



AMIBA

ASOCIACIÓN MEXICANA DE
INGENIERÍA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

RIIT Científica
Bimestre
Vol. 10, No. 60
Enero-Febrero 2023



La revista **RIIT** comparte
algunos de los trabajos presentados en el
**3er Congreso Nacional de
Ingeniería y Biotecnología de Alimentos | 2021**

Evaluación de propiedades fisicoquímicas, bioactivas y sensoriales en la obtención del ajo negro (*Allium sativum* L.)

Martínez-Castillo, J.I., Camarena-Beltrán, P.F., Loza-Ornelas, N., Baltazar-Vera J.C., Díaz-Cervantes E., Abraham-Juárez, M.R.



Extracción asistida por ultrasonido/microonda y evaluación de las propiedades funcionales de compuestos bioactivos de cáscara de granada (*Punica granatum* L.)

Valero-Mendoza, A.G., Meléndez-Rentería, N.P., Chávez-González, M.L., Flores-Gallegos, A.C., Govea-Salas, M., Wong-Paz, J.E., Zugasti-Cruz, A., Ascacio-Valdés, J.A.



Antioxidant effect of polyphenols extracted from pomegranate peel on vegetable oil/ethylcellulose-based oleogels

Álvarez-Díaz, N.G., Michel-Michel, M.R., Aguilar-Zárate, P., Ascacio-Valdés, J.A., Wong-Paz J.E., Muñiz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, M.



Extracción y caracterización parcial de polifenoles de cáscara, semilla y cotiledón de mango Ataulfo

González-Sosa, A., Martínez-Ávila, G.C.G., Medina-Herrera, N., Tafolla-Arellano, J.C., Rojas, R.



Caracterización fisicoquímica de un polvo de *Ardisia compressa* Kunth usado para elaborar productos de panificación

Vargas-Santos, R.L., Hilario-Medina, S., Torres-Rodríguez, A., Vázquez-Sánchez, A.Y.

Cintillo Legal

RIIT REVISTA INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA, Vol. 10, No. 60. Enero - Febrero 2023, es una publicación bimestral editada y publicada por Universidad Autónoma de Coahuila, boulevard Venustiano Carranza s/n colonia República Oriente, C.P. 25280, Saltillo, Coahuila, Tel. (844) 414 85 82, <https://riit.com.mx/>, correo electrónico: publicacionesriit@uadec.edu.mx. Editor responsable: Dra. Antonia Mtz. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-021512364600-102, ISSN: 2007-9753, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Departamento de Divulgación y Comunicación Digital de la Dirección de Investigación y Posgrado de la UAdeC, Q.F.B. Fernando García, Edificio "D" planta alta, unidad Camporredondo, Saltillo, Coahuila, C.P. 25280, Tel. (844) 414 85 82, fecha de última modificación: 01 Enero 2023.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de Universidad Autónoma de Coahuila.

Tabla de Contenido

Título artículo/ Autores	Páginas
Evaluación de propiedades fisicoquímicas, bioactivas y sensoriales en la obtención del ajo negro (<i>Allium sativum</i> L.) Martínez-Castillo, J.I., Camarena-Beltrán, P.F., Loza-Ornelas, N., Baltazar-Vera J.C., Díaz-Cervantes E., Abraham-Juárez, M.R.	1 – 8
Extracción asistida por ultrasonido/microonda y evaluación de las propiedades funcionales de compuestos bioactivos de cáscara de granada (<i>Punica granatum</i> L.) Valero-Mendoza, A.G., Meléndez-Rentería, N.P., Chávez-González, M.L., Flores-Gallegos, A.C., Govea-Salas, M., Wong-Paz, J.E., Zugasti-Cruz, A., Ascacio-Valdés, J.A.	9 - 30
Efecto antioxidante de polifenoles extraídos de cáscara de granada sobre oleogeles a base de aceite vegetal y etilcelulosa Álvarez-Díaz, N.G., Michel-Michel, M.R., Aguilar-Zárate, P., Ascacio-Valdés, J.A., Wong-Paz, J.E., Muñiz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, M.	31 - 48
Extracción y caracterización parcial de polifenoles de cáscara, semilla y cotiledón de mango Ataulfo González-Sosa, A., Martínez-Ávila, G.C.G., Medina-Herrera, N., Tafolla-Arellano, J.C., Rojas-Molina, R.	49 - 59
Caracterización fisicoquímica de un polvo de <i>Ardisia compressa</i> Kunth usado para elaborar productos de panificación Vargas-Santos, R.L., Hilario-Medina, S., Torres-Rodríguez, A., Vázquez-Sánchez, A.Y.	60 - 70



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Evaluación de propiedades fisicoquímicas, bioactivas y sensoriales en la obtención del ajo negro (*Allium sativum* L.)

Evaluation of physicochemical, bioactive, and sensory properties in the production of black garlic (*Allium sativum* L.)

Martínez-Castillo, J.I.¹, Camarena-Beltrán, P.F.², Loza-Ornelas, N.², Baltazar-Vera J.C.³, Díaz-Cervantes E.⁴
Abraham-Juárez, M.R.^{2*}

¹ Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. CP: 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

² Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. CP: 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

³ Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. CP: 36020, Guanajuato, Guanajuato, México.

⁴ Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Universidad de Guanajuato. CP: 37973, Tierra Blanca, Guanajuato, México.

ji.martinezcastillo@ugto.mx; pf.camarenabeltran@ugto.mx; n.lozaornelas@ugto.mx; jc.baltazarvera@ugto.mx; e.diaz@ugto.mx; * mabraham@ugto.mx

Innovación tecnológica: El presente artículo de investigación tiene como finalidad estandarizar y evaluar el proceso de obtención del ajo negro, un producto el cual es de reciente novedad dentro de los alimentos nutraceuticos por los múltiples beneficios que puede proporcionar su consumo a la salud humana.

Área de aplicación: Tecnología de alimentos.

Recibido: 02 junio 2022

Aceptado: 12 noviembre 2022

Abstract

Currently the health benefits provided by the consumption of garlic are known, however, there is a part of the population that dislikes its consumption mainly due to digestive and taste discomfort. In this sense, postharvest processes have been designed in garlic to modify its undesirable sensory properties and provide benefit value; such is the case of the production of black garlic (AN). The objective was to standardize AN production in the Chonajos company, and to evaluate its physicochemical properties, phenolic compounds, and sensory acceptance. Three different temperature curves were evaluated to obtain AN. Through a sensory test, temperature curve No 2

was chosen, which showed the greatest acceptability in the panelists and was used as the AN standardization process. During standardization process, the content of Total Soluble Solids (TSS), pH, color, and Total Phenolic Compounds (CFT) were evaluated. The results of the standardization of the AN obtaining process provide 8.49 ± 0.27 mEAG/g BS of CFT, with 51.56° Brix of SST, and pH of 3.44; In addition, the AN acquired the characteristic color of the product, and therefore a decrease in the CIEL*a*b* parameters respect to AF. As for the sensory analysis, a sweet taste and creamy texture were described in AN compared to fresh garlic (AF). It is concluded that the AN standardization process allows obtaining a product with better nutraceutical qualities and greater sensory acceptability respect to AF.

Key words: sensory acceptability; fermented garlic; black garlic; phenolic compounds.

Resumen

Actualmente se conocen los beneficios a la salud que proporciona el consumo de ajo, sin embargo, existe una parte de la población a la que le disgusta su consumo por las molestias digestivas y gustativas principalmente. En este sentido, se han diseñado procesos postcosecha en el ajo con el fin de modificar sus propiedades sensoriales indeseables y proporcionar valor agregado; tal es el caso de la producción de ajo negro (AN). El objetivo fue estandarizar la obtención del AN en la empresa Chonajos, y evaluar sus propiedades fisicoquímicas, compuestos fenólicos y aceptación sensorial. Se evaluaron tres diferentes curvas de temperatura para la obtención del AN. Mediante una prueba sensorial se eligió la curva de temperatura No 2, que mostró la mayor aceptabilidad en los panelistas y que se utilizó como proceso de estandarización del AN. Durante el proceso de estandarización se evaluó el contenido de Sólidos Soluble Totales (SST), pH, color, y Compuestos Fenólicos Totales (CFT). Los resultados de la estandarización del proceso de obtención del AN le proporcionan 8.49 ± 0.27 mEAG/g BS de CFT, con a 51.56° Brix de SST, y pH de 3.44; además que el AN adquirió el color característico del producto, y por tanto una disminución en los parámetros CIEL*a*b* con respecto al AF. En cuanto al análisis sensorial se describió un sabor dulce y textura cremosa en el AN con respecto al ajo fresco (AF). Se concluye que el proceso de estandarización de AN permite obtener un producto con mejores cualidades nutraceuticas y mayor aceptabilidad sensorial con respecto al AF.

Palabras clave: aceptabilidad sensorial; ajo fermentado; ajo negro; compuestos fenólicos.

I. Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) es una raíz bulbosa usada principalmente en gastronomía por sus virtudes culinarias, aunque también posee cualidades farmacéuticas [1]. Dentro de estas últimas se han reportado sus propiedades como desintoxicante para el organismo, para combatir infecciones, y para estimular el

sistema inmune [2,3]; no obstante, pese a los beneficios que aporta el ajo a la salud, existe una parte de la población a la que le disgusta su consumo debido a que puede ocasionar molestias digestivas [4] y por sus características organolépticas indeseables [5]. En este sentido, se han diseñado procesos postcosecha en el ajo con el fin de modificar

y/o enmascarar sus propiedades sensoriales indeseables y proporcionar valor nutracéutico; tal es el caso del proceso de obtención de ajo negro (AN) [6].

El AN es un producto elaborado a partir del ajo fresco (AF) que conlleva al oscurecimiento del bulbo, y que es producido mediante un proceso tecnológico a temperatura y humedad controlada durante un período prolongado de tiempo [7]. A este proceso se le ha llamado erróneamente “fermentación del AF”, sin embargo, la reacción que realmente sucede es un pardeamiento no enzimático (o reacción de Maillard) en donde ocurren un conjunto de reacciones químicas entre los azúcares y las proteínas del ajo que transforman numerosos compuestos del AF en toda una nueva gama de compuestos diferentes [5], los cuales confieren propiedades nutracéuticas, y características sensoriales únicas.

Entre los compuestos desarrollados en el AN que confieren poseen valor nutracéutico se han reportado polifenoles y algunos compuestos intermediarios de la reacción de Maillard, entre los que destacan la S-alil-L-cisteína, el piruvato, y el tiosulfato [7,8]. Se ha reportado que dichos compuestos, principalmente confieren a este producto actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, así como efecto inmunomodulador [9,10]; en este sentido, se ha reportado que el consumo del AN puede ayudar a controlar a combatir el cáncer y reforzar el sistema inmune [11], solo por mencionar algunos beneficios. Además, los compuestos derivados de la caramelización de los azúcares del AF confieren el color oscuro al AN, y otorgan características sensoriales para desarrollar el perfil de sabor complejo (sabor suave y dulzón que oscila entre el regaliz y el chocolate) que caracteriza a este producto [5].

Pese a la mejora de propiedades organolépticas y adición de valor agregado que proporciona la producción de AN con respecto al AF, actualmente la difusión y conocimiento sobre el AN es escasa entre la población. Además, durante la producción del AN existen limitaciones que ocasionan que algunas características y beneficios del producto final puedan variar por influencia de inestabilidad en la temperatura, humedad y tiempo [7], cuando no existe un estricto control durante su proceso de producción.

Durante el proceso de producción de AN se ha reportado el uso de temperaturas (40 a 90 °C) y humedad relativa (60-90 %) variantes, mientras que el tiempo de producción estará en función de la temperatura, y puede ir desde 10 a 40 días dependiendo la intensidad con que ocurran las reacciones en el ajo [12,13]. Existen reportes en donde temperaturas altas (~90 °C) provocan que el periodo de obtención del AN sea más corto, pero una consecuencia adversa es el sabor amargo tan prominente en comparación con una temperatura de 60 °C (temperatura baja); sin embargo, la desventaja de esta última es que no adquiere el color oscuro deseado, por lo tanto, tampoco sería una temperatura óptima para el proceso de obtención de AN [5].

Por lo anterior, el presente trabajo de investigación se realizó en colaboración con la empresa Chonajos, con el objetivo de optimizar y estandarizar su proceso de producción de AN, monitoreando e inspeccionando cada parte del proceso fundamentado en la reacción de Maillard que ocurre. Para esto se evaluaron los distintos parámetros de temperatura, humedad, color, SST y pH, involucrados en el proceso.

II. Materiales y equipos

Reactivos: Se utilizó como materia prima de análisis ajo fresco (AF) (*Allium sativum* L. tipo chino), proporcionado por la empresa

Comercializadora y exportadora Chonajos S. De R.L. De C.V. ubicada en Juventino Rosas, Gto. Todos los reactivos fueron de grado analítico: alcohol metílico (Karal, México), agua destilada (Karal, México), carbonato de sodio anhidro (Karal, México), fenol de Folin & Ciocalteu's (Sigma-Aldrich, EUA).

Equipos: Para la obtención del AN se usó un horno de secado MMM Group (Venticell VC111). Para los análisis fisicoquímicos se usó un colorímetro HunterLab (tipo espectrofotómetro ColorFlex EZ), un refractómetro Hanna Instruments (HI96801), y un potenciómetro ThermoScientific (Orion Star A24). Para la medición de los compuestos bioactivos se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible ThermoScientific (Genesys 10S).

III. Métodos experimentales

Para la obtención del ajo negro (AN) a partir del AF se evaluaron 3 diferentes rampas de temperaturas iniciales (ver Tabla 1) en 3

diferentes curvas de secado; este parámetro interfiere directamente en la obtención del AN, ya que se ha reportado que altas temperaturas provocan un proceso de obtención más corto, mientras que temperaturas bajas ocurre lo contrario [5]. Las temperaturas se manipularon manualmente con respecto a la humedad del ajo durante el periodo de secado y obtención del AN, el cual se estandarizó durante 30 días, teniendo para las 3 curvas una temperatura final de 20 °C. Se realizaron 3 réplicas del proceso para cada curva de secado, y se utilizó un análisis sensorial usando una prueba afectiva de aceptabilidad con escala hedónica de 9 puntos (realizada a 20 panelistas), con la cual se eligió la rampa de temperatura inicial que permitió obtener un AN con la aceptación deseada por los panelistas. Una vez seleccionado la rampa de temperatura inicial de secado para la obtención del AN, se utilizó dicho ajo para realizar análisis fisicoquímicos, de compuestos bioactivos, y características sensoriales con respecto al AF.

Tabla 1. Curvas de temperatura de secado para obtención de AN.

Curva	Temperatura inicial	Rampa de temperatura inicial	Temperatura final	% Aceptabilidad (prueba sensorial)
1	45 °C	70 °C	20 °C	6.90
2		75 °C		7.25
3		60 °C		8.00

El proceso de obtención de AN en cada curva de secado fue de 30 días.

La rampa inicial de temperatura de la curva de secado que fue seleccionada se consideró como base para el proceso de estandarización del AN. Los análisis fisicoquímicos que se evaluaron en el AN obtenido de dicho proceso fueron el contenido de Sólidos Solubles Totales (SST) usando un refractómetro y expresando los resultados en °Brix, el pH mediante el uso de un potenciómetro, la humedad (diferencia de peso), y el color (modelo CIEL*a*b*). Entre los compuestos bioactivos evaluados están el Contenido de Fenoles Totales (CFT), los cuales se determinaron mediante

espectrofotometría usando la técnica de Folin-Ciocalteu [14] a partir de un extracto hidro alcohólico (metanol al 80%) en proporción 1:10 (p/v). Para la evaluación sensorial del AN se realizó una prueba afectiva de características sensoriales, evaluando el color, olor y sabor (dulzor).

Todos los análisis se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron con valores de media y desviación estándar (media $\pm$ DS). Las diferencias significativas se determinaron mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) simple mediante la prueba de

comparaciones de Tukey a un nivel de significancia de $p < 0,05$ utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I.

IV. Resultados y Discusión

La prueba de aceptabilidad que evaluó el proceso de obtención del AN a 3 diferentes rampas de temperaturas iniciales de secado, permitió elegir la curva con una rampa de temperatura inicial de 45 a 60 °C (curva 3), la cual tuvo una aceptabilidad general entre los panelistas del 8.0% (ver Tabla 1), probablemente las curvas 1 (45 a 70 °C) y 2 (45 a 75 °C) tuvieron una menor aceptabilidad debido a sabores amargos que se originan en la obtención del AN a temperaturas elevadas, tal y como lo describe Toledano *et al.* (2017) [5]. Dicha curva se consideró para la estandarización de la obtención del AN durante un periodo de 30 días a una temperatura final de 20 °C. Además, al AN obtenido de la curva de secado elegida se realizó una prueba sensorial para evaluar las características de color, olor y sabor (dulzor); en donde en los resultados describen cualitativamente, en >50% de las evaluaciones, al AN como un producto con sabor dulce y una textura más cremosa con respecto al AF. Además, los panelistas describen que el olor característico que tiene el AF fue menos intenso en el AN, incluso algunas descripciones mencionan un olor mucho más agradable. Esto se debe a que durante el proceso de producción del AN el compuesto precursor del olor y sabor del AF (S-Alil-cisteina-sulfóxido o aliina) no produce alicina, ácido pirúvico y amoníaco (característicos del olor), como ocurre normalmente, sino que se transforma en otros compuestos menos volátiles que disminuyen

la presencia del olor y sabor pungente del AF [5].

Las características de color AN que se obtuvieron durante el proceso de estandarización muestran un pardeamiento no enzimático con respecto al AF, los cuales se ven reflejados en los parámetros de color del modelo cromático CIEL*a*b*. En la Figura 1 se observa el comportamiento de cada uno de los parámetros de dicho modelo, y se observa que el parámetro a* (tonalidad verde (-) y (+) tonalidad rojo) fue el único que presentó un comportamiento estable durante el proceso de obtención del AF (-0.69 ± 0.09) al AN (1.12 ± 0.14) con solo una diferencia de 0.43 entre ambos ajos; esto debido probablemente a que la gama de colores que indica el parámetro a manera bidimensional no se ve afectada al obtener el AN. Sin embargo, otros parámetros como la luminosidad y el parámetro b* si están relacionados con el cambio de color que ocurre en la obtención del AN; en este sentido, se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la luminosidad superficial del AF ($L^* = 64.05 \pm 0.21$) hasta la obtención del AN ($L^* = 0.21 \pm 0.03$), la cual es producto de la reacción de Maillard, dicha reacción se ha reportado por Andreo-Martínez *et al.* (2021) [7] como la reacción responsable del típico color oscuro/negro del AN. Así mismo, el parámetro b* (tonalidad azul (-) y (+) tonalidad amarillo) tiende a disminuir de 34.13 ± 0.07 en el AF a 0.36 ± 0.06 en el AN, indicando que la tonalidad de color amarillo paja que caracteriza al AF se va perdiendo durante las reacciones de caramelización ocurridas; las cuales proporcionan el color café marrón oscuro/negro característico del AN, este color es similar a lo descrito por Cuzco & Ortiz (2019) [12].

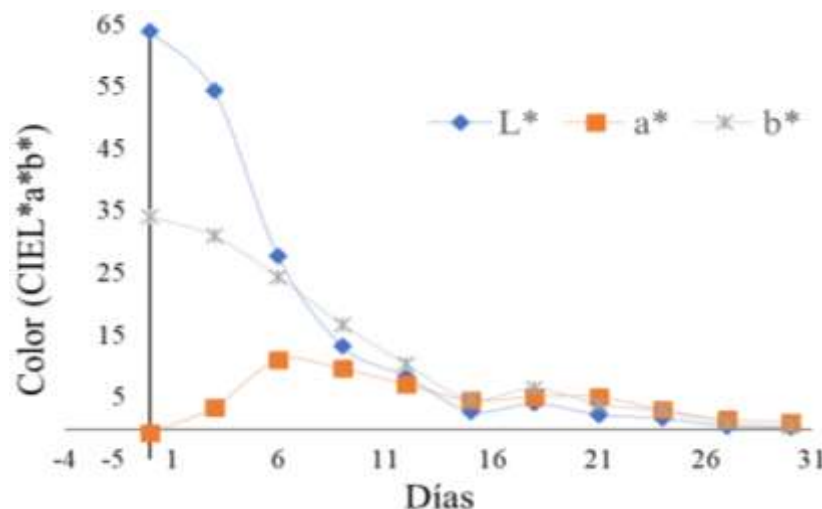


Figura 1. Comportamiento de color con los parámetros CIELab durante la estandarización del AN.
 L^* = luminosidad (0=negro, 100=blanco), a^* = tonalidad (-)verde-rojo(+), b^* = tonalidad (-)azul-amarillo(+).

Otras características fisicoquímicas del AN como los SST se observan en la Figura 2A, en donde los SST fueron en incremento significativamente ($p < 0.05$) a lo largo del tiempo, teniendo 33.1° Brix en el AF y 51.56° Brix en el AN, esto debido a la concentración de SST que ocurre por la pérdida de agua durante el proceso de secado [7], de hecho, la humedad que se reportó para el AN fue de $53.18 \pm 0.39\%$. Mientras que el pH (Figura 2B), varió con el tiempo tendiendo a la baja de manera significativa ($p < 0.05$) de 6.07 en el AF a 3.44 en el término del proceso de obtención del AN. Dicha disminución del pH en el AN concuerda con los resultados reportados por Toledano *et al.* (2017) [5]; en donde mencionan que la reacción de Maillard se favorece en el AF por su pH neutro-alcálico, pero al tener un AN el pH desciende y por lo tanto se detiene dicha reacción; además, el pH bajo en el AN es favorable para evitar el crecimiento microbiano.

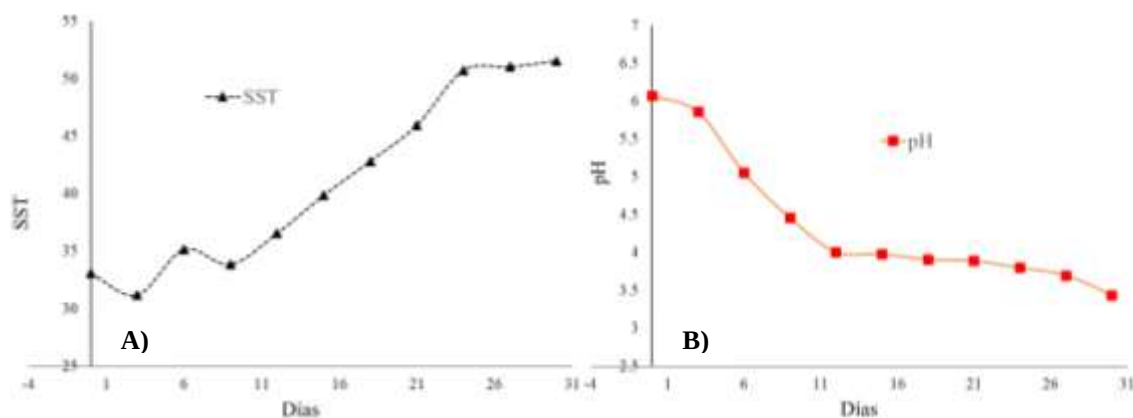


Figura 2. Comportamiento de parámetros fisicoquímicos durante la estandarización del AN.
 A) SST= Sólidos Solubles Totales, B) pH.

Los compuestos bioactivos evaluados a partir del Contenido de Fenoles Totales (CFT) se incrementaron en el AN, siendo de 8.49 ± 0.27 mEAG/g BS en este tipo de ajo; mientras que un AF tiene aproximadamente 0.84 ± 0.06 mEAG/g BS. Este incremento probablemente

se debe a que algunos biocompuestos, como los CFT, pueden estar más biodisponibles en el AN que presenta pH ácido, ya que este pH puede ser favorable para la liberación de compuestos bioactivos contenidos en matrices vegetales-alimentarias, por lo que

puede existir una relación entre el pH bajo y el mayor contenido de CFT en el AN; además, existe la producción de CFT durante las reacciones de caramelización y de Maillard que ocurren en la obtención del AN [7]. El incremento de CFT en el AN ya se ha reportado con anterioridad en otros trabajos [5], y se debe a que a partir de la oxidación química de los fenoles aparecen un grupo importante de ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales proporcionan valor agregado a este producto, e incluso puede considerarse un superalimento o alimento nutraceutico.

V. Conclusiones

Durante el proceso de obtención del AN se concluye que las variaciones de temperatura inicial pueden interferir con las características sensoriales del AN, y por consiguiente con la aceptación general del producto, tal y como se observó con los resultados de la prueba afectiva de aceptabilidad. Por lo que es necesario considerar el control de la variable temperatura y sus variaciones para futuros procesos de obtención del AN.

En cuanto a las propiedades del AN, los ensayos permiten concluir que el AN difiere principalmente del AF en sus características fisicoquímicas, esto con un color más aceptable, pH más bajo y SST más altos. Al mismo tiempo, el AN se puede considerar un producto nutraceutico con respecto al AF, esto debido a la mayor concentración de CFT que se obtienen del proceso. Además, las características sensoriales de AF se mejoran considerablemente en la obtención del AN, por lo que el proceso de estandarización seleccionado del AN permite obtener un producto con características sensoriales y fisicoquímicas mejoradas y con valor agregado.

VI. Agradecimientos

A la empresa Chonajos por su apoyo para realizar el proyecto.

VII. Referencias

1. Alpizar Martínez, V.L., Mariezcurrena Berasain, M.A., Arzate Serrano, D., & Vega Castillo, L.F. (2020). “Estudio comparativo *in vitro* de la inhibición bacteriana del ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*) y ajo negro (*Allium sativum*) sobre *Escherichia coli* ATCC® 25922”. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista. *Universidad Autónoma del Estado de México*, 1-46. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/109930>
2. White, D. (2021). “Healthy Uses for Garlic”. *Nursing Clinics of North America*, 56(1), 153-156. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.12.001>
3. Tsai, C. W., Chen, H. W., Sheen, L. Y., & Lii, C. K. (2012). “Garlic: Health benefits and actions”. *BioMedicine*, 2(1), 17-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomed.2011.12.002>
4. Maza, M. G., Ibañez, G. G., Hernández, J. C. M., & Dopico, A. C. (2017). “Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo”. *Revista cubana de medicina física y rehabilitación*, 6(1), 61-71.
5. Toledano Medina, M.A., Pérez Aparicio, J., & Moreno Rojas, R. (2017). “Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica, fisicoquímica del ajo negro”. Tesis doctoral. *Universidad de Córdoba UCOPress*. 1-141. <http://hdl.handle.net/10396/15111>
6. Estalles, M.M. (2020). Tesis: “Bases para la elaboración de protocolos para la obtención de ajo negro con cultivares INTA de ajo (*Allium sativum*), y

- caracterización organoléptica, físico-química y nutracéutica”. *Universidad Nacional de Cuyo*, Argentina.
7. Andreo-Martínez, P., García-Martínez, N., & Navarro-González, I. (2021). “Efectos de la ingesta de ajo negro en el cerebro: Una revisión sistemática”. *Revista de Discapacidad, Clínica y Neurociencias*. ISSN 2341-2526. Vol. 8, Núm. 1. pp. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.14198/DCN.19486>
 8. Aires da Silva, D., Moreira Ferreira, J., Moreira Lima, B., Figueiredo Viana, L.B., Melo Aires, G.C. (2021). “Evaluation of processing in phenolic compounds and antioxidante capacity in black garlic (*Allium sativum*)”. *Congreso Internacional de la Agroindustria “Inovação, Gestão e Sustentabilidade na Agroindustria”*. DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0267>
 9. Hue, C. T., Tan, L. Q., Van Hung, H., Le, Q. T. N., Nguyen, T. H., Huong, N. T. L., Ha, N.M & Trinh, D. K. (2022). “Assessment of the physicochemical properties and biological activity of Vietnamese single-bulb black garlic”. *Food Bioscience*, 101866.
 10. Wu, J., Jin, Y., & Zhang, M. (2021). “Evaluation on the physicochemical and digestive properties of melanoidin from black garlic and their antioxidant activities in vitro”. *Food chemistry*, 340, 127934.
 11. Kimura, S., Tung, Y.C., Pan, M.H., Su, N.W., Lai, Y.J., & Cheng, K.C. (2017). “Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application”. *Journal of Food and Drug Analysis*. Volume 25, Issue 1, pp 62-70. ISSN 1021-9498. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.003>.
 12. Cuzco Cusco, M.M. & Ortiz Rodas, P.E. (2019). “Obtención del ajo negro por reacción de Maillard para el desarrollo de productos culinarios y su aplicación en cocina innovadora”. *Universidad De Cuenca*, Ecuador. 1-160. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/33657>
 13. Ryu, J. H., & Kang, D. (2017). “Physicochemical properties, biological activity, health benefits, and general limitations of aged black garlic: A review”. *Molecules*, 22(6), 919. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22060919>
 14. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). “[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent”. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Extracción asistida por ultrasonido/microonda y evaluación de las propiedades funcionales de compuestos bioactivos de cáscara de granada (*Punica granatum* L.)

Ultrasound/Microwave assisted extraction and evaluation of functional properties of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.)

Valero-Mendoza, A.G.¹, Meléndez-Rentería, N.P.², Chávez-González, M.L.¹, Flores-Gallegos, A.C.¹, Govea-Salas, M.¹, Wong-Paz, J.E.³, Zugasti-Cruz, A.¹, Ascacio-Valdés, J.A.^{a*}

¹ Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioproductos. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila; C. P. 25280 Saltillo, Coahuila.

² Centro de Investigación y Conservación de la Biodiversidad y Ecología de Coahuila, Universidad Autónoma de Coahuila, C. P. 27640 Cuatro Ciénegas, Coahuila.

³ Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Ciudad Valles S.L.P. C. P. 79060 Cd. Valles, S.L.P.

a.valero@uadec.edu.mx; paola.melendez@uadec.edu.mx; monicachavez@uadec.edu.mx;
adrianaflores@uadec.edu.mx; m.govea.salas@uadec.edu.mx; jorge.wong@uaslp.mx;
alejandrozugasti@uadec.edu.mx; *albertoascaciovaldes@uadec.edu.mx

Innovación tecnológica: Uso de tecnologías verdes para obtención de compuestos bioactivos naturales.

Área de aplicación industrial: farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Recibido: 24 mayo 2022

Aceptado: 14 noviembre 2022

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a tropical and subtropical fruit native to Asia that has been researched in recent years due to the bioactive compounds it possesses. It is estimated that the pomegranate juice extraction processing industry produces approximately 1.9 million metric tons of pomegranate peel worldwide as agro-industrial waste since only the arils are used and the peel, which comprises about 50% of the total weight of the fruit, it is discarded. This residue can be used due to the higher content of the phenolic compounds, that has demonstrated high antioxidant capacity among other biological activities such as antimicrobial and antiviral.

In this work, emerging technologies such as microwave, ultrasound, and hybridization of both techniques were experimented with for the extraction of bioactive compounds from pomegranate

peel. The results show that extraction with hybrid technology yielded the highest polyphenolic content (377.77 mg GAE/g dried pomegranate peel). HPLC/MS/ESI analysis showed that punicalagin, punicalin, and ellagic acid are the major compounds present in the pomegranate peel. These compounds reveal positive results from the biological assays, namely the antioxidant activity evaluated by DPPH and ABTS assays, which showed a high antioxidant capacity with 79.31% and 100% respectively. As well as the antimicrobial activity with *E. coli* and *Salmonella* spp. with inhibition diameters of 8.40 mm and 4.18 mm. It also proved the influence on stimulating the growth of the bacterium *Lactobacillus brevis*. Finally, the phenolic compounds recovered from the pomegranate peel showed no activity as a result of the cell toxicity tests. Being all this set of results favorable and promising for the manufacture of products in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries.

Key words: Emerging technologies, biological activities, Industrial application.

Resumen

La granada (*Punica granatum* L.), es una fruta tropical y subtropical originaria de Asia que ha sido investigada en los últimos años, debido a los compuestos bioactivos que posee. Se estima que la industria del jugo de granada produce en todo el mundo aproximadamente 1.9 millones de toneladas métricas de cáscara de granada, como residuos agroindustriales, ya que sólo se utilizan los arilos y se deshecha la cáscara, que comprende alrededor del 50% del peso total de la fruta. Este residuo puede utilizarse, debido a que contiene una alta concentración de compuestos fenólicos, los cuales han demostrado poseer alta capacidad antioxidante, entre otras actividades biológicas tales como la antimicrobiana y la antiviral.

En este trabajo se experimentaron tecnologías emergentes como el microondas, el ultrasonido y la tecnología híbrida de ambas técnicas; en la extracción de compuestos bioactivos de la cáscara de granada. Los resultados muestran que la extracción con tecnología híbrida consiguió el mayor contenido polifenólico (377.77 mg GAE/g de cáscara seca de granada). El análisis HPLC/MS/ESI mostró que la punicalagina, la punicalina y el ácido elágico son los compuestos mayoritarios presentes en dicha cáscara. Estos compuestos obtuvieron resultados positivos en los ensayos biológicos, a saber, la actividad antioxidante evaluada por los ensayos de DPPH y ABTS mostraron un resultado favorecedor con un 79.31% y 100%, respectivamente, de capacidad antioxidante. La actividad antimicrobiana con *E. coli* y *Salmonella* spp. resultó con diámetros de inhibición de 8.40 y 4.18 mm. También demostró tener un efecto para el estímulo de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus brevis*. Para finalizar, los compuestos fenólicos recuperados de la cáscara de granada no mostraron actividad como resultado de los ensayos de toxicidad celular. Siendo todo este conjunto de resultados favorecedores y prometedores para la fabricación de productos en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Palabras clave: Tecnologías emergentes, Actividades biológicas, Aplicación industrial.

1. Introducción

La granada (*Punica granatum* L.), ha sido un cultivo utilizado por la humanidad desde la antigüedad y pertenece a la familia *Punicaceae*, que crece en regiones tropicales y subtropicales [1]. Es originaria de Irán, pero se cultiva principalmente en India, Túnez y Turquía [2,3]. La producción mundial de granada se estimó en 3.8 millones de toneladas métricas en 2017. Siendo India el mayor productor con 234.000 hectáreas y una producción de 2.84 millones de toneladas métricas [3]. En México, el granado se cultiva en los estados de Oaxaca, Morelos, Guanajuato e Hidalgo, que representan más del 50% de la producción de granada [4]. La granada se consume generalmente en fresco, sin embargo, su uso ha aumentado debido su delicioso sabor, ya que ha ganado la aceptación del consumidor, incrementando la producción de vinos, jaleas y mermeladas [5]. En consecuencia, la cantidad de subproductos de granada también se ha ido aumentando, dado que se estima que la industria del zumo de granada genera en todo el mundo aproximadamente 1.9 millones de toneladas métricas de cáscara de granada [3]. La porción comestible representa el 50% del peso total y el 50% restante correspondiente a la cáscara. Esto se convierte en una problemática medio ambiental, debido a que, al representar la mitad del fruto, se acumula como residuo, que podría tener aplicaciones para su mayor aprovechamiento. Estudios previos han demostrado que los residuos de frutas tienen importantes e incluso actividades biológicas, con alta efectividad. Un hallazgo que sirve como referencia, ha sido la semilla de uva. Se ha reportado de manera *in vitro* que las proantocianinas promueven la apoptosis de las células de cáncer de colon (a través de la vía mitocondrial) [6]. Los resultados de otro estudio demostraron que los subproductos de la industria frutícola son una fuente prometedora de aceite de semilla de sandía

(*Citrullus lanatus*), melón dulce (*Cucumis melo*), espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*), grosella roja (*Ribes rubrum*), granada (*Punica granatum*), membrillo japonés (*Chaenomeles japonica*), uva (*Vitis vinifera*), grosella espinosa (*Ribes uva-crispa*) y manzana (*Malus domestica*); dónde cada uno de los nueve aceites de semilla recuperados de diferentes especies de fruta, tenía una composición y concentración únicas de ácidos grasos, fitoesteroles y escualeno [7]. Esta información sirve de referencia a este trabajo para darle paso a los subproductos a nuevas aplicaciones. La cáscara de granada ha sido objeto de estudio demostrando que se puede usar en distintas aplicaciones. Este residuo contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos como los flavonoides (catequinas y antocianinas). Además, es rica en taninos hidrolizables, especialmente elagitaninos; isómeros de punicalagina, que son los polifenoles más comunes en esta fruta y constituyen hasta el 85% (p/p) de los taninos presentes en la cáscara de la granada [8,9]. Estas moléculas son reconocidas en la literatura por poseer un gran efecto terapéutico, por ejemplo, capacidad antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antiviral y anti-obesidad [10,11,12]. También se ha informado de que la cáscara de granada ejerce efectos antiproliferativos contra líneas celulares de cáncer de mama, colon e inhiben el crecimiento células de cáncer de próstata [13,14,15]. Otra actividad biológica estudiada de la cáscara de granada ha sido la actividad antimicrobiana. Los extractos de cáscara de granada se han estudiado como agentes eficaces para tratar o prevenir diferentes infecciones causadas por distintos patógenos como, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* [16,17].

Las tecnologías verdes tienen la finalidad de extraer compuestos fenólicos en un menor tiempo, y la utilización de menos solventes.

Los compuestos recuperados pueden ser aplicados ya sea en el área farmacéutica, cosmética o alimentaria. En el pasado, se utilizaban procesos de extracción convencionales, tales como la extracción con solventes, sin embargo, éstos poseen desventajas que afectan la calidad de los compuestos y elongan los tiempos de extracción. En la actualidad, se ha reportado el uso de extracciones verdes, tales como: extracción asistida por ultrasonido, microondas, y la tecnología híbrida de ultrasonido y microondas. La extracción asistida por ultrasonido (UAE) logra la extracción de fitoquímicos en menor tiempo, a baja temperatura, con menor requerimiento de energía y de solventes [18]. Las ondas de ultrasonido inducen la disrupción en el tejido vegetal, a través de las fuerzas físicas desarrolladas durante la cavitación acústica y ayudan a liberar los componentes extraíbles en el disolvente [19]. La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica de calentamiento sin contacto que ayuda a reducir el gradiente térmico y a acelerar la transferencia de energía. Las microondas pueden asociarse con los ultrasonidos, una combinación que puede actuar como una tecnología híbrida emergente denominada extracción asistida por ultrasonidos/microondas (U/M-AE). La U/M-AE, comparada con los métodos convencionales, tiene más ventajas, al reducir el tiempo de extracción, dar mayores rendimientos y consumir menor cantidad de solventes [20]. Esto da paso a las nuevas tecnologías, debido a las ventajas que ofrecen con respecto a los métodos convencionales, para procesos que aceleren la recuperación de moléculas con alta bioactividad.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue, extraer e identificar los compuestos presentes en la cáscara de granada mediante el uso de ultrasonidos, microondas y tecnologías emergentes híbridas, así como comparar la efectividad de extracción de estos tres

métodos. Además de caracterizar las propiedades funcionales de estos compuestos en términos de actividades antioxidante, prebiótica, antimicrobiana y anti hemolíticas para futuras aplicaciones en las industrias, alimentaria, farmacéutica y cosmética.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de la materia prima

Las granadas (*Punica granatum* L.) se obtuvieron de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Dichas granadas fueron lavadas y los arilos fueron separados de la cáscara. Las cáscaras se secaron a 50 °C durante 48 h dentro de una estufa de secado por flujo de aire laminar, para reducir el contenido de humedad. Posteriormente se molieron y tamizaron a un tamaño de partícula de 0,6-0,8 mm. Las muestras se empaquetaron en bolsas de plástico y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

2.2. Extracción de polifenoles

Los extractos se obtuvieron mediante tres tecnologías emergentes: MAE, UAE, y la tecnología híbrida de las tecnologías anteriores, para conservar un aspecto más ecológico y limpio en el proyecto. Las condiciones utilizadas para la extracción con las tres tecnologías fueron definidas previamente por el grupo de trabajo de Hernández-Hernández *et al.* [20]. En las tres extracciones se utilizó agua como disolvente con una relación masa/volumen de 1:16 (un litro de agua y 62.5 g de polvo de cáscara de granada). Para la EAU, el equipo se hizo funcionar a una frecuencia de 25 kHz durante 20 minutos. En el caso de la MAE, el equipo se operó a 2450 MHz y el tiempo de extracción fue de 5 min hasta alcanzar una temperatura objetivo de 70 °C, manteniendo así los compuestos polifenólicos intactos, ya que no se vieron afectados, debido al bajo tiempo de exposición a la alta temperatura. Los periodos prolongados de altas temperaturas pueden conducir a la

degradación y pérdida de rendimiento y calidad. Las extracciones del contenido polifenólico mediante la combinación de ultrasonidos y extracción asistida por microondas se realizaron con un sistema de tecnología híbrida, es decir, la estación de trabajo cooperativa de ultrasonidos/microondas (Nanjing ATPIO Instruments Manufacture Co., Ltd. Company, Nanjing, China). Para la extracción asistida por híbridos, se emplearon a la vez las mismas condiciones utilizadas para las extracciones asistidas por ultrasonidos y por microondas. Todos los extractos se filtraron por papel, se conservaron y se almacenaron con protección de luz hasta sus posteriores análisis.

2.3. Determinación del contenido total de polifenoles

El contenido de polifenoles condensados e hidrolizables en los extractos de cáscara de granada se cuantificó mediante los métodos de HCL-Butanol y Folin-Ciocalteu [21], respectivamente. El experimento se realizó por triplicado de cada tratamiento. Como estándares de referencia se utilizaron catequina (taninos condensados) y ácido gálico (taninos hidrolizables) en una curva de calibración para cada familia. El contenido total de polifenoles se obtuvo con la suma de polifenoles hidrolizables y condensados.

2.4. Separación y purificación parcial de las fracciones de polifenoles

La separación de las fracciones fenólicas de la cáscara de granada con Amberlite XAD-16 se preparó siguiendo la metodología definida por Ascacio-Valdés *et al.* [22]. Se utilizó la resina Amberlita XAD-16 en una columna de cromatografía. Los extractos polifenólicos se pasaron por la columna empleando agua destilada como eluyente. Posteriormente, se utilizó etanol para recuperar la fracción fenólica. La fracción fenólica obtenida se

sometió a una estufa a 50 °C para la recuperación de los compuestos en polvo.

2.5. Identificación por HPLC/ MS

La identificación de los compuestos fenólicos obtenidos del extracto de cáscara de granada se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con el método descrito por Hernández-Hernández *et al.* [20]. El polvo recuperado del extracto de cáscara de granada que contiene polifenoles se preparó en una solución de 2000 partes por millón (ppm). La solución se filtró usando membranas de nylon de 0.45 µm. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa en un sistema HPLC marca Varian, que incluía un automuestreador (ProStar 410, Varian, Palo Alto, CA, EE.UU.), una bomba ternaria (ProStar 230I, Varian, Palo Alto, CA, EE.UU.) y un detector PDA (Photo Diode Array, ProStar 330, Varian, Atlanta, GA, EE.UU.).

También se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica de cromatografía (Varian 500-MS I.T. Mass Spectrometer, Palo Alto, CA, USA) equipado con una fuente de iones de electrospray, acoplado al sistema HPLC. Las muestras (5 µl) se inyectaron en una columna Denali C18 preequilibrada (150 mm × 2.1 mm, 3 µm, Grace, Albany, OR, EE.UU.) y la temperatura del horno se mantuvo a 30 °C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2%, v/v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: 3% B de 0 a 5 min, 9% B lineal de 5 a 15 min, 16% B lineal de 15 a 45 min y 50% B lineal de 45 a 60 min. A continuación, se lavó y reacondicionó la columna. La velocidad de flujo se mantuvo en 0.2 mL/min, y la elución se monitorizó a 245, 280, 320 y 550 nm para los compuestos de interés. Todo el efluente (0.2 mL/min) se inyectó posteriormente en la fuente del espectrómetro de masas (MS) sin dividirlo.

Todos los experimentos de se llevaron a cabo en el modo negativo. Se utilizó nitrógeno [M-H] como gas nebulizador y helio como gas de amortiguación. Los parámetros de la fuente de iones fueron los siguientes 5,0 kV de tensión de nebulización, 90.0 V de tensión capilar y 350 °C de temperatura. Los datos se recogieron y procesaron con el software MS Workstation (V 6.9). Las muestras se analizaron en modo de barrido completo adquirido en el rango m/z 50-2000. Los análisis MS/MS se realizaron sobre una serie de iones precursores seleccionados. Posteriormente, los compuestos se compararon utilizando una base de datos de compuestos bioactivos (base de datos WorkStation versión 2.0, VARIAN, Palo Alto, CA, USA).

2.6. Actividad antioxidante anión radical 2,2-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺)

La actividad antioxidante total de los polifenoles recuperados de cáscara de granada se determinó mediante el ensayo ABTS⁺ de acuerdo con el método de Stämpfli, *et al.* [23] con ligeras modificaciones. Se formó ABTS⁺ mezclando solución madre de ABTS⁺ (7 mM) y persulfato de potasio (2.45 mM) en agua destilada y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12-16 h. El ensayo se realizó en celdilla de 2000 µl. La reacción se inició mezclando 100 µL de la solución de muestra o Trolox diluido con 900 µL de ABTS⁺ diluido (absorbancia 0.7 a 734 nm). La disminución de la absorbancia se midió a 734 nm después de 1 minuto de incubación de cada celda. El efecto de eliminación se expresó como porcentaje de actividad de eliminación de radicales con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ABTS} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

(Ec. 1)

2.7. Actividad antioxidante por 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

Para la actividad de eliminación de radicales DPPH, el método utilizado se basa en el método de Molyneux, [24] con algunas modificaciones. La solución de DPPH se preparó en metanol a una concentración de 60 mM. Se utilizó metanol como blanco de lectura. Se colocaron en una microplaca de 96 pocillos 7 µL de cada muestra y 193 µL de radical DPPH. Las muestras se taparon y se incubaron por 30 minutos protegidas de la luz. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm (espectrofotómetro de microplacas Epoch, Bio Tek, Winooski, VT, EE. UU.). El efecto de barrido de radicales DPPH se expresó, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\% \text{ DPPH} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

(Ec. 2)

2.8. Evaluación del efecto prebiótico

La estimulación del crecimiento de las bacterias probióticas por los compuestos fenólicos presentes en el extracto se evaluó como se llevó a cabo según la metodología de Estrada-Gil *et al.* [25]. Se utilizó la cepa bacteriana prebiótica *Lactobacillus brevis*. La cepa pertenece a la colección de cepas del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. Esta cepa bacteriana fue activada en medio de cultivo MRS e incubada a 37 °C durante 24 h. El día del experimento, el cultivo bacteriano en crecimiento exponencial fue diluido en solución salina estéril hasta una concentración final de 1.5×10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los experimentos se llevaron a cabo en caldo MRS sin glucosa y fue complementado con los polifenoles en polvo de cáscara de granada (PCG). Cada pocillo se inoculó con 4.17 µl de cada suspensión bacteriana (1.5 X

10^8 UFC/mL) y diluciones seriadas de (PCG) (31.25, 62.5, 125, 250, 500 1000 ppm). Las

placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Los tratamientos se hicieron por triplicado.

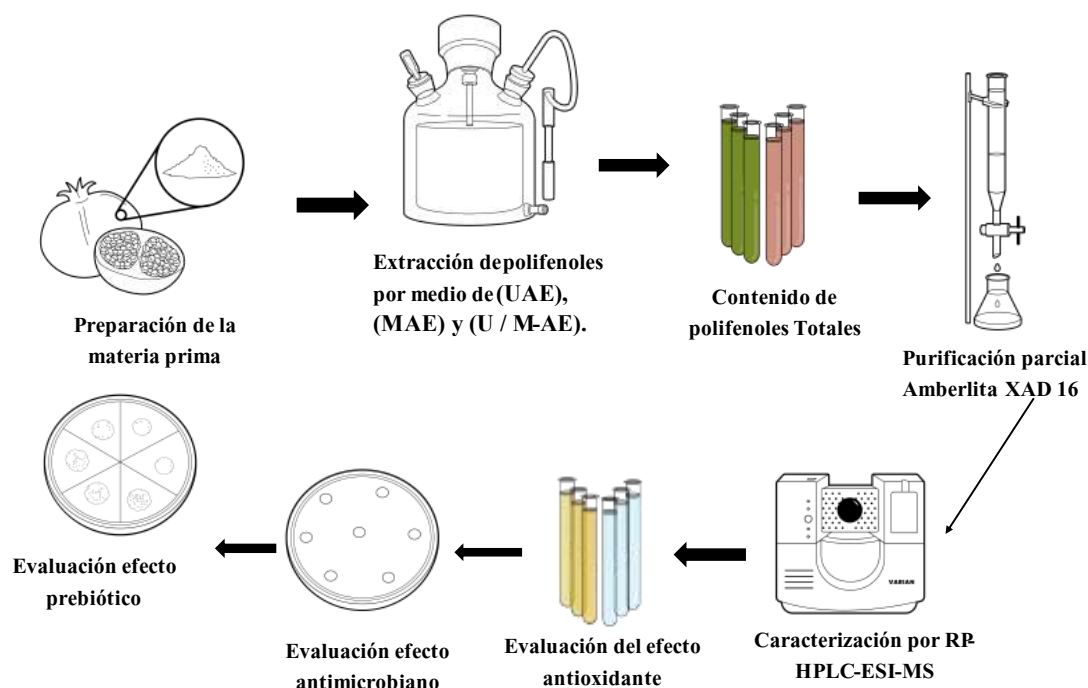


Figura 1. Diagrama de flujo de los ensayos que se llevaron a cabo: Preparación de la materia prima para la obtención de polvo de cáscara de granada, proceso de extracción por ultrasonido (UAE), microondas (MAE) e hibridación de las tecnologías ya mencionadas (U/M-AE), determinación del contenido fenólico por Folin-Ciocalteu y HCl-Butanol, purificación parcial Amberlita XAD 16 (selección de la fracción etanólica), caracterización por HPLC-ESI-MS y evaluación de propiedades biológicas (actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y actividad prebiótica).

2.9. Actividad antimicrobiana por ensayo de difusión de agar (ADA)

Se determinó la actividad antimicrobiana de las diluciones de polifenoles de cáscara de granada contra patógenos como *Escherichia coli*, y *Salmonella typhi*, según Venegas-Ortega *et al.* [26] con algunas modificaciones. Se inocularon las bacterias en agar Soya Trypticaseína y se realizó un ajuste de inóculo a estándares de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Una vez solidificado el agar, se perforaron orificios de aproximadamente 7 mm, se agregaron 50 μ l de cada disolución en cada pocillo por triplicado, además de añadir el agua como control negativo y antibiótico (Tetraciclina) como control positivo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h y se midieron las zonas despejadas alrededor de los pocillos

para calcular la actividad antimicrobiana, que se expresó como unidades arbitrarias (AU) con la siguiente ecuación:

$$AU = \frac{\text{Área de inhibición (mm)} - \text{Área de pozo (mm)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}} \quad (\text{Ec 3})$$

2.10. Determinación de la actividad hemolítica en eritrocitos humanos aislados

Se determinó la actividad hemolítica en eritrocitos humanos aislados según Nubi *et al.* [27], con algunas modificaciones. Se extrajo sangre de un voluntario sano y no fumador, por punción venosa, del brazo, siguiendo los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, para estudios donde se utilizan muestras humanas. La sangre se colectó en tubos Vacutainer con

citrato de sodio como anticoagulante. La muestra fue centrifugada a 2500 rpm durante 4 minutos a 4 °C. El pellet de eritrocitos fue lavado tres veces con una solución Alsever (pH 6.4). Una vez que se obtuvo el pellet de eritrocitos lavados, se preparó una dilución 1:99. Se agitó suavemente hasta formar una suspensión homogénea que sirvió de base para las pruebas de hemólisis. Para cada prueba se realizaron dos experimentos y cada uno por triplicado, teniéndose además de las muestras de estudio, un control negativo (eritrocitos en la solución Alsever sin la muestra experimental) y un control positivo (eritrocitos colocados en agua destilada para obtener el 100% de hemólisis). Se procedió a incubar las muestras de sangre con dosis crecientes del extracto de las diluciones de polifenoles de cáscara de granada (0, 125, 250, 500 y 1000 g/ml) por 60 minutos de incubación a 37 °C. Una vez terminado el tiempo, se centrifugaron los tubos para separar el sobrenadante, del cual se colocó 1 ml en celdas multiplaca, para la determinación de la absorbancia a 415 nm.

Los resultados de la actividad hemolítica se cuantificaron de acuerdo con la Ec. 4.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs. Grupo experimental} - \text{Control-}}{\text{Control+} - \text{Control-}} \times 100$$

(Ec. 4)

2.11. Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre las muestras. El análisis de las medias se realizó mediante el procedimiento LSD Fisher a $p < 0.05$ utilizando el software Infostat versión 2020.

3. Resultados y Discusión

3.1. Polifenoles totales

Se utilizaron tres tecnologías de extracción UAE, MAE y (U/M-AE), definiendo una extracción con base a la eficiencia en la recuperación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto de cáscara de granada.

Tabla 1. Contenido polifenólico del extracto de cáscara de granada.

	Hidrolizables	Condensados
UAE	109.33 ± 30.55 ^b	27.97 ± 0.16 ^a
MAE	119.82 ± 1.32 ^b	36.55 ± 3.88 ^a
(U/M-AE)	345.33 ± 72.03 ^a	34.36 ± 3.56 ^a

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. En cada columna, los valores seguidos de letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de Fischer ($P \leq 0.05$).

La evaluación se llevó a cabo por los ensayos de Folin-Ciocalteu y HCl-Butanol. La combinación de las tecnologías UAE y MAE mostró un mayor efecto para extraer polifenoles hidrolizables. Por otro lado, el contenido polifenólico condensado, a diferencia de los polifenoles hidrolizables obtuvo concentraciones en un rango inferior, ya que no existió diferencia significativa entre ninguna tecnología. Sin embargo, los métodos de extracción analizados y los resultados muestran que hay una diferencia

significativa entre la tecnología U/M-AE), MAE y UAE en los resultados de polifenoles totales. Los resultados del contenido de taninos hidrolizables y condensados se pueden observar en la tabla 1.

Los resultados determinaron que la tecnología (U/M-AE), fue la tecnología de mayor rendimiento, ya que fue significativamente diferente de las otras dos tecnologías, mientras que no se pudieron

encontrar diferencias significativas entre los resultados de UAE y MAE.

Considerando los resultados del contenido, se puede observar que el mayor contenido total se encuentra en la extracción (U/M-AE), la extracción por el método híbrido obtuvo un rendimiento de 377.77 GAE/g de materia seca de polifenoles solubles totales indicando que el 91.42% de los polifenoles totales corresponden a los hidrolizables. Comparado

con los estudios realizados por Seeram *et al.* [28], quienes reportaron un porcentaje de 85% (p/p) de los isómeros de punicalagina que constituyen el peso total de taninos hidrolizables. De acuerdo con los resultados antes mencionados, las tecnologías verdes de extracción tienen mayor eficacia para la recuperación de compuestos bioactivos, con lo que se observó que la combinación de las tecnologías UAE y MAE mostró un gran potencial para la extracción de polifenoles.

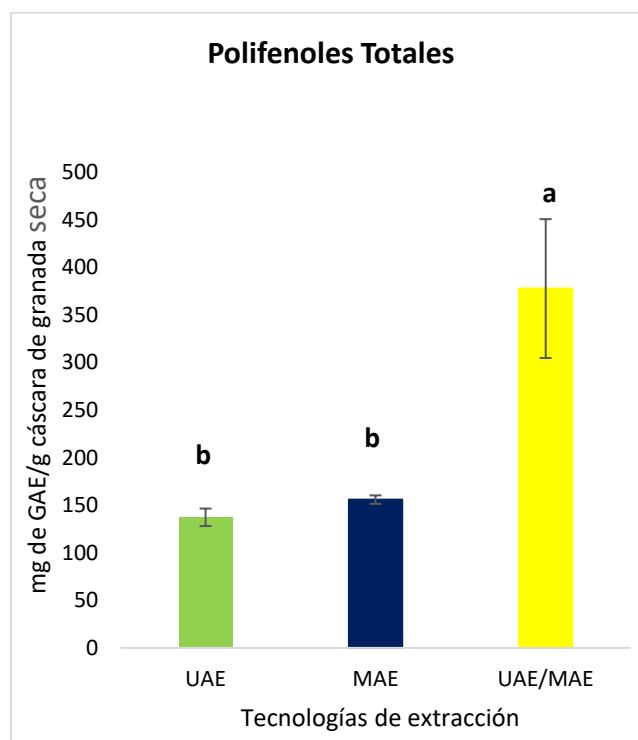


Figura 2. Contenido polifenólico total del extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$). Proceso de extracción por ultrasonido (UAE), microondas (MAE) e hibridación de las tecnologías ya mencionadas (U/M-AE).

El contenido polifenólico encontrado en la extracción híbrida de la cáscara de granada demostró ser mayor que el encontrado en otras frutas. Estrada-Gil *et al.* [25] realizaron una extracción de polifenoles de cáscara de rambután mexicano, utilizando la tecnología obtuvieron un rendimiento de extracción dos veces menor con respecto a la cáscara de granada. Ordoñez-Torres *et al.* [29], también se realizaron extracciones por medio de una tecnología de extracción híbrida, con un

resultado de un mejor rendimiento de extracción en comparación con los resultados obtenidos por las tecnologías convencionales. En otro estudio realizado por More & Arya [30] extrajeron compuestos bioactivos de cáscara de granada con una tecnología asistida por ultrasonidos pulsados (PUAE), para intensificar la eficacia de extracción, en la cual obtuvieron como resultado 177.54 mg de GAE/g de materia seca de polifenoles. Esto indica que la tecnología híbrida

empleada en el presente trabajo obtuvo un resultado dos veces mayor. La razón de este fenómeno podría deberse a que, con la ayuda de la cavitación acústica y el calentamiento rápido seleccionado de las microondas, la extracción mejoró de forma evidente [31], además de reducir los tiempos y con ello dar como resultado mayor concentración de contenido fenólico. El tiempo es una cuestión que se debe tomar en cuenta para la extracción de compuestos de interés, autores han reportado que en tiempos más cortos obtuvieron mejores resultados en la extracción de compuestos de cáscara de mango, esto es de gran importancia desde un punto de vista de sostenibilidad, ya que se ahorra mayor cantidad de energía [29].

Por consiguiente, una tecnología combinada, ha resultado en mayor eficacia a la hora de recuperar compuestos bioactivos como se demostró en el presente trabajo; por lo que para el resto de los análisis de la presente investigación se seleccionó la tecnología U/M-AE.

3.2. Identificación de los polifenoles de la cáscara de granada

Los compuestos presentes en el extracto de cáscara de granada se recuperaron por medio de la tecnología de (U/M-AE). El extracto fue sometido a una purificación parcial y analizado mediante HPLC/ESI/MS que permitió la identificación de los compuestos reportados en la tabla 2.

Tabla 2. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto polifenólico de la cáscara de granada.

Tiempo de Retención	Masa	Compuesto	Familia
3.39	316.8	Hidroxitirosol4-O-glucósido	Tirosoles
4.03	195.0	3,4-DHPEA-AC	Tirosoles
5.26	330.9	Acido gálico 4-O-glucosido	Ácidos hidroxibenzoicos
6.95	480.9	HHDP-hexósido	Elagitaninos
12.635	780.9	Punicalina	Elagitaninos*
13.557	706.9	(-)-Epicatequina-(2a-7) (4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido	Dímeros de proantocianidina
14.258	1082.6	Punicalagina	Elagitaninos*
15.144	1082.6	Punicalagina	Elagitaninos*
20.537	462.9	Ácido elágico-hexósido	Elagitaninos
26.707	300.9	Ácido elágico	Dímeros de ácido hidroxibenzoico

*compuestos mayoritarios presentes en el extracto.

La purificación parcial del extracto de cáscara de granada fue realizada por Amberlita XAD-16 y se eluyó con etanol, produciendo (5.12%) de rendimiento de polvo de extracto polifenólico. En un estudio por Aqil *et al.* [32] obtuvieron 2.7% de rendimiento, por lo que el resultado en el presente trabajo es 2 veces más alto. La amberlita XAD-16 es una resina no iónica que permite la separación de los compuestos de interés por su contraste de

polaridad de los compuestos no polares. La columna permite que los compuestos no deseados como carbohidratos, interfieran en la identificación y caracterización de los compuestos objetivo.

Se detectó la punicalagina como el compuesto mayoritario, seguido de los compuestos punicalina, epicatequina y ácido elágico hexósido, estos compuestos han sido

identificados previamente en la cáscara de la granada y han sido estudiados por su amplia variedad de propiedades biológicas.

De acuerdo a un estudio realizado por Sepúlveda *et al.* [33] donde trabajo con fermentación sólida para la purificación de ácido elágico (EA), identifico por medio de HPLC/ESI/MS punicalagina (1082,97 m/z), punicalina (780,99 m/z) y ácido elágico (300,80 m/z). Otro estudio por Muñiz-Márquez *et al.* [4] donde realizaron una extracción asistida por ultrasonidos de EA a partir de cáscara de granada. Se confirmaron como compuestos mayoritarios los elagitaninos llamados punicalagina y EA respectivamente que al igual que en el presente estudio pudieron ser identificados.

Por otro lado en otro estudio Gosset-Erard *et al.* [34] demostraron que los extractos de cáscara de granada estaban formados principalmente por compuestos fenólicos como las pedunculaginas I y II, el ácido elágico, el ácido elágico-O- pentósido y las punicalaginas α , sin embargo se identificaron compuestos como pedunculaginas I y II que no fueron reconocidos en este estudio. Cabe destacar que, en los tres estudios, los compuestos mayoritarios fueron también la punicalagina, punicalina y ácido elágico, sin embargo, la identificación de otros compuestos puede ser atribuida a la variedad de granada que se utilizó, ya que en el previo estudio se analizaron dos variedades de granada originarias de Marruecos y Turquía. Estos resultados están relacionados con las diferentes composiciones fitoquímicas entre plantas de diferentes variedades y/o regiones geográficas, ya que el clima y el tipo de suelo también tienen una influencia en el crecimiento y composición química del cultivo.

3.3. Ensayos antioxidantes

Los ensayos antioxidantes se realizaron exclusivamente con el contenido polifenólico extraído de la cáscara de granada sometida a una extracción híbrida. Para estudiar la capacidad antioxidante de dicho extracto de cáscara, se utilizó la actividad de barrido ABTS y DPPH. En este caso, la actividad antioxidante se determinó mediante el porcentaje de inhibición.

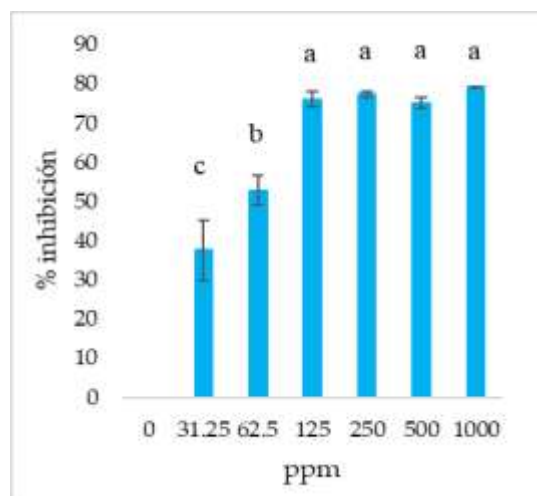


Figura 3. Prueba DPPH de las diferentes concentraciones de polifenoles de extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$).

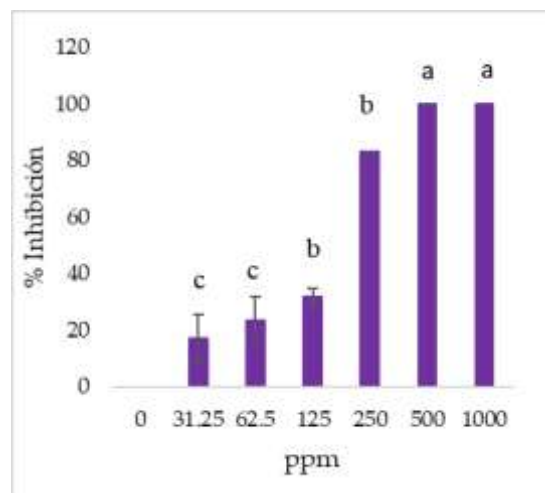


Figura 4. Prueba ABTS de las diferentes concentraciones de polifenoles de extracto de cáscara de granada; las diferencias significativas entre los valores se indican con letras diferentes a y b ($P < 0.05$).

Los resultados de la actividad antioxidante con DPPH se observan en la figura 3, los polifenoles a una concentración de 1000 ppm (79.18%) y 500 ppm (75.22%) no tuvieron diferencias significativas entre sí, pero si se diferenciaron de las demás concentraciones. Mientras tanto la correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante por DPPH es positiva, es decir hay una relación directa entre la concentración y la actividad. El extracto tuvo una mejor actividad antioxidante en el ensayo ABTS (figura 4), en la cual hubo diferencias significativas en las concentraciones más altas donde se obtuvo en 1000 y 500 ppm (100%), resultados diferentes de correlación fueron los reportados por Kaderides *et al.* [35], dónde usó el método de DPPH, los resultados de la efectividad de barrido de radicales, de los extractos de cáscara de granada optimizados para MAE y UAE fueron del 94.91% y 94.77%, respectivamente. Otro estudio reportado por More & Arya [29] en el cual trabajaron con el extracto obtenido por extracción por ultrasonido optimizada, obtuvieron resultados de 81.67% y 76.50% de inhibición utilizando los reactivos DPPH y ABTS respectivamente. Kennas *et al.* [36] obtuvieron resultados del extracto crudo de cáscara de granada para aumentar la capacidad antioxidante en yogurt, dónde se presentaron valores de 40 y 65 %, estas diferencias pueden ser atribuidas a otros compuestos como carbohidratos presentes que pueden interferir en la interacción de los polifenoles con los radicales.

En este estudio los polifenoles recuperados de la cáscara de granada poseen presumiblemente una alta actividad antioxidante. Los resultados obtenidos anteriormente, son atribuidos a la presencia de elagitaninos hidrolizables, que fueron identificados anteriormente como compuestos mayoritarios: punicalagina, punicalina y el ácido elágico, lo que

concuerda con otros estudios recientes [37,38]. Algunos investigadores han reportado que la punicalagina y la punicalina tienen un alto grado de hidroxilación, y esto le podría otorgar una mayor capacidad de eliminación de radicales libres que el ácido elágico [38,39]. Dicha bioactividad puede estar implicada con la inhibición de enfermedades como el cáncer, ya que en el cuerpo se producen naturalmente radicales libres, sin embargo, en altas concentraciones, los radicales libres pueden ser peligrosos para el cuerpo y pueden dañar todos los componentes principales de las células [40]. Los polifenoles de cáscara de granada al poseer alta efectividad contra estas moléculas interactúan con los radicales libres y los neutralizan, lo que les impide causar daño, por lo que los resultados con los ensayos antioxidantes demuestran que pueden tener efectos positivos en el uso como antioxidantes [41].

3.4. Evaluación del efecto antimicrobiano

La tabla 3 contiene los resultados del efecto antimicrobiano de *Salmonella*. El control positivo tuvo un halo de inhibición de 8.23 mm, mientras que las concentraciones de extracto de polifenoles de cáscara de granada tuvieron una correlación positiva con la actividad antimicrobiana. Es decir, a mayor concentración mayor halo de inhibición, siendo significantes las diferencias entre el control positivo (8.23 mm) y las diferentes concentraciones evaluadas (4.47 mm para 500 ppm y 8.40 mm para 1000 ppm). El efecto contra *Escherichia coli* (tabla 3) muestra un comportamiento similar, debido a que se sigue la misma tendencia, a mayor concentración mayor halo de inhibición, siendo significantes las diferencias entre el control positivo, el halo de inhibición de (2.1 mm), mientras que las concentraciones de extracto de cáscara de granada tuvieron una semejanza positiva con la actividad antimicrobiana, teniendo diferencias

significativas (4.18 mm para 1000, 2.70 mm para 250 y 1.45 mm para 250 ppm). Resultados diferentes fueron reportados por Al-Zoreky *et al.* [42] quienes tuvieron resultados de 16 mm de diámetro de inhibición, esta diferencia puede ser atribuida a que utilizaron metanol para diluir los polifenoles, debido a que el metanol es un fuerte antimicrobiano. Otro estudio realizado por Khan & Haneef [43] tuvieron resultados similares a este trabajo, debido a la utilización de tetraciclina como control positivo. Además, demostró que el extracto acuoso de cáscara de granada contra *Pseudomonas aeruginosa* tuvo un efecto de inhibición mayor comparado con el control positivo (tetraciclina). Otro estudio realizado por Harini *et al.* [44] donde trabajaron con seis microorganismos, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

pneumoniae y *Salmonella enteritidis*, donde *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser el patógeno alimentario con más resistencia al extracto de cáscara de granada en acetona. *Salmonella* y *Klebsiella* resultaron ser más susceptibles a los compuestos activos presentes en el extracto, dando como resultado diámetros de inhibición de 6.53 y 10.45 mm, respectivamente. Los extractos acuosos de cáscara de granada y jugo también han sido probados contra *Salmonella*. Los resultados han reportado que inhibe eficazmente el crecimiento de la bacteria [45]. Kharchoufi *et al.* [46] probaron con otros microorganismos como como *Penicillium digitatum*, *Pseudomonas putida* y *Saccharomyces cerevisiae*, los resultados demostraron una inhibición mayor con los extractos de cáscara de granada en metanol respecto al extracto acuoso, donde hubo una inhibición significativa entre los tratamientos.

Tabla 3. Diámetro de inhibición del crecimiento (mm) de los microorganismos objetivo por diferentes concentraciones de polifenoles de cáscara de granada.

Concentración ppm	<i>Salmonella spp</i>	<i>E. coli</i>
250	0 ± 0	1.45 ± 0.15 ^c
500	4.47 ± 0.35 ^b	2.70 ± 0.12 ^b
1000	8.40 ± 0.10 ^a	4.18 ± 0.18 ^a
Control positivo (tetraciclina)	8.23 ± 0.06 ^a	2.10 ± 0.06 ^b

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. En cada columna, los valores seguidos de letras distintas son significativamente diferentes según la prueba de Fischer ($P \leq 0.05$).

La efectividad antioxidante y antimicrobiana de los taninos hidrolizables, condensados y de los flavonoides se rige por sus estructuras químicas [11]. Los compuestos mayoritarios identificados en este estudio por HPLC-MS, principalmente la punicalagina han sido estudiados previamente, la punicalagina ha sido extraída y ha sido probada su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* [47]. Este hallazgo está respaldado por los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los taninos hidrolizables [48,49]. Estos taninos poseen mecanismos inhibidores, que varían según sus estructuras como grupos hidroxilo fenólicos que

transportan los residuos de hidroxilo a los radicales libres, bloqueando así estas especies nocivas [45].

La estructura básica de anillos aromáticos otorga a los polifenoles una adaptación lipofílica. Los polifenoles lipofílicos pueden interactuar y cambiar la permeabilidad e integridad de las membranas celulares bacterianas. Esto dependiendo de las variaciones en las estructuras de la superficie celular entre las especies Gram-negativas y Gram-positivas Cetin-Karaca & Newman. [50]. Siendo las Gram-positivas más susceptibles a la acción de los ácidos

fenólicos que las bacterias Gram-negativas [51,52]. Además, otros autores reportan que la catequina, una sustancia polifenólica predominante en la cáscara de la granada, puede también inhibir el crecimiento de las células bacterianas al dañar sus membranas celulares [53].

3.5. Evaluación del efecto prebiótico

Los ensayos prebióticos mostraron resultados diferentes para *Lactobacillus brevis*.

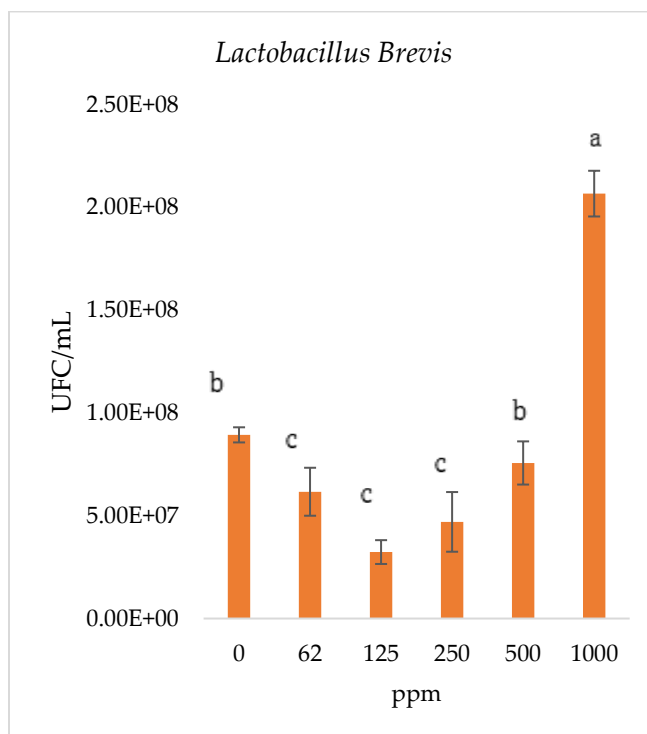


Figura 5. Crecimiento máximo y ratio de crecimiento máximo recogidos en el ensayo prebiótico. Se realizó una prueba de comparación de medias de Fischer en las concentraciones de polifenoles de cáscara de granada con la cepa bacteriana de *L. brevis* con un nivel de significación de ($P \leq 0.05$) lo que indica que hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

Es posible observar la tendencia de crecimiento de *L. brevis* con diferentes concentraciones de polifenoles de cáscara de granada (62, 125, 250, 500 y 1000 ppm), donde la mejor respuesta de crecimiento fue con la más alta concentración figura 5, la dilución de 1000 ppm obtuvo un crecimiento de 2.07×10^8 UFC/mL. Estrada-Gil *et al.* [25] trabajó con *Lactobacillus brevis* utilizando polifenoles extraídos de cáscara de rambután, no obtuvo crecimiento de esta bacteria, ya que la geranina el compuesto mayoritario en la cáscara de rambután mexicano, puede beneficiar selectivamente la proliferación de

ciertas bacterias probióticas, caso contrario a lo encontrado con los polifenoles de cáscara de granada, ya que estos pueden ejercer un mayor estímulo para el crecimiento de *Lactobacillus brevis*. Previos estudios han demostrado que los subproductos de granada, tales como el extracto de cáscara, mejora el crecimiento de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* así como la creación de ácidos grasos de cadena corta en medios inoculados con microflora fecal humana [54,55] obtuvieron un aumento en los recuentos de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* e inhibieron el crecimiento del grupo *B.*

fragilis, los *clostridios* y las *enterobacterias* en cultivos fecales *in vitro*. Otros autores corroboraron que los compuestos mayoritarios presentes en la cáscara de granada (punicalaginas, punicalinas, ácido gálico y ácido elágico) inhiben parcialmente el crecimiento de *Bifidobacterium animalis lactis* y de *Bifidobacterium bifidum*, mientras que el crecimiento de *Bifidobacterium brevis* y *Bifidobacterium infantis* se vio significativamente fomentado. Sin embargo, patógenos como *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium ramosum* y *Bacteroides fragilis* fueron fuertemente inhibidos por los elagitaninos [56].

Se ha evaluado, utilizando la digestión gastrointestinal simulada, la actividad prebiótica del zumo y la cáscara de granada con bacterias ácido-lácticas. Dando como resultado el aumento de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y garantiza la supervivencia de las bacterias del ácido lácticas que puede deberse al metabolismo de los elagitaninos, la catequina y la epicatequina [57]. Los polifenoles consiguen ser absorbidos en el intestino delgado, sin embargo, esto generalmente solo ocurre con aquellas estructuras que son mono o diméricas [58], después llega la liberación de agliconas que ingresan al revestimiento celular intestinal y se someten a

biotransformación, después de lo cual los productos metabólicos se pasan por todo el cuerpo o se excretan [59]. Probablemente el tamaño molecular de los polifenoles influye en la absorción de estos, debido a que los polifenoles de menor peso se absorben con mayor rapidez, mientras que los más complejos consiguen llegar al colon sin cambios, además de que estos sufren transformación enzimática (por las enzimas α -ramnosidasa, β -glucosidasa y β -glucuronidasa) por el microbioma intestinal, se rompen las estructuras de los compuestos que pueden ser absorbidos para ejercer un beneficio a la salud [60].

Conforme los resultados obtenidos por la prueba prebiótica, los polifenoles extraídos de la cáscara de granada muestran actividad prebiótica en todas las concentraciones, sin embargo, la mayor concentración mostró un mayor efecto de crecimiento.

3.6. Actividad hemolítica

Para validar el uso de plantas biológicamente activas, es necesario realizar ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo humano, ya que es un paso ineludible para poder integrar productor herbales en los sistemas de salud [56]. Esto con el fin de tener productos seguros, que no perjudiquen con efectos secundarios la salud.

Tabla 4. Actividad hemolítica los polifenoles de cáscara de granada.

Muestra (extracto de la cáscara de granada)	Actividad hemolítica
	Media $\pm$ DE
Control negativo (Solución Alsever))	0.05 $\pm$ 0.009
125 μ g/mL	0.01 $\pm$ 0.019
250 μ g/mL	0.1 $\pm$ 0.013
500 μ g/mL	0.1 $\pm$ 0.014
1000 μ g/mL	0.1 $\pm$ 0.019
Control positivo (Agua destilada)	100 $\pm$ 0.008

Los resultados de este ensayo de hemólisis mostraron que los polifenoles de cáscara de granada no afectan o destruyen los eritrocitos

humanos. Por lo cual, no tendrían un efecto secundario en células sanguíneas humanas y se puede garantizar un producto seguro. Las

diferentes concentraciones de polifenoles analizadas muestran un 0% de actividad hemolítica, estos datos se compararon con un control positivo y uno negativo. Los resultados se muestran en la tabla 4. Se observa que el control positivo muestra diferencia significativa donde obtuvo un 100% de actividad hemolítica respecto a las demás concentraciones. Previamente se han realizado estudios con extractos polifenólicos de otros residuos de frutas tales como el rambután mexicano. De acuerdo con Estrada-Gil *et al.* [25] se obtuvieron en todas las concentraciones analizadas un 0% de actividad hemolítica. En otro estudio, se trabajó con el extracto de Semilla de *Moringa oleífera*, se estudió la actividad endosomolítica y citocompatibilidad por medio de un ensayo hemolítico en eritrocitos bovinos. Se demostró un aumento de la hemólisis dependiente de la concentración a 80 µg/ml, el extracto mostró un 45% de hemólisis en comparación con el control (11%) [27]. Asimismo, los aceites esenciales de algunas plantas medicinales como *Pituranthos scoparius*, *Argelia*, *Myrtus nivelllei*, *Mentha piperita* y *Rosmarinus officinalis*, han mostrado más del 40% de actividad hemolítica. Esto con un mayor tiempo de incubación con glóbulos rojos [61].

4. Conclusión

La cáscara de granada al representar el 50% del peso total del fruto es una oportunidad de aprovechamiento del residuo agroindustrial. Dentro de este residuo se encuentran compuestos fenólicos con efectos biológicos, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas, anticancerígenas y antivirales.

En el presente estudio dichos compuestos fueron extraídos, purificados e identificados como la punicalagina y punicalina. Además, que se comprobó la alta capacidad antioxidante, así como efecto antimicrobiano,

prebiótico y también la nula actividad hemolítica.

En la actualidad, las pruebas previamente realizadas en este trabajo son altamente relevantes para el desarrollo de productos de valor agregado, como lo son la elaboración de suplementos alimenticios, entre otros productos de valor agregado. Tanto la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, buscan la forma de obtener moléculas con una actividad biológica interesante y una forma viable de obtenerlas.

Hoy en día el estilo de vida y las enfermedades han incrementado y con ello el uso de fármacos, que a su vez tienen efectos secundarios a la salud. Con ello se pretende buscar en los residuos de frutas más alternativas que ayuden a contrarrestar o evitar estos daños. Con este estudio se demuestra la importancia de darle mayor valorización a los residuos agroindustriales, ya que muchos pueden contener efectos positivos que pueden contribuir a la salud. El presente estudio abre la posibilidad de seguir investigando en el tema para la creación nuevos productos en las industrias alimentaria, cosmética.

5. Referencias

1. Pareek, S., Valero, D., & Serrano, M. (2015). *Postharvest biology and technology of pomegranate*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(12), 2360–2379. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7069>
2. El Barnossi, A., Moussaid, F., & Iraqi Housseini, A. (2021). *Tangerine, banana and pomegranate peels valorisation for sustainable environment: A review*. Biotechnology Reports, 29, e00574. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00574>

3. Kahramanoglu, I. (2019). *Trends in Pomegranate Sector Production, Postharvest Handling and Marketing*. International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences, 3(2), 239–246.
4. Muñiz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Sepúlveda, L., Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, J. A., & Aguilar, C. N. (2021). *Effect of ultrasound on the extraction of ellagic acid and hydrolysis of ellagitannins from pomegranate husk*. Environmental Technology and Innovation, 24, 102063. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102063>
5. Jaiswal, V., DerMarderosian, A., & Porter, J. R. (2010). *Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (Punica granatum L.)*. Food Chemistry, 118(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.095>
6. Zhang, C., Chen, W., Zhang, X., Zheng, Y., Yu, F., Liu, Y., et al. (2017). *Grape seed proanthocyanidins induce mitochondrial pathway-mediated apoptosis in human colorectal carcinoma cells*. Oncology Letters, 14(5), 5853–5860. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6992>
7. Górna, P., & Rudzi, M. (2016). *Seeds recovered from industry by-products of nine fruit species with a high potential utility as a source of unconventional oil for biodiesel and cosmetic and pharmaceutical sectors*. Industrial Crops and Products 83, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.021>
8. Lu, J., Wei, Y., & Yuan, Q. (2007). *Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 857(1), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.038>
9. Wu, S., & Tian, L. (2017). *Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (punica granatum)*. Molecules, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101606>
10. Zhang, L., Fu, Q., & Zhang, Y. (2011). *Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity*. Food Chemistry, 127(4), 1444–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.077>
11. Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). *Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts*. Industrial Crops and Products, 111(October 2016), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
12. Al-Megrin, W. A. (2017). *In vivo study of pomegranate (Punica granatum) peel extract efficacy against Giardia lamblia in infected experimental mice*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.018>
13. Seidi, K., Jahanban-Esfahlan, R., Abasi, M., & Abbasi, M. M. (2016). *Anti tumoral properties of Punica granatum (Pomegranate) seed extract in different*

- human cancer cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(3), 1119–1122.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.3.1119>
14. Deng, Y., Li, Y., Yang, F., Zeng, A., Yang, S., Luo, Y., Zhang, Y., Xie, Y., Ye, T., Xia, Y., & Yin, W. (2017). *The extract from Punica granatum (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 976–984.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.008>
 15. Gumus, Z. P., Ustun Argon, Z., & Celenk, V. U. (2020). *Cold pressed pomegranate (Punica granatum) seed oil. In Cold Pressed Oils. Elsevier Inc.*
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818188-1.00053-0>
 16. Panichayupakaranant, P., Tewtrakul, S., & Yuenyongsawad, S. (2010). *Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. Food Chemistry*, 123(2), 400–403.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.054>
 17. Gulube, Z., & Patel, M. (2016). *Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microbial Pathogenesis*, 98, 45–49.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.027>
 18. Rajha, H. N., Koubaa, M., Boussetta, N., Maroun, R. G., Louka, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2020). *Selective ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7), 1–9.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14545>
 19. Ashokkumar, M. (2015). *Applications of ultrasound in food and bioprocessing. Ultrasonics Sonochemistry*, 25(1), 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
 20. Hernández-Hernández, C., Aguilar, C. N., Flores-Gallegos, A. C., Sepúlveda, L., Rodríguez-Herrera, R., Morlett-Chávez, J., Govea-Salas, M., & Ascacio-Valdés, J. (2020). *Preliminary testing of ultrasound/microwave-assisted extraction (U/M-AE) for the isolation of Geraniin from Nephelium lappaceum L. (Mexican Variety) peel. Processes*, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/PR8050572>
 21. Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008). *Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189–199.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
 22. Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. F., Buenrostro, J. J., Prado-Barragán, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2016). *The complete biodegradation pathway of ellagitannins by Aspergillus niger in solid-state fermentation. Journal of Basic Microbiology*, 56(4), 329–336.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201500557>
 23. Stämpfli, R., Brühwiler, P., Mourad, S., Verdejo, R., & Shaffer, M. (2007). *Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. EMPA Activities*, 26(2007), 51.
 24. Molyneux P. (2004). *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-*

- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26(May), 211–219.
25. Estrada-Gil, L., Contreras-Esquivel, J. C., Flores-Gallegos, C., Zugasti-Cruz, A., Govea-Salas, M., Mata-Gómez, M. A., & Ascacio-Valdés, J. A. (2022). *Recovery of bioactive ellagitannins by ultrasound/microwave-assisted extraction from mexican rambutan peel (Nephelium lappaceum L.)*. *Molecules* 27, 1592.
 26. Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernández, J. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2020). *Multi-functional potential of presumptive lactic acid bacteria isolated from Chihuahua cheese*. *Foods*, 9(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods9030276>
 27. Nubi, T., Adewole, T. S., Agunbiade, T. O., Osukoya, O. A., & Kuku, A. (2021). *Purification and erythrocyte-membrane perturbing activity of a ketose-specific lectin from Moringa oleifera seeds*. *Biotechnology Reports*, 31(October 2020), e00650. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00650>
 28. Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). *Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry*. *Separation and Purification Technology*, 41(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.04.003>
 29. Ordoñez-Torres, A.; Torres-León, C.; Hernández-Almanza, A.; Flores-Guía, T.; Luque-Contreras, D.; Aguilar, C.N.; Ascacio-Valdés, J. *Ultrasound-Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Mexican “Ataulfo” Mango Peels: Antioxidant Potential and Identification by HPLC/ESI/MS*. *Phytochem. Anal.* 2021, 32, 495–502. <https://doi.org/10.1002/pca.2997>
 30. More, P. R., & Arya, S. S. (2021). *Intensification of bio-actives extraction from pomegranate peel using pulsed ultrasound: Effect of factors, correlation, optimization and antioxidant bioactivities*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 105423. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105423>
 31. Lianfu Z, Zelong L. *Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes*. *Ultrason Sonochem.* 2008;15(5):731-737. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.12.001>
 32. Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). *Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk*. *Food Research International*, 49(1), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.059>
 33. Sepúlveda, L., Wong-Paz, J. E., Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A., & Aguilar, C. N. (2018). *Solid state fermentation of pomegranate husk: Recovery of ellagic acid by SEC and identification of ellagitannins by HPLC/ESI/MS*. *Food Bioscience*, 22(October 2017), 99–104.

- <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.01.006>
34. Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). *Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels*. *Food Chemistry*, 352(October 2020), 129396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129396>
 35. Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., & Goula, A. M. (2019). *Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction*. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137(November 2018), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>
 36. Kennas, A., Amellal-Chibane, H., Kessal, F., & Halladj, F. (2020). *Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.07.001>
 37. SUN, Y. qing, TAO, X., MEN, X. ming, XU, Z. wei, & WANG, T. (2017). *In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin*. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1808–1818. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61560-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61560-5)
 38. Wang Y, Zhang H, Liang H, Yuan Q. 2013. Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk. *Food Chemistry*, 138, 437–443. DOI: [10.1016/j.foodchem.2012.10.092](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.092)
 39. Pfundstein B, El Desouky S K , Hull W E , Haubner R , Erben G, Owen R W. 2010. *Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (Terminalia ballerica, Terminalia chebula and Terminalia horrida): Characterisation, quantitation and determination of antioxidant capacities*. *Phytochemistry*, 71, 1132–1148. DOI: [10.1016/j.phytochem.2010.03.018](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.018)
 40. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
 41. Diplock, A. T., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., & Viña-Ribes, J. (1998). *Functional food science and defence against reactive oxidative species*. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S77–S112. <https://doi.org/10.1079/bjn19980106>
 42. Al-Zoreky, N. S. (2009). *Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels*. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
 43. Khan, J.A. and Haneef, S. (2011). *ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF*

- PUNICA GRANATUM PEELS*. Inter. J. Appl. Biolog. and Pharmaceutic. Technolo. (2): 3.
44. Harini, K., Chandra Mohan, C., Ramya, K., Karthikeyan, S., & Sukumar, M. (2018). *Effect of Punica granatum peel extracts on antimicrobial properties in Walnut shell cellulose reinforced Bio-thermoplastic starch films from cashew nut shells*. *Carbohydrate Polymers*, 184(August 2017), 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.072>
 45. Wu, W., Mis Solval, K., & Chen, J. (2022). *Inhibitory activity of aqueous extracts of pomegranate peel products and juice powder against Salmonella enterica*. *Lwt*, 155, 112934. and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*, 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
 46. Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2018). *Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts*. *Industrial Crops and Products*, 111(October 2016), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
 47. Gosset-Erard, C., Zhao, M., Lordel-Madeleine, S., & Ennahar, S. (2021). *Identification of punicalagin as the bioactive compound behind the antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) peels*. *Food Chemistry*, 352(October 2020), 129396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129396>
 48. Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Balakrishnan, A. (2016). *Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent*. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1035–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.v30.710.1002/ptr.5616>.
 49. Xu, Y., Shi, C., Wu, Q., Zheng, Z., Liu, P., Li, G., ... Xia, X. (2017). *Antimicrobial Activity of Punicalagin Against Staphylococcus aureus and Its Effect on Biofilm Formation*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(5), 282–287. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2226>.
 50. Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2015). *Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, 11, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.03.002>
 51. Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., et al. (2010). *Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria*. *Research in Microbiology*, 161, 372–382.
 52. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. *BBA - Biomembranes*, 1147(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)
 53. Bialonska, D., Ramnani, P., Kasimsetty, S. G., Muntha, K. R., Gibson, G. R., & Ferreira, D. (2010). *The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota*. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2–3), 175–182.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038>
54. Li, Z., Summanen, P. H., Komoriya, T., Henning, S. M., Lee, R. P., Carlson, E., Heber, D., & Finegold, S. M. (2015). *Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria invitro: Implications for prebiotic and metabolic effects*. *Anaerobe*, 34, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.012>
 55. Ahtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). *Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features*. *Food Chemistry*, 174, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.035>
 56. Kandyli, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). *Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives*. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020122>
 57. Sayers, B., Wijeyesekera, A., & Gibson, G. (2021). *Exploring the potential of prebiotic and polyphenol-based dietary interventions for the alleviation of cognitive and gastrointestinal perturbations associated with military specific stressors*. *Journal of Functional Foods*, 87, 104753. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104753>
 58. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scanzocchio, B., & Masella, R. (2010). *Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies*. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
 59. Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). *Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: A review*. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 325–341. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0852-y>
 60. Ezuruike, U. F., & Prieto, J. M. (2014). *The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations*. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2), 857–924. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.055>
 61. Halla, N.; Boucherit, K.; Zeragui, B.; Djelti, A.; Belkhedim, Z.; Hassani, R.; Benatallah, S.; Djellouli, H.; Kacimi, O.; Boucherit- Otmani, Z. *Polyphenols Content and Antimicrobial, Antioxidant and Hemolytic Activities of Essential Oils from Four Selected Medicinal Plants Growing in Algeria*. *Biol. Med. Nat. Prod. Chem.* 2020, 9, 65–75.



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Antioxidant effect of polyphenols extracted from pomegranate peel on vegetable oil/ethylcellulose-based oleogels

Efecto antioxidante de polifenoles extraídos de cáscara de granada sobre oleogeles a base de aceite vegetal y etilcelulosa

Álvarez-Díaz, N.G.¹, Michel-Michel, M.R.¹, Aguilar-Zárate, P.^{1*}, Ascacio-Valdés, J.A.², Wong-Paz, J.E.³, Muñiz-Márquez, D.B.¹, Aguilar-Zárate, M.^{4*}

¹ Departamento de Ingenierías, Instituto Tecnológico de Ciudad Valles, Tecnológico Nacional de México, Carretera al Ingenio Plan de Ayala Km. 2, Colonia Vista Hermosa, Ciudad Valles, San Luis Potosí, C.P. 79010, México.

² Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza s/n, Colonia República Oriente, Saltillo, Coahuila, C.P. 25280, México.

³ Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Romualdo del Campo 501, Colonia Rafael Curiel, Ciudad Valles, San Luis Potosí, C. P. 79060, México.

⁴ Facultad de Ciencias Químicas-CIEP, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, San Luis Potosí C.P. 78210, México.

16690092@tecvalles.mx; mariela.michel@tecvalles.mx; *pedro.aguilar@tecvalles.mx; alberto_ascaciovaldes@uadec.edu.mx; jorge.wong@uaslp.mx; diana.marquez@tecvalles.mx; *mayra.aguilar@uaslp.mx

Technological innovation: Use of polyphenols extracted from pomegranate peel as antioxidants in edible oleogels.

Industrial application area: Edible fats and oils.

Received: may 16th, 2022

Accepted: november 14th, 2022

Resumen

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar el uso de polifenoles extraídos de la cáscara de granada como agente antioxidante para el desarrollo de oleogeles a base de etilcelulosa en aceite vegetal y establecer la cantidad óptima de polifenoles necesaria para preservar la estabilidad oxidativa del oleogel y sus propiedades mecánicas. Los polifenoles de cáscara de granada (pp-polifenoles) se extrajeron y purificaron (usando HPLC-flash), se deshidrataron y se pulverizaron; sus componentes se caracterizaron por HPLC-MS/MS. Utilizando la metodología de Taguchi (arreglo ortogonal L9 3³), se evaluaron los factores etilcelulosa 45 cP (3, 6 y 12 %), pp-polifenoles (0.05, 0.1 y 0.2 %) y temperatura (140, 150 y 160 °C) sobre el oxidación de lípidos producidos

durante el proceso de elaboración del oleogel mediante métodos de peróxidos y dienos conjugados y complementada con FTIR. También se determinaron las propiedades mecánicas de los oleogeles desarrollados. Los resultados mostraron que el principal polifenol identificado en la cáscara de granada fue la punicalagina (anómeros α y β). Con base en el modelo estadístico de Taguchi, se seleccionó la formulación con 3% de EC y 0.1% de pp-polifenoles y el procedimiento térmico a 160 °C durante 2 horas, ya que bajo estas condiciones se obtuvo la mayor inhibición de oxidación (hasta 90%). El índice de peróxidos determinado en esta muestra ($5,62 \pm 0,4$ mEq/kg) estuvo dentro del límite permitido para aceites vegetales comestibles (máximo 10 mEq/kg). Se determinó que ni la adición de polifenoles ni el proceso térmico establecido alteraron las propiedades mecánicas de los oleogeles, independientemente de la adición de pp-polifenoles. Se sugirió complementar este trabajo con la investigación del sinergismo entre los pp-polifenoles y los componentes del oleogel antes de sugerir una funcionalidad o posible aplicación.

Palabras clave: oleogel; etilcelulosa; punicalagina; polifenoles.

Abstract

The objectives of the present work were to evaluate the use of polyphenols extracted from pomegranate peel as an antioxidant agent for the development of ethylcellulose based oleogels on vegetable oil and establish the optimal amount of polyphenols necessary to preserve the oleogel oxidative stability and its mechanical properties. Pomegranate peel polyphenols (pp-polyphenols) were extracted and purified, dehydrated and pulverized; their components were characterized by HPLC-MS/MS and the polyphenols was purified by HPLC-flash. Using Taguchi's methodology (orthogonal array L9 3³), the factors ethylcellulose 45 cP (3, 6 and 12%), pp-polyphenols (0.05, 0.1 and 0.2%) and temperature (140, 150 and 160 °C) were evaluated on the oxidation of lipids produced during the oleogel elaboration process through peroxide and conjugated dienes methods and complemented with FTIR. Mechanical properties of the oleogels developed also were determined. Based on Taguchi's statistical model, the formulation with 3% EC and 0.1% pp-polyphenols and the thermal procedure at 160 °C for 2 hours was selected, under these conditions the greatest oxidation inhibition was obtained (up to 90%). The peroxides value determined in this sample (5.62 ± 0.4 mEq/kg) was within the limit allowed for edible vegetable oils (maximum 10 mEq/kg). It was determined that neither the addition of polyphenols nor the established thermal process altered the mechanical properties of the oleogels, regardless of the addition of pp-polyphenols. It was suggested to complement this work with the investigation of the synergism between pp-polyphenols and the components of the oleogel before suggesting a functionality or possible application.

Keywords: oleogel; ethylcellulose; punicalagin; polyphenols.

INTRODUCTION

The pomegranate (*Punica granatum*) is a fruit rich in minerals (i.e., potassium, phosphorus,

manganese, calcium, iron and magnesium), it contains some vitamins such as C, B₁ and B₂ and high amounts of antioxidants of which

70% is concentrated in the skin and membranes of the fruit. Due to these nutraceutical properties, the pomegranate has managed to take an important place in the industrial production of arils and juices. However, the processing of pomegranate juice generates waste and 78% of it corresponds to the peel, which contains polyphenolic compounds such as ellagitannins, proanthocyanins, as well as alkaloid compounds and glycosides. (Buenrostro et al., 2017; Coronado-Reyes et al., 2020). Among ellagitannins, punicalagin is the main compound found in pomegranate peel (Çam & Hişil, 2010). This polyphenol has important biological capacities such as anti-inflammatory, hepatoprotective, antigenotoxic and also as an antioxidant or free radical scavenger, the latter standing out since punicalagin is responsible for approximately 50% of this activity (Giamogante et al., 2018; Nuncio-Jáuregui et al., 2015; Young et al., 2017). In addition, this compound has shown excellent bioavailability, stability and safety in humans, when administered within food matrices or independently, making it a great alternative for application in oleogels to help prevent or reverse the oxidation process. (Quirós Fernández & López Plaza, 2017). An oleogel is a material made by dissolving gelator molecules (i.e., low molecular weight molecules, lower than 3000 Daltons) in organic solvents such as vegetable oils or mineral oil (López-Martínez et al., 2014). Edible oleogels are structured with vegetable oils, predominantly rich in "healthier" polyunsaturated fats, which provide viscoelastic mechanical properties like those of a solid fat (i.e., lard, butter, vegetable shortening, etc.) (M. Aguilar-Zárate et al., 2019; Mattice & Marangoni, 2018). Because of this, oleogels have been proposed as alternatives to substitute saturated and *trans* fats that are associated with harmful health risks and a negative perception by the consumer. To prepare oleogels high

temperatures are required to dissolve gelator molecules and sometimes this process can affect the quality of the systems due to the sensitivity to heat associated with their components (i.e., gelators and polyunsaturated oils). Because of this, the use of an antioxidant agent is important for the development of some oleogels (Singh et al., 2017). This is the case of ethylcellulose (EC) oleogels, which are formed by the interaction of EC polymeric strands through hydrogen bonds (Laredo et al., 2011) after their solubilization in vegetable oils at ~120-140 °C. The temperature to which these solutions are heated causes decomposition of the gelator, surfactants used in the gel and also could cause the oxidation of the oil. The oxidation mechanism that could occur in this type of oleogelled systems is the autooxidation or radical mechanism. This pathway requires an initial activation energy for the removal of a hydrogen atom, thus it is enhanced by high temperatures and the presence and position of double bonds (Barriuso et al., 2013; Taghvaei & Jafari, 2015; Villeneuve et al., 2021). As consequence, the degradation of the molecules of the system (i. e., unsaturated and polyunsaturated fatty acids) can lead to a deterioration in gel quality (texture properties) and safety for use (Gravelle et al., 2012). Due to this, one of the most used ways to control and reduce autooxidation has been the incorporation of synthetic antioxidants as butylated hydroxytoluene (BHT), that has been applied to try to prevent the effects of oxidation caused by temperature on its mechanical properties (Davidovich-Pinhas et al., 2015). In the present work, the possibility to use a natural antioxidant to prevent the oxidation has been studied, in EC oleogels, presenting as alternative the polyphenols extracted from pomegranate peel. It has been reported that punicalagin is the main pomegranate polyphenol (P. Aguilar-Zárate et al., 2017), is not toxic (Kulkarni et al., 2007) and it is resistant to temperatures of up

to 121 °C under vacuum (Qu et al., 2014). In a recent study, in which was compared punicalagin antioxidant effect with the BTH in canola oil, presented similar reduction effect of primary oxidation products than BHT, so the authors proposed punicalagin as suitable replacements of synthetic antioxidants for canola oil (Alsufiani et al., 2020). Because the above, in the present work it was hypothesized that pomegranate polyphenols can act as an antioxidant in EC oleogels in canola oil, since it is necessary to subject the solutions to high temperatures to complete dissolution of the gelator. The study of natural antioxidants using in edible oleogelled systems is limited due to some of them are unrecognized as safe or assesses long term stability because in the most studies they have been examined in model systems. Only few natural antioxidants have demonstrated being effective in oleogels. For example, it has been reported that the addition of curcumin to beeswax oleogels increased their oxidative stability but only during refrigerated storage. (Ramírez-Carrasco et al., 2020). On the other hand, it was obtained that in β -sitosterol and lecithin oleogels also added with curcumin, the crystalline network of molecules served to inhibit the chain of oxidation reactions and, in turn, protected the antioxidant activity of curcumin, it was deduced because diminished the formation of hydroperoxides (Li et al., 2019). But the preparation temperature of these oleogels in the last two cases was 90 °C and their studies were carried out at 60 °C, so there was no evidence that curcumin acted effectively at high temperatures, but rather it turned out that the oleogel served as vehicle for curcumin. In this context, the objectives of the present work were to evaluate the use of polyphenols extracted from pomegranate peel as an antioxidant agent for the development of ethylcellulose based oleogels on vegetable oil and establish the optimal amount of polyphenols necessary to preserve the oleogel

oxidative stability and its mechanical properties.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The pomegranate peel was extracted from ripe fruits obtained from a local farm market in Ciudad Valles, San Luis Potosi, Mexico. For the development of the oleogels, ethylcellulose (EC) with a viscosity of 45 cP was used (Ethocel Standard 45 Premium, DUPONT, Suiza) and canola oil (high in polyunsaturated fatty acids) Canoil brand that was purchased from a local supermarket. To filter, Whatman No. 41 brand filters were used; Amberlite XAD – 16 was used in the separation columns. All reagents used for primary and secondary oxidation analyzes (acetic acid, isooctane, potassium iodide, sodium thiosulfate, sodium laureate, starch indicator, tween 20, ethanol, and sodium hydroxide) were purchased from various commercial sources.

Experimental methods

Extraction and purification of polyphenols from pomegranate peel

The extraction and purification was carried out according to the methodology reported by Ascacio-Valdés et al., (2013) with some modifications, from dehydrated and pulverized residues of pomegranate peel 40 grams of powdered sample was weighed into a container and 400 mL of water was added. For extraction, the mixture was heated at 60 °C for 30 min, and then filtered. After this, the obtained extract was taken to centrifugation for 2 min at 2000 rpm and vacuum filtered using filter paper (Whatman No. 41) to remove larger debris particles. The extraction process was applied 3 times to the same plant material. Afterward, purification was performed using a column packed with Amberlite XAD-16, previously washed with ethanol and then with distilled water. Two hundred mL of extract were emptied into the

column and a first wash with water was performed to discard undesirable compounds, then a wash with ethanol was performed to obtain a fraction rich in ellagitannins, and finally the recovery of the sample was carried out. The process was repeated until the desired volume was achieved. The purified sample was taken to a rotary evaporator to remove as much ethanol as possible, then placed in Petri dishes and dried in an oven at 50 °C for 48 h. Finally, the dried powder was recovered and stored in an aluminum-lined glass jar in a cool, dry place until use.

Characterization of polyphenols by HPLC

The analyzes of the fractions (200 ppm) were conducted according to the methodology of Aguilar-Zárate et al. (2017) by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), including an autosampler (Varian ProStar 410, Palo Alto, CA, USA), a ternary pump (Varian ProStar 230I) and a photodiode array detector (PDA) (Varian ProStar 330). Ten μL of sample was injected onto a Denali C18 column (150 mm $\times$ 4,6 mm, 3,1 μm , Grace, Columbia, MD, EE.UU.). The oven temperature was 30 °C. The eluent was a gradient of aqueous acetic acid (3%, v/v; solvent A) and acetonitrile (solvent B). Solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes. The flow rate was kept at 0.2 mL/min, and the elution of the phenolic compounds was monitored at 280 nm. Data processing was performed with the Workstation Multi instrument (V. 6.2). The following gradient was applied: initial, 3% B; 5-15 min, 16% linear B; 15-45 min, 50% linear B. The column was then washed and reconditioned.

Determination of ESI-MS parameters

A liquid chromatography ion trap mass spectrometer (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer) equipped with an electrospray ion source was used. Samples were submitted

in tandem from HPLC to ESI-MS. All MS experiments were performed in the negative mode $[\text{M-H}]^{-1}$. Nitrogen was used as the nebulization gas and helium as the buffer gas. The ion source parameters were nebulization voltage 5.0 kV and capillary voltage, and temperature were 90.0 V and 350 °C, respectively. Data was collected and processed with MS Workstation software (V 6.9). Full scan spectra were acquired in the range m/z 50-2000. Samples were first analyzed in full scan mode. MS/MS analyzes were performed on a series of selected precursor ions.

Oleogels development

The oleogels were prepared following the experimental design as in Table 1 by dispersing the percentage (w/w) of EC (3%, 6% or 12%) in vegetable oil and adding the correspondent pomegranate polyphenol amount (0.05%, 0.1% or 2%), to finally heat the solution at the respective temperature (140 °C, 150 °C or 160 °C). The mixture was heated for approximately two hours, in an oil bath inside an oven (Mettler UN30, Germany). Every 30 minutes the temperature of the oil bath was monitored and agitations of approximately 1 minute per glass were performed. When the time was up, they were placed in another incubator at 50 °C for cooling for 40 minutes, then tempered at room temperature (~ 25 °C) and finally stored in refrigeration (~ 4 °C) for 24 h.

Optimization of the development of the ethylcellulose oleogel with polyphenols

Table 1 shows the factors and levels that were used in the development of the oleogels. A Taguchi L9 array was used to investigate the effect of these factors in 9 runs, in order to find the combination of elements that gave us the most stable and reliable performance. The L9 orthogonal array was obtained using Statistica 7 software (Statsoft, OK, USA).

Table 1. Factors and their respective levels used to oleogel preparation.

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
Ethylcellulose %	3	6	12
pp-polyphenols %	0.05	0.1	0.2
Temperature °C	140	150	160

The experiments were performed combining the factors and levels according to the information presented in Table 2. As a response variable, the percentage of

inhibition of lipid oxidation was evaluated. For the statistical analysis of the results, the Statistica 7 software (Statsoft, OK, USA) was used, using the bigger model is better.

Table 2. Experimental matrix L9 of the Taguchi design.

No.	Ethyl cellulose	pp-polyphenols	Temperature
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

The experimental data were previously transformed using the signal/noise ratio (S/N) using equation 1. In the Taguchi design, the S/N ratio is the ratio of the mean (signal) to the standard deviation (noise), the result is a measure of performance that allows for choosing better levels of control (Minitab LLC, 2022).

$$S/N = -10 \log ((\sum 1/y^2)/n) \text{ (Eq. 1)}$$

Where γ represents the experimental value of oxidation inhibition and n the number of treatments analyzed. The contribution of each factor was estimated from the analysis of variance (ANOVA) using equation 2.

$$P = \frac{SSi}{SST} * 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Where SSi represents the sum of the squares of factor i and SST the sum of the total squares.

Determination of lipid oxidation

It has been reported that the amount of unsaturated fatty acids and their degree of unsaturation are the most important factors affecting oxidation and other aspects, such as the position of unsaturated fatty acids in the triacylglycerols and the presence of anti- and pro-oxidants controlling oxidation. As peroxides value and conjugated dienes are the indicators of primary oxidative reactions and are rapid and widespread techniques, they were performed in the present work.

Peroxidation

The presence of peroxides in the oleogels was determined using the AOCS acetic acid-isooctane method for quantification of peroxide values (PV) (AOCS official method Cd 8b-90), expressed in milliequivalents of active oxygen per kg of fat in the sample, that cause the oxidation of potassium iodide under the described working conditions. In a 250 mL flask, 50 mL of acetic acid-isooctane solution were added. Separately, 1g of oleogel was weighed and mixed in the previous solution, stirring constantly for one

minute, using a magnetic stir plate (Corning brand), until the sample was completely dissolved. Then, 0.5 mL of saturated potassium iodide solution was added to the same solution and stirring was continued. After 1 minute, 30 mL of distilled water were added, and the titration of this solution was carried out. A 25 mL burette (Pyrex brand) was used, which was calibrated with sodium thiosulfate and little by little aliquots were added to the flask until the yellow color of the iodide faded. At this point, 0.5 mL of sodium laurate and two drops of starch indicator were added. Titration was continued until complete discoloration of the solution. The results were calculated with equation 3 and reported in milliequivalents of peroxides present per kilogram of oleogel. All treatments were performed in triplicate.

$$IP = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{P} = mEq/Kg^{-1} \text{ (Eq. 3)}$$

Where, V is the volume of the spent thiosulfate solution, N is the normality of the thiosulfate solution, and P is the weight of the sample.

Conjugated dienes

Conjugated dienes determination in the oleogels were made using the methodology of Castro-López et al. (2019) with modifications. This test determines the ability and speed of the formation of substances to inhibit the generation of hydroxylated peroxides in the early stages of linoleic acid oxidation, accompanied by stabilization of the radical state via double-bond rearrangement (electron delocalization), which results in conjugated dienes. These relatively stable compounds absorb in the UV at 235 nm, and their absorption can be measured by spectrophotometric techniques to assess oxidation level (Javidipour et al., 2017). The sample was prepared by mixing 0.6 g of oleogel with 1.5 g of Tween 20 in 8 mL of ethanol and 1.5 mL of water. The

mixture was homogenized in a vortex and an aliquot of 250 μ L was extracted. Each aliquot was processed fresh as follows: a NaOH solution (1 mL, 0.1 M, in 10% ethanol, v/v) was added to stop the oxidation process; then ethanol (2.5 mL, 10%, v/v) was added to dilute the sample. Then, the absorbance of the samples at 235 nm was measured. Water was used as a blank and was processed in the same way as the aliquots in substitution of the oleogel sample. The percentage of inhibition of lipid oxidation was calculated with equation 4.

$$\text{Inhibition of lipid oxidation (\%)} = [(A - B_{24}) - (A - B_0)/A] \times 100 \text{ (Eq. 4)}$$

Where A is the absorbance of distilled water (as a control), B_{24} is the absorbance of the oleogel with the antioxidants and B_0 the gel control.

Infrared spectroscopy

In order to acquire information on the effect of pomegranate polyphenol extract at the molecular level in inhibiting the oxidation of oleogels, the infrared spectra of the samples previously selected in the Taguchi model were obtained. The Bruker Vertex 70 model infrared spectroscopy equipment (Bruker Optics, Billerica, MA, USA) was used. Spectras were detected in ATR-transmission mode, using the Vertex accessory, through 32 scans in the λ interval from 400 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} . Spectras were obtained using Opus 7.2 software (Bruker Optics, Billerica, MA, USA). The principle of infrared (IR) spectroscopy is to detect the absorption of light by a compound in the IR region of the electromagnetic spectrum. In order to absorb light, a molecule must have a bond within its structure that can exhibit what is known as a "dipole moment," meaning that the electrons within a bond are not shared equally. When energy is applied in the form of infrared radiation, it causes vibration between the atoms of the molecules,

and when a certain infrared frequency is applied, a natural frequency of vibration of the bonds that make up the molecule is expressed.

Determination of mechanical properties of the oleogels

Mechanical properties of the oleogels were evaluated as a first and fast indicator of texture quality of the materials developed, after the different processes to which were subjected. Determination was made using the compression technique in a TA.HD.plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). For this analysis, 20 mL of sample was prepared and poured into 40 mL Pyrex beakers. After 24 h of storage at 20 °C, texture analysis was performed using the cylindrical geometry of stainless steel with a diameter of 20 mm and a height of 80 mm (P/20, Stable Micro Systems) to penetrate 30 mm into each tube with sample at a speed of 1 mm/s. The resulting force response was measured using Exponent software (Stable Micro Systems Ltd., 2000). 5 independent measurements were made at room temperature (~20 °C) and the results were statistically analyzed.

Statistical analysis

The results of all the measurements of each analysis were statistically analyzed by means of an ANOVA and the comparison between the respective means, using the STATISTICA version 7 software (Stat Soft, Tulsa, Oklahoma, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of polyphenols from pomegranate peel

The yield obtained from the extraction of polyphenols from pomegranate peel (pp-polyphenols) was 12%-14% for every 40 g of sample. Its composition was characterized by HPLC (Fig. 1) and the identified peaks were assigned to the corresponding compounds based on comparisons of data previously reported in the literature (P. Aguilar-Zárate et al., 2017; Fernandes et al., 2017; Hernández-Corroto et al., 2019). In Figure 1a 11 peaks can be seen, of which the signals of interest are: the first peak, at 781 m/z that corresponded to punicalin, peaks 2 and 3 at 1083 m/z that were identified as punicalagin α and β respectively and peak 4 at 799 m/z was ellagic acid derivatives. It is important to note that punicalagin was the main compound identified and in the highest proportion in pomegranate peel followed by its derivatives (i. e., punicalin, gallic acid, ellagic acid, and ellagic acid glycosides). These findings were similar to the P. Aguilar-Zárate et al., (2017) and Çam & Hişil (2010). In Fig.1 peaks 5, 6, 7, and 8 were the ones obtained in the least quantity, these correspond to pedunculagin II (ion 785 m/z), galloyl-HHDP-hexoside (ion 633 m/z), acid ellagic-hexoside (ion 463 m/z) and the last peak was not identified. Finally, in peaks 9, 10 and 11 grenatine B (ion 951 m/z), ellagic acid-deoxyhexoside (ion 447 m/z) and ellagic acid (ion 301 m/z) were detected, respectively, in agreement with the studies made by Fernandes et al. (2017), P. Aguilar-Zárate et al. (2017), Fischer et al. (2011) y Kharchoufi et al. (2018). However, due to the low yields obtained with the technique used for the punicalagin separation, it was decided to use the total polyphenols, assuming that punicalagin was the compound with the highest concentration, as shown in Fig. 1.

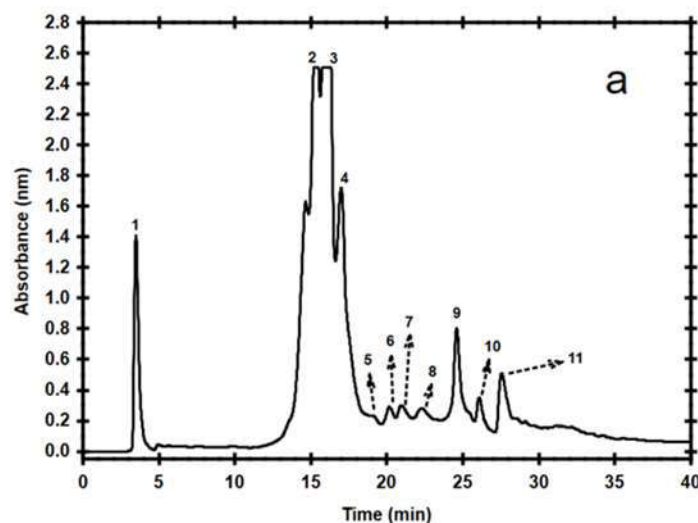


Figure 1. Polyphenols profile identified from pomegranate peel, obtained using HPLC.

Conditions selected to prepare EC oleogels added with pomegranate peel polyphenols

The selection of the adequate conditions to formulate an ethylcellulose (EC) oleogels, added with pomegranate peel polyphenols (pp-polyphenols) as antioxidant agent, was made after analyzing the 9 treatments established in the Taguchi design (Table 2). The results are shown in Table 3, where is observed for each treatment, the percentage

of oxidation inhibition, and their respective signal/noise ratio (S/N) resulting from the combination of factors (EC, pp-polyphenols, and temperature). The determination of oxidation in this stage was performed using conjugated dienes technique, because it has been suggested as a better marker of oxidative deterioration than hydroperoxides at higher levels of heat exposure of vegetable oils (Dostálová et al., 2005; Javidipour et al., 2017).

Table 3. Results of the experimental matrix L9 of the Taguchi design on the inhibition of lipid oxidation.

Treatment	Inhibition of lipid oxidation (%)	Signal/noise ratio (S/N)
1	4.00 ± 0.71	11.97
2	30.95 ± 3.37	29.78
3	83.33 ± 6.43	38.40
4	24.62 ± 8.70	27.54
5	29.22 ± 6.46	29.20
6	23.13 ± 1.06	27.28
7	50.81 ± 3.42	34.10
8	79.66 ± 0.00	38.02
9	0.00 ± 0.00	-80.00

The results showed that treatments 3 (3% EC, 0.2% pp-polyphenols, 160 °C) and 8 (12% EC, 0.1% pp-polyphenols, 140 °C) had the best effects with 83% and 79% inhibition of oxidation, respectively. With these

treatments, a high value in the signal/noise ratio (S/N) was obtained (Table 3), which implied that the signal is much greater than the random effects of the noise factors (i.e., lipid oxidation). It was also observed that

under the conditions of treatment 3 it was possible to get a better dissolution of the system and consequently a gel with a visually homogeneous consistency was obtained, better than the produced with treatment 8, which had a slightly gritty feel to the touch. It is worth mentioning that for this last treatment a higher concentration of EC was being used and possibly the applied temperature did not allow the gelator completely dissolve during the treatment time, which is why cooling the solution resulted in a system with the consistency that was described above. This gave rise to the oleogel developed under treatment 3 being selected as the best. On the other hand, treatment 9 was the one that had 0% inhibition, this could be attributed to the high concentration of ethylcellulose used to make the gel (i. e., 12%) and to the fact that it was

not possible to achieve complete dissolution of this gelator agent (Marangoni, 2013).

Additionally, the optimal conditions were calculated to propose the most favorable results at which an effective inhibition of lipid oxidation was obtained. This was identified using the signal/noise ratio (i. e., the relation between means and standard deviations of the oxidation values). The results shown in Table 4 indicate that the best effect should be obtained using ethylcellulose and pp-polyphenols at level 2 (i.e., 3% and 0.1%, respectively) and at the selected temperature at level 3 (160 °C). These data coincide with the results obtained from the Taguchi L9 experimental matrix, except for the concentration of pp-polyphenols, which in the model turned out to be 0.05%.

Table 4. Effect of the factors in the calculated optimal conditions and in the established conditions.

<i>a) Optimal conditions</i>				<i>b) Stablished conditions</i>		
Factor	Level	Effect	Standard error	Level	Effect	Standard error
Ethylcellulose	2	10.64	15.90	1	9.35	15.90
pp-polyphenols	2	14.97	15.90	2	14.97	15.90
Temperature	3	16.54	15.90	3	16.54	15.90
Expected S/N		59.52			58.23	

Finally, it was decided to establish a level 1 for the EC factor, which corresponded to 3% (Table 4b), because an approximate signal/noise value was obtained with both levels analyzed (Table 4 a and b) and also considering that when using a lower concentration of gelator agent would reduce the cost of the product and avoid possible consequences that could arise from excessive intake of ethylcellulose (Chaves et al., 2018; Co & Marangoni, 2012).

The results of the experimental validation of the lipid inhibition, analyzed by the conjugated dienes technique, indicated that under the established conditions (Table 4 b), 90.4% ($\pm 4.37\%$) of the oxidation was

inhibited. In addition, a signal-to-noise ratio of 48.67 was obtained, which was much lower than statistically predicted (Table 4 a). Additionally, the presence of peroxides, products of the primary oxidation of lipids, in the samples that resulted from the determination of the optimal conditions for the development of oleogels was evaluated experimentally. In these determinations it was found that the peroxide index of an oleogel without and with pp-polyphenols (i. e., 5.41 ± 0.7 mEq/Kg y 5.62 ± 0.4 mEq/Kg, respectively) was statistically equal ($p > 0.05$). It is worth mentioning that the peroxide values that were identified in the developed oleogels are within the limits established in the standards (AOCS Cd-8b-90, 1996) and in

the acceptable quality range for vegetable oils (A. J. Gravelle et al., 2012, 2016). However, Javidipour et al., (2017) have observed that peroxide value is a reliable parameter to evaluate oxidative stability in vegetable oils kept at room temperature but not when they were heated at high temperatures due to the rapid transformation of the peroxides on secondary products. So, this technique could be questionable to be applied in this type of study and it would be necessary to reevaluate and analyze again in future investigations of EC oleogelled systems. Although, the results of the present work it could be said that under the established experimental conditions (Table 4 b) it was possible to obtain oleogels with lower oxidation values, regardless of whether or not pp-polyphenols were added. Other authors have reported favorable results when using phytochemicals as oxidation inhibitors during the development of oleogels. Shi et al. (2014) developed a bigel (mixture of a hydrogel with an oleogel), composed of tea-water/stearic acid-peanut oil polyphenols, in which the formation of peroxides was reduced by 60% by adding only 5% polyphenols to the system, compared to the control made up of peanut oil with stearic acid, where only the formation of peroxides was reduced by approximately 14% over 84 h. It was also shown that the concentration of tea polyphenols in bigel inhibited oxidation 2.5 times more compared to other chemically synthesized antioxidants (i. e., BHT and PG). Besides, Luo et al. (2019) developed an oleogel based on camellia oil structured with particles of tea polyphenol palmitate and citrus pectin and showed that the oleogelation of camellia oil with particles of Tp-palmitate (tea polyphenol-palmitate) and citrus pectin caused an inhibition in oxidation of liquid oil. These authors measured the oxidative effect at high temperature, heating camellia oil for 3 h obtaining its complete oxidation and deterioration, while the oleogel remained acceptable even after heating for 5 h. In this

paper, unlike those mentioned above, the studies were carried out after having stored the samples for 24 h at 4 °C and much lower antioxidant concentrations were used (i.e., 0.05% - 0.2%), which are within the range established by the regulations for the use of synthetic antioxidants (i.e., less than 200 ppm) in foods containing fats (U.S. Food and Drug Administration, 2020). It is worth mentioning that Kulkarni et al. (2007) had already reported punicalagin was effective in inhibiting lipid peroxidation of cholesterol, even was twice as effective as the synthetic antioxidant BHT ($36.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ and $86.32 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$ of peroxide content, respectively), using concentrations of 10-100 $\mu\text{M/mL}$. Also, in the study made by Alsufiani et al., (2020) was reported that punicalagin (600 ppm) had similar antioxidant effect than BHT (600 ppm) in canola oil stored during 60 days at room temperature. However, recently the application of some individual natural antioxidants has not been relevant in the edible oil industry, since the separation and purification of an antioxidant compound from a natural extract is not economical, however, these studies provide to the researchers with a better understanding of how phytochemicals act as antioxidants of lipid systems. On the other hand, although they are antioxidants of natural origin, which could be exempt from health risks, it has also been necessary to study whether the addition of polyphenols to edible oils causes alterations in the physicochemical properties of the product that contains them (Davidovich-Pinhas et al., 2014; Gravelle et al., 2012; Gravelle et al., 2014; Zetzl et al., 2014), as a result of its interaction with the molecules that make up the oil. An alternative method to study lipid degradation is FTIR and the investigation of the treated edible vegetable oils revealed that the heating oils caused significant changes in the intensities of their absorption bands and produced no shifts in the position of the bands. These changes have been attributed to the reduction in linoleic (18:2) and linolenic

(18:3) fatty acids content due to the oxidation. These differences are usually observed at $3600\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ (stretching mode of --OO--H , due to peroxides formation); 3006 y 1650 cm^{-1} (stretching of --CH in regions *cis* HC=CH y *cis* C=C); between $1800\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (strong vibration of carboxyl groups C=O , due to overlapping of the ester group band of triacylglycerols.) (Barriuso et al., 2013). To verify this, in the present work the infrared spectra of oleogels with and without pp-polyphenols were obtained (Figure 2) and it was observed that there was no difference in the intensity or in the length of the vibrations, that is, in both samples the spectras overlapped in the entire range of wavelengths detected, so it was not possible to conclude

any difference in the vibration bands of the functional groups that could reflect the presence of oxidation (Ismail et al., 1993; Ma et al., 2000; van de Voort et al., 1994). This could be attributed to the fact that the samples were analyzed a few hours after preparation (i. e., after 24 hours) and some authors have reported that the presence of oxidation in oils was more easily identified by IR in aged samples (Christy et al., 2003; Rusak et al., 2003). So, there will be needed more detailed FTIR studies to assess the long-term oxidation stability of EC oleogels added with pp-polyphenols and to identify possible synergistic effects between such polyphenols and the components of the oleogel (EC and canola oil constituents fatty acids).

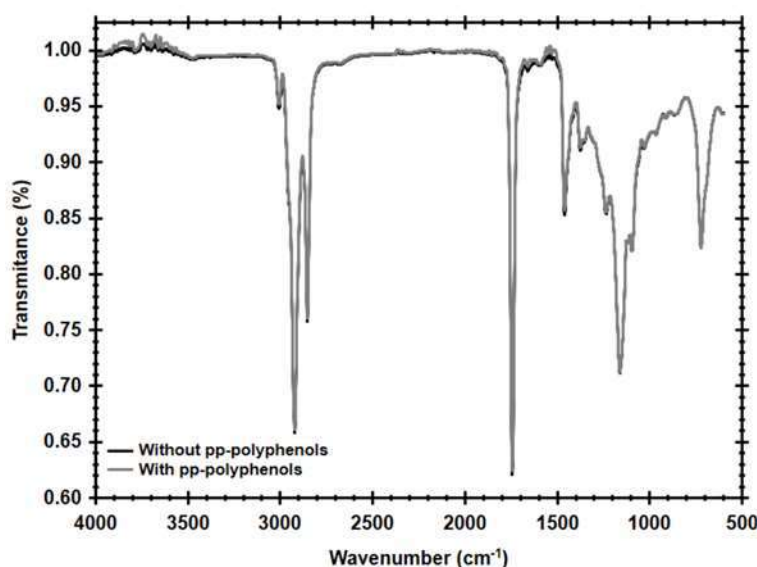


Figure 2. Infrared spectra identified in the oleogel samples with and without polyphenols, obtained at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ by ATR.

Mechanical properties of the oleogels developed

Mechanical properties were identified determining texture parameters (i. e., firmness, consistency and cohesivity) of EC oleogels with and without pp-polyphenols, that were formulated as the selected formulation as the better. The results indicated that both samples analyzed had statistically the same firmness, consistency

and cohesivity ($p > 0.05$), independently if was added with pp- polyphenols. This mean that the formulations and processing conditions selected (3% EC, 0.1% pp-polyphenols, $160\text{ }^{\circ}\text{C}$), and even the degree of oxidation caused during oleogel preparation, did not change the texture quality of the material developed. The importance of determining this properties in structured fats such as oleogels lies in knowing and comparing their mechanical behavior with

that of saturated, hydrogenated or partially hydrogenated fats that are on the market and are used for the industrial or artisanal production of various food products, such as chocolates, bakery products, in the

formulation of dairy products, in the preparation of sausages, among others (Davidovich-Pinhas et al., 2016; Rogers et al., 2014; Stortz & Marangoni, 2014; Zetzl et al., 2012).

Table 5. Texture parameters determined in oleogels without and with pp-polyphenols.

Sample	Firmness (g)	Consistency (g.s)	Cohesivity (g)
Without pp-polyphenols	390.28 ± 144.32 ^a	4614.07 ± 1619.39 ^a	-59.98 ± 7.55 ^a
With pp-polyphenols	456.24 ± 46.94 ^a	5012.48 ± 338.33 ^a	-63.13 ± 1.35 ^a

Superscript letters in each column indicate that the samples are statistically equal ($p > 0.05$).

CONCLUSIONS

In this study, under the selected temperature treatment (160 °C) and the addition of pomegranate peel polyphenols (0.05-0.1 %) as antioxidant to prepare oleogels with 3% of ethylcellulose, the primary lipid oxidation was maintained between the limits permitted by the standards and in the acceptable mechanical properties. It is likely that in order to alter the quality of these oleogels through lipid oxidation, it is necessary to storage the systems for long term periods of time, greater than the 24 hours that were applied in this study. As future research, it would be convenient to complement this work with the study of the effect of pp-polyphenols in ethylcellulose oleogels on lipid oxidation during the storage time. In addition, other detailed studies to explain the possible synergism between pp-polyphenols and the oleogel components are required to complement and understand the origin of the behaviors since molecular level to the macrostructure of the system, and finally this could permit to suggest possible applications of the EC oleogels developed and the use of the pp-polyphenols as natural antioxidants for this type of structured oily systems.

Acknowledgments

The authors thank to I.A. Marisol Dávila Martínez for the technical support in experiments performed in the Laboratory of

Food Physicochemistry of the Facultad de Ciencias Químicas of the Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Authors acknowledge to QFB. Miguel Gutiérrez and to DowDuPont for providing the ethyl cellulose used in the present work.

REFERENCES

- Aguilar-Zárate, M., Macias-Rodriguez, B. A., Toro-Vazquez, J. F., & Marangoni, A. G. (2019). Engineering rheological properties of edible oleogels with ethylcellulose and lecithin. *Carbohydrate Polymers*, 205, 98–105. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.10.032>
- Aguilar-Zárate, P., Wong-Paz, J. E., Michel, M., Buenrostro-Figueroa, J., Díaz, H. R., Ascacio, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., Gutiérrez-Sánchez, G., & Aguilar, C. N. (2017). Characterisation of Pomegranate-Husk Polyphenols and Semi-Preparative Fractionation of Punicalagin. *Phytochemical Analysis*, 28(5), 433–438. <https://doi.org/10.1002/pca.2691>
- Alsufiani, H., Mansouri, R., Almalki, A., Alsolami, A., Kuddah, L., Yamani, R., Alghashmari, N., & Omar, U. (2020). Effect of Punicalagin as natural antioxidant on the oxidative stability of Canola oil during storage. *Egyptian*

- Journal of Chemistry*, 63(6), 2369–2378.
<https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.23776.2436>
- Ascacio-Valdés, J., Burboa, E., Aguilera-Carbo, A. F., Aparicio, M., Pérez-Schmidt, R., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2013). Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisiphilitica* Zucc. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), 41–46.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60021-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60021-0)
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: A challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>
- Buenrostro, J., Sepúlveda, L., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Huerta, S., & Prado, A. (2017). Cáscara de granada como soporte para la producción de pectinasas. *XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170208144742>
- Çam, M., & Hişil, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878–885.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.011>
- Castro-López, C., Bautista-Hernández, I., González-Hernández, M. D., Martínez-Ávila, G. C. G., Rojas, R., Gutiérrez-Díez, A., Medina-Herrera, N., & Aguirre-Arzola, V. E. (2019). Polyphenolic profile and antioxidant activity of leaf purified hydroalcoholic extracts from seven Mexican *Persea americana* cultivars. *Molecules*, 24(1), 173.
<https://doi.org/10.3390/molecules24010173>
- Chaves, K. F., Barrera-Arellano, D., & Ribeiro, A. P. B. (2018). Potential application of lipid organogels for food industry. In *Food Research International* (Vol. 105, pp. 863–872). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.020>
- Christy, A. A., Egeberg, P. K., & Ostensen, E. T. (2003). Simultaneous quantitative determination of isolated trans fatty acids and conjugated linoleic acids in oils and fats by chemometric analysis. *Vibrational Spectroscopy*, 33, 37–48.
- Co, E. D., & Marangoni, A. G. (2012). Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(5), 749–780.
<https://doi.org/10.1007/s11746-012-2049-3>
- Coronado-Reyes, J. A., Tinoco-Salazar, J., Guisa-Morales, M. L., Cortés-Penagos, C. de J., & González-Hernández, J. C. (2020). Morphology about the varieties Mexican pomegranate fruit (*Punica granatum*) and its ripening stage. *Food Science and Technology, AHEAD*. <https://doi.org/10.1590/fst.28620>
- Davidovich-Pinhas, M., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2014). Physical structure and thermal behavior of ethylcellulose. *Cellulose*, 21, 3243–3255. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0377-1>
- Davidovich-Pinhas, M., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2016). Development, Characterization, and Utilization of Food-Grade Polymer Oleogels. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 7, 65–91.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033225>

- Davidovich-Pinhas, M., Gravelle, A. J., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2015). Temperature effects on the gelation of ethylcellulose oleogels. *Food Hydrocolloids*, 46, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.030>
- Dostálová, J., Hanzlík, P., Réblová, Z., & Pokorný, J. (2005). Oxidative Changes of Vegetable Oils during Microwave Heating. *Czech J. Food Sci*, 23(6), 230–239.
- Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D. M., González-Álvarez, J., & Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1799–1814. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2884-4>
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, 127(2), 807–821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>
- Giamogante, F., Marrocco, I., Cervoni, L., Eufemi, M., Chichiarelli, S., & Altieri, F. (2018). Punicalagin, an active pomegranate component, is a new inhibitor of PDIA3 reductase activity. *Biochimie*, 147, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.008>
- Gravelle, A. J., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2012). Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation. *Food Research International*, 48, 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.020>
- Gravelle, A. J., Davidovich-Pinhas, M., Zetzl, A. K., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2016). Influence of solvent quality on the mechanical strength of ethylcellulose oleogels. *Carbohydrate Polymers*, 135, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.050>
- Gravelle, A. J., Barbut, S., Quinton, M., & Marangoni, A. G. (2014). Towards the development of a predictive model of the formulation-dependent mechanical behaviour of edible oil-based ethylcellulose oleogels. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.036>
- Hernández-Corroto, E., Marina, M. L., & García, M. C. (2019). Extraction and identification by high resolution mass spectrometry of bioactive substances in different extracts obtained from pomegranate peel. *Journal of Chromatography A*, 1594, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.018>
- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., Emo, G., & Sedman, J. (1993). Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/BF02552703>
- Javidipour, I., Erinc, H., Baştürk, A., & Tekin, A. (2017). Oxidative changes in hazelnut, olive, soybean, and sunflower oils during microwave heating. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1582–1592. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1214963>
- Kharchoufi, S., Licciardello, F., Siracusa, L., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia,

- C. (2018). Antimicrobial and antioxidant features of 'Gabsi' pomegranate peel extracts. *Industrial Crops and Products*, 111, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>
- Kulkarni, A. P., Mahal, H. S., Kapoor, S., & Aradhya, S. M. (2007). In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1491–1500. <https://doi.org/10.1021/JF0626720>
- Laredo, T., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2011). Molecular interactions of polymer oleogelation. *Soft Matter*, 7, 2734–2743. <https://doi.org/10.1039/c0sm00885k>
- Li, L., Wan, W., Cheng, W., Liu, G., & Han, L. (2019). Oxidatively stable curcumin-loaded oleogels structured by β -sitosterol and lecithin: physical characteristics and release behaviour in vitro. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 2502–2510. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14208>
- López-Martínez, A., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M. A., Marangoni, A. G., & Toro-Vazquez, J. F. (2014). Comparing the crystallization and rheological behavior of organogels developed by pure and commercial monoglycerides in vegetable oil. *Food Research International*, 64, 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.029>
- Luo, S. Z., Hu, X. F., Jia, Y. J., Pan, L. H., Zheng, Z., Zhao, Y. Y., Mu, D. D., Zhong, X. Y., & Jiang, S. T. (2019). Camellia oil-based oleogels structuring with tea polyphenol-palmitate particles and citrus pectin by emulsion-templated method: Preparation, characterization and potential application. *Food Hydrocolloids*, 95, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.016>
- Ma, K., Van De Voort, F. R., Ismail, A. A., Zhuo, H., & Cheng, B. (2000). Monitoring peroxide value in fatliquor manufacture by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2000 77:6, 77(6), 681–685. <https://doi.org/10.1007/S11746-000-0109-2>
- Marangoni, A. (2013). *Gelificación de polímeros de aceites* (Patent No. ES 2 437 394 T3). Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Mattice, K. D., & Marangoni, A. G. (2018). Oleogels in food. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 255–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21662-4>
- Minitab LLC. (2022). *Minitab Support*. Web Page. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/taguchi-designs>
- Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, Á., Vázquez-Araújo, L., Pérez-López, A. J., Frutos-Fernández, M. J., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2015). Processing Pomegranates for Juice and Impact on Bioactive Components. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 629–636). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00076-7>
- Qu, W., Li, P., Hong, J., Liu, Z., Chen, Y., Breksa, A. P., & Pan, Z. (2014). Thermal stability of liquid antioxidative extracts from pomegranate peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 1005–1012. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6361>

- Quirós Fernández, R., & López Plaza, B. (2017). *Estudio de intervención nutricional para evaluar el efecto de la suplementación oral con hidroxitirosol y punicalagina sobre diferentes marcadores tempranos de la aterosclerosis en sujetos de mediana edad, aparentemente sanos sin enfermedad cardiovascular* [UAM. Departamento de Química Física Aplicada; Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de La Paz (IdiPAZ)]. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/680393>
- Ramírez-carrasco, P., Paredes-toledo, J., Romero-hasler, P., Soto-bustamante, E., Díaz-calderón, P., Robert, P., & Giménez, B. (2020). Effect of adding curcumin on the properties of linseed oil organogels used as fat replacers in Pâtés. *Antioxidants*, 9(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/antiox9080735>
- Rogers, M. A., Strober, T., Bot, A., Toro-Vazquez, J. F., Stortz, T., & Marangoni, A. G. (2014). Edible oleogels in molecular gastronomy. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2014.05.001>
- Rusak, D. A., Brown, L. M., & Martin, S. D. (2003). Classification of Vegetable Oils by Principal Component Analysis of FTIR Spectra. *Journal of Chemical Education*, 80(5), 541–543. <https://doi.org/10.1021/ED080P541>
- Shi, R., Zhang, Q., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Preparation of organogel with tea polyphenols complex for enhancing the antioxidation properties of edible oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8379–8384. <https://doi.org/10.1021/jf501512y>
- Singh, A., Auzanneau, F.-I., & Rogers, M. A. (2017). Advances in edible oleogel technologies – A decade in review. *Food Research International*, 97(May), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.022>
- Stortz, T. A., & Marangoni, A. G. (2014). *Ethylcellulose-Stabilized Heat Resistant Chocolate* [University of Guelph, ON, Canada]. https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/8310/Stortz_Terri_201408_PhD.pdf?sequence=1
- Taghvaei, M., & Jafari, S. M. (2015). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1272–1282. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1080-1>
- U.S. Food and Drug Administration. (2020). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>
- van de Voort, F. R., Ismail, A. A., Sedman, J., Dubois, J., & Nicodemo, T. (1994). The determination of peroxide value by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(9), 921–926. <https://doi.org/10.1007/BF02542254>
- Villeneuve, P., Bourlieu-Lacanal, C., Durand, E., Lecomte, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2021). Lipid oxidation in emulsions and bulk oils: a review of the importance of micelles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2006138>
- Young, J. E., Pan, Z., Teh, H. E., Menon, V.,

- Moderegger, B., Pesek, J. J., Matyska, M. T., Dao, L., & Takeoka, G. (2017). Phenolic composition of pomegranate peel extracts using an liquid chromatography-mass spectrometry approach with silica hydride columns. *Journal of Separation Science*, 40(7), 1449–1456.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201601310>
- Zetzl, A. K., Gravelle, A. J., Kurylowicz, M., Dutcher, J., Barbut, S., & Marangoni, A. G. (2014). Microstructure of ethylcellulose oleogels and its relationship to mechanical properties. *Food Structure*, 2, 27–40.
<https://doi.org/10.1016/j.foostr.2014.07.002>
- Zetzl, A. K., Marangoni, A. G., & Barbut, S. (2012). Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters. *Food and Function*, 3(3), 327–337.
<https://doi.org/10.1039/c2fo10202a>



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Extracción y caracterización parcial de polifenoles de cáscara, semilla y cotiledón de mango Ataulfo

Extraction and partial characterization of polyphenols from mango Ataulfo peels, seed, and kernel

González-Sosa, A.^a, Martínez-Ávila, G.C.G.^a, Medina-Herrera, N.^a, Tafolla-Arellano, J.C.^b, Rojas-Molina, R.^{a*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda el Canadá, 66054. Tel. (81) 1340 4399.

^b Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, Coah.

andres.gonzalezss@uanl.edu.mx; guillermo.martinezavil@uanl.edu.mx; nancy.medinahr@uanl.edu.mx;

jtafare@uaaan.edu.mx; ^{*}romeo.rojasmln@uanl.edu.mx

Innovación tecnológica: aprovechamiento integral de mango.

Área de aplicación industrial: revalorización de residuos agroindustriales.

Recibido: 11 junio 2022

Aceptado: 14 noviembre 2022

Abstract

Mango processing residues (peels, kernel and seed) have little application because they are discarded or used as food feed. However, they have been reported to be potential sources of bioactive compounds. The peel has been the most studied, however, for the Ataulfo variety, the kernel and the seed have been little used, which is why it represents a viable alternative for its revaluation. Pectin recovery conditions were using a 1:40 weight/volume ratio and polyphenols using a 0.20 g/mL ratio. Proximal characterization was performed according to AOAC, antioxidant capacity, and FT-IR ATR in accordance with previous reports. The mango peel is the best source of polyphenols (58 mg/DM), being the polyphenols of the seed the ones with the highest antioxidant capacity (IC₅₀ 98.18 ppm) and with the FT-IR ATR a reduction in the intensity of the absorbances (region 1610-1575, 1400-1300 and 1070-1020 cm⁻¹), this is attributed to the recovery of phenolic compounds and pectin from the residues. Therefore, the seed, the stone and the shells are a potential source of bioactive compounds that can have multiple applications.

Keywords: pectin, DPPH^{*}, FT-IR, proximal analysis, Ataulfo.

Resumen

Los residuos del procesamiento de mango (cáscaras, cotiledón y semilla) tienen poca aplicación debido a que se descartan o son usados como piensos alimentarios. Sin embargo, se ha reportado que son fuente potencial de compuestos bioactivos. La cáscara ha sido el más estudiado, sin embargo, para la variedad Ataulfo el cotiledón y la semilla ha sido poco aprovechada por lo que representa una alternativa viable para su revalorización. Las condiciones de recuperación de pectina fueron usando una relación 1:40 peso/volumen y los polifenoles usando una relación 0.20 g/mL. La caracterización proximal se realizó de acuerdo con la AOAC, la capacidad antioxidante y FT-IR ATR de acuerdo con reportes previos. La cáscara de mango es la mejor fuente de polifenoles (58 mg/cáscara), siendo los polifenoles de la semilla los que tienen mayor capacidad antioxidante (IC₅₀ 98.18 ppm), con el FT-IR ATR se observa una reducción en la intensidad de las absorbancias (región 1610-1575, 1400-1300 y 1070-1020 cm⁻¹), esto se atribuye a la recuperación de compuestos fenólicos y pectina de los residuos. Por ello, la semilla, el cotiledón y las cáscaras son fuente potencial de compuestos bioactivos que pueden tener múltiples aplicaciones.

Palabras clave: pectina, DPPH•, FT-IT, análisis proximal, Ataulfo.

I. Introducción

El mango (*Mangifera indica* L.) es una de las frutas más populares a nivel mundial debido a sus propiedades sensoriales y organolépticas [1]. En 2018, México ocupó el sexto lugar en producción de mango con un estimado de 436 millones de dólares [2]. La variedad Ataulfo (*Mangifera caesia* Jack ex Wall) tiene su centro de origen en México, específicamente en una región costera de Chiapas denominada Soconusco. Dicha región delimitada le otorga la protección de denominación de origen la cual asegura que el producto cumple con especificaciones que lo hacen único [3]. Además, tiene altos volúmenes de producción con un 30.29% de la producción total [4].

Su procesamiento en jugos, néctares, mermeladas, etc. es una de las alternativas más comunes [5-8]. Sin embargo, genera una gran cantidad de desperdicios (cáscara, cotiledón y semilla) de los cuales la cáscara y el cotiledón representan el 24% y 40%, respectivamente [9]. Adicionalmente, el escaldado de la pulpa y/o los residuos es de

suma importancia debido a la naturaleza del mango (climatérico) ya que sufre cambios enzimáticos provocando que se deteriore rápidamente [10]. La polifenol oxidasa (PPO), pectin metil esterasa (PME) y peroxidasa (POD) son las principales ya que POD participa parcialmente en reacciones de pardeamiento mediadas por peróxido de hidrógeno residual (H₂O₂) de los compuestos fenólicos oxidados por PPO [11]. Así mismo, la PME cataliza la esterificación dimetil la cual influye en las interacciones entre los componentes de la pared celular y modula la actividad de las hidrolasas de la pared celular, lo que hace que las pectinas sean más degradables por las enzimas pectinolíticas. Lo anterior provoca el ablandamiento y modifica la viscosidad de los productos alimenticios [12].

Aunado a lo anterior, esto toma relevancia en otras variedades de mango ya que el cotiledón y la semilla son una fuente potencial de antioxidantes, almidón, y fibra dietética [13-15]. Sin embargo, existe poca información respecto al mango Ataulfo. Dichos

compuestos (antioxidantes, principalmente) tienen diversas aplicaciones que van desde capacidad antioxidante ^[16], antifúngica ^[9,17], antidiabética ^[18], antiinflamatoria ^[19], entre muchas otras. Actualmente existen diversas metodologías para la recuperación de dichos compuestos, sin embargo, son metodologías específicas y de un solo propósito. Actualmente, existe solo un reporte donde recuperan pectina y polifenoles en un solo proceso ^[9] pero solo se enfoca al aprovechamiento de las cáscaras. Por ello, en el presente estudio se presenta el aprovechamiento de los residuos de mango Ataulfo (cáscara, semilla y cotiledón) como fuente potencial de compuestos fenólicos, así como su caracterización parcial como punto de partida.

II. Materiales y equipos

Etanol (E5325-17) grado analítico usado para la extracción. Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) (D9132-1G, Sigma-Aldrich Co®). La solución de radical DPPH fue preparada cada día que se usó, antes de cada determinación. Autoclave (All American, Modelo 25X), Estufa de secado (Riossa HCF-48), Molino (CGOLDENWALL 300g), Espectrómetro infrarrojo (Agilent Cary 600).

III. Métodos experimentales

Preparación de materia prima

Un lote de 25 kg de mango Ataulfo fue adquirido en la Central de Abastos San Nicolas de Los Garza, Monterrey, Nuevo León, México. Después fueron tratados de acuerdo con lo reportado por Rojas *et al.* ^[9] donde la cáscara se removió usando un cuchillo de acero inoxidable. Una vez obtenida la cáscara, se retiró la pulpa del mango para obtener la semilla. Ambos subproductos se escaldaron con vapor de agua a 105 °C/15 min para inactivar enzimas. Las cáscaras y las semillas de mango se secaron en un horno con aire a 60 °C/24 h, o

hasta una pérdida de peso del 80%. Después, la semilla seca se dividió en cotiledón y semilla. Se obtuvieron tres productos, cáscara, cotiledón y semilla; los cuales fueron molidas por separado. Se obtuvo un polvo fino por cada muestra molida y se almacenaron en bolsas de polietileno a una temperatura ambiente hasta su uso.

Extracción de polifenoles totales y pectina

El método utilizado fue establecido por Rojas *et al.* ^[9] con algunas modificaciones para polifenoles totales de la cubierta de semilla (PTC) y de las semillas (PTS). Las muestras deshidratadas y pulverizadas se colocaron en un vaso de precipitado en una proporción de 0.20 g/mL y se calentó a 60 °C/30 min ^[20]. Para extraer polifenoles totales y pectina de las cáscaras de mango (PTCM) se utilizó la metodología establecida por Contreras-Esquivel *et al.* ^[21]. La muestra deshidratada y pulverizada se hidrató con agua destilada en un matraz Erlenmeyer en una relación 1:40 (g/mL) la cual se calentó a 121 °C/20 min en una autoclave. Posteriormente, los extractos obtenidos se centrifugaron a 4000 rpm/30 min para eliminar las partículas de agua insolubles ^[22]. Para recuperar la pectina del sobrenadante obtenido de la cáscara de mango, se precipitó con alcohol absoluto en una relación 1:2 v/v. La pectina precipitada se separó del sobrenadante y ambos se calentaron a 50 °C/24 h para eliminar el agua destilada/alcohol absoluto residual; la pectina seca se recuperó como una masa sólida, la cual se trituró manualmente en un mortero y se almacenó en una botella ámbar a temperatura ambiente.

Después, el sobrenadante deshidratado de cáscara se re-suspendió en agua destilada (1:100 g/mL) y se realizó una cromatografía en columna utilizando Amberlita XAD-16. Primero, se usó agua como eluyente para descartar compuestos indeseables, y luego, se empleó alcohol absoluto como eluyente para

obtener los polifenoles totales. El etanol absoluto residual se eliminó colocando la fracción etanólica en placas Petri de vidrio a 60 °C/24 h; los polifenoles se recuperaron como un polvo fino y se almacenaron en un frasco ámbar a -20 °C hasta su uso ^[23]. El rendimiento se determinó gravimétricamente.

Análisis proximal

Para las muestras de cotiledón y semilla se determinó cenizas y grasa (942.05), fibra soluble e insoluble por los métodos enzimáticos gravimétricos (991.43) de acuerdo con lo establecido por la Association of Official Agricultural Chemists ^[24], el contenido de proteína bruta (PB) por titulación ^[25]. Los carbohidratos totales fueron obtenidos por la siguiente Ec. (1):

$$Ct = 100 - \% \text{ proteína} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ cenizas} \quad (\text{Ec. 1})$$

Espectroscopía infrarroja

Las muestras fueron analizadas usando un espectrómetro infrarrojo en modo de reflectancia total atenuada (ATR) con un accesorio de cristal de platino en el rango de número de onda: 4000-650 cm⁻¹ usando 32 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹. Antes del análisis, se registró un espectro de fondo de rayo abierto como un blanco.

Actividad antioxidante

Ensayo de actividad antioxidante por DPPH•

El método se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Philip ^[26]. Primero, se añadieron 193 µL de solución DPPH• (60 µM) a 7 µL de cada muestra en una microplaca. La microplaca se colocó en la oscuridad y después de 30 min se leyó la absorbancia (Abs) a 517 nm. Los controles contenían 7 µL de agua destilada. Las

concentraciones evaluadas serán 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de polifenoles en agua destilada para determinar la cantidad de compuestos fenólicos necesarios para inhibir el radical DPPH• en un 50% (IC₅₀). La capacidad de captación de radicales de los extractos se calculó usando la siguiente Ec. (2) y se expresó como el porcentaje de inhibición de DPPH•.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{[(\text{Abscontrol} - \text{Absmuestra})]}{\text{Abscontrol}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron como un diseño completamente al azar con el software Minitab (versión 17), mediante análisis de varianza. Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

IV. Discusión de resultados

Extracción de polifenoles totales y pectina

El rendimiento de polifenoles totales y pectina de semilla y cubierta se encuentran en la Tabla 1. El mango es una de las frutas de mayor distribución en el mundo. Se recuperó una mayor cantidad de polifenoles totales a partir de la cáscara seca (5.8%), seguido por la semilla seca (1.6%). Así mismo, diversos autores reportan contenido de polifenoles que va desde 9.18 a 91.21 mg/g de cáscara en 12 diferentes variedades de mango ^[27]. Para pectina otros autores han reportado valores de 9.38 g/g de cáscara seca de mango Ataulfo, así como valores de polifenoles totales de 72.61 mg/g cáscara seca ^[9]. Las variaciones en el contenido de polifenoles totales pueden deberse a las condiciones de cultivo y madurez del producto ^[28].

Tabla 1. Rendimiento de los polifenoles totales presentes en los subproductos del mango deshidratado y en rendimiento de pectina presente en la cáscara de mango (*Mangifera indica* var. Ataulfo)

Muestra	Rendimiento de polifenoles (mg/g MS)	Pectina (g/g 100 MS)
Cáscara de mango	58.0 ± 4.2 ^a	14.4 ± 1.4
Semilla de mango	15.8 ± 1.9 ^b	NA
Cotiledón de mango	8.3 ± 1.0 ^c	NA

Análisis proximal

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 2, se observa que el cotiledón y la semilla de mango Ataulfo tienen valores similares en su composición. Sin embargo, la semilla contiene mayor concentración de proteínas, mientras el cotiledón contiene mayor cantidad de carbohidratos. Otros autores han obtenido diferentes porcentajes de composición al analizar el cotiledón y la semilla de diferentes variedades de mango y de diferentes países de origen. Kaur *et al.* y

Mutua *et al.* ^[29,30] reportaron valores similares en los macronutrientes analizados en la semilla de mango deshidratado de origen indio y keniano; reportaron un promedio de 2.64 – 3.71% en cenizas, 6.8 – 9.2% en proteína cruda, 9.84 – 13.0% en grasas, 1.78 – 2.89% en fibra cruda y 72.86 – 76.81% de carbohidratos totales. Makris y Sahin ^[31] analizaron mango de origen etíopio donde reportaron un promedio de 2 – 3.5% en cenizas, 4.95 – 7.36% en proteína cruda, 2.32 – 4.86% en fibra cruda, 12.46 – 18.67% en grasas y 65.95 – 72.55% en carbohidratos.

Tabla 2. Análisis químico proximal de cotiledón y semilla del mango deshidratado (*Mangifera indica* var. Ataulfo).

Composición	Cotiledón (%)	Semilla (%)
Cenizas	1.57 ± 0.21 ^a	1.67 ± 0.49 ^a
Proteína	0.47 ± 0.06 ^a	1.04 ± 0.04 ^b
Grasas	2.53 ± 1.92 ^a	3.48 ± 0.80 ^a
Fibra cruda	3.53 ± 1.60 ^a	2.95 ± 0.09 ^a
Carbohidratos totales	91.90 ± 0.29 ^a	90.86 ± 0.47 ^b

Los valores del proximal del cotiledón y la semilla de mango observados en el presente estudio y literatura muestran una variabilidad. Sin embargo, el componente mayoritario son los carbohidratos, el cual se mantiene en la misma tendencia. Esta variabilidad se debe principalmente a que la composición nutricional depende de factores como la variedad del fruto, su madurez, localidad de cosecha, condiciones climáticas, el manejo postcosecha y el procesamiento industrial ^[32].

Espectroscopía infrarroja

Se realizó un análisis de FT-IR ATR para identificar los principales grupos funcionales presentes en los subproductos del mango Ataulfo. La Fig. 1 muestra los resultados de

la espectroscopia FT-IR del cotiledón antes de la extracción (CSM) y después de la extracción (CSMSP). A primera instancia se puede observar que ambas lecturas siguen el mismo patrón, sin embargo, la absorbancia es menor en la muestra CSMSP. Se pueden observar bandas que son características de la presencia de ciertos grupos funcionales que se encuentran en los fragmentos de lignina y hemicelulosa; como en la región 1610 – 575 cm⁻¹ que está asociada al grupo funcional de anillos aromáticos C=C y a la región 1400 – 1300 cm⁻¹ que está asociada al grupo funcional de compuestos fenólicos OH ^[33]. Además, en la región 1070 – 1020 cm⁻¹ se encuentra el pico con mayor absorbancia en cual pudiera corresponder a enlaces C-O de grupo alcohol y ácidos carboxílicos ^[34].

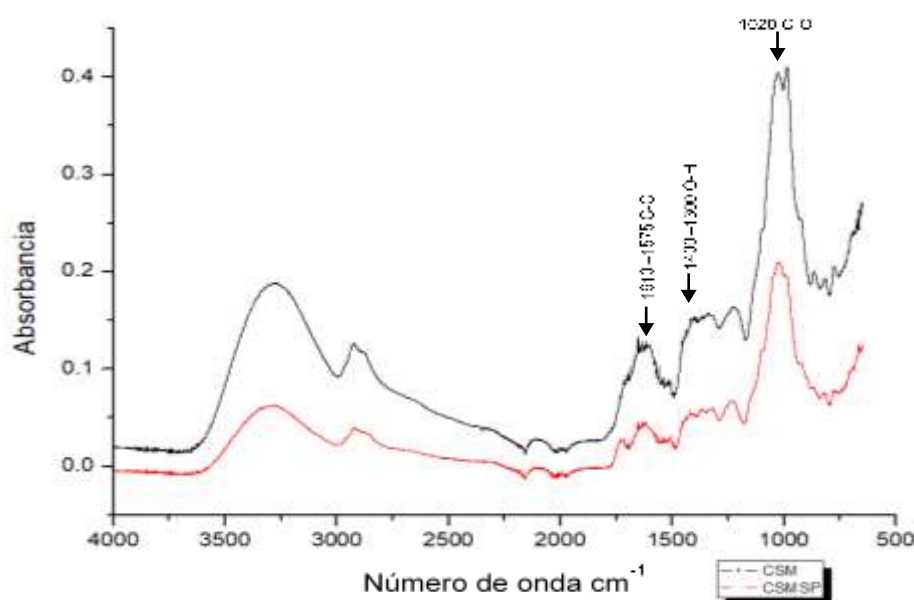


Figura 1. Comparativa de caracterizaciones de FT-IR ATR del cotiledón del mango antes de la extracción (CSM) y después de la extracción (CSMSP).

La Fig. 2 muestra los resultados de la espectroscopia FT-IR de la semilla del mango antes de la extracción (SPP) y después de la extracción (SP). Se detectaron los mismos picos de absorbancia que las muestras de cotiledón, sin embargo, hay una mayor intensidad en los picos de la región 1600-1200 cm^{-1} . Por otro lado, en la Fig. 3 se muestran los resultados de la espectroscopia FT-IR ATR de la cáscara del mango antes de

la extracción (CM) y después de la extracción (CMSPP). A primera instancia se puede observar que ambas lecturas siguen el mismo patrón y se asemejan a las lecturas de semilla y cotiledón. No obstante, se puede observar un pico en el número de onda 1300 cm^{-1} . Dicho pico pudiera corresponder a enlaces de grupo carboxilo, lo cuales corresponden a la posible presencia de pectina ^[34].

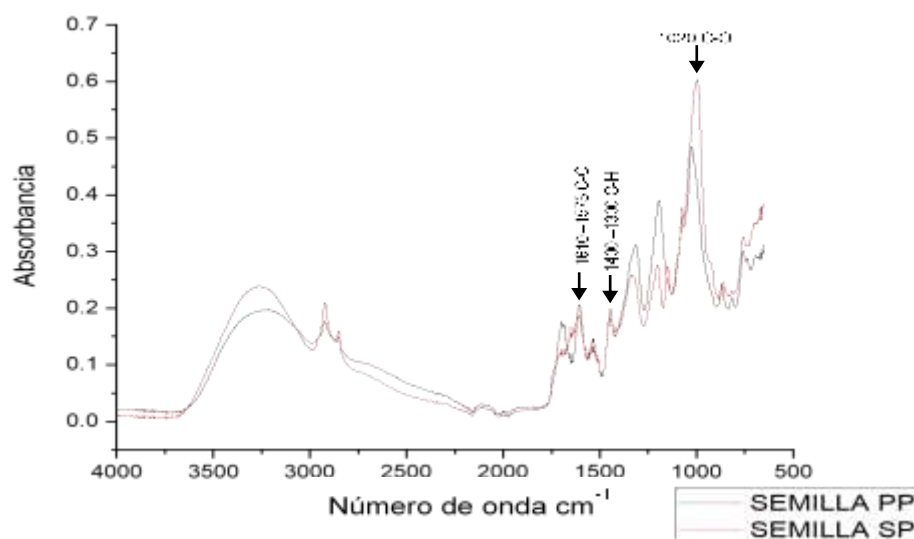


Figura 2. Comparativa de caracterizaciones de FT-IR ATR de la semilla del mango antes de la extracción (SEMILLA PP) y después de la extracción (SEMILLA SP).

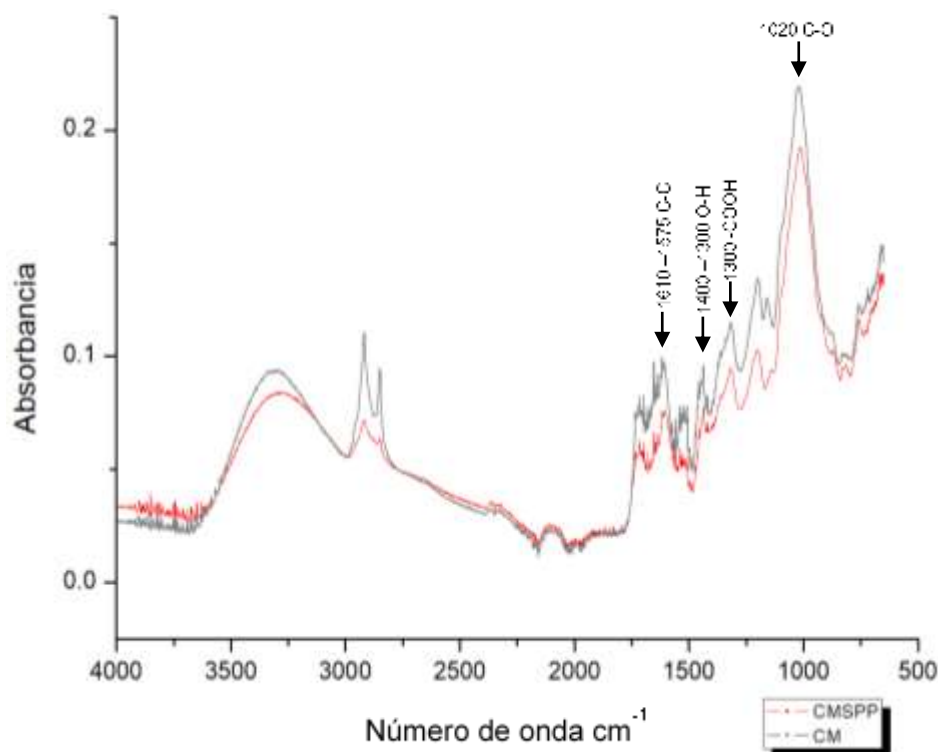


Figura 3. Comparativa de caracterizaciones de FT-IR ATR de la cáscara de mango antes de la extracción (CM) y después de la extracción (CMSPP).

Con base a la literatura, la espectroscopia FT-IR ATR se pudiera utilizar como un método para cuantificar o predecir el contenido de compuestos bioquímicos. Anjos *et al.* [35] propusieron una metodología para predecir el contenido de azúcares en muestras de miel utilizando en mayor medida las intensidades de absorbancias en la región 1500 a 750 cm^{-1} . Obtuvieron un modelo de calibración r^2 86.60 con una desviación de predicción residual de 2.6 para fructosa y glucosa. Por lo anterior, es probable que se pueda ajustar un modelo específico para la cuantificación de polifenoles y pectina en base a las absorbancias en regiones específicas.

Actividad antioxidante

El IC_{50} es la cantidad de antioxidantes necesarios para inhibir en un 50% los radicales libres presentes en la solución, en decir, mientras menos concentración de

antioxidantes sea necesaria para inhibir los radicales indica mayor potencial antioxidante. Los valores obtenidos se presentaron en IC_{50} y se presentan en la Tabla 3. Los polifenoles totales presentes en la semilla de mango fueron los que mayor actividad de inhibición presentaron, mientras que el cotiledón presenta una actividad aproximadamente de 15 veces menor que la semilla y cáscara. Rojas *et al.* [9] reportaron valores de IC_{50} entre 60 y 80 ppm de PT provenientes de la cáscara de mango Ataulfo utilizando la misma metodología de extracción de polifenoles y pectina. Estos valores tuvieron mayor actividad antioxidante que los resultados obtenidos. Por otro lado, Badee *et al.* [36] reportaron valores de inhibición ≈ 50 ppm (IC_{50}) de PT provenientes semilla de mango Zebdia. Estos valores son mayores de los obtenidos en el presente trabajo (IC_{50} 98.18 ppm).

Tabla 3. Concentración mínima de inhibición (IC₅₀) de polifenoles totales de los extractos de los subproductos del mango (*Mangifera indica* var. Ataulfo).

Muestra	DPPH (IC ₅₀), ppm de PT
Cáscara de mango	111.18 ± 4.84 ^b
Semilla de mango	98.18 ± 4.91 ^a
Cubierta de semilla de mango	1523.23 ± 68.89 ^c

V. Conclusión

Los resultados obtenidos en el análisis FT-IR ATR muestran la posible presencia de metabolitos (polifenoles y pectina), así como una posible disminución en las absorbancias por la extracción de estos (región 1610-1575, 1400-1300 y 1070-1020 cm⁻¹). La cáscara es la mejor fuente de compuestos fenólicos (58 mg/g MS), así como fuente de pectina. Sin embargo, los compuestos fenólicos de la semilla es la que presenta mayor capacidad antioxidante (IC₅₀ 98.18 ppm) por lo que las investigaciones deben dirigirse a la identificación de los polifenoles totales, así como su uso de los polifenoles totales como aditivos antioxidantes y antifúngicos naturales en los suplementos alimentarios.

VI. Agradecimientos

Al Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal por el financiamiento otorgado a través del proyecto B-S-65769.

Bibliografía

- Barrón-García, O. Y., Gaytán-Martínez, M., Ramírez-Jiménez, A. K., Luzardo-Ocampo, I., Velazquez, G., & Morales-Sánchez, E. (2021). "Physicochemical characterization and polyphenol oxidase inactivation of Ataulfo mango pulp pasteurized by conventional and ohmic heating processes". *LWT*, 143, 111113. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111113>
- FAOSTAT. (n.d.). Retrieved May 25, 2022, from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
- NOM-188-SCFI. (2012, November 29). *Mango Ataulfo del Soconusco, Chiapas (Mangifera caesia Jack ex Wall)-Especificaciones y métodos de prueba*. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5280541&fecha=29/11/2012#gsc.tab=0
- SIAP. (2022). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Lozano, E., Salcedo, J., & Andrade, R. (2020). "Evaluation of yam (*Dioscorea rotundata*) mucilage as a stabilizer in the production of mango néctar". *Heliyon*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04359>
- Huang, B., Zhao, K., Zhang, Z., Liu, F., Hu, H., & Pan, S. (2018). "Changes on the rheological properties of pectin-enriched mango nectar by high intensity ultrasound". *LWT - Food Science and Technology*, 91, 414-422. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.01.062>
- Ke, Y., Dai, T., Xiao, M., Chen, M., Liang, R., Liu, W., Liu, C., Chen, J., & Deng, L. (2022). "Industry-scale microfluidizer system produced whole mango juice: Effect on the physical properties, microstructure and pectin properties". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 75. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2021.102887>

8. Bekele, M., Satheesh, N., & J.A, S. (2020). "Screening of Ethiopian mango cultivars for suitability for preparing jam and determination of pectin, sugar, and acid effects on physico-chemical and sensory properties of mango jam". *Scientific African*, 7. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00277>
9. Rojas, R., Alvarez-Pérez, O. B., Contreras-Esquivel, J. C., Vicente, A., Flores, A., Sandoval, J., & Aguilar, C. N. (2020). "Valorisation of Mango Peels: Extraction of Pectin and Antioxidant and Antifungal Polyphenols". *Waste and Biomass Valorization*, 1(11), 89–98.
10. Marques Silva, F. V., & Sulaiman, A. (2019). "Polyphenoloxidase in Fruit and Vegetables: Inactivation by Thermal and Non-thermal Processes". *Encyclopedia of Food Chemistry*, 287–301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21636-3>
11. Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2014). "High-Pressure Inactivation of Enzymes: A Review on Its Recent Applications on Fruit Purees and Juices". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 578–596. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12071>
12. Hu, K., Dars, A. G., Liu, Q., Xie, B., & Sun, Z. (2018). "Phytochemical profiling of the ripening of Chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars by real-time monitoring using UPLC-ESI-QTOF-MS and its potential benefits as prebiotic ingredients". *Food Chemistry*, 256, 171–180. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.02.014>
13. Punia Bangar, S., Kumar, M., & Whiteside, W. S. (2021). "Mango seed starch: A sustainable and eco-friendly alternative to increasing industrial requirements". *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1807–1817. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.05.157>
14. Patiño-Rodríguez, O., Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., & Pacheco-Vargas, G. (2020). "Pulp and peel of unripe stenospermocarpic mango (*Mangifera indica* L. cv Ataulfo) as an alternative source of starch, polyphenols and dietary fibre". *Food Research International*, 138. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109719>
15. Lanjekar, K. J., Gokhale, S., & Rathod, V. K. (2022). "Utilization of waste mango peels for extraction of polyphenolic antioxidants by ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent". *Bioresource Technology Reports*, 18, 101074. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2022.101074>
16. Lanjekar, K. J., Gokhale, S., & Rathod, V. K. (2022). "Utilization of waste mango peels for extraction of polyphenolic antioxidants by ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent". *Bioresource Technology Reports*, 18, 101074. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2022.101074>
17. Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y. Y., Carle, R., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2009). "Antimicrobial Activity of Gallotannins Isolated from Mango (*Mangifera indica* L.) Kernels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 57(17), 7712–7718.
<https://doi.org/10.1021/JF901621M>
18. Ren, Y., Himmeldirk, K., & Chen, X. (2006). “Synthesis and structure-activity relationship study of antidiabetic penta-O-galloyl-D-glucopyranose and its analogues”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(9), 2829–2837.
https://doi.org/10.1021/JM060087K/SUPPL_FILE/JM060087KSI20060310_094101.PDF
19. Kang, D. G., Moon, M. K., Choi, D. H., Lee, J. K., Kwon, T. O., & Lee, H. S. (2005). “Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-d-glucose (PGG) via a nitric oxide–cGMP pathway”. *European Journal of Pharmacology*, 524(1–3), 111–119.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2005.08.061>
20. Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A., Martínez-Hernández, J. L., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2010). “Euphorbia antisiphilitica residues as a new source of ellagic acid”. *Chemical Papers*, 64(4), 528–532.
21. Contreras-Esquivel, J. C., Espinoza-Pérez, J. D., Montanez, J. C., Charles-Rodriguez, A. v, Renovato, J., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R., Wicker, L., Juan, C. C.-E., Judith, D. E.-P., Julio, C. M., Ana, V. C.-R., Jacqueline, R., Cristóbal, N. A., Raúl, R.-H., Louise, W., Contreras-Esquivel Juan, C., Espinoza-Pérez Judith, D., Montanez Julio, C., ... Wicker, L. (2006). “Extraction and Characterization of Pectin from Novel Sources”. In *Advances in Biopolymers* (Vol. 935, Issue 935, pp. 215–229). American Chemical Society.
<https://doi.org/doi:10.1021/bk-2006-0935.ch014>
22. Seeram, N., Lee, R., Hardy, M., & Heber, D. (2005). “Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry”. *Separation and Purification Technology*, 41(1), 49–55.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2004.04.003>
23. Hernández, M., Ventura, J., Castro, C., Boone, V., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J., & Martínez-Ávila, G. (2018). “UPLC-ESI-QTOF-MS2-Based Identification and Antioxidant Activity Assessment of Phenolic Compounds from Red Corn Cob (*Zea mays* L.)”. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1425, 23(6), 1425.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061425>
24. AOAC. (1984). Official methods of analysis (14th Ed.). In A. of O. A. Chemists. (Ed.), *Official methods of analysis (14th Ed.)*.
25. Kjeldahl, J. (1883). “Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern”. *Zeitschrift Für Analytische Chemie* 1883 22:1, 22(1), 366–382.
<https://doi.org/10.1007/BF01338151>
26. Philip, M. (2004). “The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
27. Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalter, B., &

- Owen, R. W. (2008). "Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5599–5610. <https://doi.org/10.1021/JF800738R>
28. Castro-Vargas, H. I., Vivas, D. B., Barbosa, J. O., Medina, S. J. M., Gutiérrez, F. A., & Parada-Alfonso, F. (2019). "Bioactive Phenolic Compounds from the Agroindustrial Waste of Colombian Mango Cultivars 'Sugar Mango' and 'Tommy Atkins'—An Alternative for Their Use and Valorization". *Antioxidants* 2019, Vol. 8, Page 41, 8(2), 41. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8020041>
 29. Kaur, A., Brar, J. K., & Journal, R. (2017). "Use of mango seed kernels for the development of antioxidant rich health foods FOOD SCIENCE". *Food Sci. Res. J*, 8(2), 368–374. <https://doi.org/10.15740/HAS/FSRJ/8.2/368-374>
 30. Mutua, J. K., Imathiu, S., & Owino, W. (2017). "Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel extracts". *Food Science & Nutrition*, 5(2), 349–357. <https://doi.org/10.1002/FSN3.399>
 31. Polyphenolic Antioxidants from Agri-Food Waste Biomass. (2020). *Polyphenolic Antioxidants from Agri-Food Waste Biomass*. <https://doi.org/10.3390/BOOKS978-3-03928-675-1>
 32. Lebaka, V. R., Wee, Y. J., Ye, W., & Korivi, M. (2021). "Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol. 18, Page 741, 18(2), 741. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18020741>
 33. Andrade, L. A., Barrozo, M. A. S., & Vieira, L. G. M. (2016). "Thermochemical behavior and product formation during pyrolysis of mango seed Shell". *Industrial Crops and Products*, 85, 174–180. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.03.004>
 34. Eitex, T. T. (2017). *Valorisation of Mango Fruit By-products: Physicochemical Characterisation and Future Prospect*. 50. www.iiste.org
 35. Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). "Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey". *Food Chemistry*, 169, 218–223. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.07.138>
 36. Badee, A., Moawad, R., ElNoketi, M., & Gouda, M. (2020). *Bioactive substances, antibacterial and antioxidant activities of mango kernel, olive and coriander leaves* | *Semantic Scholar*. <https://www.semanticscholar.org/paper/BIOACTIVE-SUBSTANCES%2C-ANTIBACTERIAL-AND-ANTIOXIDANT-Badee-Moawad/0c5704b16903b2f5484a53bd726837ffb0c351d9>



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Caracterización fisicoquímica de un polvo de *Ardisia compressa* Kunth usado para elaborar productos de panificación

Physicochemical characterization of a powder of *Ardisia compressa* Kunth used to manufacture bakery products

Vargas-Santos, R.L., Hilario-Medina, S., Torres-Rodríguez, A., Vázquez-Sánchez, A.Y.

Área Agroindustrial Alimentaria. Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez, Xicotepec de Juárez, Puebla, México.

rosylizzet.vargas@utxicotepec.edu.mx; hilariosilvestre3328@gmail.com; araceli.torres@utxicotepec.edu.mx; *alma.vazquez@utxicotepec.edu.mx

Innovación tecnológica: Productos alimenticios de panificación como alimentos funcionales.

Área de aplicación industrial: Áreas de industrias alimentarias.

Recibido: 02 junio 2022

Aceptado: 13 noviembre 2022

Abstract

The acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) is a wild shrub that grows in tropical and subtropical regions of the country. Various investigations have shown that the fruits have a high antioxidant capacity, related to their high content of anthocyanins and phenolic compounds. The main objective of this research was to look for consumption alternatives from the obtaining and physicochemical characterization of a powder of the dehydrated fruits of acáchul to later be used as an ingredient in the elaboration of two bakery products such as Polvorones and enriched integral biscuits. with amaranth flour, the experimental methodology consisted of pitting the fruit and separating the seed to dry separately, the pulp was placed in aluminum trays and dehydrated in a convection oven for 40 hours at 60 °C. The dehydrated pulp was ground in a blender until a homogeneous powder was obtained, which was preserved in the absence of light and humidity. The fruit and the dehydrated powder were characterized based on °Brix, pH, titratable acidity (TA), sugars and humidity. The dehydrated pulp was ground in the blender until obtaining a homogeneous powder, which was preserved in the absence of light and humidity, to proceed with the preparation of the bakery products, three formulations were made with different percentages of acáchul powder, in the case

of the integral cookies, 5.7% was used for formulation 1, formulation 2 (11.5%), formulation 3 (19.2%), respectively. For the acáchul Polvorones, test 3 was appropriate since it had a color and flavor characteristic of the fruit, and test 2 was accepted for the whole-grain cookies. A sensory analysis was carried out regarding the attributes: color, aroma, texture, and flavor (Sour and sweet) and overall satisfaction. In the case of the shortbread, a 95% overall acceptability was obtained in the good and excellent categories, and in the case of whole-grain cookies, an acceptability of 38%. These results show that the products were perceived by consumers with a high percentage of acceptance. Therefore, they represent a healthy option as functional foods and very promising consumption in the market.

Key Words: Acáchul (*Ardisia compressa* Kunth), physicochemical characterization, sensory evaluation.

Resumen

El acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) es un arbusto silvestre que crece en regiones tropicales y subtropicales del país. Diversas investigaciones han demostrado que los frutos poseen una alta capacidad antioxidante, relacionada con su alto contenido de antocianinas y compuestos fenólicos. El objetivo de esta investigación fue buscar alternativas de consumo a partir de la obtención y caracterización fisicoquímica de un polvo de los frutos deshidratados de acáchul para posteriormente ser utilizado como ingrediente en la elaboración de dos productos de panificación tales como los polvorones y galletas integrales enriquecidas con harina de amaranto, la metodología experimental consistió en deshuesar la fruta y separar la semilla para así secar por separado, la pulpa se colocó en charolas de aluminio y se introdujo en un horno de convección por 40 horas a 60 °C. La pulpa deshidratada fue molida en la licuadora hasta obtener un polvo homogéneo, el cual fue conservado en ausencia de luz y humedad. Se caracterizó al fruto y el polvo deshidratado con base a °Brix, pH, acidez titulable (AT), azúcares y humedad. En la elaboración de los productos de panificación se realizaron tres formulaciones con diferente porcentaje de polvo de acáchul, para los polvorones se utilizaron tres formulaciones: 1. PF1 (1.04%), PF2 (2.6%), PF3 (5.04%). En el caso de las galletas integrales se utilizó GIF1 (5.7%), GIF2 (11.5%), GIF3 (19.2%), respectivamente. Para los polvorones de acáchul la formulación PF3 fue la adecuada ya que tenía un color y sabor característico al fruto y en las galletas integrales la que tuvo mejor aceptación fue la formulación GIF2. Se realizó un análisis sensorial respecto a los atributos: color, aroma, textura y sabor (ácido y dulce) y la satisfacción global. En el caso de los polvorones se obtuvo un 95% en la aceptabilidad global en las categorías bueno y excelente mientras que para el caso de las galletas integrales fue una aceptabilidad del 38%. Estos resultados demuestran que los productos fueron percibidos por los consumidores con un gran porcentaje de aceptación. Por lo tanto, representan una opción saludable como alimentos funcionales y muy prometedor consumo en el mercado.

Palabras Clave: Acáchul (*Ardisia compressa* Kunth), análisis sensorial, caracterización fisicoquímica.

1. Introducción

El género *Ardisia*, es miembro de la familia de las Myrsinaceae, estos son arbustos de hoja perenne y árboles de las regiones tropicales y subtropicales del mundo [1]. El acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) conocido con ese nombre en la Sierra Norte del Estado de Puebla, México; es un arbusto silvestre que crece en regiones tropicales y subtropicales del país. Produce frutillas pequeñas de color morado intenso, con sabor agridulce, la brotación de flores ocurre en los meses de febrero y marzo, la cosecha se realiza en los meses de abril y junio. La semilla dentro del fruto es esférica y está rodeada por un endocarpio (almendra) que tiene un sabor amargo [1-3]. Diversas investigaciones han demostrado que los frutos poseen una alta capacidad antioxidante, relacionada con su alto contenido de antocianinas y compuestos fenólicos. Contiene compuestos polifenólicos como flavonoides, particularmente flavonoides glicosilados como el 3-O-glucósidos (quercetina 3-O-glucósido) y 3-O-rutinósidos (isorhamnetina-3-O-rutinosido) [2,4]. En Xicotepec, los frutos de acáchul son usados solamente para preparar algunos productos alimenticios artesanales como licores, paletas, atoles y mermeladas, aunque en otros lugares, también se consume como bebida refrescante y dulces [1, 5 - 6]. Actualmente, ha aumentado el interés por el uso de antocianinas y compuestos fenólicos para enriquecer nutricionalmente los alimentos, pero también por las propiedades que se reportan como actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, entre otras [7]. Actualmente, la ingesta de antocianinas se está incrementando en el consumo de la dieta diaria de manera significativa debido a que los extractos de jugos de frutas y vegetales con alto contenido de antocianinas están llegando a ser mucho más disponibles comercialmente, y los beneficios a la salud de las antocianinas han llegado a ser evidentes

[8]. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue buscar alternativas de consumo a partir de la obtención y caracterización fisicoquímica de un polvo de los frutos deshidratados de acáchul para posteriormente ser utilizado como ingrediente en la elaboración de dos productos de panificación tales como los polvorones y galletas integrales enriquecidas con harina de amaranto.

Clasificación taxonómica

Nombre científico: *Ardisia compressa* Kunth
En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica del acáchul que pertenece a la familia Myrsinaceae, del género *Ardisia* epíteto específico *compressa*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica.

Reino	Plantae
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Ericales</i>
Familia	<i>Myrsinaceae</i>
Género	<i>Ardisia</i>
Epíteto específico	<i>Compressa</i>

Una vez que la flor se seca da origen al fruto, que es de forma globosa, da un color rojo morado hasta negro en la madurez, su cascara es lisa y muy frágil, la pulpa es jugosa y tiene un diámetro aproximadamente de 12 mm, cuenta con una semilla que abarca hasta un 50% de su peso total (Figura 1). El sabor que tiene este fruto es agridulce y un poco astringente. La semilla dentro del fruto es esférica y está rodeada por un endocarpio (almendra) que tiene un sabor amargo, germina fácilmente, por lo que el árbol crece de manera silvestre [9].

Metabolitos y actividad antioxidante del fruto de acáchul

Debido a la falta de información de su riqueza en propiedades antioxidantes es poco consumido por la población, estas propiedades se asocian a su alto contenido de

antocianinas (570.35 mg cianidin-3-glucosido/kg b.s). En este sentido, se demostró que los frutos de acáchul presentan un alto contenido de fenoles totales (1051.3 ± 43.5 mg de equivalentes de ácido gálico / 100 g de fruto fresco), entre los que predominan las antocianinas (796.0 ± 2.3 mg de equivalentes de cianidina 3-O-glucósido / 100 g de fruto fresco) [2]. Entre las principales antocianinas identificadas destacan la malvidina-3-O-galactósido (35%), delphinidina 3-O-galactósido (28%) y petunidina 3-O-galactósido (19%). Otros polifenoles identificados incluyeron: flavonoles, flavan-3-oles (dímeros de

catequina y proantocianidina) y derivados de hidroxycinamoílo [2, 10]. La ingesta de los compuestos fenólicos en valores superiores de 600 mg/p/d tienen un efecto protector frente a las enfermedades crónicas degenerativas, por lo que ingerir cantidades suficientes de polifenoles en la dieta podría beneficiar de sus efectos positivos sobre la salud. A pesar de la relación de los compuestos fenólicos y su efecto benéfico para la salud, son necesarios más estudios que tengan en cuenta biodisponibilidad, absorción y el metabolismo de estos en el organismo humano [11].



Figura 1. Planta, frutos y semilla de acáchul. a) Planta, b) Racimo de frutos inmaduros, c) Racimo de frutos maduros, d) Frutos cosechados, e) Semilla y f) Diferentes estados de madurez del fruto.

Polvo de acáchul

Se elaboró un polvo de acáchul a partir de los frutos deshidratados que fue incorporado a láminas de fruta a base de manzana. El polvo de acáchul presentó una elevada concentración de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante [10].

2. Materiales y métodos

Los frutos se recolectaron de las cercanías de Xicotepec de Juárez, Puebla (-97.96 20° $16'$ $33''$ N, 97° $57'$ $36''$ O), altitud de 1,180 m.s.n.m., temperatura anual en un rango de

11 a 30°C , en estado de madurez comercial con apropiado desarrollo de color de fruto morado intenso y peso aproximado de 0.5 g. Se utilizaron 9.572 kg de fruta fresca y maduros de acáchul, se lavaron y desinfectaron con una solución de NaClO a 200 ppm durante 5 min y luego se enjuagaron con agua potable. Posteriormente, se realizó un deshuesado, de tal manera que se separa la pulpa del hueso para continuar con el procedimiento. Posteriormente, la muestra fue colocada en charolas de aluminio y secadas en un horno de convección de acero inoxidable (HC-35-CXL CORIAT) a una

temperatura de 60 °C por 40 horas. La pulpa y la cáscara deshidratada fueron molidas en una licuadora (Oster® BPMT02-BS0- 00) hasta obtener un polvo homogéneo, el cual se conservó en ausencia de luz y humedad hasta su utilización.

Para el análisis fisicoquímico se realizaron las siguientes pruebas:

Grados Brix (°Bx) se midieron con un refractómetro HANNA, modelo HI96801 según el método Refractométrico. Para la muestra en fresco, se utilizó el jugo del del fruto de acáchul para realizar la medición, para el polvo del acáchul deshidratado, se tomaron 1 g de muestra disueltos con 10 mL de agua destilada [12].

Determinación de pH se realizó conforme al método potenciométrico, se tomó 0.5 g del polvo en 50 mL de agua destilada previamente hervida y templada con 0.5 gramos de muestra, se rehidrató el polvo de acáchul y se filtraron. Para la medición se utilizó un potenciómetro marca HANNA 17 instruments HI2216, calibrando previamente con disoluciones buffers de pH 7.00, 4.00 y 10.0 a 25°C [12].

Determinación de acidez total titulable (AT) se realizó por titulación potenciométrica, usando una solución de NaOH 0.1N hasta un pH de 8.7 ± 0.2 según estandarización previa realizada en el laboratorio. El resultado obtenido se expresó como % de ácido cítrico [13].

Azúcares totales. Se tomaron muestras de 5 g del snack para hacer un macerado con agua destilada y clarificarlas con acetato de plomo a 45% y oxalato de potasio a 22%. El extracto se sometió a un procedimiento acidificación con HCl y una neutralización con NaOH al 40%, para causar inversión de azúcares y usar la mezcla resultante para titular también las soluciones de Fehling. En forma breve, se prepararon soluciones acuosas de Fehling de CuSO_4 y tartrato de sodio-potasio-NaOH, las cuales se mezclaron 5 mL de cada una, se

melaron y se agregaron 50 mL de agua destilada. El extracto se empleó, por un lado, para titular la mezcla de soluciones de Fehling y determinar contenido de azúcares reductores con base en la estandarización con glucosa de lo cual se determinó el contenido de azúcares totales. Finalmente, a partir de la diferencia entre azúcares totales y reductores, se obtuvo el contenido de azúcares no reductores. Los resultados se expresaron en gramos por cada 100 g de muestra [14].

Humedad. Para determinar la humedad se utilizó el método termogravimétrico, para lo cual se toma el peso inicial de una charola de aluminio, posteriormente esta se pone a peso constante, después se coloca la muestra y se pone a secar a 112 °C por 5 horas en la estufa a peso constante, una vez transcurrido el tiempo se pesó (Balanza analítica Mettler) y se calcula el % de humedad.

Formulación de polvorones empleando polvo de Acáchul

El polvo obtenido a partir de la deshidratación del polvo de acáchul, se utilizaron en diferentes proporciones en la formulación de los polvorones (Tabla 1). Partiendo de la formulación control de los polvorones, se reemplazó parte de la harina por el polvo de acáchul. Iniciando con la formulación de polvorones, donde se realizó un batido de la manteca vegetal, azúcar y huevos hasta la obtención una crema suave y ligera, para después integrar de forma homogénea la harina de trigo y posteriormente añadir el polvo de hornear y el polvo de acáchul y amasando hasta obtener una masa sólida. A continuación, se almacenó en el refrigerador durante 30 minutos a 4 °C. Por último, se realizó el cortado de la masa en porciones de 50 gramos para cada polvorón distribuyéndolo en charolas de acero inoxidable y se horneó a 180 °C durante 20 minutos.

Tabla 1. Formulación de polvorones con polvo de acácul.

Formulaciones	Harina de trigo (%)	Polvo de acácul (%)	Huevos (%)	Azúcar (%)	Polvo para hornear (%)	Manteca vegetal (%)
PControl	43.47	0	12	21.7	1.1	21.73
PF1	42.43	1.04	12	21.7	1.1	21.73
PF2	40.87	2.6	12	21.7	1.1	21.73
PF3	38.43	5.04	12	21.7	1.1	21.73

Formulación de galletas integrales empleando polvo de Acácul

De igual forma para las galletas integrales, se empleó el polvo obtenido a partir de la deshidratación del polvo de acácul, se utilizaron en diferentes proporciones (Tabla 2). Se llevó a cabo el batido de los huevos, azúcar y aceite en un bowl, después, se integraron todos los insumos secos como lo son la harina de amaranto, harina de trigo,

avena, polvo para hornear, polvo de acácul con la mezcla anterior. Posteriormente, se realizó el amasado hasta obtener una masa firme, acto seguido, se llevó a cabo el cortado de la masa en porciones de 50 gramos y la colocación sobre charolas de acero inoxidable, espolvoreado de las galletas con un poco de avena. Por último, el horneado a una temperatura de 180 °C durante 20 minutos.

Tabla 2. Formulación de galletas integrales con polvo de acácul.

Formulaciones	Harina de trigo (%)	Harina de amaranto (%)	Avena molida (%)	Polvo de acácul (%)	Huevos (%)	Aceite de oliva (%)	Azúcar (%)	Polvo para hornear (%)
Control	20.2	20.2	9.9	0	17.38	15.4	15.42	1.5
GIF1	17.85	17.85	8.9	5.7	17.38	15.4	15.42	1.5
GIF2	15.52	15.52	7.76	11.5	17.38	15.4	15.42	1.5
GIF3	12.45	12.45	6.2	19.2	17.38	15.4	15.42	1.5

Se llevó a cabo un análisis sensorial con un panel de 51 catadores no entrenados catadores en la comunidad del Porvenir, Xicotepec de Juárez, Puebla. La población de estudio para la prueba sensorial comprendió edades de 15 a 60 años. Se efectuó una prueba de aceptación. Para la realización de la cata de las muestras, se presentaron codificadas con números de 3 dígitos no consecutivos. Donde se tomaron en cuenta criterios físicos de los productos tales como el color, aroma, sabor y textura con una escala del 1 al 4 con respecto a las consideraciones malo, regular, bueno y excelente.

Análisis Estadístico

Se hicieron 3 réplicas experimentales por tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA (Análisis de varianza),

seguido de una prueba de rango múltiple de Tukey a un nivel de confianza del 95%, utilizando como paquete estadístico GradPad Prism versión 5. Los resultados fueron presentados como la media $\pm$ desviación estándar con una $p < 0.05\%$.

3.Discusión y resultados

Obtención del polvo de acácul y caracterización fisicoquímica

El acácul presenta propiedades similares a los berries, por tener un alto contenido en compuestos fenólicos. La propiedad funcional que posee el acácul es mayor que el arándano, fresas, zarzamora; esto puede deberse a la cantidad de compuestos activos como antocianinas y hasta veinte polifenoles no antocianinos [2]. Los compuestos polifenólicos identificados en frutos de

acáchul son flavonoides, particularmente flavonoides glicosilados como el 3-O-glucósidos (quercetina 3-O-glucósido) y 3-O-rutinósidos (isorhamnetina-3-O-rutinosido) [4]. Existe gran interés en estudiar los compuestos fenólicos debido a sus propiedades antioxidantes y los efectos benéficos en la salud. La diversidad de consumo de productos procesados a base de productos del fruto de acáchul en la región de Xicotepec de Juárez, es muy limitado además de ser un producto altamente perecedero. Por este motivo, se realizó la obtención del polvo del acáchul, donde se deshidrató 9.572 kg de fruta fresca, obteniendo un resultado del 5.5% de rendimiento del polvo deshidratado.

Los resultados obtenidos de la

caracterización fisicoquímica se resumen en la Tabla 3. El pH además de ser una medida de intensidad del sabor ácido de un producto es muy importante en el control del desarrollo de poblaciones de microorganismos y en la actividad de sistemas enzimáticos, reportaron un pH de 3.1 en el polvo de manzana, este valor es similar al obtenido con el polvo de los frutos de *Ardisia compressa* [15]. Por otro lado, se sabe que el pH en un sistema regula la presencia de sustancias en estado funcional, por lo que influye de manera directa en la actividad y estabilidad de los compuestos polifenólicos presentes en el jugo. Por lo tanto, los valores de pH en el jugo de *Ardisia compressa* Kunth favorecen la actividad de las antocianinas, ya que a pH alcalinos estos se degradan [12].

Tabla 3. Resultados del análisis fisicoquímico del fruto y polvo de acáchul.

Muestra	pH	SST	Acidez Titulable	Humedad	Azúcares
Fruta fresca	5.49 ± 0.07 a	4.94 ± 0.07 a	0.21 ± 0.02 a	96.52 ± 0.11 a	25.00 ± 0.71 a
Polvo	3.07 ± 0.02 b	17.25 ± 0.07 b	0.32 ± 0.02 b	19.71 ± 0.69 b	23.81 ± 0.96 a

Los valores representan el promedio de 3 determinaciones ± desviación estándar. Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05\%$) de acuerdo a Tuckey.

Los sólidos solubles totales del polvo de acáchul tuvo un valor de 17.25 ± 0.07 °Brix. Valores similares, se reportaron en acachul silvestre (18 °Brix) debido a la pérdida de agua en la deshidratación, en un proceso de maduración avanzado [16]. La acidez se expresó como porcentaje de ácido cítrico. Los valores de acidez titulable se relacionan con la calidad organoléptica, además el pH y la acidez no presentan una relación inversa como se esperaría debido a que existen otros ácidos que influyen sobre el pH. El porcentaje de humedad del polvo de acáchul fue de $19.71 \pm 0.69\%$, considerándose baja, por otro, se reportaron valores bajos de humedad en el polvo de acáchul [4] debido a que la determinación de este parámetro se realiza en

la mayoría de los alimentos por la determinación de la pérdida de masa que sufre un alimento cuando se somete a una combinación tiempo a una temperatura adecuada. El polvo de acáchul mostró porcentaje de azúcares totales del 23.81 ± 0.96 , este resultado podría relacionarse con la mayor cantidad de carbohidratos presentes en la muestra. Se reportaron valores que concuerdan con el polvo de fruto deshidratado acáchul [12].

Evaluación sensorial de los polvorones

Los resultados de la evaluación sensorial efectuada para los polvorones para la PF2 con 5.04% de polvo de acáchul, reflejan que tuvieron una aceptación favorable en

comparación con las demás formulaciones (Figura 2). En tal sentido, se observa que para el atributo color el mayor porcentaje lo tuvo el criterio bueno (53%), además, de un 45% para el criterio excelente, lo que significa que al 95% de los consumidores les agrada el color. En cuanto al aroma el mayor porcentaje fue del 60% para el criterio bueno, mientras que 27.5% de los consumidores lo clasificó como excelente. Para el atributo de textura, el

mayor porcentaje (57%) lo presentó el criterio bueno y el 35% fue evaluado como excelente. Por último, para el atributo del sabor, el 65% de los consumidores lo evaluó como bueno y el 30% como excelente. Esto significa que se obtuvo un polvorón con buenas características sensoriales, crujiente al momento de consumo y sabor característico al acáchul (agridulce).

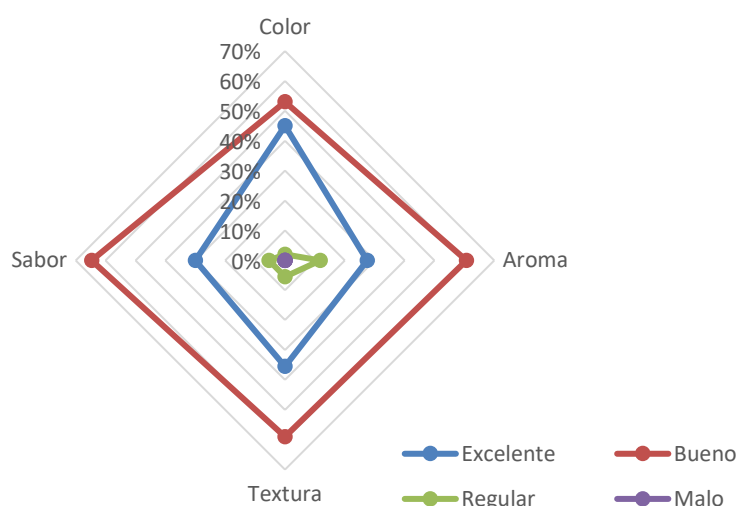


Figura 2. Análisis sensorial de los polvorones por grado de satisfacción por atributo.

En las Figura 3, respectivamente se observó la aceptabilidad global de la evaluación sensorial de los polvorones y de las galletas integrales de acáchul. En el caso de los polvorones, el 52% de los consumidores

evaluaron el producto como bueno, mientras que el 30% lo evaluó como excelente, resultando en un 82% de aceptabilidad del producto.

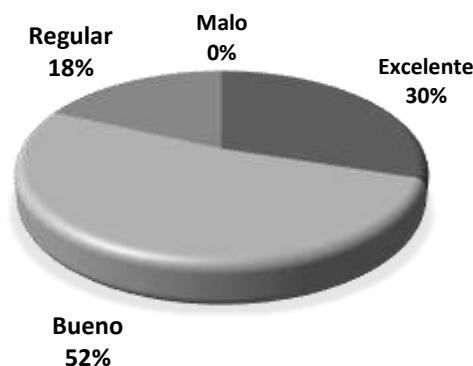


Figura 3. Porcentajes de aceptación global de los polvorones.

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación sensorial para las galletas integrales éstos reflejan que dicho producto tuvo una aceptación poco favorable en comparación con los polvorones (Figura 4). La formulación GIF2 con un 11.05% de polvo de acácul muestra el siguiente comportamiento en la evaluación sensorial. En este sentido, se observa que para el atributo color el mayor porcentaje fue el criterio de bueno (57%), mientras que el 35% de los consumidores evaluó el producto como excelente, lo que significa que el 92% le agrada el color ya que la corteza de la galleta se tornó un color morado oscuro, sin embargo, en el interior el color fue morado claro, lo cual es atractivo para el consumidor. En cuanto al aroma el mayor porcentaje obtenido fue del 41% para el criterio bueno. Para el atributo de textura, fue evaluado como bueno en un 52%.

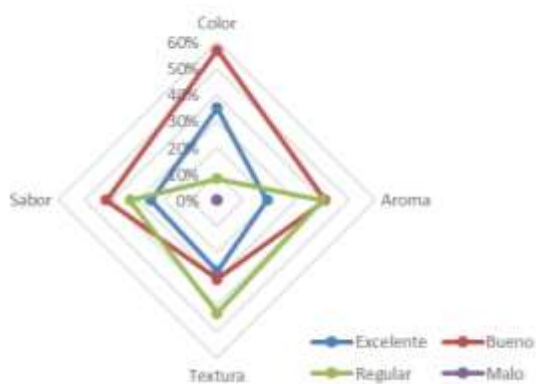


Figura 4. Análisis sensorial de las galletas integrales por el grado satisfacción por atributo.

En la Figura 5, se observa la aceptabilidad global de las galletas integrales, el 24% de los consumidores evaluaron al producto como bueno, mientras que sólo el 14% evaluó el producto como excelente, resultando sólo en un 38% de aceptabilidad global del producto. Esta aceptación global del producto pudo deberse a la resistencia que aun los consumidores tienen por los productos integrales y saludables. Por otro parte

encontraron que al incluir el 1% de polvo de acácul en las laminillas de frutas [10]. Presentaron una importante presencia de los compuestos fenólicos principalmente de antocianinas que son importantes fitoquímicos que aportan beneficios a la salud. En comparación con otros polvos de frutos de berries deshidratados. Además, la adición del polvo de acácul deshidratado promueve el efecto de la actividad antioxidante en los productos donde se incorpore en la formulación como ingrediente atractivo.

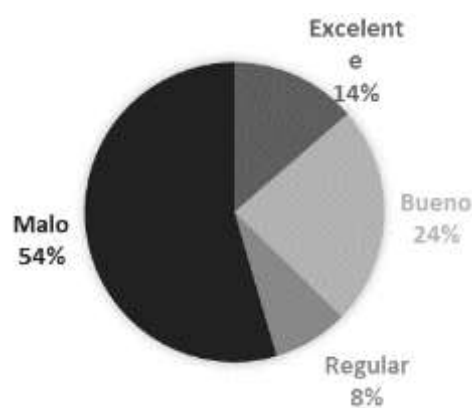


Figura 5. Porcentajes de aceptación global de las galletas integrales.

4. Conclusiones

De la presente investigación se concluye que es posible obtener polvo de acácul mediante un proceso de deshidratación con un 5.5% de rendimiento. Esta opción de conservación proporciona la oportunidad de aplicarlos en diferentes productos del área de alimentos, debido a que mantiene aún compuestos fenólicos benéficos para la salud en comparación de otros polvos berries deshidratados. Los resultados obtenidos en las pruebas fisicoquímicas sugieren que el polvo de acácul representa una buena opción para preservar la materia prima, estando disponible para su consumo durante todo el año. Además, representan una opción saludable como alimentos funcionales y muy prometedor para su consumo en el mercado, además de ser una alternativa como

ingrediente atractivo para otros productos de panificación. Para los polvorones de acácul la PF1 3 (5.04%) fue la adecuada ya que mostró un color y sabor característico al fruto por parte de los catadores mientras que en las galletas integrales se aceptó la GIF2 (11.5%). Concentraciones mayores a las mencionadas podrían influir en la presencia de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, en los polvorones y las galletas el color morado fue por la presencia de antocianinas en el polvo de acácul que son las encargadas de proporcionarles dicho color y no se hace uso de colorantes artificiales los cuales no contienen propiedades funcionales en su composición.

Agradecimientos

Agradecemos al III CNIBA (CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS).

Referencias

- [1] Heredia V. J. (2013). Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de polvos nanoestructurados de *Ardisia compressa* Kunth. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana de Ciencias Básicas. Xalapa, Veracruz, México.
- [2] Joaquín-Cruz E, Dueñas, Garcia-Cruz M, Salinas-Moreno Y, Santos Buelga C, García Salinas C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. Food Research International. Food Research International. HPLC–DAD–ESI-MS 70 (2015) 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.033>
- [3] López-Yerena A., Guerra-Ramírez, D., Vázquez-Sánchez, A., Y González- López, J. (2017). Determinación del potencial nutraceutico de frutos de *Ardisia compressa* K. colectados en Xicotepec de Juárez, Puebla. Revista de Sistemas Experimentales, 4(10), 49–56.
- [4] Vázquez-Sánchez AY, Aguilar-Zárate P, Muñiz-Márquez DB, Wong-Paz JE, Rojas R, Ascacio-Valdés JA, Martínez-Ávila GCG. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. Heliyon 18;5(12): e03058. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03058>
- [5] Lascurain, M., Avendaño, S.D., y Niembro, A. (2010). Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz, Conafor-Conacyt, México.
- [6] Vázquez-Sánchez AY y Gallardo-Sandoval A. (2020). Evaluación sensorial de láminas de frutas saludables a base de arándano y acácul. Red Iberoamericana de Academias de Investigación, A.C. Innovación en Biotecnología 2. México, D.F. México. 131-140.
- [7] Shih, P., Chan, Y., Liao, J., Wang, M., Yen, G., (2010). Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocynin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L) on senescence-acelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. J. Nutr. Biochem. 21, 598-605. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.03.008>
- [8] Aguilera-Otíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Biotecnia, 13(2), 16-22.
- [9] Kobayashi, H., & De Mejía, E. (2005). The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. Journal of

Ethnopharmacology, 96(3), 347-354.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.037>

[10] Vázquez-Sánchez AY, Corfield R, Sosa N, Salvatori D & Schebor C. (2021). Physicochemical, functional, and sensory characterization of apple leathers enriched with acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) powder. LWT -Food Science and Technology 146 (2021) 111472.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111472>.

[11] Navarro González, I., Periago, M. J., & García Alonso, F. J. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, 21(4), 320-326.

[12] Bautista - De León, H. y Torres-Rodríguez. A. (2020). Caracterización fisicoquímica de snacks de frutas de arándano – acáchul. Pp 141-154. Innovación en Biotecnología II. Editor Daniel Armando Olivera Gómez. Red Iberoamericana de Académias de Investigación A.C.

[13] Corona Leo, Lizbeth Sandra, Hernández-Martínez, Diana Maylet, & Meza-Márquez, Ofelia Gabriela. (2020). Análisis de parámetros fisicoquímicos, compuestos

fenólicos y capacidad antioxidante en piel, pulpa y fruto entero de cinco cultivares de manzana (*Malus domestica*) cosechadas en México. Biotecnia, 22(1), 166-174.

[14] Valle-Guadarrama, Salvador; Ruiz-Sánchez, Xóchitl G., Saucedo-Veloz, Crescenciano, Gómez-Cruz, Adalberto y Marroquín-Andrade, Lila M. 2012. Comportamiento postcosecha de frutos de ilama (*Annona diversifolia*) en madurez comestible almacenados en atmósfera modificada. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (Núm. Especial 5): 75-81.

[15] Millan, Cristobal, D.M. (2021). “Desarrollo de Láminas Frutales a Base de Manzana, Arándano y Acáchul. (Tesis Ingeniería en Biotecnología) Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez.

[16] Medina y Pagano, (2003). Elaboración de Láminas de Fruta a partir de Arándano (*Vaccinium corymbosum*) c.v.Elliot y Manzana (*Maluspumila* Mill.) c.v.Liberty. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería de Alimentos, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias Escuela De Ingeniería En Alimentos, Valdivia – Chile.