos frutales nativos se encuentra el Arazá uno de los productos con más potencial económico, con propiedades organolépticas y nutricionales muy importantes. A continuación se presenta una recopilación de

información y algunos estudios acerca de este fruto y del subproducto principal como lo es la pulpa de arazá.

### 3.3 Arazá

#### Clasificación taxonómica del arazá:

**Tabla 3.1** Taxonomía de arazá

Reino	Vegetal (Plantae)
Subreino	Embryiophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermopsida
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Orden	Myrtaceae
Familia	Myrtaceae
Genero	Eugenia
Especie	Eugenia stipitata Mc Vaught
Subespecie	Eugenia stipitata subsp. Sororia
	Eugenia stipitata subsp. Stipitia

Fuente: [1]

Origen y distribución: El arazá es originario de la región amazónica occidental comprendida entre el río marañón y el río Ucayali y en las proximidades de Requena y el nacimiento del río Amazonas. La mayor diversidad genética de *Eugenia stipitata* se registra en el sudoeste de la Amazonia, de igual manera, la especie se encuentra en estado silvestre solamente en la Amazonia occidental.

El arazá (*Eugenia stipitata*) Mc Vaught (Tabla 3.1) es cultivada en los países Perú, Brasil, Ecuador, Colombia, Bolivia y Costa Rica. En Colombia, aunque no en grandes cultivos, se encuentra distribuida en los departamentos del Meta, Caquetá, Putumayo y Amazonas, así como se encuentran reportes en Cundinamarca y el Eje Cafetero. El epicentro de la distribución de la especie en Colombia se encuentra en la Amazonia suroccidental (Putumayo principalmente) donde se propagó a las otras regiones del país [2,3,4].

Descripción del fruto: La fruta de arazá (*Eugenia stipitata*) se caracteriza por ser una baya esférica con epicarpio delgado, pubescencia fina y color verde claro que

se torna amarillento y anaranjado en la madurez, el mesocarpio es espeso, jugoso de color, entre amarillo y naranja, aromático y agridulce; y la cavidad interior del fruto está ocupada por un número de 12 a 16 semillas [5]. El árbol de arazá puede producir de dos a cuatro cosechas [6] es decir la planta produce prácticamente el año entero [7] cada planta produce entre 400kg por cosecha en temporada alta [8] con una mayor producción en los meses lluviosos [9]. El arazá se considera como un fruto promisorio de la región amazónica colombiana aunque sigue siendo desconocido en varios países amazónicos [10<sup>a</sup>.] Se destaca por su adaptación a los suelos pobres y ácidos propios de esta región, por sus propiedades organolépticas, como sabor y aroma, contenido nutricional, buena capacidad antioxidante y contenido de los mismos, compuestos que tienen acciones antitumorales, antialérgicos, antiinflamatorias, y disminuyen el riesgo de padecer enfermedades degenerativas y coronarias [11]. El arazá o guayaba amazónica inicia su fructificación entre los 18 y 20 meses después de la siembra en el campo, con fructificación cada 2.5 meses y una producción promedio de 5kg. El arazá es un producto que presenta la característica de ser climatérico [12] por lo tanto se puede cosechar cuando ha alcanzado su máximo desarrollo (madurez fisiológica) estado de madurez 0 - 1 cambio en coloración de la cascara de verde intenso a verde claro sin brillo o cuando en su parte inferior aparezcan los primeros visos amarillos, continua su proceso de maduración después de su cosecha (Figura 3.1, Tabla 3. 2).

**Figura 3.1** Cambios colorimétricos durante el desarrollo y la maduración del Arazá



Fuente: [13]

**Tabla 3.2** Escala de color durante el desarrollo y maduración del Arazá

Escala de color	Estado	Color		Descripción
		Descripción	Valor Coordenadas	
1	Inmaduro	Verde	L= 52-54 C= 32-37 H= 106-108°	Color verde oscuro, leve modificación a tonalidad mate
2	Verde-maduro	Verde mate	L= 54-57 C= 38-41 H= 101-105°	Color verde claro sin brillo
3	Pintón	Verde-amarillo	L= 58-60 C= 42-44 H= 95-99°	Color verde con 10-25% de color amarillo
4	Pintón $\frac{3}{4}$	Verde-amarillo	L= 61-64 C= 45-48 H= 89-94°	Color amarillo en más del 50% del fruto
5	Maduro	Amarillo	L= 65-67 C= 49-54 H= 83-88°	Color amarillo en el 100% de la superficie del fruto
6	Sobre maduro	Amarillo oscuro	L= 68-71 C= 55-59 H= 80-84°	Color amarillo oscuro, fruto blando

Fuente: [13]

### Composición y caracterización química

Los frutos en óptimo estado de madurez presentan una considerable acidez y, en consecuencia bajo pH. Adicionalmente tiene un contenido moderado de vitamina C, importante para la conservación de la pulpa [4] ver Tabla 3.3.

**Tabla 3.3** Caracterización química del fruto fresco de arazá (base húmeda)

Característica	Cantidad
Humedad	95,8
pH	2,9
Sólidos solubles (°Brix)	3,2
Acidez (g Ac cítrico/100 g de parte comestible)	1,06
Azúcares reductores (g de glucosa anh/ 100g parte comestible)	0,39
Azúcares totales (g de glucosa anh/ 100g parte comestible)	2,93
Vitamina C mg/100g	191
Proteína (g)	0,9
Fibra %	0,51
Cenizas %	0,21

Fuente: [4]

El fruto de arazá posee un alto contenido de humedad, que contribuye al incremento de la tasa respiratoria e incide directamente en la alta perecebilidad. Los contenidos proteicos resultan moderadamente altos y pueden estar asociados a una alta tasa metabólica, con un importante nivel de actividad enzimática. Por otra parte, la fibra cruda constituye un interesante aporte a la dieta básica. El arazá aporta una moderada cantidad de ácido ascórbico, entre otras vitaminas, favoreciendo de esta forma la seguridad alimentaria en la región amazónica, ya que otra manera el consumo de vitaminas provendría siempre de frutos “importados” a la región (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4** Caracterización química de la pulpa de fruto de arazá del piedemonte amazónico en estado maduro

Variable	Contenido	
	Ecotipo brasilero	Ecotipo peruano
Materia seca (%bs)	9.68	7.89
Proteína (%bs)	12.67	11.05
Extracto etéreo (%bs)	12.32	12.23
ENN (%bs)	61.68	64.17
Fibra cruda (%bs)	11.29	9.74
Cenizas (%bs)	2.04	2.81

Fuente: [14,15]

Posee un alto contenido en nitrógeno y por lo tanto de proteína bruta, pero escaso contenido en fósforo. También presenta un alto contenido de hidratos de carbono, cantidades medias de provitamina A, B1 y C, y bajos contenidos de aceite y grasas [1]. El contenido de aminoácidos en la pulpa de arazá se presenta en la Tabla 3.5.

En cuanto a la capacidad antioxidante del arazá (cascara junto con la pulpa) por el método de FRAP es de  $11.4 \pm 0.14$  y por el método de ABTS  $20.2 \pm 2.44$  las unidades de medida son micromoles de equivalentes trolox por gramo de peso fresco ( $\mu\text{mol}$  of TEs/g of FW), los fenoles totales son de  $111 \pm 3.64$  miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de peso fresco (mg of GAEs/100 g of FW) y de ácido ascórbico de  $8.92 \pm 0.38$  miligramos equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 gramos de peso fresco (mg AA/100 g of FW) [16].

**Tabla 3.5** Contenido de aminoácidos de la pulpa de arazá

Contenido de aminoácidos	g/100g proteína
Glicina	4.17±0.19
Alanina	6.84±0.17
Valina	4.77±0.24
Leucina	6.05±0.44
Isoleucina	3.79±0.15
Prolina	3.46±0.06
Fenilalanina	4.1±0.25
Tirosina	2.94±0.14
Serina	4.11±0.22
Treonina	3.64±0.19
Cisteina	1.78±0.16
Metionina	1.84±0.04
Asparagina-Acido aspartico	8.57±0.06
Glutamina-Acido glutamico	31.86±2.14
Lisina	5.53±0.28
Arginina	4.14±0.07
Histidina	2.43±0.13

Fuente: [17]

Perecebilidad y almacenamiento: La fruta es muy susceptible, presentando daños por manipulación y transporte especialmente cuando está madura, entonces la cosecha se debe realizar cuando el fruto esta casi verde (pintón) [8]. La alta perecebilidad se presenta con características como pérdida de peso, ablandamiento, pardeamiento y susceptibilidad a las pudriciones [11]. Si la fruta de arazá se deja madurar en el árbol, la vida útil poscosecha solo alcanza a las 72 horas como resultado de la antracnosis y otros problemas de decaimiento [18, 19]. Su transporte y almacenamiento debe efectuarse bajo condiciones de baja iluminación y temperatura controlada 12°C (Temperatura critica) y una humedad relativa del 85%, por periodos de 15 días; con previa labor de pre-enfriamiento, sumergiendo los frutos entre 1 y 7 °C por 30 minutos después de cosechado para disminuir el calor de respiración [10]. La temperatura de almacenamiento de 12°C disminuye la perdida de ácidos orgánicos, acido ascórbico y retraso de la senescencia [20].

Los frutos almacenados en temperaturas por debajo de la temperatura crítica presentan la mayor incidencia del ataque de *Gloesporium sp* lo cual puede explicarse sobre la base de que los frutos con daño por frío resultan más susceptibles a la pudrición y ataques de patógenos, producto de los cambios metabólicos ocurridos [21,4].

Debido a su gran susceptibilidad, al daño y el rápido ablandamiento durante la etapa poscosecha y al poco contenido de fibra [17], se recomienda procesarlo en forma de pulpa y almacenarla bajo congelación, para obtener posteriormente productos derivados [7,22].

Se ha determinado que los mejores métodos para la conservación del fruto de arazá son el uso de Metilciclopropeno (1MCP) y el uso de atmósferas modificadas. El primer tratamiento funciona como gas bloqueador de los receptores de etileno, retrasando la maduración, la senescencia, el cambio de color y la incidencia de antracnosis de los frutos, y el segundo tratamiento consiste en la modificación de la composición gaseosa circundante al fruto con el fin de reducir los procesos metabólicos y la respiración del fruto y de este modo mantener la calidad del mismo, disminuyendo pérdidas de peso, pudriciones y cambios de textura y color, entre otros [13, 19, 23].

Comercialización y subproductos: En Colombia el interés económico por el arazá ha crecido de manera importante, constituyéndose asociaciones de cultivadores y encontrándose en los supermercados [5], siendo considerado como un fruto tropical promisorio, con altas perspectivas para ampliarse en el mercado a pesar de no estar difundido como cultivo. En países como Perú y Brasil, la especie ha venido adquiriendo importancia económica como componente principal de los sistemas de producción alternativo en áreas de colonización [1].

Por estas razones el arazá requiere de tecnologías de innovación para productos novedosos, convenientes, inocuos y con altas cualidades nutricionales [24] impulsando el desarrollo competitivo de la fruticultura en Colombia.

Por su alto contenido de provitamina A, es ideal como alimento infantil porque cumple una función importante en el desarrollo de las células y contribuye en la prevención de enfermedades infecciosas [25]. También posee una actividad antioxidante que es importante desde el punto de vista funcional ya que interviene en la prevención de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer [22].

La alta acidez que presenta ocasiona una menor demanda del producto fresco, es por ello que se comercializa usualmente en forma de productos derivados: Pulpas, jugos, conservas, mermeladas, bocadillos, néctares, cocteles, vinos, deshidratados [26, 9]. Algunas investigaciones se han centrado en la producción de jugos clarificados [22], yogurt [8, 27], confite duro [5]. La fruta también tiene potencial para la extracción de los principios aromáticos por su olor agradable y exótico que es utilizada en la industria de perfumes [27].

Otros productos derivados del Arazá que han tomado gran importancia son el dulce o ate de arazá (bocadillos de arazá) y la salsa de arazá para yogurt empleada en la saborización del yogurt [28].

### **3.4 Pulpas de arazá**

La pulpa de fruta es un producto pasteurizado, congelado o refrigerado, que se obtiene de la desintegración y tamizado de la fracción comestible de la fruta fresca, sana, madura y limpia, después de haber sido inspeccionada, pesada, seleccionada, clasificada y escaldada. Es un producto no diluido, concentrado, ni fermentado, sin aditivos ni preservativos, listo para su comercialización o utilización en la elaboración de otros productos. Los jugos y pulpas de frutas deben elaborarse en condiciones apropiadas, con frutas frescas, sanas, maduras y limpias [29]. Es reconocida la importancia de las pulpas de fruta como uno de los métodos de conservación que permite obtener un producto con características sensoriales, sanitarias y nutricionales parecidas a las de las frutas de origen.

Por otra parte, la demanda nacional de productos procesados a base de frutas, presenta un gran dinamismo y podría constituir, indudablemente, una fuente de crecimiento de la actividad primaria. La demanda de fruta procesada se duplicó entre 1992 y 1997, creciendo en mayor magnitud la demanda industrial de pulpas, concentrados, frutas en conserva y uvas pasas. Las exportaciones colombianas de frutas procesadas han venido disminuyendo drásticamente a una tasa promedio del 15% entre 1992 y 2000 [30].

Para extraer la pulpa de arazá debe utilizarse fruta madura; la fruta semimadura es demasiado ácida, con poco aroma, y presenta menos facilidad para extraer la pulpa [5]. Este fruto presenta un rendimiento en la pulpa del 70%, se puede procesar con la corteza, sin disminuir sus características organolépticas y fisicoquímicas, la pulpa refinada tiene un rendimiento de 51 a 55%. Se ha determinado que el mejor momento para la obtención de la pulpa, se presenta

cuando el fruto posee coloración amarillo intenso, tanto en la corteza como en la pulpa, en frutos sanos y sin daños biológicos (como ataque de hongos, bacterias u otro tipo de pudriciones) [31, 20].

Los componentes químicos y nutricionales de pulpa fresca de arazá de origen peruano se muestran en el Tabla 3.6.

**Tabla 3.6** Componentes químicos y nutricionales de pulpa de arazá

Componentes	Cantidad	Unidad de expresión
Carbohidratos	69,0 - 71,6	g/100 g pulpa base seca
Nitrógeno	1,2 - 1,7	
Fosforo	0,1	
Potasio	1,7 - 2,3	
Calcio	0,1 - 0,2	
Magnesio	0,08 - 0,13	
Vitamina A	7,7	µg/100g pulpa base húmeda
Vitamina B1	9,8	
Vitamina C	7,6	mg/100g pulpa base húmeda

Fuente: [13, 32].

Con la pulpa de arazá pueden elaborarse varios productos como néctares, jugos, mermeladas, pasta de bocadillo, yogurt, postres [4]. La pulpa pasteurizada a 80 °C por seis minutos y congelada a -20 °C se mantiene como un producto estable por más de dos meses, sin cambios en sus características organolépticas, excepto la hidrólisis de las cadenas pépticas, que hace más fluida la pulpa [33].

Toledo (2009) [34] determinó el valor nutritivo y funcional de tres clones de arazá y evaluó el proceso para la obtención de pulpas pasteurizadas y congeladas en cuanto a la conservación de dichas propiedades. Se encuentra que la calidad de las pulpas congeladas mantienen sus características nutricionales, organolépticas y microbiológicas durante 6 meses sin pasteurizar, conservando el contenido de sólidos solubles, vitamina C y contaminación microbiología.

### **3.5 Cambios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales en las frutas**

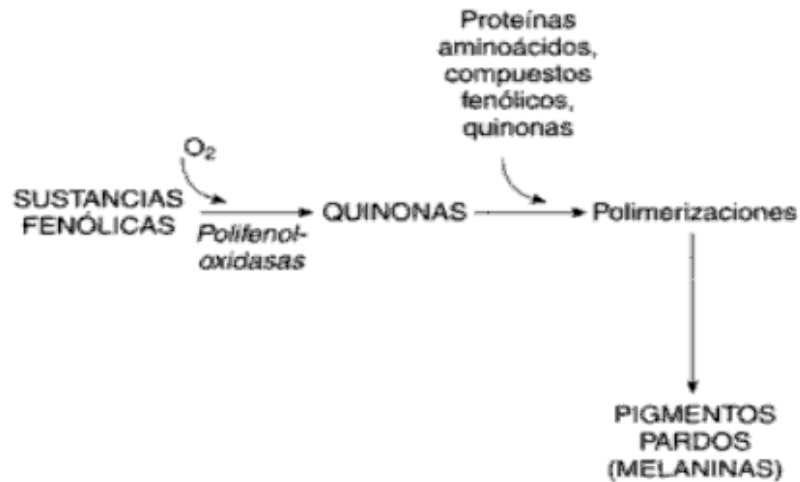
Las frutas y vegetales están constituidas por tejidos biológicamente activos y por lo tanto contienen una gran cantidad de enzimas. Después de la recolección, los frutos en general continúan con su actividad respiratoria, se producen cambios intensos durante su almacenamiento. La actividad más común en frutas deriva en las enzimas pectinasa, lipasa, lipoxigenasa, clorofilasa, proteasa, peroxidasa, polifenoloxidasa y la ascórbico oxidasa. Estas enzimas deterioran la calidad de los frutos frescos [35].

**Pardeamiento Enzimático:** Las enzimas son catalizadores muy potentes y eficaces, químicamente son proteínas. Los alimentos poseen mecanismos enzimáticos que intervienen en las reacciones químicas de los mismos, estas reacciones pueden ser beneficiosas o causantes de deterioro al degradar los componentes [36].

El pardeamiento en frutas puede ser considerado como un conjunto de reacciones bioquímicas que van en detrimento de un atributo de calidad de gran importancia como lo es el color [36], un cambio en el puede señalar otras alteraciones y, además reducir la aceptabilidad del consumidor [37] y se hace evidente de forma inmediata, cuando los tejidos de las frutas se exponen al contacto del oxígeno del aire [35]. Dichas reacciones son un gran problema para la industria procesadora de frutas, debido a la generación de características sensoriales indeseables durante las etapas de manipulación, procesamiento y almacenamiento, minimizando la vida comercial de los alimentos procesados.

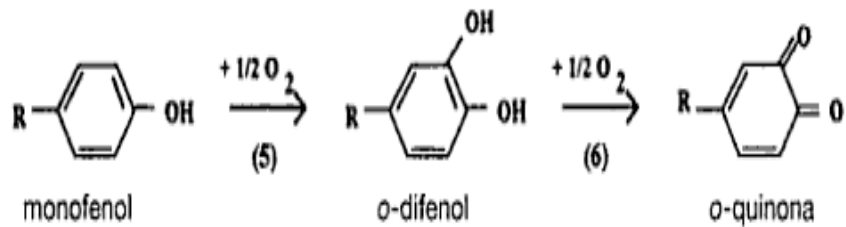
Las reacciones de pardeamiento enzimático en las frutas, se da por la acción de la enzima polifenoloxidasa, la cual se encuentra presente en tejidos animales y vegetales que actúa sobre algunos compuestos fenólicos. Los principales sustratos de la polifenoloxidasa (PFO) son compuestos fenólicos (monofenóles u o-difenóles) presentes en los tejidos vegetales (Figura 3.2 y 3.3). En estos tejidos vegetales intactos, la PFO y otros sustratos están separados por estructuras celulares y el pardeamiento no se lleva a cabo; al realizar un corte, una magulladura o al dañar en cualquier forma la integridad del fruto o de la verdura, se permite que la enzima y sus sustratos se pongan en contacto, y den lugar a coloraciones oscuras o pardas [38, 39].

**Figura 3.2** Etapas de la reacción del pardeamiento enzimático



Fuente: [40]

**Figura 3.3** Reacción de pardeamiento enzimático



Fuente: [41]

Esta reacción se lleva a cabo cuando están presentes tres componentes: La polifenoloxidasas activa, el oxígeno y el sustrato adecuado (monofenoles, ortofenoles, difenoles); la eliminación de uno de ellos evitará el pardeamiento del alimento [39, 42]. Los principales sustratos del pardeamiento se presentan en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7** Principales sustratos del pardeamiento enzimático

Sustratos	Catecol
	Ácido cafeico
	Ácido protocatético
	Dopa
	Dopamina
	Ácido gálico
	Ácido clorogénico

Fuente: [43]

Por consiguiente, para el control de las etapas indicadoras del proceso resulta posible actuar sobre dos de estos factores: la actividad enzimática y la disponibilidad del oxígeno, existen otros métodos para controlar o impedir el pardeamiento; los principales son: i) tratamiento térmico con agua en ebullición, vapor y microondas (escaldado) con lo cual se inactivan las enzimas; y ii) tratamiento con anhídrido sulfuroso o con bisulfito [35].

En la actualidad los consumidores exigen alimentos preservados lo más parecido a los frescos, que garanticen una larga duración, pero que reduzcan los químicos en el procesamiento. Esto orienta hacia la búsqueda de sustancias naturales que reduzcan el ataque microbiano, el pardeamiento enzimático y prolonguen la vida de anaquel; antioxidantes y antimicrobianos que tengan un origen natural [44].

Pardeamiento no enzimático: En los productos procesados derivados de las frutas el pardeamiento no enzimático es producido por la reacción de Maillard entre los azúcares reductores y los grupos amino libres [45]. En el caso de las frutas, con alto contenido de azúcares es inconveniente por que el producto final presenta colores oscuros que le hacen poco apetecible [46].

Microorganismos: El deterioro de los alimentos de origen microbiano es muy variado, pues depende de las características del alimento y del entorno, debido a que los microorganismos tienen restricciones para su desarrollo [36]. El arazá es una fruta altamente perecedera ya que no posee tejido de sostén, susceptible a daño mecánico y por su alto contenido de agua es fácilmente atacable por microorganismos [12].

Los mohos invaden con gran rapidez cualquier sustrato, gracias a que se diseminan eficazmente, también a un alto índice de crecimiento y a su alta carga enzimática, que les permite degradar la mayoría de los compuestos de alto peso molecular y utilizarlos como energía cubriendo los requerimientos de su metabolismo [36].

Peña y colaboradores (2007) realizaron un estudio en donde acondicionaron los frutos de arazá basados en selección y clasificación, lavado, desinfección y remoción de la humedad residual y compararon el deterioro de frutos acondicionados y sin acondicionar. Los resultados de muestran una reducción en las pudriciones y el ataque de hongos [12].

### **3.6 Almacenamiento**

Las condiciones de almacenamiento de las pulpas son aspectos importantes que pueden afectar la calidad de un producto final, en términos microbiológicos, físicos, químicos y sensoriales. La temperatura, la concentración de gases y la humedad relativa en el embalaje son los factores de mayor influencia sobre la microbiota y la determinación de vida útil de los productos [47].

Al evaluar los efectos en términos físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante cuatro meses se encontró que el tratamiento de congelación conservó la pulpa con buenas características sensoriales durante el primer mes de almacenamiento, sin embargo en este periodo se vio seriamente afectada la textura instrumental y el ácido ascórbico. Después de dicho periodo se presentó una disminución muy significativa en la actividad antioxidante y el contenido de carotenoides [11].

Por otra parte el escaldado, la velocidad de congelación y descongelación ejerce un efecto sobre en la calidad de la pulpa de arazá, específicamente en cuanto al contenido de ácido ascórbico, capacidad de retención de líquidos, y propiedades relacionadas con la textura y la acidez se ha encontrado que el escaldado durante 7 minutos en combinación con la congelación rápida y la descongelación lenta ofrecen la mejor alternativa para la conservación del arazá logrando una menor degradación del ácido ascórbico y un menor deterioro en la capacidad de retención de líquidos y menor daño en las características funcionales como viscosidad, firmeza, cohesividad y consistencia. La aplicación del escaldado de pulpas permite la inactivación de enzimas, con la disminución de la pérdida de

ácido ascórbico, de aroma, de sabor y color, se reduce la fermentación y ayuda a la estabilización de la textura [48].

### **3.7 Color**

El color es la cualidad de la sensación provocada en la retina de un observador por las ondas luminosas de  $\lambda$  entre 380-760nm. El color resulta de la interacción de la luz en la retina y un componente físico que depende de determinadas características de la luz. Estas características son, esencialmente el tono o matiz, la saturación o pureza y la luminosidad o brillo [49].

Para la medida del color se emplea un colorímetro el cual reporta la medida de color por las coordenadas  $L^* a^* b^*$  donde:

$L^*$ : Es el eje vertical que representa la luminosidad, variando desde el negro en la parte inferior, que tiene un valor de cero, al blanco de la parte superior con un valor de 100.

$a^*$ : Representa la tendencia al rojo (+) o verde (-). Esta coordenada varía entre -120 y 120.

$b^*$ : Representa la tendencia al azul (-) o amarillo (+). Esta coordenada varía entre -120 y 120.

La medida de color se basa en seleccionar un punto de medida, colocar el colorímetro y accionarlo. El valor obtenido de las coordenadas cromáticas reflejará el color de la superficie [50].

### **Conclusiones**

Las investigaciones acerca del arazá (*Eugenia stipitata*) se han centrado principalmente en aspectos de cultivo, manejo de la cosecha, etapas de maduración, momento de recolección, enfermedades de la planta, caracterización física y química del fruto, perecebilidad, cambios durante la senescencia, métodos de almacenamiento, retardo de la senescencia y formas de procesamiento, es decir obtención de productos menos perecederos. Se evidencia claramente que el arazá es una fruta con un gran potencial de comercialización y que constituye una gran oportunidad de desarrollo para la región amazónica, con importantes características organolépticas y nutricionales como contenido de vitamina C, proteína bruta, aminoácidos, fibra, ácido ascórbico, vitaminas A, B1, y C. Sin

embargo también han existido esfuerzos para la conservación del fruto ya que es una fruta muy susceptible a presentar daños por manipulación y transporte especialmente cuando está madura, presentando características como pérdida de peso, ablandamiento, pardeamiento y susceptibilidad a las pudriciones. Es por ello que es necesario emplear métodos de conservación como manejo de temperaturas, humedad relativa, atmósferas modificadas, uso de metilciclopropeno o transformación en subproductos.

Los principales subproductos que se han obtenido del arazá son la pulpa de fruta, jugos, conservas, salsas, cocteles, vinos, deshidratados, yogurt, dulces y extractos para perfumería. La base de cualquiera de estos derivados es la pulpa de arazá, el rendimiento de la pulpa es aproximadamente del 70% y se puede procesar con cascara, sin embargo la industria de obtención de pulpas en general también enfrenta algunos obstáculos derivados de los cambios durante el almacenamiento, como pardeamiento enzimático y cambios microbiológicos.

Los estudios realizados acerca del arazá no han abordado técnicas para evitar los cambios naturales en la pulpa, que inhiban el pardeamiento enzimático y el crecimiento de hongos y levaduras. En este tipo de pulpas es importante emplear agentes naturales que permitan disminuir o inhibir estos procesos, proporcionar mayor estabilidad microbiológica, para obtener productos con propiedades parecidas a la fruta fresca.

## Referencias bibliográficas

1. ESCOBAR, C.; ZULUAGA, J.; MARTINEZ, A. El cultivo de arazá (*Eugenia stipitata*). Programa regional agrícola. Corpoica-Fondo amazónico. 1 ed. Florencia Caquetá (Colombia): Graficas de Florencia, 1996. p.1-6.
2. PINEDO, P.; RAMIREZ, N., BLASCO, L. Preliminary notes concerning the arazá (*Eugenia stipitata*), native fruit of the Peruvian Amazonia. Estación experimental San Roque/CIPA XVI. Publicación miscelánea 229. Lima-Perú, 1981. 57p.
3. QUEVEDO, G. Aspectos agronómicos sobre el cultivo del arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh): frutal promisorio de la amazonia colombiana. Revista Agronomía Colombiana, 1995. 12(1), p. 27-58.
4. HERNANDEZ, M.S. y BARRERA, J. Manejo poscosecha y transformación de frutales nativos promisorios en la Amazonia colombiana. Instituto

amazónico de investigaciones científicas, SINCHI. Programa nacional de transferencia tecnológica agropecuaria, PRONATA. Bogotá (Colombia): ProduMedios, 2000. p.11.21.

5. RODRIGUEZ, E. y BASTIDAS, P. Evaluación del proceso de cocción para obtener un confite duro a partir de pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*). Revista ingeniería e investigación, 2009. 29 (2), p.35-41.
6. GALVIS, J. y HERNANDEZ, M.S. Análisis del crecimiento del fruto y determinación del momento de cosecha del arazá (*Eugenia stipitata*). Colombia Amazónica, 1993<sup>a</sup>. 6 (2), p.107-121.
7. DO NASCIMENTO, S. y DE OLIVEIRA, G. Manual técnico sobre cultivo y utilización del arazá (*Eugenia stipitata*). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA-CPCA). Brasil: A&C Impresores, 1999. 92p.
8. AUSTIDILLO, M.S. y HARALDSSON, L. Elaboración y comercialización del batiyogurt de Arazá en Guayaquil. [Tesis de grado Ingeniería comercial y empresarial]. Guayaquil (Ecuador): Escuela superior politécnica del litoral, Facultad de ciencias humanísticas y económicas, 2006. 100p.
9. KATEN, R., BEER, J. Production and phenology of the fruit shrub *Eugenia stipitata* in agroforestry systems in Costa Rica. Agroforestry Systems, 2005. 64, p. 203-209.
10. HERNANDEZ, M.S.; MARTINEZ, O.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P. Behavior of arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. Scientia Horticulturae, 2007. 111, p. 220-227.
11. MEJIA, L.; NARVAEZ, C.; RESTREPO, P. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). Agronomía colombiana, 2006. 24 (1), p.87-95.
12. PEÑA, A.; GONZALEZ, M.; HERNANDEZ, M.S.; NOVOA, C.; QUICAZAN, M.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. Evaluación del comportamiento del fruto de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) en las operaciones de acondicionamiento húmedo postcosecha. Revista Colombiana de ciencias hortícolas, 2007. 1 (2), p.182-188.

13. HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; CARRILLO, M.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. Arazá Origen, fisiología y conservación. 1 ed. Colombia: Instituto amazónico de investigaciones científicas SINCHI, 2006. 70p.
14. OVIEDO, E. Caracterización y valoración nutricional de frutas promisorias en la Amazonía colombiana. En: Memorias seminario "Tecnologías de recolección y manejo postcosecha de frutas amazónicas con potencial económico y comercial en la Amazonía occidental colombiana". Universidad de la Amazonía. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI-. Programa Nacional de Transferencia de tecnología Agropecuaria - PRONATTA-. Florencia-Caquetá (Colombia): 2000.
15. BARRERA, J.; HERNÁNDEZ, M.S.; PÁEZ, D.; OVIEDO, E. Tecnologías para el aprovechamiento integral de frutas nativas en la región amazónica colombiana. Programa Nacional de Transferencia de tecnología Agropecuaria - PRONATTA-. Instituto Amazónico de investigaciones científicas -SINCHI. Universidad de la Amazonía. Florencia-Caquetá. 2001.
16. CONTRERAS, J.; CALDERON, L.; GUERRA, E.; GARCIA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. Food Research International, 2011. 44, p.2047-2053.
17. ROGEZ, H.; BUZANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J.; SILVA, E.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araca-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuacu (*Theobroma grandiflorum*). Eur Food Res Technol, 2004. 218, p.380-384.
18. HERNANDEZ, M.S. and FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P. Arazá fruit. Postharvest quality maintenance guidelines. USDA Agricultural Handbook No. 66, Wang (Eds), 2004.
19. HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J.; CARRILLO, M.; BARDALES, X. Arazá Manejo y conservación. 1 ed. Instituto amazónico de investigaciones científicas SINCHI (Colombia): Editorial Nomos S.A, 2007. p.19-43.

20. HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; MARTINEZ, J.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. Postharvest quality of arazá fruit during low temperature storage. *LWT Food Science and Technology*, 2009. 42, p.879-884. b
21. SALTVEIT, M. and MORRIS, L. Overview on chilling injury of horticultural crops. Boca Raton: In C.Y. Wang eds. *Chilling horticultural crops*. CRC Press Inc, 1990. p. 4-15.
22. LAVERDE, J. Estudio de las condiciones óptimas para la obtención de jugo clarificado de arazá (*Eugenia stipitata*), mediante procesos enzimático y membranario. Tesis de grado Ingeniería agroindustrial. Quito (Ecuador): Escuela Politécnica Nacional, Facultad de ingeniería química y agroindustria, 2010. 133p.
23. CARRILLO, M.; HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; MARTINEZ, O.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P. 1-,Methylcyclopropene delays arazá ripening and improves postharvest fruit quality. *LWT Food Science and Technology*, 2011. 44, p. 250-255.
24. ESPINAL, C.; MARTINEZ, H.; PEÑA, Y. La cadena de los frutales de exportación en Colombia, una mirada global a su estructura dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 67. Ministerio de agricultura y desarrollo rural observatorio agrocadenas Bogotá (Colombia), 2005. 66p.
25. HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; CARRILLO, M.; BARDALES, X.; CAICEDO, D.; ÁLVAREZ, A.; CASTRO, S.; CARDONA, J.; BUCHELLI, P.; JIMENEZ, S.; GARCIA, A.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J.; MARTINEZ, O. Colombia frutas de la amazonia. Instituto amazónico de investigaciones científicas SINCHI. 1 ed. Bogotá (Colombia): Alen impresores, 2008. p. 14-15.
26. HERNANDEZ, M.S.; ARJONA, H.; MARTINEZ, O.; FERNANDEZ, J. Influence of intermittent warming treatments on the postharvest quality of Araza fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Food Technology and Quality Evaluation*. Science Publishers Inc. USA., 2003. 4 (43), p.
27. LOMA, D.; CASTELLANOS, E.; PAGALO, C.; MORENO, I. Introducción en Guayaquil del yogurt artesanal hecho de arazá con stevia, con fines medicinales. Guayaquil (Ecuador): Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Economía y negocios, 2007. p. 1-6.

28. HERNANDEZ, M.S. y BARRERA, J. Frutas amazónicas competitividad e innovación. Instituto amazónico de investigaciones científicas SINCHI. 1 ed. Bogotá (Colombia): Editorial Scripto, 2009. p. 71-75.
29. CAMACHO, G. Obtención de pulpas de fruta. Curso de procesamiento y conservación de frutas. Instituto de ciencia y tecnología de alimentos ICTA. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia), 2004.
30. SIM. Sistema Inteligencia de Mercados. Perfil del producto 10 Frutas procesadas. Ministerio de Cultura y Desarrollo Rural. Corporación Colombiana Internacional. Bogotá (Colombia): 2000. 12p.
31. HERNANDEZ, M.S. Obtención de pulpas: Caso Arazá y Copoazu. Curso-taller manejo poscosecha y procesamiento de frutas de San José de Guaviare. 1992.
32. SILVA, K. Evaluación de la efectividad de técnicas combinadas en la conservación de pulpa de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaught). Tesis maestría en química. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, 2009. 103p.
33. HERNANDEZ, M.S. y GALVIS, J.A. Procesamiento de arazá y copoazú. Colombia Amazónica, 1993b. 6 (2), p. 135-148.
34. TOLEDO, D. Determinación del valor nutritivo y funcional de tres clones seleccionados de arazá (*Eugenia stipitata*) y seis de borojo (*Borojoa patinoi*), y evaluación del proceso para la obtención de pulpas pasteurizadas y congeladas. Tesis de grado ingeniería agroindustrial. Quito (Ecuador): Escuela Politécnica Nacional, Facultad de ingeniería química y agroindustria, 2009. 159p.
35. GARCIA, R. y RIOS, P. Uso de la pulpa refinada de camu y arazá en la elaboración de paletas congeladas de plátano. Revista amazónica de investigación alimentaria, 2001. 1 (1), p.15-21.
36. QUIÑONES, M. Diseño del proceso de obtención y estudio de estabilidad de la pulpa refinada de Arazá. Tesis de grado Ingeniería de alimentos. Guayaquil (Ecuador): Escuela superior politécnica del litoral, Facultad de ingeniería mecánica y ciencias de la producción, 2005. 141p.

37. GARCIA, C.; GIRALDO, G.; HURTADO, H.; MENDIVIL, C. Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano Gros Michel en diferentes estados de maduración. *Vitae Revista de la facultad de química farmacéutica*, 2006. 13 (2), 13-19p.
38. MILLAN, F. y ROA, V. Uso de la metodología de superficie de respuesta en la evaluación del pardeamiento en cambur procesado por impregnación al vacío. *Interciencia revista de ciencia y tecnología de América*, 2001. 26 (7), p. 290-295.
39. HERRERA, C.; BOLANOS, N.; LUIZ, G. *Química de Alimentos. Manual de Laboratorio*. 1 ed. San José (Costa Rica): Editorial Universidad de Costa Rica, 2003. 143p.
40. HERNANDEZ, M. y SASTRE, A. *Tratado de nutrición*. 1 ed. Madrid (España): Editorial Díaz de Santos, 1999. 1476p.
41. FLANZI, C. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 2 ed. Madrid (España): Editorial AMV ediciones, 2003. 679p.
42. GASULL, E. y BECERRA, D. Caracterización de Polifenoloxidasa Extraída de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). *Informacion Tecnologica*. 2006. 17 (6), 69-74p.
43. GUTIERREZ, J. *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. 1 ed. Madrid (España): Ed. Díaz de Santos, 2000. 577p.
44. AQUINO, L.; RODRIGUEZ, J.; MENDEZ, L.; TORRES, K. Inhibición del Oscurecimiento con Mucílago de Nopal (*Opuntia ficus indica*) en el Secado de Plátano Roatán. *Información Tecnológica*, 2009. 20 (4), p.15-20.
45. REMACHA, J.; IBARZ, A.; GINEV, J. Evolución del color por efecto de la temperatura, en pulpas de fruta. *Servicio de información y documentación alimentaria*. Datos no publicados. Madrid 2002.
46. HERNANDEZ, L. y JIMENEZ, P. Retención de nutrientes en bocadillos de guayaba (*Psidium guajava*) y feijoa (*Acca sellowiana*) elaborados en evaporador al vacío y a presión atmosférica. *Revista de investigación Universidad la Salle*, 2006. 6 (2), p. 171-177.

47. AREVALO, R. y KIECKBUSCH, T. Tiempo de vida útil de la fruta de Camu-Camu (*Myciaria dubia* H.B.K. (Mc Vaugh) almacenado a diferentes condiciones. Departamento de termofluidodinamica, facultad de ingeniería química, UNICAMP. Datos no publicados. 2005, 8p.
48. MILLAN, E.; RESTREPO, L.; NARVAEZ, C. Efecto del escaldado, de la velocidad de congelación y de descongelación sobre la calidad de la pulpa congelada de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaught). *Agronomía Colombiana*, 2007. 25 (2), p.333-338.
49. SANCHO, J. y BOTA, E. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. 1 ed. Barcelona (España): Ediciones de la universitat de Barcelona, 1999, 336p.
50. ARROYO, F.; ALCALDE, M.; VILLEGAS, R.; ROBADOR, M. Influencia del diámetro y color de las plantillas reductoras de la superficie de proyección de los colorímetros en la medida del color de una superficie. *Materiales de construcción*, 2008. 58 (291), p. 99-109.

## 4. Capítulo 4

### EVALUACION DEL EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA COMO ANTIOXIDANTE Y CONSERVANTE EN PULPA DE ARAZA

#### EVALUATION OF CALENDULA FLOWER EXTRACT AS ANTIOXIDANT AND PRESERVATIVE IN PULP ARAZA

Lady Elizabeth Domínguez M, Néstor Ariel Algecira E, María Soledad Hernández, Luz Patricia Restrepo.

#### 4.1 Resumen

La evaluación del extracto hidroalcohólico de flores de caléndula como conservante y antioxidante en la pulpa de arazá, se realizó mediante el control de los parámetros: pardeamiento enzimático, calidad microbiológica y calidad sensorial, durante 2 meses de almacenamiento. El extracto fue incluido en dos concentraciones, el umbral de detección ([1]) y el umbral de identificación ([2]);  $8.26 \times 10^{-3}$  y  $1,90 \times 10^{-2}$ g de extracto en 100g de pulpa respectivamente. El pardeamiento enzimático no se vio modificado por la adición del extracto en las concentraciones evaluadas, las variaciones detectadas dependieron de la temperatura de almacenamiento, presentándose cambios de color más fuertes en refrigeración. La evaluación microbiológica revela que la combinación entre la adición del extracto y el almacenamiento en refrigeración es una buena opción para la conservación de la pulpa de arazá en términos de hongos y levaduras. En cuanto a la calidad sensorial los parámetros de sabor y aroma de la pulpa se vieron afectados negativamente con la adición del extracto. Se estableció que aunque el extracto presenta importantes propiedades para la industria de alimentos, debe emplearse algún tratamiento previo que permita probar concentraciones más altas y aprovechar su poder antioxidante y antifúngico, sin afectar la calidad sensorial del alimento.

#### Palabras clave

*Calendula officinalis* L., *Eugenia stipitata*, Pardeamiento enzimático, Hongos y levaduras, Calidad sensorial.

## Abstract

Evaluation of hydroalcoholic extract of marigold flower as a preservative and antioxidant in the pulp arazá carried out by control the parameters: enzymatic browning, microbiological quality and sensory quality for 2 months of storage. The extract was included in two concentrations, the detection threshold ([1]) and the identification threshold ([2]);  $8.26 \times 10^{-3}$  y  $1,90 \times 10^{-2}$ g of extract in 100g of pulp respectively. Enzymatic browning was not modified by the addition of extract in concentrations tested, the variations depended on storage temperature, by stronger color changes in refrigeration. Microbiological evaluation shows the combination of adding the extract and cold storage is a good option for conservation of arazá pulp in terms of yeast and fungi. As for the sensory quality parameters of taste and smell of pulp was negatively affected with the addition of the extract. In conclusion although the extract has important properties for the food industry be used to some treatment that allows testing higher concentrations and use the antioxidant and antifungal, without affecting the sensory quality of food.

## Key words

*Calendula officinalis* L., *Eugenia stipitata*, Enzymatic browning, Fungi and yeast, Sensory quality.

## 4.2 Introducción

El arazá (*Eugenia stipitata*) es una fruta cultivada principalmente en la Amazonia colombiana norte y sur y en menor proporción en los Llanos orientales, Santander, Eje cafetero y Valle del cauca. Esta fruta constituye una oferta natural que ha sido vista como una alternativa productiva y promisoría, y como elemento fundamental del desarrollo sostenible de estas regiones [1], debido a sus características se evidencia una gran susceptibilidad al deterioro, con una duración de 15 días como máximo almacenado a temperatura de 12°C y humedad relativa del 85% con una previa labor de enfriamiento [2], que la hace una fruta muy perecedera, razón por la cual ha tomado gran importancia el procesamiento en pulpa para prolongar su vida útil, sin embargo, este producto presenta problemas de estabilidad como el pardeamiento enzimático, reacción bioquímica que va en detrimento de la calidad sensorial, afectando de manera directa el color de la pulpa. Adicionalmente se presentan problemas de calidad por hongos y levaduras constituyéndose de esta forma en parámetros críticos a controlar [3]. Actualmente existe un gran interés por

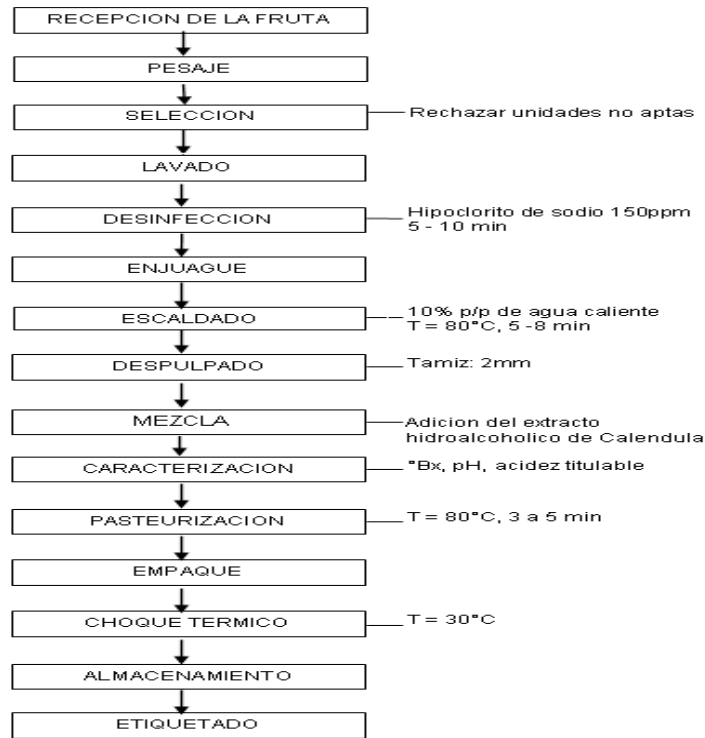
encontrar conservantes naturales que frenen estos procesos y que sustituyan los compuestos químicos empleados usualmente, que no presenten efectos secundarios indeseables [4] y que sean benéficos en la calidad del producto final y la salud de los consumidores.

El extracto de la flor de caléndula (*Calendula officinalis* L.) puede constituir una solución para este tipo de problemas ya que su alto contenido de antioxidantes y por consiguiente alta capacidad antioxidante (74,33% en porcentaje de decoloración de DPPH ó 35,29 8mmol de trolox/g extracto y en porcentaje de inhibición ABTS de 61,80% ó 142,8mmol de trolox/g extracto por ABTS) indica que el extracto de esta flor tiene un gran potencial para ser utilizado como antioxidante natural, adicionalmente el extracto hidroalcohólico de caléndula fue empleado por su actividad fotoestabilizante en la estabilización de riboflavina; sustancia altamente sensible a la luz [5]. Por otra parte se encuentran reportes acerca de la actividad antifúngica [6,7] y antibacterial [8,9,10] de sus aceites esenciales y extractos etanólicos. Teniendo en cuenta las propiedades benéficas de la flor de caléndula se planteó la presente investigación en busca de su hallar una aplicación como conservante natural en la industria de alimentos. Como primer acercamiento se empleó como matriz alimenticia la pulpa de arazá, fruta altamente perecedera pero de gran importancia para la economía colombiana y el desarrollo de algunas regiones del país. En este estudio básicamente se determinó el efecto que tiene el extracto hidroalcohólico de flores de caléndula como antioxidante y conservante natural en la pulpa de Arazá (*Eugenia stipitata*).

## 4.3 Método

### Elaboración de la pulpa

Figura 4.1 Proceso de elaboración de pulpa de fruta



Para la elaboración de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*) Figura 4.1, se utilizaron muestras comerciales adquiridas en Bogotá. Los frutos fueron seleccionados en condiciones óptimas de calidad y madurez, limpios y desinfectados.

### Análisis sensorial

Los análisis sensoriales de determinación de umbrales de detección e identificación y el perfil sensorial fueron realizados por el panel entrenado del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Determinación de umbrales de detección e identificación. Los panelistas evaluaron siete muestras de pulpa con diferentes adiciones de extracto, las concentraciones utilizadas son 0,005 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8 – 0,16 – 0,32 g del extracto/ 100g de pulpa. La metodología consiste en evaluación y comparación de

las pulpas con extracto, con una muestra patrón que corresponde a la pulpa de arazá sin extracto, y se determina en cuál de las pulpas se percibe una sensación distinta a las características y en cuál de ellas se logró identificar dicha sensación [11].

### **Preparación de las muestras de pulpa de arazá**

En la preparación de la pulpa de arazá con inclusión del extracto se tiene en cuenta el análisis sensorial de detección de umbrales, se realizaron tres pulpas de arazá; una control que no contiene extracto de caléndula (Control), una con la concentración hallada en el umbral de detección ([1]) y la última con la concentración hallada en el umbral de identificación ([2]). Muestras de las tres pulpas fueron almacenadas en refrigeración aproximadamente 5°C (Control R, [1]R y [2]R) y en temperatura ambiente aproximadamente 18 °C (Control A, [1]A y [2]A). Cada 10 días se efectuaron controles colorimétricos y microbiológicos y cada 20 días sensoriales.

### **Análisis colorimétrico**

Para la medida del color se empleó un colorímetro MINOLTA CR 300, el cual reporta la medida de color por las coordenadas L\* a\* b\*, el valor obtenido de las coordenadas cromáticas reflejará el color de la superficie [12]. El patrón de calibración fue blanco CR 300. Se realizaron tres medidas para cada tratamiento en sitios al azar. Los resultados son expresados como índice CIRG (Colour Index Red Grape) del sistema CIE L\*a\*b\* mediante la Ec.4.1 [13].

$$CIRG = \frac{180 - h^*}{L^* + C^*}$$

Ec.4.1

Donde L\* corresponde a la luminosidad, variando desde el negro en la parte inferior, que tiene un valor de cero, al blanco de la parte superior con un valor de 100. C\* corresponde al valor chroma (saturación) y h\* al hue angle (tonalidad), que se definen mediante la Ec 4.2 y 4.3.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad y$$

$$h^* = \begin{cases} 180 + \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{360}{2\pi} & \text{si } a^* < 0 \\ \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \times \frac{360}{2\pi} & \text{si } a^* > 0 \end{cases}$$

Ec. 4.2 y 4.3.

a\*: Representa la tendencia al rojo (+) o verde (-). Esta coordenada varía entre -120 y 120.

b\*: Representa la tendencia al azul (-) o amarillo (+). Esta coordenada varía entre -120 y 120.

### **Análisis microbiológico**

Recuento de mohos y levaduras. Los hongos (mohos y levaduras) se evidencian en condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano como: pH bajo, alto contenido de sales y azúcares, bajo contenido de humedad y baja temperatura de almacenamiento.

El medio de cultivo utilizado es Agar extracto de levadura-dextrosa-cloranfenicol. El procedimiento se sigue de acuerdo a la técnica del ICONTEC NTC 4132 [14].

### **Análisis sensorial**

Perfil sensorial. Para la evaluación de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata*) se empleó un perfil sensorial aplicando el test de puntaje [11], con cuatro variables sensoriales: Aroma, sabor, textura, apariencia y color, tomado de [15], en donde se dio la escala de calificación más amplia para la variable apariencia y color. Los panelistas evaluaron seis muestras de pulpa, tres almacenadas a temperatura ambiente; control A, [1]A, y [2]A y tres almacenadas en refrigeración control R, [1]R, y [2]R. El procedimiento fue realizado los días 1, 20, 40 y 60.

### **Análisis estadístico**

Para la realización del análisis estadístico se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.

## 4.4 Resultados

### Análisis sensorial

Determinación de umbrales de detección e identificación. La prueba de umbrales se realizó con 7 panelistas, cada uno de ellos evaluó las 7 muestras de pulpa con diferente concentración de extracto de la flor, comparándolas con una muestra patrón que correspondía a la pulpa de arazá sola Tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Resultados prueba determinación de umbrales detección e identificación

Catadores	Concentración del extracto							Umbral de detección	Umbral de identificación
	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16	0.32		
1	-	-	-	+	+	+	+	0.03	0.06
	-	-	-	-	+	+	+		
2	-	-	+	+	+	+	+	0.01	0.03
	-	-	-	+	+	+	+		
3	+	+	+	+	+	+	+	3.53x10 <sup>-3</sup>	7.07x10 <sup>-3</sup>
	-	+	+	+	+	+	+		
4	-	+	+	+	+	+	+	7.07x10 <sup>-3</sup>	7.07x10 <sup>-3</sup>
	-	+	+	+	+	+	+		
5	+	+	+	+	+	+	+	3.53x10 <sup>-3</sup>	0.03
	-	-	-	+	+	+	+		
6	-	-	+	+	+	+	+	0.01	0.03
	-	-	-	+	+	+	+		
7	-	-	+	+	+	+	+	0.01	0.01
	-	-	+	+	+	+	+		
Umbral de detección grupal								8.26x10 <sup>-3</sup>	
Umbral de identificación grupal									0.019

Como indica la prueba de determinación de umbrales (Tabla 4.1) la concentración del extracto en la cual el grupo de panelistas detecta un sabor diferente al usual en la pulpa de arazá es 8.26x10<sup>-3</sup>g de extracto de caléndula en 100 g de pulpa de fruta y la concentración en la cual el grupo de panelistas identifica el sabor amargo suministrado por la flor es de 1,90\*10<sup>-2</sup>g de extracto de caléndula en 100 g de pulpa de arazá, por lo tanto, a partir de esta concentración no se recomienda su uso en este tipo de alimento. Cabe resaltar que mediante este método no se determinó la concentración del extracto de caléndula en pulpa de arazá aceptada por el consumidor, sino que se determinó el nivel sensorial en que se podía incluir el extracto en la pulpa.

### Preparación de las muestras de pulpa de arazá

La pulpa de arazá se realizó teniendo en cuenta el análisis sensorial de detección de umbrales, elaborándose tres pulpas; una control que no contiene extracto de caléndula, una con la concentración del umbral grupal de detección ([1]) y la ultima con la concentración del umbral grupal

de identificación ([2]), y fueron almacenadas a dos temperaturas: ambiente y refrigeración.

Es importante resaltar que se realizó un análisis inicial de la pulpa de arazá cruda es decir elaborada sin los procesos térmicos de escaldado y pasteurización y se repartió en tres partes; una control que no contiene extracto de caléndula, una con la concentración del umbral grupal de detección ([1]) y la última con la concentración del umbral grupal de identificación ([2]). Experimentalmente se observó que el recuento microbiológico de hongos y levaduras el día de la elaboración presentó una población incontable en diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , y  $10^{-3}$ , en los dos tratamientos con adición de caléndula y en la muestra patrón. Estos resultados impedían completamente la evaluación del extracto de la flor de caléndula por un periodo de almacenamiento, ya que desde la elaboración se hacía imposible el control de los parámetros. Por esta razón se decidió emplear la tecnología por obstáculos utilizando la combinación de tratamientos térmicos que minimizan parcialmente la carga microbiológica y el pardeamiento de la pulpa, posibilitando de esta manera la evaluación del efecto del extracto con datos iniciales de recuentos microbiológicos mucho más bajos y evidencias de pardeamiento en un periodo de almacenamiento más prolongado. Sin embargo el proceso experimental contó con una muestra patrón que permite su comparación con los resultados de la pulpa con adición del extracto, determinando si el extracto ejerce o no un efecto sobre los parámetros analizados. Respecto a este tema se Pérez (2003) realizó un estudio en donde aplicó métodos combinados para el control del pardeamiento enzimático en la pera, combinando tratamientos térmicos, agentes antipardeantes en medios osmóticos e isotónicos, almacenamiento en refrigeración y uso de sales de calcio, encontrando los mejores resultados entre la combinación de compuestos antipardeantes con sales de calcio [16]. De igual manera Pinto (2010) evaluó la combinación de procesos empaque al vacío, almacenamiento a bajas temperaturas e impregnación al vacío con soluciones antipardeantes, evaluando atributos de calidad comercial como el pardeamiento enzimático, estableciendo que la combinación entre el empaque al vacío, temperatura de almacenamiento de 4°C y tratamiento con soluciones de sulfito como la mejor alterna para prolongar la vida útil de la pulpa de banano [17].

Los tratamientos térmicos empleados como tecnología de obstáculos fueron escaldado y pasteurización. Se considera que el proceso de esterilización

pretende la destrucción de los microorganismos y la inactivación total de las enzimas, mientras que los procesos de pasteurización son considerados como tratamientos térmicos leves que buscan la reducción de la población microbiana y la actividad enzimática hasta niveles compatibles con el uso de otro medio de conservación [18].

Respecto a los tratamientos de escaldado y pasteurización existen estudios en donde se puede determinar su efecto benéfico sobre la calidad microbiológica de alimentos reduciendo la población de microorganismos, por ejemplo en leche materna [19], calostro [20], jugo de tuna [21], jugo de mora [22], néctar de tomate de árbol [23], entre otros, sin embargo en todos los casos queda en evidencia que la población microbiana no se elimina completamente con el uso de estos tratamientos, sino que se reduce en cantidades significativas.

En cuanto a la inactivación enzimática la efectividad del tratamiento depende igualmente de las variables del tratamiento (tiempo, temperatura, pH, de la composición del alimento y del tipo de enzima [18]. El proceso de pasteurización empleado fue a una temperatura de 80°C por un intervalo de 3 minutos, y con este se reduce la actividad principalmente de las enzimas pectinmetilesterasa, peroxidasa y polifenoloxidasa, siendo esta última la enzima que ha sido considerada la que presenta mayor termoresistencia en los vegetales [24], que significa que después de realizar el proceso térmico de pasteurización queda presente actividad enzimática residual, lo que produce cambios indeseables en el color del producto, por efecto de la polifenoloxidasa o peroxidasa residual [25], clarificaciones, decoloraciones y aparición de sabores y aromas extraños. De acuerdo a un estudio realizado por Osorio (2008) en donde evaluó la influencia de los tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa, la actividad residual de la enzima polifenoloxidasa se disminuyó de un 100% a un 71% con una pasteurización a 75°C por 15 segundos, a un 57% con una pasteurización a 90°C por 20 segundos y la mayor reducción obtenida a 90°C por 2 minutos, empaque y sellado en caliente [18]. De la misma forma Osorio (2008) reporta estudios de inactivación de la polifenoloxidasa en fresa variedad Elsanta a una actividad del 50% con pasteurización de 55°C por 10 minutos, en puré de piña se obtiene una reducción al 60% con tratamiento de 75°C por 5 minutos y en zumos de Clementina Nules hasta un 6,5% de la inicial con tratamiento de 74°C por 10 segundos [18].

Los estudios en donde determinan la reducción en la población microbiológica y la actividad enzimática demuestran que los procesos térmicos de escaldado y

pasteurización pueden ser utilizados en esta investigación como tecnología de obstáculo ya que no son 100% eficientes por si solos, sino que se emplearon para reducir la población microbiana y la actividad enzimática hasta niveles que permitían la experimentación con el extracto de caléndula como antifúngico y antioxidante natural. Aclarando el uso de una muestra control sin la adición del extracto, pero con el empleo de los procesos térmicos, de esta manera se puede controlar que los cambios de color solo se puedan relacionar con la actividad residual de las enzimas oxidativas y su mitigación con el uso del extracto de flor de caléndula.

### **Análisis colorimétrico**

En el almacenamiento de la pulpa se evidencian visualmente cambios químicos derivados del proceso de pardeamiento enzimático mediante el cambio de color, sin embargo, dependiendo de la temperatura de almacenamiento y la concentración del extracto de caléndula se observan diferencias entre dichos cambios de color. Inicialmente la pulpa era de color amarillo claro ( $b^*=40,64\pm 0,66$ ) y luminosidad intermedia ( $L^*=54,35\pm 0,33$ ), con una tendencia muy moderada al verde ( $a^*=-1,57\pm 0,21$ ), en el proceso de almacenamiento a temperatura ambiente la coordenada  $b^*$  (tendencia al amarillo) disminuyó un poco, presentándose pequeñas diferencias entre los tres tratamientos, para el control llego a  $b^*=34,93\pm 1,97$ , para la muestra [1] a  $b^*=34,27\pm 2,23$  y para muestra [2] a  $b^*=35,42\pm 1,37$ , en la apariencia visual el color no presentó cambios que se detectaran fácilmente, en cuanto al almacenamiento a temperatura de refrigeración se presentaron cambios más drásticos, es decir la coordenada  $b^*$  disminuyó en mayor proporción el control llego a  $b^*=23,50\pm 2,69$ , en la muestra [1] a  $b^*=25,48\pm 0,71$ , y en la muestra [2] a  $b^*=20,82\pm 1,74$ , la apariencia visual se vio muy afectada con la aparición de un color café-crema.

En cuanto a la coordenada  $a^*$  las muestras almacenadas a temperatura ambiente aumentaron un poco del día 0 al día 10, después de esto el valor disminuyó y alcanzó un equilibrio, la muestra control al final del almacenamiento presentó una  $a^*=-2,35\pm 0,25$ , la muestra [1] una  $a^*=-2,64\pm 0,79$  y la muestra [2] una  $a^*=-2,47\pm 0,33$  valores que se encuentran muy cercanos entre sí. Estas variaciones en los valores de  $a^*$  reflejan que inicialmente el color de la pulpa presentó una leve tendencia al rojo y posteriormente se inclino más al color verde. En el almacenamiento a temperatura de refrigeración desde el principio del proceso de almacenamiento la coordenada  $a^*$  disminuyó en los tres tratamientos, sin embargo en el día 60 la muestra [2] presentó un gran aumento pasando de valores

negativos a un valor positivo, es decir paso de tener tendencia al color verde a aproximarse al color rojo, los valores finales para  $a^*$  fueron: muestra control  $a^*=-3,07\pm 0,28$ , muestra [1]  $a^*=-1,66\pm 0,26$ , muestra [2]  $a^*=2,29\pm 1,81$ .

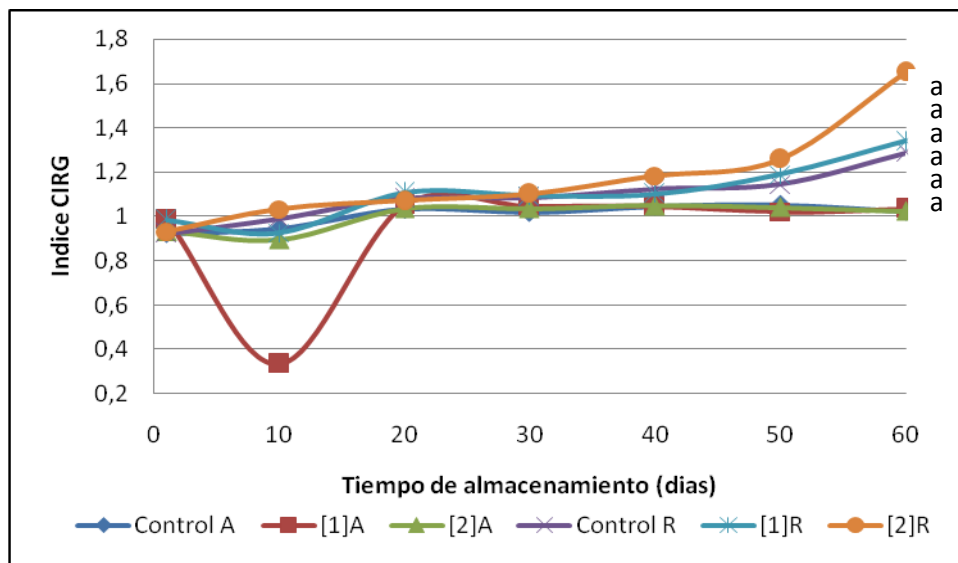
La luminosidad disminuyó en los tres tratamientos tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración debido al oscurecimiento de la pulpa. En temperatura ambiente los resultados finales fueron: muestra control  $L^*=49,12\pm 0,31$ , muestra [1]  $L^*=48,17\pm 0,61$ , muestra [2]  $L^*=48,47\pm 0,73$  y a temperatura de refrigeración fueron: muestra control  $L^*=40,37\pm 0,11$ , muestra [1]  $L^*=38,88\pm 0,43$ , muestra [2]  $L^*=37,22\pm 0,54$ .

Las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración presentaron una mayor formación de melaninas derivadas del proceso de pardeamiento enzimático por lo cual su cambio de color fue más fuerte (colores pardos), en comparación con las muestras de temperatura ambiente; aunque estas últimas muestras también presentan procesos de pardeamiento enzimático la intensidad del proceso fue menor.

El índice CIRG relaciona los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  estableciendo un único parámetro instrumental de comparación. Un índice CIRG alto indica un color oscuro y con baja luminosidad, un valor bajo indica un color claro y más luminoso [13].

En la Figura 4.2 se observa que el índice CIRG se mantiene relativamente estable en un valor de uno para las muestras almacenadas a temperatura ambiente, a excepción de la muestra de [1] la cual en el día 10 disminuyó de manera considerable evidenciando un color más claro y luminoso, en general estas muestras no presentaron cambios importantes, es decir siempre se mantuvieron de color amarillo claro, sin percibirse cambios fácilmente detectables comparándolas con la pulpa al inicio del proceso de almacenamiento. Por otra parte las muestras de pulpa almacenadas a temperatura de refrigeración presentan un incremento a partir del día treinta indicando la formación de colores más oscuros y menos luminosos durante el proceso de almacenamiento, el incremento con mayor intensidad fue para la muestra [2].

**Figura 4.2** Índice CIRG durante el almacenamiento de las muestras



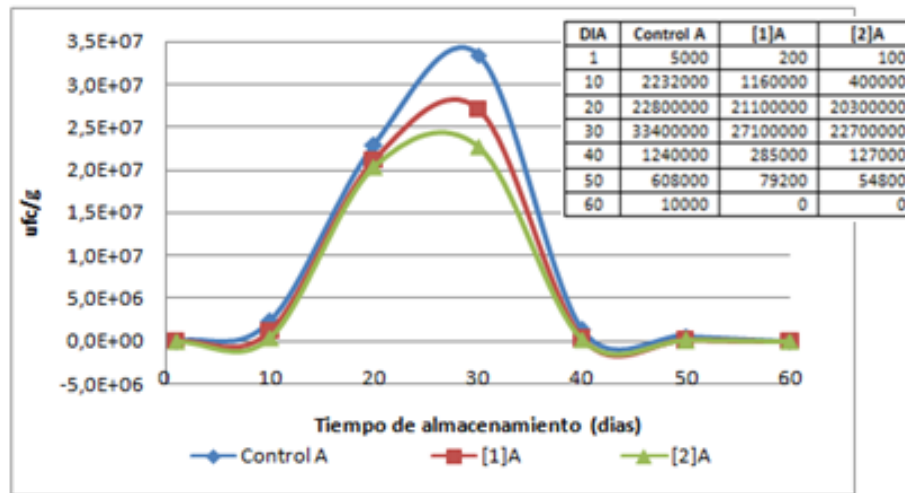
Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre las muestras ( $p \leq 0,05$ )

El índice CIRG muestra en general un cambio de color más fuerte para la pulpa almacenada a temperatura de refrigeración en comparación con la pulpa almacenada a temperatura ambiente. Sin embargo el análisis ANOVA muestra que no existe una diferencia significativa entre las muestras, es decir aunque existen diferencias estas no son lo suficientemente grandes como para ser reportadas para futuros estudios.

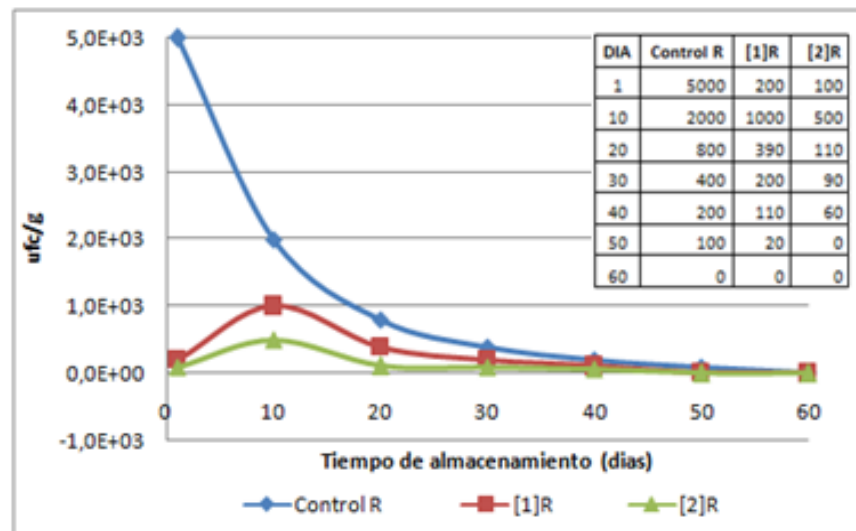
### Análisis microbiológico

Recuento de mohos y levaduras. El análisis microbiológico se realizó en muestras representativas de cada uno de los tratamientos. Los resultados se presentan en la Figura 4.3 y 4.4.

**Figura 4.3** Crecimiento de hongos y levaduras en muestras almacenadas a temperatura ambiente



**Figura 4.4** Crecimiento de hongos y levaduras en muestras almacenadas a temperatura de refrigeración



El nivel de microorganismos permitido en las pulpas de frutas se rige bajo la Norma Técnica Colombiana NTC 404 en donde una pulpa de buena calidad contiene máximo 1000 ufc/g (Unidades formadores de colonia por gramo) y una de calidad aceptable máximo 3000 (ufc/g). Según los resultados obtenidos, el día 1 es decir el día de la elaboración de la pulpa, la muestra control no cumplió con los requisitos microbiológicos de calidad en términos de hongos y levaduras, mientras

que la pulpa con adición de caléndula en concentración 1 y 2 se puede clasificar inicialmente como de buena calidad, sin embargo a partir del día 10 de almacenamiento el recuento microbiológico aumenta y sobrepasan los parámetros de la NTC 404.

En el proceso de almacenamiento en temperatura ambiente la pulpa con los tres tratamientos presentó un crecimiento exponencial de hongos y levaduras hasta el día 30, a partir de este día la población disminuyó, es decir se desarrolló la etapa de mortalidad, llegando en el día 60 a un recuento de 10000ufc/g en la muestra control y a 0ufc/g en las muestras [1] y [2]. En general la curva de crecimiento mostró una tendencia similar para los tres tratamientos Figura 4.3, sin embargo es de resaltar que la muestra [1] presenta en todo el proceso de almacenamiento recuentos menores que el control, de la misma forma la muestra [2] tiene recuentos menores que la [1] y el control, lo que indica que el extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula si ejerce un efecto contra el crecimiento de este tipo de microorganismos.

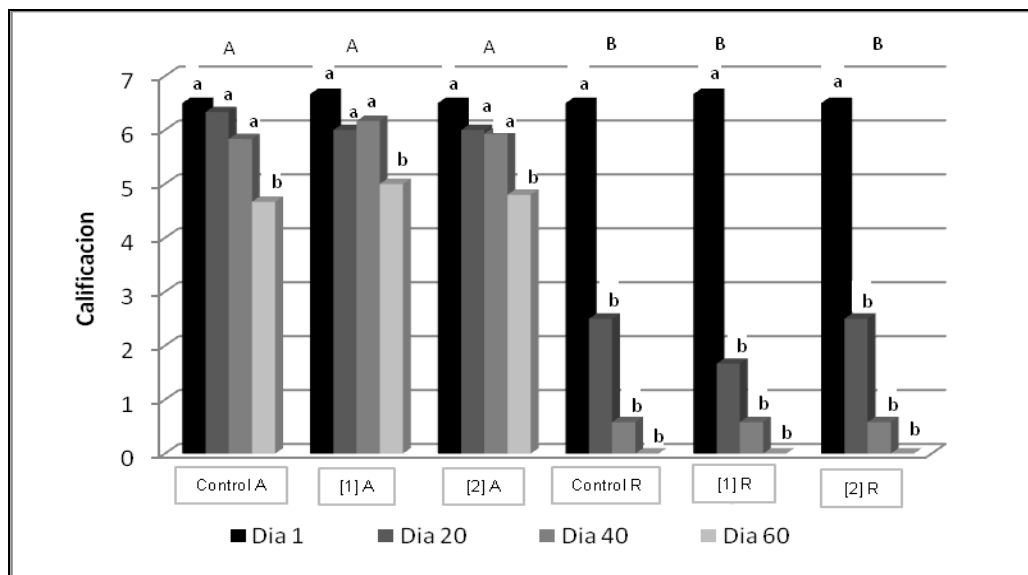
En el almacenamiento de las pulpas en refrigeración 4.4, se observa que la muestra control tiene un decrecimiento exponencial en el recuento de hongos y levaduras desde el día 1 llegando en el día 60 0ufc/g, mientras que las pulpas [1] y [2] tienen un crecimiento exponencial hasta el día 10 y a partir de allí decrece la población alcanzando en el día 60 0ufc/g. El comportamiento de estos dos tratamientos es similar al que se presentó en el almacenamiento a temperatura ambiente, siendo menores los recuentos para la pulpa [2] que los de la pulpa [1] ratificando el efecto contra los hongos y levaduras del extracto hidroalcohólico de la caléndula. Según esto la combinación entre la adición del extracto de caléndula y el almacenamiento en refrigeración es una buena opción para la conservación en términos microbiológicos de la pulpa de arazá.

### **Análisis sensorial**

---

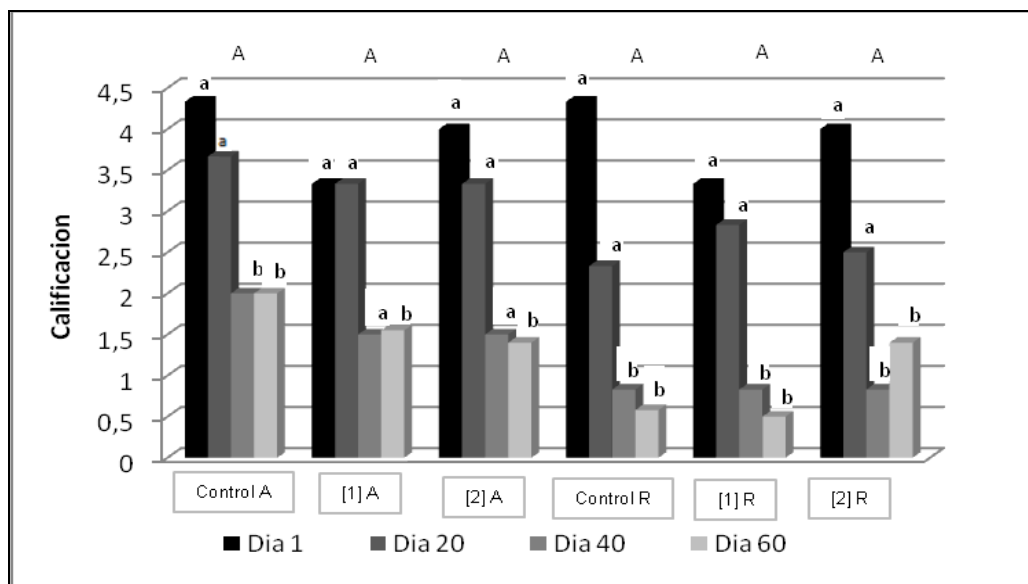
La pulpa de arazá con los diferentes tratamientos se evaluó mediante perfil sensorial con cuatro variables: Apariencia y color, sabor, textura y aroma, durante un periodo de almacenamiento de 60 días. Los resultados se presentan en las Figuras 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8.

**Figura 4.5** Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable apariencia y color



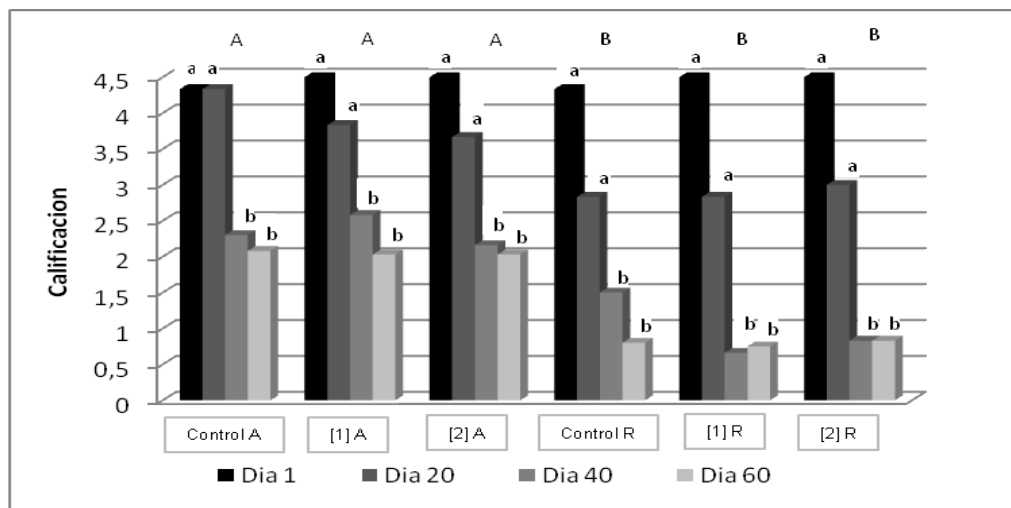
El histograma corresponde al promedio de los resultados. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre días ( $p \leq 0,05$ )

**Figura 4.6** Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable sabor



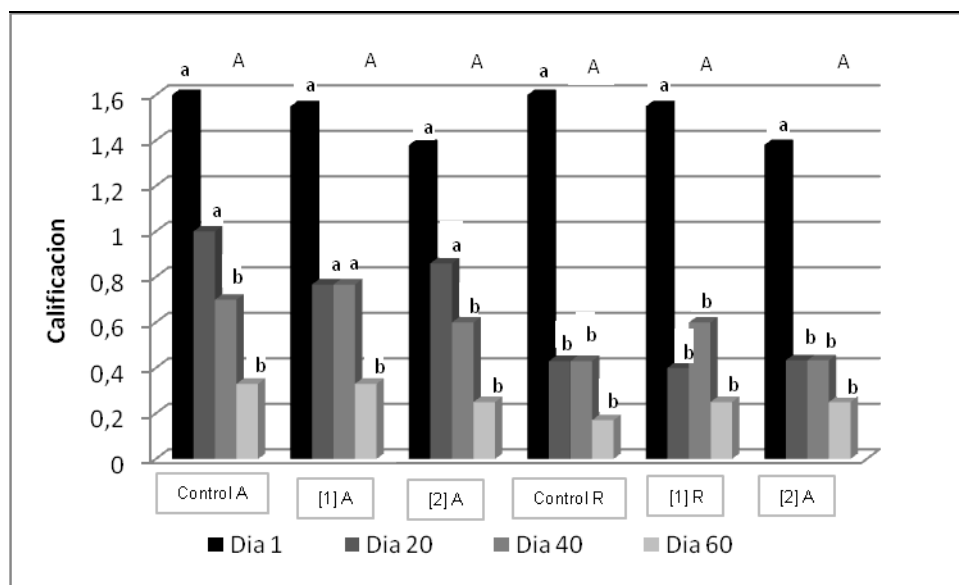
El histograma corresponde al promedio de los resultados. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre días ( $p \leq 0,05$ )

**Figura 4.7** Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable textura



El histograma corresponde al promedio de los resultados. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre días ( $p \leq 0,05$ )

**Figura 4.8** Evaluación sensorial pulpa de arazá. Variable aroma



El histograma corresponde al promedio de los resultados. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos y letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre días ( $p \leq 0,05$ )

Como se puede ver en la 4.5 la variable apariencia y color en todos los tratamientos y temperaturas de almacenamiento disminuye desde el primer día, existiendo una diferencia significativa entre los cambios según la temperatura de almacenamiento, es decir el cambio es más notorio para las muestras almacenadas en refrigeración que para las almacenadas en ambiente. En temperatura ambiente el color y la apariencia es aceptable hasta el día 40, mientras que en refrigeración desde el día 20 las calificaciones son muy inferiores, mostrando el efecto negativo del color de la pulpa al ser almacenada a esta temperatura. También se deduce que la adición del extracto de la flor de caléndula en las concentraciones evaluadas no inhibe la reacción de pardeamiento enzimático, a pesar de su alta capacidad antioxidante (Porcentaje de decoloración de DPPH de 74,33% y porcentaje de inhibición ABTS de 61,80%). Es posible que concentraciones más altas si logren el efecto deseado, sin embargo para ello es necesario desarrollar un método en donde se pueda controlar el sabor amargo del extracto y se conserven sus características antioxidantes, resultando un potente antioxidante natural ideal para la industria de alimentos.

En la evaluación sensorial del sabor de la pulpa (Figura 4.6), la calidad disminuye con la adición del extracto en cualquiera de las dos concentraciones, sin embargo no hay una diferencia significativa entre los tratamientos y las temperaturas de almacenamiento. La calidad en el sabor de la pulpa se mantiene aceptable hasta el día 20, a partir de allí ya no es sensorialmente aceptable. Por otra parte la textura (Figura 4.7) no se ve afectada por la adición del extracto, pero si por la temperatura de almacenamiento, siendo inferior para el almacenamiento en refrigeración. Por último el aroma (Figura 4.8) disminuye proporcionalmente con la adición del extracto, y por el almacenamiento en refrigeración.

Según estos resultados es posible deducir que el extracto de la flor de caléndula puede llegar a ser una excelente alternativa como conservante y antioxidante químico, ya que a pequeñas concentraciones minimizó sustancialmente el crecimiento de hongos y levaduras. Respecto al pardeamiento enzimático es necesario profundizar más en la investigación, evaluando tratamientos que puedan minimizar características sensoriales indeseables del extracto, para así poder evaluar el efecto del extracto en concentraciones mayores.

Actualmente existen varias investigaciones que se enfocan en el estudio de las propiedades antimicrobianas de compuestos de origen vegetal que básicamente incluyen compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y fitoalexinas; como el apio, la almendra, el café y la vainillina, romero, orégano, mandarina, entre otros, en la

mayoría de los casos se extrae el aceite esencial y se evalúa su poder antimicrobiano. En el caso de la flor de caléndula también se ha evaluado el poder antimicrobiano del aceite esencial obteniendo muy buenos resultados, en este caso no se extrajo el aceite esencial ya que se buscaba obtener dos propiedades, actividad antimicrobiana y actividad antioxidante en otro tipo de extracto vegetal obtenido a partir de la caléndula, estas dos propiedades en conjunto son el ideal de un conservante de origen natural. Adicionalmente, la adición del extracto de caléndula a una matriz alimenticia puede llegar a considerarse como un alimento funcional, claro está realizando los respectivos estudios clínicos, de manera que se genere efectos favorables en el organismo, justificados en todas las propiedades farmacológicas encontradas en la caléndula y debidamente comprobadas.

Este extracto también podría ser incorporado en recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos, manteniendo la calidad de los productos recubiertos retrasando las principales causas de alteración; cambios químicos que puedan afectar las cualidades sensoriales del mismo y mejorando la estabilidad microbiológica, alargando de esta forma la vida útil del producto durante el almacenamiento.

## **Conclusiones**

La elaboración de la pulpa de arazá con procesos térmicos previos a la inclusión del extracto (escaldado y pasteurización), empleados como tecnología de obstáculos o tratamientos combinados con los cuales se logró reducir la carga microbiológica y la actividad enzimática hasta niveles que permitieron la evaluación del extracto como antifúngico y antioxidante natural.

La inclusión del extracto de la flor de caléndula a la pulpa de arazá se realizó en dos niveles de concentración uno fue el umbral de detección ([1]) y el otro fue el umbral de identificación ([2]), al realizar análisis colorimétricos, microbiológicos y sensoriales a la pulpa de arazá almacenadas se encontró que dependiendo de la temperatura de almacenamiento los cambios ocurridos en el proceso son diferentes.

El análisis colorimétrico permite establecer que la adición del extracto de caléndula, en las concentraciones evaluadas, no mitiga el pardeamiento enzimático, ya que las diferencias encontradas en el color de las pulpas obedecen únicamente a la temperatura de almacenamiento. Empero, esto no significa que el

extracto no funcione para este fin, ya que no se debe olvidar su alto poder antioxidante, es posible que al probar concentraciones mayores los resultados varíen.

La adición del extracto de flores de caléndula combinado con el almacenamiento en refrigeración mantiene una buena calidad microbiológica en términos de hongos y levaduras, reflejando el poder antifúngico del extracto.

Por último, los análisis sensoriales muestran que la adición del extracto de caléndula disminuye la calidad del sabor y el aroma de la pulpa y no presenta influencia alguna en el color y la textura de la misma.

## Referencias bibliográficas

1. HERNANDEZ, M.S. y BARRERA, J. Manejo pos cosecha y transformación de frutales nativos promisorios en la Amazonia colombiana. Instituto amazónico de investigaciones científicas, SINCHI. Programa nacional de transferencia tecnológica agropecuaria, PRONATA. Bogotá (Colombia): Produmedios, 2000. p.11.21.
2. HERNANDEZ, M.S.; BARRERA, J.; MARTINEZ, J.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. Postharvest quality of arazá fruit during low temperature storage. LWT Food Science and Technology, 2009. 42, p.879-884. b
3. QUIÑONES, M. Diseño del proceso de obtención y estudio de estabilidad de la pulpa refinada de Arazá. Tesis de grado Ingeniería de alimentos. Guayaquil (Ecuador): Escuela superior politécnica del litoral, Facultad de ingeniería mecánica y ciencias de la producción, 2005. 141p.
4. BARREIRA, J.; FERREIRA, C.; OLIVEIRA, B.; PEREIRA, J. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. Food chemistry, 2008. 107, p. 1106-1113.
5. GUZMAN, C.; LOPERA, S.; GALLARDO, C. Técnicas para fotoestabilizar la riboflavina. Tesis de pregrado. Antioquia (Colombia): Universidad de Antioquia, 2009. p. 1-3.
6. SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; JANISZOWSKA, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. –structure, biosynthesis, transport and biological activity. Phytochemistry Reviews, 2005. 4 (2-3), p. 151-158.

7. SOLIMAN, K. and BADEAA, R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology.*, noviembre, 2002. 40 (11), p.1669-1675.
8. ACOSTA, L.; RODRIGUEZ, C.; SANCHEZ, E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis* L. Estación experimental de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med*, 2001. 1 (23), p. 23-27.
9. AGUILA, B.; MENENDEZ, R.; GONZALEZ, C.; FERNANDEZ D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis* L., Estudio preliminar de sus propiedades. *Rev Cubana Plant Med*, 2000, 5 (1), p.1-2.
10. DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, C.; GUIRAUD H.; LALLEMAND, M. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* L. flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* and *C. arvensis*. *Ann Pharm Fr*, 1980, 38 (6), p.493-499.
11. CARPENTER, R.; LYON, D.; HASDELL, T. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos. 2 ed. Zaragoza (España): Acribia, 2002, 191p.
12. ARROYO, F.; ALCALDE, M.; VILLEGAS, R.; ROBADOR, M. Influencia del diámetro y color de las plantillas reductoras de la superficie de proyección de los colorímetros en la medida del color de una superficie. *Materiales de construcción*, 2008. 58 (291), p. 99-109.
13. ESPINAL, M. Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira ICA I (*Psidium guajava*) [Tesis Magister en ciencias químicas]. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, 2010. 141p.
14. COLOMBIA. NORMAS TECNICAS ICONTEC. NTC 4132. Bogotá (Colombia): 1997. 7p.
15. SILVA, K. Evaluación de la efectividad de técnicas combinadas en la conservación de pulpa de Arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaught). Tesis Magister en ciencias químicas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, 2009. 141p.
16. PEREZ, L. Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad blanquilla) mínimamente

procesada. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos. 2003.

17. PINTO, L. Caracterización de los atributos de calidad durante el almacenamiento del banano verde (*Musa Cavendish*) mínimamente procesado impregnado al vacío con soluciones antipardeantes. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias. 2010.
18. OSORIO, O. Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (*Fragaria x ananassa*, cv Caramosa). Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos. Consejo superior de investigaciones científicas. Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos. Doctorado por la Universidad Politécnica de Valencia. 2008.
19. TROMBINO, V.; HERNANDEZ, M.; RIOS, M. Efecto de los procesos de higienización sobre la calidad microbiológica de la leche humana del banco de leche del hospital universitario de Caracas (HUC). Instituto nacional de higiene Rafael Rangel, 2003. 34 (1), p. 10-16.
20. ELIZONDO, J., JAYARAO, B., HEINRICHS, A. Pasteurización de calostro: efecto sobre la carga bacteriana y la concentración de inmunoglobulinas G. Revista electrónica de veterinaria, 2008. 4 (9), p.1-9.
21. CARRANDI, S. Efecto de conservantes en la estabilidad de jugo de tuna pasteurizado. Tesis Ingeniería Agronómica. Universidad de Chile, Escuela de agronomía, 1995. 80p.
22. MORENO, M., VILORIA, A., LOPEZ., E. Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). Archivos latinoamericanos de nutrición, 2002. 52 (2), p.181-186.
23. MORENO, M., GIRAN, N., SERRANO, K., GARCIA, D., BELEN, D. Evaluación microbiológica y fisicoquímica de néctares pasteurizados elaborados con pulpa de tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* Sendth). Archivos latinoamericanos de nutrición, 2003. 53 (3), p.282-286.

24. MARTENS, M., SCHEERLINCK, N., DE BELIE, N., DE BAERDEMAEKER, J. Numerical model for the combined simulation of heat transfer and enzyme inactivation kinetics in cylindrical vegetables. *Journal of Food Engineering*, 2001. 47 (3), p.185-193.
25. CHISARI, M., BARBAGALLO, R., SPAGNA, G. Characterization of polyphenoloxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. 55 (9), p. 3469-3476.
26. NARVAEZ, C. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* MC Vaugh). *Quim. Nova*, 2008. 31 (8), p.2047-2051.

## Conclusiones

Al estudiar el extracto de la flor de caléndula se encontraron propiedades que pueden responder a los actuales desafíos de la industria de alimentos, encontrando sustancias de origen natural que se pueden emplear como conservantes y aditivos, en remplazo de los aditivos químicos que en muchos casos causan problemas en la salud de los consumidores. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de la flor de caléndula tiene importantes compuestos como taninos, quinonas, carotenoides (licopeno, luteína y  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno) kaempherol, quercetina, isorhamnetina, sesquiterpenos, cadineno, muurolol, cumarinas, flavonoides, éteres, esterres, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos, taninos, celulosa y saponinas; compuestos conocidos por sus propiedades benéficas y algunos de ellos por sus propiedades antioxidantes y antifúngicos. Por otra parte la capacidad antioxidante del extracto fue bastante alta con resultados de 74,33% por DPPH y 142,87 mmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto de caléndula por ABTS. Según estos resultados se concluye que el extracto hidroalcohólico de caléndula puede ser una sustancia alternativa utilizada como antioxidante natural en la industria alimentaria, incrementando la concentración de antioxidantes de forma natural hasta los niveles que pueda inducir los beneficios esperados o añadir los antioxidantes que no están presentes normalmente en el alimento.

La concentración en la cual el extracto de caléndula puede ser agregado a la pulpa de arazá fue determinada teniendo en cuenta parámetros sensoriales, mediante el método de determinación de umbrales encontrando dos niveles de inclusión  $8.26 \times 10^{-3}$  g de extracto de caléndula en 100 g de pulpa de fruta y  $1,90 \times 10^{-2}$  g de extracto de caléndula en 100 g de pulpa de arazá a partir de esta concentración no se recomienda su uso en este tipo de alimento ya que confiere un sabor bastante amargo. Cabe resaltar que mediante este método no se determinó la concentración del extracto de caléndula en pulpa de arazá aceptada por el consumidor, sino que se determinó el nivel sensorial en que se podía incluir el extracto en la pulpa.

En la evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de la flor de caléndula sobre la estabilización de la pulpa de arazá se encontró que el extracto agregado en las concentraciones evaluadas no mitigo el pardeamiento enzimático de la pulpa, ya que las diferencias de color encontradas en el proceso dependieron únicamente de la temperatura de almacenamiento. En el análisis microbiológico se encontró que el extracto si funciona como conservante, en combinación con el almacenamiento en refrigeración, evitando el crecimiento de hongos y levaduras y

manteniendo de esta manera una buena calidad microbiológica durante todo el periodo de almacenamiento. Por otra parte el análisis sensorial muestra que la adición del extracto de caléndula disminuye la calidad del sabor y el aroma de la pulpa y no presenta influencia alguna en el color y la textura de la misma.

Las características propias del extracto son el sabor amargo y el color marrón, lo que dificulta su empleo en una matriz alimenticia como la pulpa de arazá, por esta razón se debería realizar algún tipo de proceso previo que controle estas propiedades y así emplear el extracto en mayores concentraciones, que pueden llegar a producir resultados favorables en la mitigación del pardeamiento enzimático.

## **Recomendaciones**

Determinar la actividad enzimática residual de la enzima polifenoloxidasas después del tratamiento térmico de escaldado y pasteurización.

Establecer un proceso o tratamiento que minimice el sabor amargo del extracto de caléndula, para que pueda ser incluido en la pulpa de arazá en mayores concentraciones y de esta manera se permita un efecto contra el pardeamiento enzimático.

Evaluar el extracto de flores de caléndula en otro tipo de matriz alimenticia.

Determinar los efectos que trae para la salud humana la inclusión del extracto de flores de caléndula en matrices alimenticias.

## Bibliografía

1. ABDULLABEKOVA, V and TULAGANOV, A. Development of the method of quantitative analysis for pot marigold flowers. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2001. Octubre 35 (10), 25-26 p.
2. ABRIL, A. *Calendula officinalis* L.: Composición, propiedades y aplicaciones cosméticas. Monografía especialización en Ciencia y Tecnología en Cosmética. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2008. 3-41p.
3. ACOSTA, L.; RODRIGUEZ, C.; SANCHEZ, E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis* L. Estación experimental de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant Med.*, 2001. 1 (23). p. 23-27.
4. AGUILA, B.; MENÉNDEZ, R.; GONZÁLEZ, C.; FERNÁNDEZ, D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis* L., Estudio preliminar de sus propiedades. *Rev Cubana Plant Med*, 2000. 5 (1), 1-2p.
5. AGUILAR, J. Araca-boi (*Eugenia stipitata* Mc vaught) aspectos e dados preliminares sobre a sua composicao química. *Acta Amazónica.*, 1983. 13 (5-6). p. 953-954.
6. BALCH, P. Prescription for Herbal Healing. New York (Estados Unidos): Penguin Putnam Inc, 2002. p.40-41.
7. BARREIRA, J.; FERREIRA, C.; OLIVEIRA, B.; PEREIRA, J. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, 2008. 107. p. 1106-1113.
8. BILIA, A.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia*, 2001. 53 (3-4), 210-215p.
9. COLOMBIA. SISTEMA INTELIGENCIA DE MERCADOS SIM. Perfil del producto bebida a base de frutas No 14. Ministerio de Cultura y Desarrollo Rural. Octubre – Diciembre del 2001.

10. CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA CORPOICA. CVR Corporación Regional Autónoma del Valle del Cauca. Frutas tropicales de Colombia para el mundo: producción, agroindustria, comercialización y cadena productiva. Memorias I simposio colombiano sobre producción, agroindustria y comercialización de frutas tropicales. Colombia, 2007.
11. DEINEKA, V.; SOROKOPUDOV, V.; DEINEKA, L.; YU, M. Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2007. 41 (10), 19-30p.
12. DOMINGUEZ, E. Utilización de flores de Caléndula (*Calendulae flos*) en salsa para carnes. Trabajo final especialización. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, programa interfacultades, 2009. p. 10-86.
13. FERAL, A and HAYAM, I. Dry fermented buffalo sausage with sage oil extract: Safety and quality. *Grasas y aceites.*, 2010. 61 (1). p. 76-85.
14. FUENTES, V.; LEMES, C.; REYES, M.; MENDEZ, G.; ALONZO, J.; RODRIGUEZ, A. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 2000. 5(1), 14-16p.
15. GARCIA, D.; SANCHEZ, E.; CRESPO, M.; CARBALLO, C. Estudio farmacognóstico de la Caléndula (*Calendula officinalis* L). *Revista cubana de plantas medicinales.*, 1996. 1 (3). p. 21-25.
16. GUZMAN, C.; LOPERA, S.; GALLARDO, C. Técnicas para fotoestabilizar la riboflavina. Tesis de pregrado. Antioquia (Colombia): Universidad de Antioquia, 2009. p. 1-3.
17. HAYAM, I.; AZZA, A.; FERAL, A. Antioxidant and antimicrobial effects of some natural plant extracts added to lamb patties during storage. *Grasas y aceites.*, 2011. 62 (2). p. 139-148.
18. HERNANDEZ, M.S and FERNANDEZ-TRUJILLO, J.P. Arazá fruit. Postharvest quality maintenance guidelines. *USDA Agricultural Handbook No. 66*, Wang (Eds), 2004.
19. -----, BARRERA, J. Manejo poscosecha y transformación de frutales nativos promisorios en la Amazonia colombiana. Instituto amazónico de

investigaciones científicas, SINCHI. Programa nacional de transferencia tecnológica agropecuaria, PRONATA. Bogotá (Colombia): Produmedios, 2000. p.11.21.

- 20.-----, BARRERA, J.; MARTINEZ, J.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. Postharvest quality of arazá fruit during low temperature storage. LWT Food Science and Technology, 2009. 42. p.879-884. b
- 21.LASTRA, H y PIQUET, R. *Calendula officinalis* L. Artículo de revisión. Revista cubana de farmacia., 1999. 33 (3). p. 188-194.
- 22.MEJIA, L.; NARVAEZ, C.; RESTREPO, P. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). Agronomía colombiana, 2006. 24 (1). p.87-95.
- 23.NARVAEZ, C. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), química Nova, 2008. 38 (8). p. 2047-2051.
- 24.ORDUZ, J y LEON, G. Avances de investigación en frutales tropicales promisorios para el departamento del Meta. Informe técnico No 25. CORPOICA, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria. 2001.
- 25.PIRES, F. Nuevo dentífrico con acción bactericida y antiinflamatoria de *Caléndula officinails*. Parte III. [Tesis de pregrado],. España: Universidad de Sevilla, 2003.
- 26.QUIÑONES, M. Diseño del proceso de obtención y estudio de estabilidad de la pulpa refinada de Arazá. Tesis de grado Ingeniería de alimentos. Guayaquil (Ecuador): Escuela superior politécnica del litoral, Facultad de ingeniería mecánica y ciencias de la producción, 2005, 141p.
- 27.RAMALHO, V and NEUZA, J. Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. Grasas y aceites., 2008. 59 (2). p. 128-131.
- 28.REMACHA, J.; IBARZ, A.; GINEV, J. Evolución del color por efecto de la temperatura, en pulpas de fruta. Servicio de información y documentación alimentaria. Datos no publicados. Madrid 2002.

29. RODRIGUEZ, E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai.*, 2011. 7 (1). p. 152-170.
30. SCHMID, D and ZULLI, F. Penetration and Metabolims of Isoflavones in Human Skin, Cosmetics y Toiletries. *Cosmetics & toiletries.*, 2003. 118 (9). p. 1-4.
31. SANCHEZ, L.; VARGAS, M.; GONZALEZ, C.; CHAFER, M.; CHIRALD, A. Incorporación de de productos naturales en recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos. *Memorias VIII Congreso SEAE Bullas.* 2008. p. 1-9.
32. SOLIMAN, K and BADEAA, R. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology.*, 2002. 40 (11). p.1669-1675.
33. SZAKIEL, A.; RUSZKOWSKI, D.; JANISZOWSKA, W. Saponins in *Calendula officinalis* L. –structure, biosynthesis, transport and biological activity. *Phytochemistry Reviews.*, 2005. 4 (2-3). p. 151-158.
34. VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Revision. Grasas y aceites.*, 2003. 54 (3). p. 295-303.

# Anexo A

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES REVISTA VITAE. Acta 016 de agosto 26 del 2010

## **Alcance y política de revisión**

La Revista VITAE es una publicación oficial de la Facultad de Química Farmacéutica, de periodicidad cuatrimestral, y tiene como misión la divulgación del pensamiento científico y el quehacer a nivel investigativo en los diversos campos de las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines. Publica artículos originales e inéditos, los cuales son seleccionados por el Comité Editorial y evaluados por pares nacionales e internacionales.

La opinión de la Facultad frente a los diversos temas de interés se consigna a través de sus páginas editoriales. La responsabilidad por los juicios, opiniones y puntos de vista expresados en los artículos publicados corresponde exclusivamente a sus autores.

## **Reserva de derechos**

El estudio y la selección de los artículos enviados por los colaboradores están a cargo del Comité Editorial. La recepción de un trabajo no implica la aceptación ni publicación del mismo, ni el compromiso por parte de la revista con respecto a su fecha de aparición. Así mismo, se reserva el derecho de realizar modificaciones editoriales necesarias para la publicación de la revista.

## **Clasificación de los artículos**

La revista VITAE publicará las siguientes clases de artículos:

- Artículos Completos
- Artículos Cortos
- Revisiones (expertos en el tema, seleccionados para el Comité Editorial)

Todos los artículos serán clasificados en alguna de las siguientes secciones:

- Alimentos: Ciencia, Tecnología e Ingeniería
- Atención Farmacéutica
- Biotecnología

- Farmacología y Toxicología
- Industrial Farmacéutica
- Productos Naturales

### **Presentación de manuscritos**

Se aceptarán manuscritos en inglés. Debe presentarse una copia impresa, a doble espacio, con tipo de letra Times New Roman de 12 puntos, en hojas de papel tamaño carta, con márgenes simétricas de 3cm. A continuación, se incluirá una copia electrónica en Word®, acompañado de los formatos de información del artículo, de los autores y la licencia de acceso abierto. Los artículos sometidos a la revista VITAE deberán tener una extensión máxima de 25 páginas, incluyendo tablas y figuras.

### **Primera página**

#### **Información del título**

En la primera página de todos los artículos debe aparecer: Título en español e inglés. Nombres completos de los autores y afiliaciones institucionales, incluyendo ciudad y país. El autor principal debe indicar el correo electrónico al cual se debe dirigir la correspondencia (véase último número de la revista).

#### **Resumen**

Se debe incluir un resumen en español e inglés, con una longitud máxima de 200 palabras, redactado en tiempo pasado, en un solo párrafo. No se deben incluir siglas, acrónimos y/o referencias bibliográficas. Debe contener:

- Presentación del tema
- Una hipótesis
- Uno o dos argumentos
- Resultados
- Conclusiones

#### **Palabras clave**

Se incluyen hasta cinco palabras clave, tanto en español como en inglés; al menos dos deben estar incluidas en los Descriptores de Ciencias de la Salud (DeCS), en la dirección web: <http://decs.bvs.br/>

## **Revisiones bibliográficas**

Son documentos donde se analizan, sistematizan e integran resultados de investigaciones sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar en cuenta los avances y tendencias de desarrollo. Son realizados por invitados seleccionados por el Comité Editorial de acuerdo a su experiencia en el tema, los cuales presentan una descripción general del campo de interés, con una evaluación crítica de su desarrollo.

La estructura y encabezamiento de las revisiones queda a criterio del autor, si bien el comité editorial puede sugerir cambios que mejoren la edición. La revisión bibliográfica debe referirse a un periodo no inferior a un año, y ser, como mínimo, de 50 referencias.

## **Artículos completos**

Presentan, de manera detallada, los resultados originales de proyectos terminados de investigación, que no hayan sido publicados previamente. Cuando se trata de estandarización de métodos analíticos, éstos deben ser validados bajo normas internacionales. El artículo completo debe presentar los siguientes apartados:

**Introducción:** expone un contexto o trasfondo del estudio, haciendo referencia a todo trabajo anteriormente publicado por los mismos autores o por otros. En este apartado se especificarán los fines y objetivos del artículo.

**Materiales y métodos:** debe incluir la información y procedimientos necesarios para la reproducibilidad de los experimentos, indicando los métodos establecidos en la literatura y las modificaciones sustanciales de los mismos.

**Resultados y discusión:** se deben presentar los resultados en una secuencia lógica, utilizando tablas y gráficos para sintetizar la información.

**Conclusiones:** deben ligarse a los objetivos del trabajo, omitiendo aquellas que no son soportadas por los resultados.

Se deben evitar conclusiones de materia económica, excepto cuando el artículo incluya dichos análisis.

## Artículos cortos

Estos presentan los resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica, que requieren de una pronta difusión, sobre trabajos relacionados con las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines, cuyo interés justifique que se tenga información sobre el tema. Tienen una extensión máxima de 15 páginas, conservando la estructura de los artículos completos.

## Normas de estilo de los artículos

Tablas y figuras: Cada artículo debe ser complementado con tablas y figuras, previamente referidas en el texto (Ej.: En la tabla 1, etc.), con un consecutivo diferente para cada categoría, en números arábigos, en las cuales se especifica información que no debe ser duplicada en el texto, y deben ser ubicadas inmediatamente después del párrafo en que son citadas por primera vez. Para su realización se debe tener en cuenta lo siguiente:

- En las tablas se incluyen cuadros, con resultados o no, utilizados para sintetizar u organizar la información, trazadas con bordes completos.
- Las figuras incluyen gráficos, ilustraciones, fotografías, dibujos, mapas y estructuras, limitándose en número y procurando yuxtaponer aquellas que, sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.
- El uso de colores en las gráficas está condicionado a los costos adicionales de publicación que se generen en el proceso editorial.
- Se debe indicar la fuente de donde han sido tomadas aquellas tablas y figuras que no son creación del autor, utilizando referencias bibliográficas de manera similar al texto.
- En las figuras y en las tablas se debe utilizar el tipo de letra Times New Roman.
- El título de las figuras se digita como un párrafo fuera de la misma, en la parte inferior, y el de las tablas en la parte superior.

**Símbolos y unidades:** el autor debe utilizar las normas del Sistema Internacional de Magnitudes (ISO/IEC 80000), en lo referente a unidades, símbolos y abreviaturas.

**Nombres comerciales:** se evitará el empleo de nombres comerciales; en su lugar se utilizarán los nombres genéricos; pero si es inevitable, se indicará con el símbolo ®.

**Nombres de equipos, instrumentos y reactivos:** debe indicarse los valores precisos para la replicación del experimento, describiendo detalles específicos que faciliten su identificación; para reactivos y medios de cultivo se debe indicar la marca y el país de procedencia entre paréntesis.

**Nombres científicos:** los nombres científicos deberán indicarse en cursiva, con mayúscula inicial, complementándose opcionalmente con la “autoridad”. Deben indicarse las cepas y las variaciones de la especie, si es relevante para el trabajo.

### **Referencias bibliográficas**

Deben indicarse en el texto mediante un número arábigo entre paréntesis según el orden de aparición. Las referencias bibliográficas completas deben colocarse al final del artículo, bajo el título de Referencias Bibliográficas, de acuerdo con las normas del ICMJE (Vancouver), las cuales pueden ser consultadas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>.

Los modelos para algunas referencias se incluyen a continuación:

**Artículos científicos:** Autores. Título del artículo. Abreviatura ISI del nombre de la Revista. Fecha; Volumen (Número): Páginas.

Restrepo A, Cortés M, Márquez CJ. Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. *Vitae*. 2009 May-Aug;16 (2): 19-30.

Keyzers R, Daoust J, Davies-Coleman M, Van R, Balgi A, Donohue E, et al. Autophagy-modulating aminosteroids isolated from the sponge *Cliona celata*. *Org Lett*. 2008 Jul 17; 10 (14): 2959-2962.

**Libros y monografías impresas:** Autores. Título. Edición. Lugar de Publicación: Editor; Año. Páginas.

Gibaldi M, Perrier D. *Farmacocinética*. Barcelona, España: Reverte; 2008. 352 p.

**Tesis y trabajos de grado:** Autores. Título. [Tipo de documento]. [Lugar de Publicación]: Editor. Fecha. Páginas.

Monsalve AF, Morales SP. Aumento de capacidad del recurso restricción en la empresa Laproff S.A. [Trabajo de pregrado]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 2009. 39 p.

**Material electrónico:** Autores. Título. [Tipo de Medio]. Lugar de Publicación: Editor: Fecha.

ASME. *Aseptic Fill & Finish for Biopharmaceuticals*. [CD-ROM]. San Diego (CA): ASME; 2007.

**Sitio de Internet:** Autores. Título. [Tipo de medio]. Lugar de Publicación: Editor. Fecha de Publicación. [Fecha de Citación]. Disponible en: dirección URL.

Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. [Internet]. Roma, Italia: FAO. 2008 [Actualizado 8 de Enero de 2008; citado 18 de Agosto de 2009].

Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0424e/i0424e00.pdf>

## **Revisión de originales**

El Comité Editorial revisará los originales, se asesorará, cuando lo requiera, de personal adecuadamente calificado y devolverá a los autores aquellos cuyo contenido no se ajuste a las presentes normas, solicitando, en todo caso, las modificaciones que estime oportunas. Selección. El Comité Editorial remitirá todos los artículos que cumplan las normas editoriales como mínimo a dos árbitros, quienes deben emitir su concepto por escrito en el formato establecido para ello. Si los árbitros sugieren correcciones, los autores deberán enviar la nueva versión acompañada del medio magnético en un plazo máximo de doce días a partir de la fecha de envío, pasado el cual perderá su turno de publicación. En la corrección de pruebas de impresión final, que deberá realizarse con gran atención, no se admitirán modificaciones al texto original. Por último, serán enviados tres ejemplares del número publicado, al autor principal, como retribución de nuestro proceso.

## **Costos de publicación**

Se establece un valor a pagar de \$300.000 (trescientos mil pesos) por artículo. Este valor se pagará tan pronto como se informe al autor principal sobre el volumen y el número en que se publicará la versión definitiva del manuscrito. El uso de gráficos, figuras o fotografías en color tiene un costo adicional de acuerdo al número de páginas.

## **Licenciamientos de la obra**

Una vez son publicados en la Revista Vitae, los artículos científicos y revisiones se encontrarán disponibles de manera libre para consulta de todo el público, tanto en el sitio web como en los diferentes sistemas de indexación y bases de datos a los que está suscrita la revista, bajo la Licencia Creative Commons, en el modo Attribution-Noncommercial-No Derivative Works aprobada en Colombia. Así mismo, los autores ceden, sin derecho a retribuciones económicas, a la Universidad de Antioquia, Revista Vitae, los Derechos Patrimoniales sobre la publicación y sus diferentes medios de difusión por el tiempo que establezca la normatividad vigente, mediante el formato de Licencia de Acceso Abierto a la Publicación propuesto para tal fin. La documentación requerida para presentar los artículos, los formatos y una copia de estas instrucciones pueden ser descargados del sitio web: <http://www.udea.edu.co/vitae>.

# Anexo B

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES REVISTA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Esta es la edición en línea de la Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, publicación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, de carácter investigativo y al servicio de la comunidad educativa.

Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial es una publicación que cuenta con un equipo de trabajo interdisciplinario, encargado de coordinar todos los procesos académicos y editoriales que intervienen en este medio de comunicación.

### 1. Políticas editoriales

Compromiso de tipo formal: con el envío del trabajo a ser considerado para publicación, los autores aceptan las condiciones en todos los aspectos indicados en estas normas. Compromiso de tipo ético: con el envío del trabajo, los autores deben establecer un compromiso de tipo ético en cuanto a la originalidad del trabajo sometido a evaluación. En la carta de presentación se debe aceptar este compromiso: "El autor firmante declara que el artículo presenta resultados de investigación original, que no ha sido publicado ni está siendo considerado para publicación en otra revista y que se ajusta a normas éticas internacionales de propiedad intelectual y autoría".

En la carta se deben incluir los datos personales de cada uno de los autores: nacionalidad, escolaridad, correo electrónico, teléfonos para su ubicación o dirección postal y filiación institucional, o en su defecto, la dirección de la página Web donde pueden ser consultados.

Cambios por la parte del Comité Editorial: El Editor se reserva el derecho de rechazar un artículo o sugerir modificaciones con el objeto de lograr una mejor presentación e impacto del trabajo en cuanto a título, resumen, palabras claves, figuras, cuadros y referencias, con lo cual se devuelve el documento para su adecuación; si éste cumple los requerimientos, será aceptado y proseguirá con el proceso. Una vez los pares evaluadores emitan sus conceptos respectivos, los autores deben realizar las correcciones (consignadas en el formato) y remitir el documento nuevamente a la revista con todas las consideraciones.

### 2. Envío de manuscritos

Las propuestas deben enviarse a: Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias sede Las Guacas, Popayán, Revista Biotecnología en el Sector

Agropecuaria y Agroindustrial, con una carta (ver formatos) dirigida al editor de la revista, Ph. D. Héctor Samuel Villada Castillo, por correo electrónico y firmada por todos los autores: cuando por algún motivo esto sea imposible, basta con un correo electrónico del autor en el que confirme su participación tanto en el artículo original como en el artículo corregido según las observaciones de los pares evaluadores.

### **3. Tipos de artículos**

"Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial" publicará preferiblemente artículos relacionados con la biotecnología en el sector agrario y agroindustrial, pero dada su ubicación institucional y regional, también contemplará publicaciones relacionadas con otros campos de estos sectores:

#### **3.1. De investigación.**

La revista está dispuesta a modelos y perspectivas diversas, motivando estudios con metodologías complementarias, siempre que cumplan mínimos requisitos de rigor y sistematicidad.

#### **3.2. De propuestas teóricas y/o avances metodológicos.**

Las cuáles sean importantes, relevantes y sugerentes para los profesionales del ámbito agropecuario y agroindustrial.

#### **3.3. De reflexión.**

Que presenten resultados de investigaciones realizadas con una intención analítica, interpretativa o crítica del autor, sobre una temática determinada, en la que se haya recurrido a fuentes originales.

#### **3.4. De reporte de caso.**

Documentos en los que se presenten los resultados de un estudio cuyo objetivo primordial sea dar a conocer las experiencias técnicas y metodológicas consideradas en un caso particular. Debe estar incluida una revisión sistemática comentada sobre casos similares.

#### **3.5. De revisión de un tema o de síntesis (review).**

Expondrá el estado de la cuestión en alguno de los ámbitos de interés de la revista. Se busca que la revista sea un instrumento útil para la puesta al día de investigadores y estudiantes.

#### **3.6. Cartas al editor.**

En éstas se expondrán las posiciones críticas, de análisis o de interpretación sobre los documentos publicados en la revista, siempre y cuando el comité editorial lo defina como un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

#### **3.7. Editorial.**

Documento escrito por el editor, un miembro del comité editorial o un investigador invitado, en el que se expongan:

- Orientaciones en el tema de la revista.

- Aportes a los investigadores en cuestiones de presentación y estructura de sus artículos.
- Reflexiones sobre la presentación de documentos escritos, su normatividad, su importancia y otros.

### **3.8. Noticias/Punto de vista.**

Se refiere a actualidades científicas, eventos académicos y científicos, política gremial, apuntes curriculares, opiniones y comentarios, reseñas bibliográficas y semblanzas. No se publicarán artículos que expresen exclusivamente opiniones, anécdotas o interpretaciones no fundamentadas.

## **4. Forma y preparación de manuscritos**

Todo documento remitido a BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL debe cumplir con:

- Originalidad: el aporte debe ser totalmente inédito, no publicado en ninguna otra publicación, excepto casos justificados.
- Consistencia metodológica: en donde se haga evidente el uso de métodos y técnicas de investigación válidos.
- Significación del asunto tal que informe o ilustre situaciones relevantes en el sector Agropecuario y Agroindustrial.
- Impacto: para un amplio sector de la academia, la investigación y estudiantes.
- Avance del campo: en el cual sea claro y evidente el aporte a consideraciones y prácticas de mejora en el campo de investigación Agropecuario y Agroindustrial.
- Consideraciones éticas.
- Estilo de redacción claro, conciso y ordenado, evitando jergas personales y expresiones locales.

La estructura de los artículos debe ser:

**Los artículos de investigación científica**, tecnológica y de reporte de caso deben cumplir con la siguiente estructura: la **Introducción** debe resaltar la importancia de la investigación, presentar la literatura relacionada y entregar antecedentes necesarios para comprender la hipótesis de los autores, terminando con un párrafo que indique claramente los objetivos de la investigación. **El Método** debe tener suficiente información que permita a otro investigador replicar el ensayo y lograr los mismos resultados, así como la inclusión del diseño experimental y el análisis estadístico. **Los Resultados** se deben presentar en forma clara, apoyados con cuadros y figuras, con el análisis estadístico y los antecedentes de otros investigadores. **Las Conclusiones** deben redactarse de

acuerdo con los objetivos de la investigación explicando claramente los principales resultados de la investigación. **Las Referencias** deben contener todos los documentos consultados.

**Los artículos de reflexión** que presenten resultados de investigaciones realizadas sobre una temática determinada, deben demostrar al menos uno de los siguientes aspectos: a) intención analítica; b) propósito interpretativo; c) posición crítica. La estructura básica de un artículo de reflexión es: Resumen, Introducción, Desarrollo del tema, Conclusiones, Referencias (mínimo 12).

**Los artículos de revisión** son el resultado de una investigación terminada, deben cumplir con las siguientes características: a) se debe analizar, sistematizar e integrar los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas, sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y las tendencias de desarrollo; b) debe presentar una cuidadosa revisión bibliográfica de por lo menos 50 referencias. La estructura básica de un artículo de revisión es: Resumen, Introducción, Desarrollo del tema, Conclusiones, Referencias.

Los elementos normativos a seguir para todos los artículos son:

- La extensión de los artículos debe ser de mínimo cinco (5) páginas y máximo de once (11) páginas tamaño carta (21,59 cm de ancho y 27,94 cm de alto), escritas con un interlineado sencillo y su contenido a doble columna (7,5 cm de ancho de columna); letra Arial recta (excepto los nombres científicos) de 11 puntos; márgenes de 3 cm en el borde superior, 2 cm en el inferior y 2,5 cm en las márgenes laterales.
- Las notas de pie de página deben estar escritas con letra Arial recta de 8 puntos y se deben justificar al margen izquierdo, en la parte inferior de la página.
- El título del artículo debe hacer referencia al contenido de una forma clara y concisa, escrito en Arial recta (excepto los nombres científicos) 11 puntos, en mayúscula, centrado y en negrilla; no debe exceder 15 palabras: si ello no es posible, deberá incluir un subtítulo luego de dos puntos. Debe incluir las traducciones inmediatamente después del idioma original, lo cual aplica para los resúmenes y las palabras clave.
- La información del autor (es) debe ir debajo del título a dos interlíneas, en mayúscula e incluir primer y segundo nombre si lo tiene, primer apellido e inicial del segundo (si lo tiene y seguido de un punto), centrado. Los autores se nombran de acuerdo con la importancia de su contribución en la investigación o en la preparación del artículo, separados entre sí por comas y enumerados con superíndice. En nota de pie de página se indicarán el último título académico, la dependencia e institución a la cual pertenece y el correo electrónico institucional de quien se elija para el envío de correspondencia, todos ellos separados por un punto.

- El RESUMEN debe ser conciso, escrito en Español, Inglés (ABSTRACT) y Portugués (RESUMO), en un solo párrafo justificado sin exceder las 200 palabras. Incluirá la justificación, objetivos, metodología, resultados precisos y conclusiones de la investigación haciendo énfasis en los logros alcanzados, así como los límites de la validez y las implicaciones de los resultados. Los títulos RESUMEN, ABSTRACT y RESUMO deben ubicarse al margen izquierdo, en mayúscula y negrilla, iniciando la escritura luego de dos interlíneas.
- Debajo del resumen deben ir mínimo tres (3) y máximo cinco (5) palabras clave que no deben hacer parte del título del artículo; el título debe ir en mayúscula, negrilla, en Español (PALABRAS CLAVE), Inglés (KEYWORDS) y Portugués (PALAVRAS-CHAVE) seguido de dos puntos. La primera letra de cada palabra debe ir en mayúscula y las restantes en minúscula.
- Los cuadros y figuras deberán aparecer dentro del texto y procesarse como objetos (para facilitar la diagramación de la revista) con el programa que se desee y se sugiere enviarlas en blanco y negro o tonos de gris, evitando las policromías: si el texto incluye fotografías, se recomienda su presentación en blanco y negro o mate con buen contraste. El título de no debe superar una línea y va en la parte superior separado por una interlínea y debe incluir la palabra Cuadro o Figura seguido del número arábigo consecutivo, un punto y una breve descripción (Arial recta normal 9 sin negrilla). Se deben usar líneas horizontales y verticales para separar las entradas del cuadro y cada columna debe tener encabezado (en negrilla, con mayúscula inicial). El tamaño de fuente al interior de un cuadro es arial 9 puntos normal y, en el caso de necesitarse algún pie de cuadro/figura o fuente de consulta, debe estar escrito con letra Arial 8 puntos normal.
- Los títulos de segundo nivel se escriben con mayúscula inicial, con letra Arial recta 11 puntos y en negrilla, separados del texto por dos interlíneas. Los títulos de tercer nivel se escriben con mayúscula inicial con letra arial recta 11 puntos y punto seguido: el texto continua con el mismo renglón dejando un espacio después del punto.
- Las ecuaciones deben seguir un formato uniforme, justificarse al margen izquierdo y usar la expresión (Ec.2) con números arábigos consecutivos justificada al margen derecho, citándolas en el sitio oportuno. El significado de las variables y sus respectivas unidades deben aparecer luego de que se utilicen por primera vez.
- Las cantidades numéricas usarán la coma para separar decimales y el punto para unidades de mil.
- Las referencias deben citarse en el documento según el orden de aparición y encerradas entre corchetes [1,2]. En la sección de referencias, se enumeran cronológicamente y se detalla la información de cada una de ellas, así:

- Autor (es): se deben citar todos los autores, conservando entre ellos las conjunciones en el idioma original:  
VIDAL, F.A.  
VIDAL, F.A. y YAYA, A.  
VIDAL, F.A., YAYA, A. and SOTO, E.
- Título: después de un punto y se separa de éste por dos espacios. La primera letra del título se escribe con mayúscula, así como los nombres propios, de instituciones o en los casos que el idioma lo establezca.
- Subtítulo: después del título, separado de éste por dos puntos y un espacio para finalizar con punto.
- Nombre de la publicación: indicar el nombre completo de la revista o su abreviación siguiendo los parámetros internacionales, seguido de coma.
- Número de la edición: a continuación del punto del título o del subtítulo si lo hay, separado por dos espacios, se escribe con números arábigos seguido de la abreviatura ed.
- Pie de imprenta: después de dos espacios siguen el lugar de la publicación (seguido de dos puntos): nombre del editor o de la imprenta sino existe el editor (seguido de coma), año de publicación (seguido de coma) y número de páginas.
- Paginación: la paginación se escribe en números arábigos y debe incluir el número total de de páginas (89 p.) o las páginas consultadas (p. 34-35).
- Serie o colección: cuando el documento forma parte de una serie o colección la mención se coloca entre paréntesis, separada del título por un punto y dos espacios así: número del libro, folleto o informe dentro de la serie, en números arábigos precedido por la abreviatura no., escrita con minúsculas y separada del título por un espacio, punto y coma (;) y un espacio.

#### **Artículo de revista:**

ALIEN, J.S., SAMUELSON, R. and NEWBERGER, A. Chaos in a model offorced quasi-geostrophic flow over topography: an application of Melinkov's method. J. Fluid Mech., 2 (3), 1991, p. 511-547.

#### **Libro:**

BAKER, G.L. and GOLUB, J. Chaotic dynamics: an introduction. 4 ed. Madrid (España): Acribia, 1990, 450 p.

**Capítulo de libro:**

LEWIS, P. and STEVENS, J.G. En: Time Series Prediction. Modeling time series by using Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS). 1 ed. Madrid (Spain): Iberoamericana, 1994, p. 297-318.

**Memoria de congreso:**

ÁLZATE, N., BOTERO, T. y CORREA, D. El arte de la escritura de artículos. Memorias XIX Congreso Latinoamericano de Ponencias Científicas. Córdoba (Argentina): Tomo II, 2000, p. 219-228.

**Reporte de un organismo o Gobierno:**

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Decreto 4567: desarrollo rural bajo incertidumbre. Bogotá (Colombia): 1997, 57 p.

Tesis: JACOBS J. Regulación of life history strategies within individuals in predictable and unpredictable environments [Ph.D. Thesis Social Communication]. Seattle (United States): University of Washington, Faculty of Humanities, 1996, 345 p.

**Referencia de Internet:**

NOAA-CIRES. Climate Diagnostics Center. Advancing Understanding and Predictions of Climate Variability [online]. Available: <http://www.cdc.noaa.gov> [citado 8 de Agosto de 1998].

**Datos no publicados:**

MONTOYA, P. Datos no publicados

**Comunicación Personal:**

JUAREZ, F. Comunicación personal

**5. Suscripción**

Instrucciones para Suscribirse a la Revista (2 ediciones por año):

1. Con el número de cédula, solicitar a la dirección de la revista la generación del recibo según el concepto deseado. A vuelta de correo, se remitirá el formato para la cancelación respectiva y posterior devolución escaneada por vía electrónica.
2. Consignar \$ 35.000 por la suscripción anual o \$ 20.000 por cada edición, en efectivo en la cuenta No. 520-366725 del Banco de Bogotá a nombre de la Universidad del Cauca.

Descargar Cupón de Suscripción

## **6. Publicación artículos**

Instrucciones para publicar en la Revista:

1. Enviar el artículo a consideración teniendo en cuenta la normativa sugerida.
2. Una vez sometido a evaluación y aprobado el artículo, se enviará el formato de autores a diligenciar.
3. Se generará el recibo (tal como en el ítem 5.1) con el valor a cancelar en la Cuenta de ahorros del Banco Popular No. 290-72027-5 o Cuenta de Ahorros del Banco de Bogotá No.520-36672-5 por valor de \$150.000 por cada artículo.
4. Enviar escaneado el recibo a el correo electrónico [biotecnofaca@unicauca.edu.co](mailto:biotecnofaca@unicauca.edu.co) o [biotecnofaca2009@gmail.com](mailto:biotecnofaca2009@gmail.com).

# Anexo C

## CONSTANCIA DE ENVIO REVISTA VITAE





The screenshot shows the submission interface for the journal Vitae. The page is titled "CONSTANCIA DE ENVIO REVISTA VITAE". The header includes the journal logo and the text "Una universidad investigadora, innovadora y humanista al servicio de las regiones y el país". The navigation menu includes Home, About the journal, Current Issue, Browse Issues, and Submission & Review. The main content area is divided into several sections:





- Editorial Board**: Scientific Board, User Home, Authors Forms and guidelines, Browse Issues, Search.
- USUARIO/A**: Su identificación actual es..., ledominguezm, Mis Revistas, Mi Perfil, Salir.
- LANGUAGE/IDIOMA**: English, Spanish.
- FOLLOW ME ON twitter**
- Facebook**: Siguenos en facebook.
- INFORMACIÓN**: Para lectoras/es, Para autoras/es, Para bibliotecarias/os.
- Envío**: Resumen, REVISIÓN, EDITAR. Autores: lady elizabeth dominguez marin. Título: MARI GOLD (Calendula officinalis L.) POTENTIAL INGREDIENT IN THE FOOD INDUSTRY. Fecha de envío: mayo 30, 2011 - 10:25. Sección: Editor/a: Alejandra del Río B., Mérida Zapata. Estado: En cola para revisión. Iniciado: 2011-05-30. Última modificación: 2012-01-23.
- Envío de metadatos**: EDITAR METADATOS. AUTORES: Nombre: lady elizabeth dominguez marin, Filiación: Universidad Nacional de Colombia, País: Colombia, Resumen biográfico: —, Contacto principal para correspondencia editorial.
- TÍTULO Y RESUMEN**: Título: MARI GOLD (Calendula officinalis L.) POTENTIAL INGREDIENT IN THE FOOD INDUSTRY. Resumen: Marigold (Calendula officinalis L.) has a good many functional properties in the food industry due to its chemical composition. Among its main compounds are antioxidants (carotenes, flavonoids and phenolic compounds). The use of natural antioxidants prevents or reduces the development of degenerative diseases and both the formation of colors and unpleasant odors in the foods due to the lipid peroxidation. Among the identified antioxidants in the marigold are: flavoxantin, luteoxantin,  $\beta$ -carotene, lycopene,  $\alpha$ -carotene, rutinósido, the development of degenerative diseases and both the formation of colors and unpleasant odors in the foods due to the lipid peroxidation. Among the identified antioxidants in the marigold are: flavoxantin, luteoxantin,  $\beta$ -carotene, lycopene,  $\alpha$ -carotene, rutinósido, isorhamnetin, narcisin. Additionally, this flower shows other important compounds such as essential oils, lutein, lutein esters, xanthophylls, triterpen alcohols, phenolic acids, tannins, among others. The essential oils of marigold have antibacterial activity against the Gram-negative bacteria Escherichia coli and antifungal especially against Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis and pathogens and toxigenic fungus strains. Moreover, the marigold has photostabilizer activity that can be used in the stabilization of the food color, as well as in the food industry as a natural replacement of synthetics additives. This review shows the most important aspects of marigold flowers, their chemical composition, properties, antioxidant activity and antibacterial and antifungicide activity.
- INDEXACIÓN**: Palabras clave: Marigold (Calendula officinalis L.); carotenoid; flavonoids; antioxidant activity; antibacterial and antifungicide activity; photoprotection. Idioma: en.
- AGENCIAS DE PATROCINIO**: Agencias: Universidad Nacional de Colombia.


Facultad de Química Farmacéutica, Edificio de Extensión C1 70 No. 52-62 Piso 3 Oficina 303 / Teléfono (+57 4219 9470 - Skype: revista.vitae Correo electrónico: revistavitae@gmail.com - vitae.udea.edu.co / Medellín - Colombia

# Anexo D

## CONSTANCIA DE ENVIO REVISTA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Envió de artículos  **Recibidos** x   

 **Lady Elizabeth Dominguez Marin**  22:00 (hace 11 horas) ☆  

para biotecnofaca 


Señores  
Revista Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial


Muy buenas noches, adjunto 3 artículos que deseo publicar en la revista, con las respectivas cartas de declaración de originalidad, estos artículos corresponden a la realización de mi tesis de maestría.


Quedo atenta a los comentarios y a cualquier solicitud de documentación.

Cordial saludo  
Elizabeth Dominguez  
Universidad Nacional de Colombia  
Sede Bogotá

---


**6 archivos adjuntos** — [Descargar todos los archivos adjuntos](#) (comprimido para Español )


 **Carta declaracion ANÁLISIS QUÍMICO DE LA FLOR DE CALÉNDULA (Calendula officinalis L.).doc**  
28 kb [Ver](#) [Descargar](#)


 **ANÁLISIS QUÍMICO DE LA FLOR DE CALÉNDULA (Calendula officinalis L.).doc**  
372 kb [Ver](#) [Descargar](#)


---

**Carta declaracion GENERALIDADES SOBRE LA FRUTA Y PULPA DE ARAZÁ**

 **(Eugenia stipitata).doc**  
28 kb [Ver](#) [Descargar](#)

 **GENERALIDADES SOBRE LA FRUTA Y PULPA DE ARAZÁ (Eugenia stipitata).doc**  
666 kb [Ver](#) [Descargar](#)

 **Carta declaracion EVALUACION DEL EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA COMO ANTIOXIDANTE Y CONSERVANTE EN PULPA DE ARAZA.doc**  
28 kb [Ver](#) [Descargar](#)

 **EVALUACION DEL EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA COMO ANTIOXIDANTE Y CONSERVANTE EN PULPA DE ARAZA.doc**  
369 kb [Ver](#) [Descargar](#)