



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN  
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C**

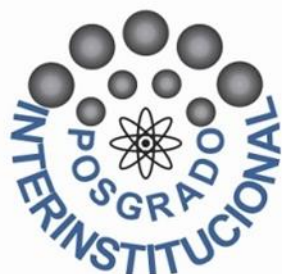
**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN DE  
EXTRACTOS DE POLIFENOLES Y ESTEVIÓSIDOS PARA SU  
APLICACIÓN COMO ADITIVOS EN LA INDUSTRIA  
ALIMENTARIA**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
EN LA ESPECIALIDAD DE PROCESOS  
AGROINDUSTRIALES**

**PRESENTA**

**M en C. ANA GABRIELA COVARRUBIAS CÁRDENAS**



**CIENCIA Y TECNOLOGIA**

**MÉRIDA, YUCATÁN. DICIEMBRE 2018.**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN  
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C**

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN DE  
EXTRACTOS DE POLIFENOLES Y ESTEVIÓSIDOS PARA SU  
APLICACIÓN COMO ADITIVOS EN LA INDUSTRIA  
ALIMENTARIA**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
EN LA ESPECIALIDAD DE PROCESOS AGROINDUSTRIALES**

**PRESENTA**

**M en C. ANA GABRIELA COVARRUBIAS CÁRDENAS**

**COMITÉ TUTORIAL**

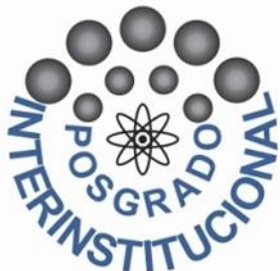
**DIRECTOR: DRA. NEITH ARACELY PACHECO LÓPEZ**

**CO- DIRECTOR: DRA. TERESA AYORA TALAVERA**

**CO- DIRECTOR: DR. HUGO ESPINOSA ANDREWS**

**ASESOR: DR. ULISES GARCÍA CRUZ**

**MÉRIDA, YUCATÁN. DICIEMBRE 2018.**



**CIENCIA Y TECNOLOGIA**

Mérida, Yucatán a 3 de diciembre de 2018

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO

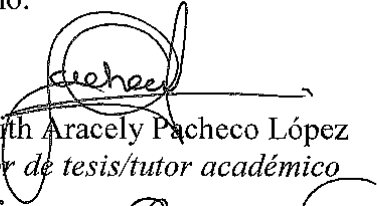
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE


Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Ana Gabriela Covarrubias Cárdenas**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS DE POLIFENOLES Y ESTEVIÓSIDOS PARA SU APLICACIÓN COMO ADITIVOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología en la especialidad de procesos agroindustriales durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 3 del mes de diciembre del año dos mil


dieciocho.




Dra. Neith Aracely Pacheco López  
*Director de tesis/tutor académico*



Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera  
*Co-director de tesis/tutor en planta*



Dr. Hugo Espinosa Andrews  
*Co-director de tesis/tutor en planta*



Dr. Norberto Ulises García Cruz  
*Asesor*



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho del Autor y la ley de la Propiedad Industrial le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollados pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de éste trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán, en todo caso por lo dispuesto por la ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

M en C. Ana Gabriela Covarrubias Cárdenas

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este proyecto con el número de asignación 441629, así como el apoyo para movilidad en el extranjero mediante la beca mixta.

Al fondo Sectorial de Investigación para la Educación: Secretaría de Educación Pública- Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT), por el financiamiento otorgado a través del proyecto Ciencia Básica: CB2015-01, Número 258118

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC (CIATEJ) por permitir hacer uso de las instalaciones y equipos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Neith Aracely Pacheco López por la dirección y coordinación de la tesis.

A la Dra. Teresa Ayora Talavera por la co-dirección de la tesis.

Al Dr. Hugo Espinosa Andrews por la co-dirección de la tesis.

Al Dr. Ulises García Cruz por su apoyo como asesor de la tesis.

A los técnicos del laboratorio de cromatografía Nelly Medina Torres y Jesus Alfonso Patrón.

Al Dr. Stéphane Trombotto por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Ingeniería de Materiales Poliméricos, en la Universidad Claude Bernard, Lyon Francia.

Al Dr. Laurent David, el Dr. Pierre Alcouffe, la Dra. Agnes Crepet y el Dr. Rubén Vera por las facilidades brindadas durante la estancia en Lyon, Francia.

A los miembros del comité sinodal conformado por el Dr. Erik Manuel Polanco Lugo, Dr. Jorge Ruiz Ruiz, Dr. Juan Carlos Bernardino Cuevas, Dra. Miriam Fabela Morón y Dr. Ulises García Cruz quienes enriquecieron la tesis con sus comentarios.

A todos mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo durante estos cuatro años, agradezco su apoyo y sobre todo su paciencia.

## DEDICATORIAS

A mi familia, por brindarme su apoyo en este y en todos los proyectos que me he propuesto realizar.

A mis amigos, por hacer mas gratos los momentos difíciles, por su apoyo y su paciencia.

## I. TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. Polifenoles .....	6
2.2. Métodos de extracción de polifenoles .....	6
2.3. Extracción asistida por ultrasonido .....	7
2.4. Variables implicadas en el rendimiento y extracción de polifenoles .....	8
2.5. Industria cítrica en México y Yucatán .....	9
2.6. Aprovechamiento de residuos cítricos para la obtención de polifenoles .....	9
2.8. Actividad antioxidante de polifenoles procedente de cítricos .....	11
2.9. Encapsulación de compuestos bioactivos .....	13
2.10. Secado por aspersión .....	14
2.11. Agentes encapsulantes .....	15
2.11.1. Quitosano .....	18
2.11.2. Goma arábica .....	18
2.11.3. Fructanos de agave .....	19
REFERENCIAS .....	20
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVO GENERAL .....	24
6.1. Objetivos específicos .....	24
CAPÍTULO 1: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL POLIFENÓLICO MEDIANTE UPLC- PDA ESI -MS DE EXTRACTOS DE <i>Citrus aurantium</i> OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO .....	
RESUMEN .....	25
7. INTRODUCCIÓN .....	26
8. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
8.1. Material vegetal y reactivos .....	27
8.2. Caracterización fisicoquímica .....	28
8.3. Evaluación de la extracción asistida por ultrasonido .....	28

8.4. Determinación de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante .....	28
8.5. Análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC–PDA y UPLC–PDA ESI–MS .....	29
8.6. Purificación parcial de compuestos fenólicos .....	30
8.7. Análisis estadístico .....	30
9. RESULTADOS .....	31
9.1. Análisis fisicoquímico de cáscaras frescas y secas de naranja agria .....	31
9.2. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.....	32
9.3. Análisis de la composición de compuestos fenólicos de extractos de cáscara seca de naranja agria mediante UPLC-PDA.....	35
9.4. Análisis UPLC-PDA ESI-MS.....	37
9.5. Análisis de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos parcialmente purificados....	39
10. CONCLUSIÓN .....	40
11. REFERENCIAS .....	41
CAPÍTULO 2: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL FENÓLICO MEDIANTE UPLC-PDA ESI-MS DE EXTRACTOS DE HOJAS SECAS DE <i>Stevia rebaudiana</i> OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO .....	
RESUMEN .....	44
12. INTRODUCCIÓN.....	45
13. MATERIALES Y METODOS.....	47
13.1. Material vegetal y reactivos .....	47
13.2. Cinética de secado.....	47
13.3. Contenido de fenoles totales y determinación de actividad antioxidante .....	47
13.4 Perfil y cuantificación de glicósidos de esteviol y fenoles mediante UPLC-PDA.....	49
13.5. Análisis mediante UPLC–PDA ESI–MS .....	50
13.6. Purificación parcial de compuestos fenólicos .....	50
13.7. Análisis estadístico .....	51
14. RESULTADOS .....	51
14.1 Cinética de secado de hojas de estevia.....	51
14.1.2. Contenido de humedad.....	51
14.2. Determinación de compuestos fenólicos totales.....	52
14.3. Inhibición de actividad radical DPPH.....	53
14.4. Evaluación de la extracción asistida por ultrasonido .....	54



14.4.1. Contenido de fenoles totales y actividad radical DPPH .....	54
14.5. Perfil de glicósidos de esteviol y compuestos fenólicos en extractos de hojas secas de estevia mediante UPLC .....	56
14.6. Análisis mediante UPLC-PDA ESI-MS.....	57
14.7. Análisis del perfil de fenoles y actividad antioxidante de muestras parcialmente purificadas .....	59
15. CONCLUSIONES.....	61
16. REFERENCIAS .....	62
<b>CAPÍTULO 3: MICROENCAPSULACIÓN DE UNA MEZCLA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE EXTRACTOS DE ESTEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i>) Y NARANJA AGRIA (<i>Citrus aurantium</i> ) EN UNA MATRIZ MÚLTIPLE .....</b>	
17. INTRODUCCIÓN.....	65
18. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
18.1. Material biológico y reactivos .....	66
18.3. Extracción de polifenoles .....	66
18.4. Cuantificación de polifenoles totales .....	66
18.5. Actividad biológica .....	67
18.5.1. Actividad antioxidante .....	67
18.5.2. Actividad antibacteriana .....	67
18.5.3. Concentración mínima inhibitoria.....	67
18.6. Evaluación de la relación de agentes de pared.....	68
18.7. Diseño experimental de formulaciones .....	68
18.8. Microencapsulación mediante secado por aspersión.....	69
18.9. Eficiencia de encapsulación.....	69
18.21. Análisis UPLC-PDA de compuestos fenólicos .....	70
18.22. Caracterización de quitosano y micropartículas .....	71
18.22.1 Determinación del grado de acetilación .....	71
18.22.2. Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión de tamaño .....	71
18.22.3. Análisis de espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier.....	71
18.22.4. Análisis de difracción de rayos X .....	72
18.22.5. Análisis termogravimétrico .....	72
18.22.6 Morfología y tamaño de partícula.....	72

19. RESULTADOS .....	72
19.1. Contenido de fenoles totales y actividad biológica de los extractos .....	72
19.2. Evaluación de la relación de agentes de pared .....	73
19.3. Diseño experimental de formulaciones .....	75
19.4. Evaluación de la actividad antioxidante de las microcápsulas.....	79
19.5. Caracterización de las micropartículas.....	79
19.5.1. Análisis mediante espectrometría de infrarrojo .....	79
19.5.2. Difracción de rayos X.....	81
19.5.3. Análisis de los encapsulados mediante termogravimetría .....	83
19.5.4. Morfología y tamaño de partícula.....	83
20. CONCLUSIÓN .....	84
21. REFERENCIAS .....	85
CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE POLIFENOLES OBTENIDOS DE NARANJA AGRIA Y ESTEVIA EN LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS, FISICOQUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN PRODUCTO DE PANADERÍA .....	88
22. INTRODUCCIÓN.....	89
23. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
23.1. Material biológico y reactivos .....	90
23.2. Extracción de polifenoles .....	90
23.3. Obtención de micropartículas.....	90
23.4. Preparación de la masa .....	90
23.5. Determinación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante .....	91
23.6. Caracterización fisicoquímica.....	91
23.7. Determinación de las propiedades reológicas de la masa de galletas.....	91
23.8. Evaluación sensorial .....	92
24. RESULTADOS .....	92
24.1. Determinación del contenido total de fenoles y actividad antioxidante.....	92
24.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y análisis proximales.....	92
24.3. Determinación de las propiedades reológicas de la masa de galletas.....	93
24.4. Determinación de la evaluación sensorial .....	96
25. CONCLUSIÓN .....	97

26. REFERENCIAS .....	98
27. CONCLUSIONES GENERALES .....	100
28. PERSPECTIVAS .....	102
29. ANEXOS .....	103

## II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la encapsulación de compuestos bioactivos.....	17
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la cáscara de naranja agria .....	32
Tabla 3. Parámetros de la extracción asistida por ultrasonido del diseño factorial 2x3, contenido de fenoles totales (TPC) y actividad antioxidante .....	34
Tabla 4. Perfil de compuestos fenólicos de extractos de cáscaras secas obtenido mediante UPLC .....	37
Tabla 5. Datos de espectroscopia y espectrometría de compuestos fenólicos.....	38
Tabla 6. Parámetros del diseño factorial 3 <sup>2</sup> de la extracción asistida por ultrasonido, contenido de fenoles totales y actividad radical DPPH.....	55
Tabla 7. Glucósidos de esteviol y contenido de polifenoles de extractos obtenidos por maceración y extracción asistida por ultrasonido.....	57
Tabla 8. Parámetros del espectrómetro de masas de compuestos fenólicos.....	58
Tabla 9. Contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos de estevia y naranja agria. ....	73
Tabla 10. Potencial zeta de agentes de pared y extractos fenólicos .....	74
Tabla 11. Rendimientos de secado, porcentaje de encapsulación y porcentaje de liberación de compuestos fenólicos.....	76
Tabla 12. Porcentaje de encapsulación de compuestos fenólicos individuales.....	76
Tabla 13. Porcentaje de compuestos fenólicos liberados con CaCl <sub>2</sub> .....	78
Tabla 14. Determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos liberados .	79
Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas y análisis proximales de muestras de masa y galletas .....	93
Tabla 16. Resultados del análisis sensorial de preferencia para galletas.....	97

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Publicaciones realizadas sobre encapsulación de compuestos bioactivos .....	15
Figura 2. Cromatograma de compuestos fenólicos de cáscara de naranja agria utilizando diferentes solventes de extracción .....	36
Figura 3. Cromatograma modificado a 290 nm de las fracciones de extractos de naranja obtenidos mediante el sistema de separación Isolera One.....	40
Figura 4. Efecto del tiempo de secado a 40 ° C sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.....	52
Figura 5. Cromatograma modificado a 290 nm de las fracciones de extractos de estevia obtenidos mediante el sistema de separación Isolera One.....	60
Figura 6. Seguimiento del potencial zeta ( $\zeta$ ) durante la titulación de la dispersión goma: fructano: quitosano. ....	74
Figura 7. Espectros infrarrojo de agentes de pared y micropartículas.....	81
Figura 8. Patrón de difracción de rayos X.....	82
Figura 9. Curvas TGA de quitosano, goma arábica, encapsulado A, encapsulado E. ....	83
Figura 10. Micrografías de las micropartículas.....	84
Figura 11. Curva de flujo para muestras de masa de galletas adicionadas con extractos y micropartículas .....	94
Figura 12. Modulo de pérdida ( $G''$ ) y almacenamiento ( $G'$ ) vs frecuencia angular de masa .....	96

#### IV. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SÍMBOLO	DEFINICIÓN
UAE	Extracción asistida por ultrasonido ( en inglés, extracción asistida por ultrasonido)
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución (en inglés, Ultra pressure liquid chromatography)
UV	Ultravioleta- visible
TGA	Análisis termogravimétrico (en inglés, thermal gravimetric analysis)
RMN-H <sup>1</sup>	Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear de protón
MIN	Minutos
PM	Peso molecular
kDA	Kilo Dalton
pH	Potencial de hidrógeno
TPC	Contenido de fenoles totales (en inglés, total phenolic content)
MIC	Concentración mínima inhibitoria (en inglés, minimum inhibitory concentration)
PPM	Partes por millón
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (en inglés, 2,2,diphenyl-2-picrylhydrazyl)
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño (en inglés, size exclusion chromatography)
BS	base seca
mV	Mili volt
GRAS	Generalmente reconocido como seguro

## RESUMEN

El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha permitido la obtención de compuestos fenólicos con actividad antioxidante y antimicrobiana a través de métodos innovadores de extracción como la extracción asistida por ultrasonido (EAU). Lo anterior, mejorando rendimientos y disminuyendo costos de producción en comparación con métodos convencionales. No obstante, el potencial biológico de dichos compuestos se ve afectado por diversos factores externos. Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar las condiciones de extracción y encapsulación de extractos polifenólicos obtenidos a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia, así como de esteviósidos para su aplicación como aditivos en la industria alimentaria.

Para llevar a cabo el presente estudio se realizó una estrategia experimental que se dividió en 4 capítulos.

El primer capítulo tuvo como objetivo evaluar diferentes pretratamientos y relaciones de solventes sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de la cáscara de *Citrus aurantium* (naranja agria) extraídos por ultrasonido. Para lo cual se implementó un diseño factorial 2 x 3, considerando como primer factor al pretratamiento de las cáscaras a 2 niveles (cáscaras frescas y secas) y como segundo factor las relaciones de solvente a 3 niveles (agua al 100%, 50% de etanol acuoso (v/v) y 96% de etanol acuoso (v/v)). Los compuestos fenólicos obtenidos se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando como detector arreglo de diodos y acoplado a un sistema de espectrometría de masas de ionización por electrospray (UPLC-PDA-ESI-MS). Los compuestos se purificaron parcialmente mediante un sistema de purificación automatizada avanzada. Los resultados indicaron que se obtuvo el contenido de fenoles máximo ( $40.95 \pm 3.44$  mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco) cuando se extrajeron cáscaras de naranja agria fresca con 50% (v/v) de etanol acuoso, mientras que la actividad antioxidante máxima ( $730.04 \pm 28.60$   $\mu$ mol Trolox equivalentes/g de peso seco) se obtuvo de la extracción acuosa de cáscaras de naranja agrias secas. De los extractos obtenidos se identificaron nueve compuestos fenólicos que fueron cuantificados. La naringina y la neohesperidina fueron los compuestos que predominaron en los extractos de cáscara agria, mientras que los ácidos cafeico y clorogénico fueron los menos abundantes. La evaluación de la actividad

antioxidante en las fracciones sugirió que esta actividad podría atribuirse al efecto sinérgico de los nueve compuestos fenólicos presentes en el extracto crudo. Por consiguiente, la cáscara de naranja agria es una fuente potencial de compuestos fenólicos con elevada actividad antioxidante.

En el segundo capítulo, se evaluó la influencia del proceso de secado en las hojas de estevia, en relación con el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos durante una cinética de secado a 40°C durante 7 h. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la concentración de solvente y el tiempo de extracción sobre el contenido total de polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante de extractos de hojas secas de estevia utilizando extracción asistida por ultrasonido (EAU), lo anterior mediante la aplicación de un diseño factorial 3<sup>2</sup>. El contenido de glicósidos de esteviol también se evaluó mediante su extracción por un método convencional y por EAU. La identificación, cuantificación y purificación de fenoles se realizó mediante cromatografía (UPLC-PDA-ESI-MS) y un sistema de purificación avanzada, respectivamente. Como resultados se observó que se alcanzó un peso constante de las hojas después de seis horas de secado observando a este tiempo una mayor actividad antioxidante, mientras que el TPC más alto se obtuvo después de siete horas de secado. Utilizando el método de EAU el TPC más alto ( $91.57 \pm 8.8$  mg GAE/g bs) y la actividad antioxidante ( $603.24 \pm 3.5$   $\mu$ mol TE/g bs) se obtuvo cuando se utilizó etanol al 50% a las 5 horas de secado. Los glicósidos de esteviol extraídos mediante EAU se registraron con un contenido de  $93.18 \pm 1.36$  mg/g bs y  $98.97 \pm 1.75$  mg/g bs para esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente. En los extractos obtenidos se identificaron y cuantificaron seis compuestos fenólicos, incluidos cuatro ácidos fenólicos y dos flavonoides, mediante UPLC-PDA, y se confirmó mediante ESI-MS describiendo su patrón de fragmentación. Diosmina y el ácido clorogénico fueron los compuestos más abundantes con valores de 2032.36  $\mu$ g/ml y 434.95  $\mu$ g/ml, respectivamente. Adicionalmente, se encontró que la actividad antioxidante evaluada en las fracciones parcialmente purificadas sugirió que la actividad biológica podría atribuirse al efecto sinérgico de los seis fenoles presentes en el extracto de hojas de estevia. Además de sus propiedades edulcorantes, las hojas de estevia constituyen una fuente potencial de compuestos polifenólicos, con actividad antioxidante que podría utilizarse como aditivo alimentario.



En el tercer capítulo se determinaron las condiciones de microencapsulación por secado por aspersión de una mezcla de compuestos antioxidantes de extractos de estevia y naranja agria en una matriz biopolimérica múltiple. Debido a la creciente tendencia por conservar las propiedades biológicas de compuestos bioactivos como los polifenólicos mediante diversos mecanismos de encapsulación, el presente capítulo tuvo por objetivo establecer las condiciones de formación de las dispersiones a partir de los extractos polifenólicos de estevia y naranja, así como de los agentes encapsulantes (goma arábica, fructanos de agave y quitosano), además de caracterizar y evaluar el método de formación de encapsulados en función a su eficiencia de encapsulación y actividad biológica. Los resultados obtenidos indicaron que las curvas de titulación entre los agentes encapsulantes permitió conocer la mejor relación de goma: fructanos:quitosano [2:1:1] que permitieran una mejor estabilidad de soluciones. Adicionalmente se evaluaron diferentes relaciones de extractos de estevia y naranja para determinar los mejores rendimientos de encapsulación. Los rendimientos obtenidos a partir del secado de soluciones mostraron porcentajes de encapsulación de fenoles totales entre 66% y 70.45%, mostrando que la formulación B (Naranja (1) - Estevia (2)) presentó los rendimientos más altos con 70.45 %. Posteriormente, se obtuvo un valor máximo de liberación de compuestos de 46.18%. La caracterización de las micropartículas mediante espectroscopia de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X permitieron representar la interacción entre los agentes de pared y los compuestos fenólicos.

En el cuarto capítulo, el objetivo fue determinar el efecto de la adición de micropartículas de polifenoles de naranja agria y estevia sobre las propiedades biológicas, fisicoquímicas y sensoriales de un producto de panadería en estado crudo (masa) y en el producto terminado (galleta). Los parámetros fisicoquímicos de las muestras de masa y galletas revelaron que los valores de color  $b^*$  correspondientes a las coordenadas de tonalidades de amarillo a azul de todas las muestras de masa no se vieron afectados por la adición de las micropartículas. Sin embargo, presentaron menor luminosidad que el control. Con respecto a las galletas, los valores de color mostraron resultados similares a los obtenidos en la masa con excepción del valor  $L^*$  (luminosidad). Los análisis de las propiedades reológicas de las masas de galletas mostraron que el tratamiento de masa adicionada con extracto de naranja obtuvo los valores

de viscosidad más altos mientras que la masa adicionada con las micropartículas la viscosidad más baja, así mismo se observó que el tratamiento de masa adicionado con micropartículas obtuvo una  $G'$  y una  $G''$  más baja lo que parece indicar que es la mejor opción al tener los valores más bajos de ambos módulos. En la evaluación sensorial se obtuvo que las galletas adicionadas con micropartículas tuvieron el mismo sabor que las adicionadas con ambos extractos. Visualmente, no hubo diferencia significativa entre las galletas control y las adicionadas con micropartículas. Las galletas elaboradas con harina de trigo y avena y adicionadas con micropartículas de polifenoles obtenidos a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia mostraron buenas características fisicoquímicas y sensoriales. La evaluación de las propiedades reológicas permitió conocer el comportamiento de las masas cuando se le adicionaron las micropartículas.

Finalmente se presenta una conclusión final y las perspectivas de acuerdo a los resultados obtenidos.

## 1. INTRODUCCIÓN

México ocupa el quinto lugar en producción mundial de cítricos. Aproximadamente el 90% de la producción se destina al consumo en fresco y el 10% se comercializa para la industria procesadora de jugos y concentrados (SAGARPA, 2012). Lo anterior ha permitido que las cáscaras que usualmente son desechadas ahora sean utilizadas en diversos procesos debido a su contenido de polifenoles y a la actividad biológica asociada a estos (Magwaza et al., 2016). Entre las variedades existentes de cítricos, la naranja agria (*Citrus aurantium*) es una variedad que se caracteriza por su sabor amargo y también porque en su composición presenta polifenoles como naringina, neohesperidina, neoeriocitrina, hesperidina (Khan, Zill-E-Huma, & Dangles, 2014). Por otra parte, estudios previos han determinado que además de los glucósidos de esteviol utilizados como edulcorante, las hojas de *Stevia rebaudiana* presentan un alto contenido de polifenoles (Lemus-Mondaca, Vega-Galvez, Zura-Bravo, & Kong, 2012)(Muanda, Soulimani, Diop, & Dicko, 2011). Los compuestos polifenólicos y glucósidos de esteviol han sido obtenidos mediante diversos métodos de extracción, entre ellos, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) ha sido considerada como un método sustentable y ha sido ampliamente utilizado para maximizar los rendimientos de recuperación de compuestos. No obstante, el potencial biológico de dichos compuestos se ve afectado por factores externos como luz, temperaturas elevadas, pH por lo que se han desarrollado métodos como la encapsulación en los cuales se lleva a cabo la formación de micropartículas empleando agentes poliméricos con la finalidad de preservar estos compuestos y su actividad biológica. Debido a sus propiedades biológicas la goma arábica, quitosano y fructanos de agave se han empleado como agentes de pared en el proceso encapsulación de distintos compuestos fitoquímicos. Si la encapsulación de polifenoles de ambos extractos y esteviósidos resulta eficiente, podría utilizarse como un aditivo edulcorante funcional e incorporarse a los alimentos sin afectar los atributos sensoriales del producto.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Polifenoles**

Los compuestos polifenólicos pertenecen a un grupo importante de metabolitos secundarios, este grupo comprende aproximadamente 8000 compuestos los cuales son sintetizados por las plantas cuando estas se encuentran bajo condiciones de estrés. Estos compuestos se caracterizan principalmente por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, en función del número de anillos y de los elementos estructurales que presentan. Estos anillos se pueden clasificar en: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Zhang y Amauzu., 2003).

El grupo más importante de los compuestos polifenólicos son los flavonoides, este grupo incluye las flavonas, isoflavonas y antocianidinas y están ampliamente distribuidos en todas las partes de las plantas. La naturaleza química de los flavonoides radica en los dos anillos bencenos (A y B) unidos por un anillo pirano. Debido a su patrón de hidroxilación estos se subdividen en antocianinas, flavan- 3-ols, flavonas, flavanonas y flavonoles (Tsao, 2010). La distribución y diversidad de los compuestos polifenólicos es muy amplia por lo que se han categorizado con base en su fuente de origen, estructura química y actividad biológica.

### **2.2. Métodos de extracción de polifenoles**

La extracción de los compuestos polifenólicos representa uno de los procesos más importantes para la obtención de compuestos bioactivos a partir del material vegetal. Se han utilizado diversos métodos para la obtención de estos compuestos a partir de residuos de cáscaras de cítricos. Algunos de los más empleados son la extracción asistida por microondas (Khizar et al., 2010; Ledesma-Escobar et al., 2015), ultrasonido (García-Castello et al., 2015; Ma et al., 2009), soxhlet (Javaprakasha et al., 2008) y maceración (Jeong et al., 2004).

Los procesos de extracción involucran variables como temperatura, tiempo de extracción y tipo de solvente, mismas que ejercen un efecto sobre la extracción de polifenoles. Diversas extracciones de polifenoles realizadas a partir de cáscaras de cítricos han empleado el método de extracción asistida por ultrasonido debido a que representa un método alternativo respecto a los tradicionales ya que emplea períodos cortos de extracción y menor cantidad de solvente lo que constituye una gran ventaja para la industria.

### 2.3. Extracción asistida por ultrasonido

El método de extracción asistida por ultrasonido se basa en la propagación de ondas mecánicas conformada por ciclos definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas como compresiones y rarefacciones. La diferencia entre ultrasonido y sonido es la frecuencia de la onda, al espectro de ondas implicadas en el ultrasonido se les denomina ondas ultrasónicas, cuyas frecuencias se encuentran por encima del intervalo audible (>20 kHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz) (Kadam et al. 2015). El efecto del ultrasonido está asociado al fenómeno de cavitación. Durante el ciclo, el líquido se somete a un esfuerzo tensional y posteriormente a una compresión, el resultado es la formación de microburbujas que van aumentando su tamaño durante la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas alcanzan un tamaño crítico e implosionan. La implosión da lugar a la liberación de energía acumulada, generando incremento en la temperatura. La radiación ultrasónica se puede aplicar de dos formas: mediante contacto directo con la muestra empleando una sonda ultrasónica o a través de las paredes del recipiente donde se encuentra la muestra, como es el caso del baño de ultrasonido.

La sonda ultrasónica se sumerge directamente en la solución y proporciona una potencia ultrasónica de al menos 100 veces mayor que la que brinda el baño de ultrasonido, en este método la amplitud juega un papel importante debido a que conforme aumenta la amplitud los ciclos de compresión y rarefacción aumentan y por consiguiente incrementa la liberación de compuestos. El incremento en los rendimientos de extracción no se atribuye únicamente al efecto de las ondas ultrasónicas en la solución, existen otras variables implicadas durante ese proceso tal como el tiempo de extracción, la amplitud de ultrasonido el diámetro de la sonda. Al Dhabí et al (2017) optimizó la extracción asistida por ultrasonido de polifenoles extraídos de granos de café mediante 4 factores (amplitud de ultrasonido, temperatura, tiempo y relación soluto-solvente). Los resultados mostraron que al aumentar la amplitud por arriba de 250 W el rendimiento de extracción disminuyó, la temperatura tuvo un efecto similar ya que se observó que rendimiento de extracción disminuyó al emplear temperaturas mayores de 45 °C. Lo anterior como resultado de la interrupción del efecto de cavitación debido al incremento en la viscosidad del solvente y tensión superficial.

#### 2.4. Variables implicadas en el rendimiento y extracción de polifenoles

El estudio de las propiedades biológicas de los compuestos fitoquímicos comienza con procesos de pre-extracción y extracción. Por procesos de pre - extracción se entiende que es una etapa inicial donde se prepara la muestra para preservan las biomoléculas antes de llevar a cabo su extracción. Se puede utilizar un sistema de secado para deshidratar hojas, raíces, tallos, cascara o pulpa o bien se pueden emplear en base fresca y los resultados obtenidos serian distintos. Seremet et al. (2016) determinó el efecto del método de secado sobre la curva de secado y la capacidad de rehidratación de muestras de calabaza. Los resultados mostraron que las muestras que fueron secadas con aire caliente tuvieron una mayor capacidad de rehidratación que las muestras secadas con una combinación de métodos. La eliminación de agua de la estructura celular conlleva a cambios fisicoquímicos en las propiedades del sistema. Cuando las muestras que fueron previamente deshidratadas se ponen en contacto con un solvente, la pared celular lo absorbe y posteriormente regresa a su forma natural reteniendo el solvente dentro de sus cavidades.

Otro de los procesos de pre-extracción más utilizados es la reducción del tamaño de partícula de la muestra, esto se realiza mediante un proceso de molido. La disminución del tamaño de partícula conlleva a un incremento en la superficie de contacto entre la muestra y el solvente de extracción. Eliasson et al. (2017) demostró que partículas con un tamaño mayor a 710  $\mu\text{m}$  tuvieron mayor contenido de antocianinas que aquellas de menor tamaño.

La polaridad del solvente también juega un papel importante en el proceso de extracción. Safdar et al (2017) comparó varios solventes como etanol, metanol, acetona y etilacetato para la extracción de polifenoles de cáscaras de un cítrico y concluyó que, en el caso del etanol y mezclas con agua, el agua crea un medio más polar lo que favorece la extracción de compuestos con polaridad similar. De la misma manera, Onivogui et al. (2017) determinó el contenido de polifenoles totales de pulpa de *Anisophyllea* en extractos con etanol, metanol, etil acetato y agua y concluyó que el etanol y el metanol fueron los solventes más eficientes para la extracción de compuestos bioactivos.

Otra de las condiciones que permiten una mejor extracción de compuestos es la relación soluto: solvente. De acuerdo con Xi et al (2009) la relación soluto: solvente está

estrechamente relacionada con los principios de transferencia de masa. Cuando el solvente está saturado sobre los compuestos bioactivos el fenómeno de difusión se detiene y hay un periodo de estabilización o disminución de los compuestos extraídos. Estudios previos determinaron que el contenido de polifenoles totales aumentó cuando la relación de soluto: solvente incremento de 1:25 a 1:50 p/p (Castro- López et al., 2017).

## 2.5. Industria cítrica en México y Yucatán

México ocupa el quinto lugar en producción mundial de cítricos. Aproximadamente el 90% de la producción se destina al consumo en fresco y el 10% se comercializa para la industria procesadora de jugos y concentrados (SAGARPA, 2012). Lo anterior ha permitido que las cáscaras que usualmente son desechadas ahora sean utilizadas en diversos procesos debido a su contenido de polifenoles y a la actividad biológica asociada a estos (Magwaza et al., 2016). Entre las variedades existentes de cítricos, la naranja agria (*Citrus aurantium*) es una variedad que se caracteriza por su sabor amargo y también porque en su composición presenta polifenoles como naringina, neohesperidina, neoeriocitrina, hesperidina (Khan, Zill-E-Huma, & Dangles, 2014).

## 2.6. Aprovechamiento de residuos cítricos para la obtención de polifenoles

Los polifenoles se pueden encontrar en diferentes fuentes de alimentos, las principales son el té (Chen et al., 2004) frutos rojos (Kosmala et al., 2014) así como la cáscara, jugo, pulpa de cítricos (Molina-Calle et al., 2015) y de muchos otros frutos. El consumo de jugo de frutos cítricos ha permitido el aprovechamiento de residuos como cáscaras y semillas generados durante el proceso de obtención del jugo y ha impulsado la búsqueda y extracción de los compuestos polifenólicos más abundantes con la finalidad de aprovechar sus diversas actividades biológicas.

Diversos estudios han revelado el alto contenido de polifenoles que poseen diversas partes de los cítricos, García-Castello et al. (2015) realizó la cuantificación de polifenoles totales y flavonoides de residuos de cáscara de toronja y cuantificó el contenido de neohesperidina, neoeriocitrina, narirutina, naringina, hesperidina y tangerina presentes en las muestras. Estudios realizados con naranja agria han mostrado que los principales compuestos polifenólicos reportados son naringina, neohesperidina, narirutina, hesperidina (Sawalha et

al., 2009), ácido cinámico, ferúlico, isoferúlico (Jeong et al., 2004). Así mismo, Ersus y Cam (2007) determinaron el contenido de polifenoles y flavonoides totales presentes en cáscara y jugo de naranja agria, los resultados mostraron que la cáscara contiene mayor cantidad de polifenoles y flavonoides totales obteniendo un valor de 487.1 mg GAE/100 g y 387.4 mg CE/100 g de cáscara respectivamente

## 2.7. Stevia rebaudiana

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria del sudeste de Paraguay y es conocida como “hoja dulce”. Los extractos de estevia se utilizan como edulcorante natural o en suplementos dietéticos por su contenido de glucósidos. Las hojas de estevia contienen una mezcla de ocho glucósidos diterpénicos que son el esteviósido, el rebaudiósido A, B, C, D Y E, dulcósido A y estevioldiósido. Los esteviol glucósidos son considerados como no tóxicos, no calóricos, estos compuestos han sido identificados para el tratamiento de algunas enfermedades por ejemplo la hipoglucemia (Singh et al., 2005).

La estevia es un endulzante natural sin calorías el cual ha sido utilizado como sustituto de azúcar o de edulcorantes artificiales, el continuo uso de estevia en los alimentos se debe a una serie de características entre ellas se encuentran que el dulzor se intensifica con la combinación de sales y ácidos orgánicos, es estable a altas temperaturas y a través de un amplio pH. Así mismo, ha sido clasificado como GRAS y aprobado por la FAO como aditivo con potencial de endulzante lo anterior es debido a que el dulzor de cualquiera de los compuestos de estevia sea rebaudiósido A (250-450 veces), B(300- 350 veces), C (50-120), D(250-450 veces), E(150-300 veces), dulcósido A (50- 120 veces) y steviolbiósido (100-125 veces) es mayor que el proporcionado por la sacarosa (Lemus-Mondaca et al., 2012).

Además de su uso como edulcorante, la estevia ha sido estudiada debido a su contenido de polifenoles ya que estevia junto con el consumo de otras plantas puede jugar un papel importante en el consumo de antioxidantes (Tadhani et al., 2007). Lemus-Mondaca et al (2016) evaluó el efecto que ejerce el proceso de secado de hojas de estevia sobre los compuestos bioactivos, actividad antioxidante y poder edulcorante concluyendo que los compuestos fenólicos incrementaron durante una temperatura menor a 50 °C, respecto a los esteviósidos se observó un incremento a temperaturas superiores a los 50 °C.



Estudios previos han evaluado la estabilidad de estevia durante diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento, así como la interacción con otros edulcorantes y su aplicación en bebidas como café y té (Kroyer., 2010). A pesar de los múltiples usos que se le puede dar a estevia es importante identificar qué es lo que se desea lograr en el producto, por ejemplo, como endulzante, modificador de sabor entre otros, antes de seleccionar el tipo y la concentración del endulzante. Lemus-Mondaca et al (2016) evaluó el efecto que ejerce el proceso de secado de hojas de estevia sobre los compuestos bioactivos, actividad antioxidante y poder edulcorante concluyendo que los compuestos fenólicos incrementaron durante una temperatura menor a 50 °C, respecto a los esteviósidos se observó un incremento a temperaturas superiores a los 50 °C.

## 2.8. Actividad antioxidante de polifenoles procedente de cítricos

Los antioxidantes son moléculas naturales o sintéticas y se pueden definir como “cualquier sustancia que sea capaz de retardar el proceso de rancidez en alimentos y otro tipo de deterioro en el sabor debido a la oxidación, extendiendo el periodo de inducción” (R y Marinova, 2001).

Las cáscaras de naranja también han sido ampliamente estudiadas debido a los compuestos fenólicos que ejercen diversas actividades biológicas (Hegazy e Ibrahim., 2012). Algunas de las actividades que desempeñan estos compuestos son la prevención de cáncer (Mei-Ling et al., 2012), diabetes, enfermedades cardiovasculares, alzheimer’s así mismo poseen actividad antimicrobiana y antioxidante (Nagle et al., 2006). De estos, la actividad antioxidante es la actividad biológica que más se ha reportado y estudiado a fondo.

En estudios donde se ha evaluado la actividad antioxidante de cítricos, los flavonoides mayormente estudiados han sido la naringina, hesperidina y naringina (Jayaprakasha et al., 2008). Diversos estudios han reportado la actividad antioxidante que ejercen distintas partes del fruto de naranja y han determinado que las cáscaras poseen mayor actividad antioxidante que otros componentes del fruto (Ersus y Cam., 2007; Jeong et al., 2004).

A lo largo de tiempo la actividad antioxidante se ha considerado como un indicador del efecto benéfico que el alimento o producto ejerza sobre la salud, por lo anterior se han desarrollado metodologías para su liberación y cuantificación. Jeong et al. (2004) evaluó la relación de las

variables tratamiento térmico y tiempo, sobre la actividad antioxidante de extractos etanólicos y acuosos. En el determinó que, la actividad antioxidante fue en aumento al incrementar la temperatura de secado.

Para cuantificar la actividad antioxidante se han desarrollado métodos *in vitro* e *in vivo*. Dentro de los primeros destacan métodos como el DPPH, ABTS, FRAP, ORAC y autooxidación del ácido linoleico (Jayaprakasha et al., 2008; Scalbert et al., 2005), estos métodos se han empleado debido a su simplicidad y rapidez.

Los métodos mayormente reportados son el DPPH Y FRAP. El método de DPPH es un método directo que se basa en la reducción de radicales libres estables del DPPH cuando está en contacto con un antioxidante. Cuando una solución de DPPH entra en contacto con un compuesto que puede donar un átomo de hidrógeno se produce la forma reducida y por consecuente ocurre la pérdida de color y absorbancia, el grado de decoloración indica el potencial antiradical de los extractos antioxidantes.

Jayaprakasha et al. (2008) evaluó la actividad antiradical mediante el método de DPPH de extractos de naranja agria elaborados con diferentes solventes, los resultados mostraron que el extracto de acetato de etilo obtuvo una inhibición máxima del 87.6 %.

Otro factor importante sobre los factores que influyen en la actividad antioxidante es la composición química de los compuestos. La configuración, estructura y las posiciones de los grupos funcionales como los grupos OH influyen en los mecanismos de la actividad antioxidante. Di Majo et al. (2005) elucidó el comportamiento antioxidante y prooxidante de flavanonas agliconas y glicosiladas y determinó que la sustitución del grupo OH de la séptima posición por un grupo neohesperidosil influye en la relación entre la estructura y la actividad antioxidante. Así mismo, otros estudios han determinado que las agliconas asumen mayor actividad antioxidante que su respectivo glicosilado (Kumar y Pandey et al., 2013). Onivogui et al. (2016) evaluó la influencia de los solventes metanol/ agua 80:20 etanol/agua 80:20 y acetato de etilo/agua 1:5 p/v sobre la actividad antioxidante de extractos de semilla y pulpa de *A. laurina* empleando el método de DPPH, ABTS y FRAP, los resultados mostraron que el extracto etanólico de pulpa mostró la actividad antiradical DPPH más alta,

mientras que la actividad antioxidante más alta evaluada mediante ABTS y FRAP fue el extracto etanólico de semillas.

## 2.9. Encapsulación de compuestos bioactivos

Un aspecto importante en la funcionalidad del compuesto es la protección del mismo, lo anterior se puede lograr mediante la tecnología de microencapsulación, este es un proceso que empaqueta un material sólido, líquido o gaseoso en pequeñas cápsulas que liberan su contenido a condiciones controladas durante largos períodos de tiempo (Champagne y Fustier., 2007) contribuyendo de esta manera al desarrollo de nuevos productos funcionales (Bonat et al., 2015). Los encapsulados están formados por el material encapsulado o fase interna y el agente encapsulante o material de pared que recubre al compuesto bioactivo (Nedovik et al., 2011).

Existe una amplia variedad de compuestos que pueden ser utilizados como material de pared como la goma arábiga, maltodextrina, quitosano etc. para la formación de una microcápsula (Flavia et al., 2012; Sáenz et al., 2009), la selección de dicho compuesto va a depender del compuesto bioactivo a encapsular y de las características deseadas en el producto final.

Los factores que se deben tomar en consideración para seleccionar dicho compuesto es la funcionalidad que el encapsulado debe proveer al producto final, la concentración del encapsulado, estabilidad, costos y tipo de liberación (Nedovik et al., 2011).

En la literatura se han descrito diversos métodos de encapsulación (coacervación, gelificación iónica, liofilización, secado por aspersión). La influencia del método utilizado, la concentración y el tipo de material de pared empleado, se puede ver reflejado en el tamaño de partícula, distribución y morfología de los microencapsulados (Paini et al., 2015; Shaikh et al., 2006). Se han realizado diversos estudios donde se evalúa el efecto que tienen estas variables sobre la morfología de los mismos (Rascón et al., 2011). Comunian et al. (2013) realizó la caracterización morfológica de coacervados de ácido ascórbico elaborados con goma arábiga y gelatina como material de pared mediante microscopía óptica y mostraron que las microcápsulas mantuvieron una forma de reservorio en el cual el compuesto bioactivo fue perfectamente rodeado por el material de pared.

## 2.10. Secado por aspersión

El secado por aspersión es un procedimiento en el cual un líquido se convierte directamente en un polvo. La encapsulación mediante secado por aspersión involucra tres etapas: Preparación de la emulsión o dispersión que se va a evaluar, homogenización de la emulsión y atomización de la muestra en la cámara de secado.

Primero se lleva a cabo la elaboración de una emulsión estable formada por los compuestos bioactivos en la solución de lo que formará la pared del encapsulado. Esta dispersión deberá ser calentada y homogenizada con o sin la adición de un emulsificante, esto último va a depender de las propiedades emulsificantes del material de la cubierta externa. Posteriormente y antes del secado, la emulsión previamente formada deberá permanecer estable durante un período considerable de tiempo, las gotas formadas deberán ser pequeñas y la viscosidad deberá ser lo más baja posible para evitar la incorporación de aire a la partícula. Enseguida, la emulsión obtenida es atomizada dentro de una corriente de aire suministrado a la cámara de secado lo que permite la evaporación del solvente y la formación de las cápsulas (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Debido a su bajo costo y disponibilidad, la encapsulación mediante el secado por aspersión ha sido empleada en diversos estudios.

Paini *et al.* (2015) evaluó los parámetros de temperatura de entrada (130 °C y 60°C) y el flujo de alimentación (5ml/min y 10ml/min) del método de secado por aspersión y determinaron que la temperatura de entrada de 130 °C y el flujo de 10 ml/min fueron las condiciones en las que se obtuvo la mayor eficiencia de encapsulación y el mayor contenido de polifenoles.

Las partículas obtenidas mediante este método suelen tener forma esférica u ovalada con superficie rugosa o lisa dependiendo del material encapsulante que se haya empleado.

Este método ha sido ampliamente utilizado para la encapsulación de polifenoles, debido a que este proceso permite enmascarar el sabor astringente que distingue a estos compuestos bioactivos. (Chranioti *et al.* 2016) mostraron que la encapsulación de esteviósidos mediante secado por aspersión empleando inulina y maltodextrina como agentes encapsulantes disminuía el sabor astringente de los esteviósidos.

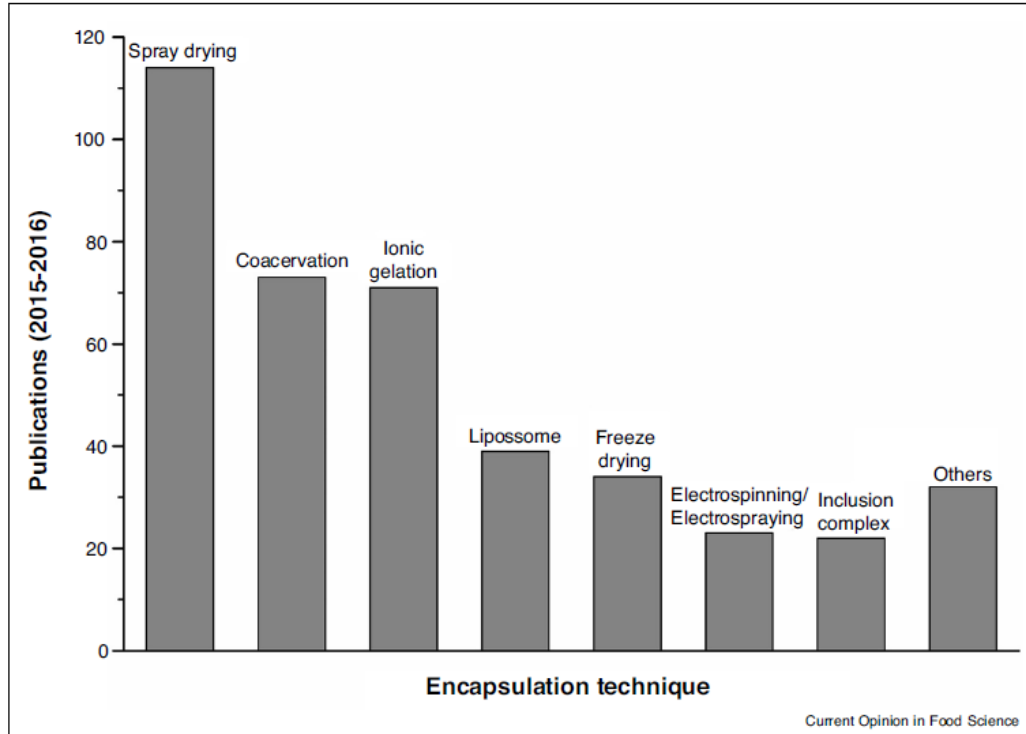


Figura 1. Publicaciones realizadas sobre encapsulación de compuestos bioactivos (Dias et al. 2017)

### 2.11. Agentes encapsulantes

Una microcápsula puede contener en su interior más de un compuesto bioactivo, lo mismo ocurre para el agente de pared que lo protege. En ocasiones la combinación de materiales de pared resulta beneficiosas debido a que es posible que ocurra una actividad sinérgica entre ellos debido a que en algunas ocasiones un solo agente no posee las propiedades necesarias para la encapsulación (Rutz et al., 2015). Barros- Fernandes et al. (2014) evaluó los efectos del reemplazamiento parcial o total de goma arábica empleando combinaciones de maltodextrina, almidón modificado e inulina y mostró que la combinación de almidón modificado e inulina es una alternativa viable para la sustitución de goma arábica como agente de pared.

Existen materiales de pared que se han utilizado ampliamente debido a que poseen alta solubilidad, son buenos emulsificantes y tienen baja viscosidad (Gharsallaoui et al., 2007) lo que hace que sean el material para la protección de compuestos activos en algunos métodos

de encapsulación. Sin embargo, la disponibilidad del recurso, así como el costo elevado de los mismos conlleva a la búsqueda de nuevos materiales o bien a la combinación con otros de menor costo (Flavia et al., 2012; Beirao da Costa et al., 2013).

Los agentes de pared más utilizados son los hidrolizados de almidón como la maltodextrina, glucosa, hidrocoloides como la goma arábiga, goma guar y otras gomas y proteínas como la proteína de soya, gelatina y caseinato de sodio (Calvo et al., 2012).

Los carbohidratos como maltodextrina, inulina, almidones y gomas han sido comúnmente utilizados en procesos de encapsulación de diversos compuestos (Barbosa et al., 2005) debido a que presentan una o varias de las siguientes características: baja viscosidad, propiedades emulsificantes y buena solubilidad. La maltodextrina ha mostrado tener altos porcentajes de recuperación del compuesto bioactivo. Saenz et al. (2009) reportó una recuperación del 100 % del compuesto bioactivo (betacianinas) presente en pulpa de nopal cuando utilizó maltodextrina como agente encapsulante.

Debido a que muchos de los compuestos polifenólicos son solubles en agua, se requiere de cierto porcentaje de agua en los materiales empleados como agentes encapsulantes. A continuación, se muestra una tabla con los agentes encapsulantes empleados para el método de secado por aspersión.

Tabla 1. Condiciones para la encapsulación de compuestos bioactivos

<b>AUTOR</b>	<b>COMPUESTO ACTIVO</b>	<b>AGENTE ENCAPSULANTE</b>	<b>CONDICIONES</b>	<b>EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN</b>
Barros et al., 2013	Aceite de romero	Goma arábica Almidón Almidón y maltodextrina Inulina y almidón Maltodextrina y GA GA e inulina	Inlet 170 °C Feed rate 0.9Lh <sup>-1</sup>	
Chatterjee et al., 2013	Extractos de clavo	Maltodextrina Goma arábica	Inlet 150 °C Outlet 86°C Feed rate 6.67 ml/min	65%
Jun-Xia et al., 2011	Aceite de naranja	Proteína de aislado de soya Goma arábica	Inlet 160°C Outlet 90°C	
Lekshmi et al; 2017	Escualeno	Quitosano	Inlet 160 °C Outle 90°C	26%
Aysu et al., 2016	Polifenoles de uva	Maltodextrina Goma arabiga	Inlet 120°/140° Feed flow 12 ml/min	99.1%
Floirendo et al. 2014	Antocianinas	Goma arabiga	Inlet 160°C Outlet 80°C	68 %>

### 2.11.1. Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la quitina formado por monómeros de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa con uniones  $\beta$  1-4, difiere en su grado de acetilación (40-98%) y peso molecular (50-2000kDa) se obtiene mediante una reacción de desacetilación sobre la quitina donde se elimina al menos un 50% de los grupos acetilo presentes.

El quitosano tiene tres grupos funcionales reactivos: el grupo amino, dos grupos hidroxilos secundarios localizados en los carbonos 4 y 3 y el grupo hidroxilo primario del carbono 6. El quitosano es de alta importancia comercial debido a sus propiedades fisicoquímicas como viscosidad y solubilidad, mismas que varían de acuerdo con su peso molecular, grado de acetilación, pH y disolvente empleado.

Algunas de las propiedades químicas del quitosano son:

- 1) Insoluble en agua, soluble en soluciones acuosas ácidas
- 2) Agente floculante, interactúa con moléculas cargadas negativamente
- 3) Forma sales en presencia de sales orgánicas e inorgánicas

### 2.11.2. Goma arábica

La goma acacia también conocida como goma arábica es un exudado gomoso que proviene de las ramas y tallo de varias especies de árboles de acacia. La goma está principalmente compuesta por  $\beta$ -D galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa, ácido D-glucurónico, y ácido 4-O-metil-D-glucurónico. La estructura altamente ramificada está compuesta por  $\beta$ -D galactopiranosas unidas a través de enlaces 1,3 con cadenas laterales enlazadas a la cadena principal a través de sustituciones en la posición O-6. Unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil and  $\alpha$ -L-ramnopiranosil están distribuidas en la cadena principal y lateral mientras que  $\beta$ -D-glucuronopiranosil y 4-O-Metil- $\beta$ -D-glucuronopiranosil son unidades terminales. Su composición bioquímica puede cambiar de acuerdo a factores externos e internos como condiciones ambientales, edad del árbol, especie de Acacia entre otros. En años anteriores la goma senegal ha sido más utilizada por la industria que la goma seyal. Acacia senegal está compuesta principalmente por fragmentos repetidos de cadenas ramificadas de galactosa con



cadenas laterales de arabinosa. Por otro lado, la estructura de la goma seyal pueden ser una mezcla de 3 o 4 fragmentos de unidades ramificadas de ácido 4-O-Me-glucoronico con unidades simples de galactosa unidas a una cadena de arabinosa. Así mismo contiene componentes menores como minerales, polifenoles y trazas de lípidos que forman del 3 % al 6% de su composición y que contribuyen a las propiedades funcionales. La concentración de iones tiene efecto en la densidad de carga, mismo que juega un papel importante en la hidratación, solubilidad, así como en la estabilidad de soluciones coloidales.

Sus aplicaciones van destinadas principalmente a la industria alimentaria debido a sus propiedades como emulsificante, estabilizante, de unión, esto permite que pueda ser utilizado en bebidas, jarabes y como agente encapsulante.

### 2.11.3. Fructanos de agave

Debido a su configuración química, los fructanos son reconocidos como prebióticos, estos compuestos no pueden ser hidrolizados por enzimas digestivas por lo que permanecen intactas durante su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal hasta que llegan a la parte inferior en donde son hidrolizados y fermentados por las bacterias. De esta manera estos compuestos permiten que sean reconocidos como fibra dietética (Stevens et al., 2001). Debido a las características que le confiere su estructura química facilita su empleo como aditivo en alimentos. Estudios previos reportaron que la encapsulación de jugo de pitanga (*Eugenia uniflora*) empleando fructanos como agente encapsulante obtuvo propiedades fisicoquímicas similares a las obtenidas con maltodextrina (Ortiz et al., 2017)

## REFERENCIAS

- Al Dhabhi, N.A., Ponmurugan, K., Jeganathan P.M. 2017. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34: 206-213.
- Beirao da Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A., Pinheiro, C., Janeiro, M.I., Vicente, A., Beirao da Costa, M., Deldadillo, I. 2013. Inulin potential for encapsulations and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*. 33: 199-206.
- Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. 2005. Light stability of spray dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*. 38: 989-994.
- Calvo, P., Castaño, A.L., Lozano, M., Gonzalez Gomez, D. 2012. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf life of extra virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. *Food Research International*. 45: 256-261.
- De Barros Fernandes, R.V., Vilela Borges, S., Alvarenga, D. 2014. Gum arabic/ starch/ maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oils. *Carbohydrate Polymers*. 101: 544-532.
- Ersus S, Cam M (2007) Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chem Nat Compd* 43:607–609.
- Flavia, O.M.S., Oliveira, E., Paula, H., de Paula R. 2012. Chitosan Cashew gum nanogels for essential oils encapsulations. *Carbohydrate Polymers*. 89: 1277- 1282.
- Garcia-Castello E. M., Rodrigues Lopez A.D., Mayor, L., Ballesteros R., Conidi C., Cassano A. 2015. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi*) solid wastes. *Food Science and Technology*. 64: 1114-1122.
- Gharsallaoui A., Roudant, G., Chambin, O., Volley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40: 1107-1121.
- Hegazy, A.E., Ibrahim, M.I. 2012. Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Science Journal*. 18: 684-688
- Jayaprakasha GK, Girenavar B, Patil BS (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresour Technol* 99:4484–4494.
- Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem* 52:3389–3393.
- Khan, M.K., Zill-E Huma., Dangles, O. 2014. A comprehensive review of flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 85-104
- Khizar, H., Zhang, X., Farooq, U., Abbas S., Xia, S., Jia, C., Zhong, F., Zhang, J. 2010. Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry*. 123: 423-429.
- Kadam, S., Tiwari, B., Alvarez, C., O` Donnell C. 2015. Ultrasound applications for the extractions, identifications and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*. 46: 60-67.

Lemus-Mondaca, R.; Ah-Hen, K.; Vega-Gálvez, A.; Honores, C.; Moraga, N.O. 2016. *Stevia rebaudiana* Leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Human. Nutrition.*, 71, 49–56

Ledesma-Escobar C., Priego Capote F., Luque de Castro MD. 2015. Comparative study of the effect of auxiliary energies on the extraction of Citrus fruit components. *Talanta*. 144: 522-528.

Mei-Ling, C., Deng-Jye Y., Shih Chuan. 2011. Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 1179-118

Muanda, F.N.; Soulimani, R.; Diop, B.; Dicko, A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT-FoodSci. Technol.* 2011, 44, 1865–1872.

Magwaza S.L, Opara, U.L, Cronje Paul J. R, Landahl, Sandra, Ordaz Ortiz Jose, Terry L. 2016. Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. *Food Science and Nutrition*. 4: 4-10.

Onivogui, G., Letsididi, R., Diaby, M., Wang, L., Song, Y. 2015. Influence of extractions solvents on antioxidant and antimicrobial activities of the pulp and seed of *Anisopyllea laurina* R. Br. Ex Sabine fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.

Ortiz-Basurto, R.I., Rubio Ibarra, M.E., Ragazzo Sanchez J.A., Beristain, C.I., Jimenez, Fernandez, M. 2017. Microencapsulation of *Eugenia uniflora* L juice by spray drying using fructans with different degrees of polymerisation. *Carbohydrate Polymers*. 175: 603-609.

Paz, R., García, P., Reyes, N., Chavez, J., Santos, J. 2012. Acetylated starch and inulin as encapsulating agents of gallic acid and their release behaviour in a hydrophilic system. *Food Chemistry*. 134: 1-8.

Ribero Dias, D., Alvarenga Botrel, D., De Barros Fernandes, R.G., Vilela Borges, S. 2017. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*. 13: 31-37.

SAGARPA (2012) Mexico, quinto productor mundial de cítricos. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201209B068.aspx>. Accessed 21 Dec 2018

Sawalha SMS, Arraez-Román D, Segura-Carretero A, Fernandez Gutierrez A (2009) Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chem* 116:567–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>

Seremet, L., Botez, E., Oana Viorela., Andronoiu, G., Mocanu, G. 2016. Effect of different drying methods on moisture ratio and rehydration of pumpkin slices. *Food Chemistry*. 195: 104-109.

Stevens, C., Meriggi, A., Booten, K. 2001. Chemical modification of inulin a valuable renewable resource and its industrial applications. *Biomacromolecules*. 2: 1.

Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2: 1231-1246.

Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R. 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*:20: 323-329

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El sector de los aditivos alimentarios se encuentra en continua transformación tratando de seguir las principales tendencias que están a favor de la inclusión de compuestos naturales que pueden ser obtenidos a partir del aprovechamiento de residuos agroindustriales y que además ofrezcan un efecto positivo en la salud debido a su composición química y puedan proteger a las células del daño oxidativo, reduciendo la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras.

Los compuestos polifenólicos han sido ampliamente estudiados por si solos y en diferentes sistemas, sin embargo, no se puede descartar que la interacción de antioxidantes de diferentes fuentes y en función de sus actividades biológicas pudieran tener alguna ventaja respecto a su uso como aditivo alimentario.

No obstante, y a pesar de los beneficios que ejercen los polifenoles, estos otorgan un sabor amargo, además de ser altamente susceptibles a la luz y altas temperaturas, lo que limita su incorporación a los productos alimenticios. Con la finalidad de facilitar lo anterior se llevan a cabo diversos procesos de encapsulación incorporando nuevas metodologías como el secado por aspersión que junto con otros equipos son utilizados para simplificar el proceso.

En dicho contexto el estudio de las condiciones de la encapsulación de polifenoles junto con un edulcorante natural no calórico en un mismo sistema permitirá la obtención de un aditivo con funciones antioxidantes que pueda incorporarse en diversos alimentos.

Para esto es esencial realizar la evaluación de las condiciones de un sistema encapsulado de extractos polifenólicos y esteviósidos obtenidos a partir de residuos agroindustriales y hojas de estevia para la obtención de un aditivo alimentario funcional bajo en calorías.

#### **4. HIPÓTESIS**

La evaluación de las condiciones de obtención mediante extracción asistida por ultrasonido de extractos polifenólicos de residuos del procesamiento de la naranja agria y de stevia, así como las condiciones de elaboración y estabilización de un matriz biopolimérica compleja como sistema de encapsulado, favorecerá la reducción de la degradación de los compuestos fitoquímicos encapsulados permitiendo la conservación de sus propiedades funcionales, mejorando la eficiencia de la actividad antioxidante y antimicrobiana del sistema, así como de los sistemas alimentarios en los que sea probado sin reducir la calidad de los productos.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las condiciones de extracción y encapsulación de extractos de polifenoles y esteviósidos para su aplicación como aditivos en la industria alimentaria.

### 6.1. Objetivos específicos

- Evaluar el contenido de polifenoles obtenidos a partir de cáscaras frescas y harina de naranja agria (*Citrus aurantium*) mediante extracción asistida por ultrasonido
- Seleccionar los extractos polifenólicos de naranja agria (*Citrus aurantium*) en función de su actividad antioxidante y antimicrobiana y caracterizar mediante cromatografía de líquidos.
- Caracterizar fisicoquímicamente extractos de estevia (*Stevia rebaudiana*) obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido en función de su actividad biológica (actividad antioxidante y antimicrobiana)
- Establecer las condiciones de formación de las dispersiones a partir de los extractos y agentes encapsulantes caracterizados.
- Evaluar el método de formación de encapsulados en función a su eficiencia de encapsulación y actividad biológica.
- Evaluar la adición de los encapsulados en productos de panadería en función de su actividad antioxidante y caracterizar fisicoquímica y sensorialmente el producto obtenido.

**CAPÍTULO 1: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL  
POLIFENÓLICO MEDIANTE UPLC- PDA ESI -MS DE EXTRACTOS  
DE *Citrus aurantium* OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN  
ASISTIDA POR ULTRASONIDO**

Capítulo publicado en versión inglés en la revista Journal of Food Science and Technology.  
55 (12): 5106-5114.

**RESUMEN**

Este estudio tuvo como objetivo evaluar diferentes pretratamientos y relaciones de solventes sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de la cáscara de *Citrus aurantium* (naranja agria) extraída por ultrasonido. Se implementó un diseño factorial de dos factores (2 x 3), con cáscaras frescas y secas como condiciones de pretratamiento y agua (100%), 50% de etanol acuoso (v/v) y 96% de etanol acuoso (v/v) como los solventes. Los compuestos fenólicos se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución-arreglo de diodos y ionización por electrospray- espectrometría de masas respectivamente. Los compuestos se purificaron parcialmente mediante purificación automatizada avanzada. Los resultados indicaron que se obtuvo el contenido de fenoles máximo ( $40.95 \pm 3.44$  mg equivalentes de ácido gálico / g de peso seco) cuando se extrajeron cáscaras de naranja agria fresca con 50% (v/v) de etanol acuoso, mientras que la actividad antioxidante máxima ( $730.04 \pm 28.60$   $\mu$ mol Trolox equivalentes/g de peso seco) se obtuvieron de la extracción acuosa de cáscaras de naranja agrias secas. Se identificaron nueve compuestos fenólicos y se cuantificaron. Naringina y neohesperidina predominaron en extractos de cáscara agria, mientras que los ácidos cafeico y clorogénico fueron los menos abundantes. La evaluación de la actividad antioxidante en las fracciones sugirió que esta actividad podría atribuirse al efecto sinérgico de los nueve compuestos fenólicos presentes en el extracto crudo. Por consiguiente, la cáscara de naranja agria es una fuente potencial de compuestos fenólicos con actividad antioxidante.

Palabras clave: *Citrus aurantium*, compuestos fenólicos de cítricos, actividad antioxidante, UPLC–PDA ESI–MS, UAE.

## 7. INTRODUCCIÓN

México se sitúa como el quinto productor mundial de cítricos, con un promedio de 4.2 millones de toneladas por año. Solo los frutos cítricos representan el 22.5% del volumen total de la producción producida en el país. Aproximadamente el 90% de la producción de cítricos de México se dedica al consumo fresco y el 10% se utiliza en la industria comercial de zumos y concentrados (SAGARPA 2012). Alrededor del 45-60% del producto se convierte en desechos, incluidas las cáscaras, las semillas y las membranas. Entre las variedades de cítricos, la naranja agria (*Citrus aurantium*) se usa raramente para el consumo fresco debido a su acidez natural (Hosseini et al. 2016). En su lugar, el jugo de naranja agria se usa a menudo como ingrediente para marinar carne o como aderezo para ensaladas. Estudios anteriores han demostrado que la cáscara de naranja agria contiene una variedad de compuestos fenólicos, como la naringina, neohesperidina, hesperidina, neoeriocitrina, narirutina, didilamina, y los ácidos clorogénico y cumárico (Jayaprakasha et al., 2008; Safdar y otros, 2017; Sawalha et al. 2009).

Los antioxidantes son capaces de retrasar o inhibir la oxidación, al interrumpir la formación y propagación de los radicales libres. Ferreira et al. (2018) observaron que los compuestos fenólicos obtenidos mediante la extracción acuosa etanólica, acuosa y en fase sólida de la mandarina (*Citrus reticulata*) presentaron una fuerte actividad de eliminación de radicales 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). El interés en compuestos fenólicos presentes en los subproductos de la fruta ha aumentado dado su uso potencial como aditivos o suplementos biológicamente activos en productos alimenticios. Además, los estudios de las condiciones de extracción para aumentar los rendimientos de recuperación al mismo tiempo que se conservan las bioactividades inherentes de los componentes también han aumentado (Papoutsiset al. 2018). Los métodos de extracción convencionales, como Soxhlet (Heleno et al. 2016) y maceración (Castro-López et al. 2017; Xu et al. 2017) son enfoques comunes para obtener compuestos fenólicos de cítricos. Sin embargo, se produce una reducción en la bioactividad de los productos resultantes (Jovanovic´et al. 2017). La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es un método no convencional que tiene ventajas demostradas con respecto a los métodos convencionales, debido a la reducción de tiempo y solvente, fácil manejo y alta reproducibilidad (Pico´2013). Factores como el pretratamiento



de la muestra y el tipo y concentración del solvente influyen en el rendimiento de los compuestos fenólicos recuperados (Molina-Calle et al. 2015). Durante la EAU de cáscaras de mandarina con etanol y metanol al 50%, 80% y 100% (v / v) se observó que las soluciones al 80% de los solventes condujeron a la mayor recuperación de compuestos fenólicos (Safdar et al. 2017). La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos a partir de residuos de cítricos se realiza comúnmente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Díaz-García et al. 2013; Sawalha et al. 2009). Sin embargo, las tecnologías mejoradas de cromatografía y técnicas de espectroscopia de masas, como la cromatografía líquida de alto rendimiento - detector de arreglo de diodos acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray (UPLC – PDA ESI – MS), han proporcionado información valiosa además que permiten la reducción del tiempo y el solvente. Hoy en día pocos estudios han investigado la EAU de compuestos fenólicos y el perfil fenólico o la actividad antioxidante de tales constituyentes en extractos de cáscara de naranja agria. Este estudio determinó el efecto del pretratamiento y la concentración de solvente sobre el contenido total de fenoles (TPC) y la actividad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos obtenidos mediante EAU a partir de cáscaras de naranja (*C. aurantium*) y caracterizó los compuestos fenólicos por UPLC – PDA ESI – MS.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Material vegetal y reactivos**

Las naranjas (*C. aurantium*), comúnmente conocidas como "naranja agria", se compraron en un mercado local en Yucatán, México. Las frutas se pelaron y las cáscaras frescas se cortaron y se dividieron en dos grupos: uno se procesó inmediatamente y el segundo grupo se secó en un deshidratador de vapor (Jersa 148-09, México) con circulación de aire a una temperatura de 45 ° C durante 24 h. Las cáscaras de naranja agria se molieron finamente (Pulvex 200 grinder, México) y se pasaron a través de un tamiz de metal de 0.500 mm. Los siguientes reactivos y estándares se adquirieron en Sigma-Aldrich, EE. UU.: Reactivo de Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido cafeico, ácido p-cumárico, sinápico, naringina, neohesperidina, ácido elágico, morina, ácido clorogénico y metanol y acetonitrilo grado HPLC. El agua ultrapura se preparó en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.)

## 8.2. Caracterización fisicoquímica

El total de sólidos solubles en muestras de cáscara de naranja agria fresca y seca se midió utilizando un refractómetro Abbe (Atago, Japón). La acidez titulable total (TTA) se midió de acuerdo con el método estándar de la AOAC (1990) y se expresó como porcentaje de ácido cítrico. El pH se registró utilizando un potenciómetro (Oaklon pH 700, Singapur) (AOAC 1990). Se calculó el contenido de humedad (AOAC 1990) empleando una termobalanza (Ohaus MB-45, Suiza). El color se caracterizó utilizando un colorímetro Mini Scan EZ (MSEZ 1505), VA, EE. UU.) y se expresaron como las coordenadas L \* (negro / blanco), a \* (verde / rojo) y b \* (azul / amarillo).

## 8.3. Evaluación de la extracción asistida por ultrasonido

Se utilizó un diseño factorial de dos factores ( $2 \times 3$ ) para identificar los principales factores que influyen en el proceso de extracción. Se utilizaron cáscaras de naranja agria fresca y seca como dos niveles del factor pretratamiento de la muestra y etanol 50% acuoso (v / v) (E50D), etanol 96% acuoso (v / v) (E90D) y 100% de agua (WD) se utilizaron como los tres niveles del factor solvente. Durante el proceso de la EAU, se sumergieron por separado 4 g de cáscaras molidas secas o 9 g de cáscaras frescas (para mantener la misma cantidad de material de cáscara en forma seca, en ambas muestras) en 200 ml de cada solvente. Posteriormente, las muestras se sonicaron con una sonda de ultrasonido (frecuencia 20 kHz, potencia 130 W, capacidad máxima de 200 ml (procesador ultrasónico, modelo GEX130PB, Newtown, CT, EE. UU.) durante 12.5 minutos a 80% de radiación, de acuerdo con el trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio (Covarrubias-Cárdenas et al. 2018). Se usó un baño frío para mantener la temperatura por debajo de 50 ° C. Se preparó una muestra control mediante la maceración de la cáscara seca con etanol al 50% (v / v) (Castro López et al., 2017). Después de la sonicación, las muestras se filtraron al vacío (papel filtro Whatman n° 1) y se almacenaron a 4 ° C para su posterior análisis.

## 8.4. Determinación de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

El TPC de los extractos de cáscara de naranja agria se determinó utilizando el método modificado de Folin y Ciocalteu (1927) y los resultados se expresados como miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco (bs) basados en una curva de

calibración de ácido gálico. El efecto de captación de radicales DPPH se expresó como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox (TE) por gramo de fruta seca, basado en una curva de calibración de Trolox.

#### 8. 5. Análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC–PDA y UPLC–PDA ESI–MS

Los perfiles cromatográficos de compuestos fenólicos en extractos de cáscara de naranja agria seca se analizaron usando un equipo Waters UPLC Acquity H Class (Milford, MA, EE. UU., 2010) equipado con una bomba cuaternaria (UPQSM), inyector automático (UPPDALTC) y el PDA (UPPDALTC)). Se utilizó el software Waters Empower 3 para la adquisición y el procesamiento de datos. Los compuestos fenólicos se separaron cromatográficamente en una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 ( $1,7 \mu\text{m}$ ,  $100 \times 2,1 \text{ mm i.d}$ ) a temperatura ambiente, flujo de  $0,2 \text{ ml min}^{-1}$  y volumen de inyección programado a  $1.56$  a  $2 \mu\text{L}$ . La fase móvil fue de  $0.1\%$  de ácido fórmico en agua ultrapura (A) y  $0.1\%$  de ácido fórmico en acetonitrilo (B). El gradiente se programó de la siguiente manera:  $100\%$  A ( $0.0$ – $2.0 \text{ min}$ ),  $90.0\%$  A ( $2.0$ – $4.0 \text{ min}$ ),  $77.0\%$  A ( $4.0$ – $6.0 \text{ min}$ ),  $77.0\%$  A ( $6.0$ – $7.0 \text{ min}$ ),  $76.5\%$  A ( $7.0$ – $17.5 \text{ min}$ ),  $0.0\%$  A ( $17.5$ – $18.0 \text{ min}$ ),  $50\%$  A ( $18.0$ – $24.0 \text{ min}$ ) y  $100\%$  A ( $24.0$ – $30 \text{ min}$ ). La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó utilizando curvas estándar construidas a concentraciones de  $1$  a  $100 \text{ ppm}$  con un límite de cuantificación de  $1 \text{ ppm}$  (ácido cafeico, ácido p-cumárico, sinápico, naringina, neohesperidina, ácido elágico, morína y ácido clorogénico). El TPC se expresó como la suma de todos los compuestos obtenidos por UPLC.

El análisis cromatográfico UPLC – PDA ESI – MS se realizó con el mismo equipo descrito anteriormente, acoplado a un detector de espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S. El software Waters MassLynx V4.1 se utilizó para la adquisición y el procesamiento de datos. El detector del espectrómetro de masas funcionó en modo ESI negativo, con el voltaje capilar a  $4,0 \text{ kV}$ , voltaje de cono de  $50 \text{ V}$ , temperatura de desolvatación de  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura de fuente de  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  y energía de colisión de  $1 \text{ V}$ . Se utilizó argón de ultra alta pureza como gas de colisión. El nitrógeno, generado por un generador de nitrógeno Peak Scientific NM32LA (Inchinnan, Escocia, Reino Unido), se usó como cono y como gas de desolvatación, con tasas de flujo de  $50$  y  $650 \text{ L h}^{-1}$ , respectivamente. Los espectros de masas se registraron en modo de exploración completa en el rango  $m / z$   $20$ – $700$ . La separación cromatográfica de los

compuestos fenólicos se logró en las mismas condiciones que las utilizadas en el análisis cuantitativo por UPLC-PDA.

#### 8.6. Purificación parcial de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se purificaron utilizando un dispositivo de cromatografía ultra rápido automatizado avanzado (Isolera One, Biotage, Suecia) equipado con un cartucho Biotage SNAP C18 de 30 g. Cuatro mililitros de la muestra se redujeron a 50% en volumen mediante evaporación rotatoria (Buchi R-215, Suiza). Las muestras se eluyeron a un caudal de  $25 \text{ ml min}^{-1}$  utilizando un gradiente de ácido fórmico al 0.1% en agua ultrapura (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B), programado de la siguiente manera: 3 volúmenes de columna (CV) de 0% isocrático B; gradiente lineal de 0 a 10% de B en 2 CV; gradiente lineal de 10 a 23% de B en 2 CV; 1 CV de 23% B isocrático; gradiente lineal de 23 a 24% de B en 10.5 CV; gradiente lineal de 24 a 100% en 2 CV; 100% a 50% B en 6 CVs. El monitoreo del pico fue por detección UV a 290 nm de longitud de onda. Las fracciones se evaluaron para determinar la actividad antioxidante y las determinaciones de TPC, como se explicó anteriormente. Para obtener resultados comparables, el TPC de las fracciones se fijó a 4 mg de GAE / g bs para la determinación de la actividad antioxidante.

#### 8.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar. El diseño factorial de dos factores se analizó mediante un análisis de varianza multifactorial (ANOVA), seguido del diseño de mínimos cuadrados (LSD) utilizando Statgraphics Centurion versión XVI, (Manugistic, Inc., Rockville, MD, software de EE. UU.).

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Análisis fisicoquímico de cáscaras frescas y secas de naranja agria

Los parámetros fisicoquímicos de las cáscaras de naranja agria fresca y seca (Tabla 1) revelaron valores de pH de 4.12 y 4.23, y valores de TTA de 0.75% y 1.43%, respectivamente. Rekha et al. (2012) y Moufida y Marzouk (2003) coinciden en que los valores de pH y TTA están relacionados con el alto contenido de ácido ascórbico y cítrico presentes en las cáscaras de naranja agria. El TTA obtenido para cáscaras de naranja agria fresca fue similar al documentado por Ersus y Cam (2007), de 0.7%. La acidez puede brindar información sobre la conservación de un producto alimenticio y el aumento de la acidez puede asociarse con una disminución del crecimiento microbiano (Jonsson et al. 2013). Las cáscaras de naranja agria secas mostraron un valor Brix más alto ( $2.0 \pm 0.0$ ) que las muestras frescas ( $1.5 \pm 0.0$ ), lo que puede atribuirse a la hidrólisis de los azúcares, la formación de productos y la concentración de sólidos, durante el pretratamiento de secado. Se observaron  $69,33 \pm 0,69\%$  y  $10,67 \pm 0,65\%$  de contenido de humedad para cáscaras de naranja agria secas y frescas, respectivamente. Un bajo contenido de humedad promueve la conservación del material biológico ya que reduce la degradación microbiana. Cáscaras frescas de naranja agria tuvieron parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) de  $65.50 \pm 0.67$ ,  $-1.12 \pm 0.13$  y  $43.99 \pm 0.13$ , respectivamente. Después del secado del tratamiento previo, los valores de  $L^*$  y  $a^*$  aumentaron, lo que indica que la cáscara de naranja agria apareció más brillante con un tono rojizo aumentado, mientras que hubo una disminución en  $b^*$ , lo que implica una reducción en la amarillez.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la cáscara de naranja agria

Determinación	Cáscara fresca	Cáscara seca
pH	4.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	4.23 ± 0.02 <sup>a</sup>
Acidez titulable total (%)	0.75 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.43 ± 1.75 <sup>a</sup>
Brix (°)	1.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
Contenido de humedad (%)	69.33 ± 0.69 <sup>a</sup>	10.67 ± 0.65 <sup>b</sup>
<i>L</i> *	65.50 ± 0.67 <sup>a</sup>	68.24 ± 3.66 <sup>a</sup>
Color <sup>a</sup> <i>a</i> *	-1.12 ± 0.13 <sup>b</sup>	6.70 ± 0.16 <sup>a</sup>
<i>b</i> *	43.99 ± 0.13 <sup>a</sup>	34.41 ± 1.41 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*L*\* (negro/blanco), *a*\* (verde/rojo) y *b*\* (azul/amarillo). Diferentes superíndices en la misma fila indica diferencia significativa a  $p \leq 0.05$ .

## 9.2. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

El ANOVA realizado en el diseño factorial de dos factores (2 x 3) indicó un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en las dos respuestas evaluadas (TPC y actividad antioxidante) (Anexos 1) de ambos factores (pretratamiento de la muestra y concentración de solvente) individualmente y su interacción. El TPC de los tratamientos frescos y secos varió de 22.65 ± 0.94 a 40.95 ± 3.44 mg de GAE / g bs (Tabla 3). Las cáscaras secas de naranja agria presentaron el contenido fenólico más bajo, mientras que el TPC más alto se observó para las cáscaras frescas de naranja agria. La variación entre resultados puede atribuirse al proceso de secado, durante el cual se adhieren las membranas celulares y organelos lo que impide la extracción de fenoles y por lo tanto disminuyen los rendimientos.

Del mismo modo, Casquete et al. (2015) obtuvieron un contenido fenólico más alto (2.84 mg GAE / g bs) en cáscaras frescas de naranja dulce en lugar de secas. Otro estudio mencionó que el pretratamiento de materiales biológicos de plantas que utilizan altas temperaturas y tiempos prolongados podría disminuir el contenido de fenoles (Liet et al., 2006). En contraste, Jeong et al. (2004) describieron un aumento significativo en el TPC a partir de extractos de cáscara de naranja agria tratados a temperaturas superiores a 50 ° C. Del mismo

modo, Que et al (2008) indicaron la posible formación de compuestos fenólicos durante el secado térmico a  $>70^{\circ}\text{C}$ . Los extractos de etanol al 50% tuvieron los contenidos fenólicos más altos. El análisis de interacción, indicado por ANOVA, mostró que la combinación de cáscara fresca de naranja agria y etanol al 50% presentó la mayor recuperación de compuestos fenólicos ( $40.95 \pm 3.44$  mg de GAE / g bs). Del mismo modo, los resultados del extracto de cascara seca de naranja también demostraron un contenido de fenoles relativamente más alto cuando se utilizó etanol al 50% ( $32.68 \pm 0.55$  mg GAE / g bs) en lugar de agua al 100% o etanol acuoso al 96% (Tabla 3). El etanol causa deshidratación celular, lo que podría disminuir el contenido fenólico cuando se utiliza una alta concentración, lo que corrobora los hallazgos de Safdar et al. (2017), en el que se encontró un mayor contenido fenólico en muestras extraídas con etanol al 50% en comparación con soluciones de etanol al 80% y 100%. La polaridad del solvente juega un papel importante en el proceso de extracción (Safdar et al. 2017). En las mezclas de etanol y agua, el agua puede crear un medio más polar, lo que favorece la extracción de compuestos con polaridad similar (Nayak et al. 2015). Además, el etanol es un solvente útil con el estado de generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés), lo que significa que se puede usar en la industria alimentaria.

Los resultados de la actividad antioxidante variaron de  $253.9 \pm 3.65$  a  $730.04 \pm 28.60$   $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ , también expresadas como porcentaje de inhibición de DPPH (Tabla 3). Se observó una actividad antioxidante mayor cuando se utilizaron cáscaras secas de naranja agria para la extracción. Esto puede indicar que algunos compuestos fitoquímicos reaccionan durante el proceso de secado formando otros compuestos antioxidantes mediante la interacción de fenoles con proteínas (Martín-Cabrejas et al., 2009). Se ha observado que el pretratamiento de secado influye en la actividad antioxidante de los extractos fenólicos. Jeonget al. (2004) determinaron que la actividad antirradical aumentaba significativamente cuando se aplicaba un tratamiento térmico a la cáscara de naranja, debido a la liberación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que poseen actividad antioxidante. Otros autores han documentado de manera similar la formación térmica inducida de dichos compuestos fenólicos (Tomaino et al., 2005; Xu y Chang, 2007). En este estudio, los extractos de agua presentaron la mayor actividad antioxidante. Por el contrario, Xu et al. (2017) encontraron un aumento en la actividad antioxidante en los extractos de flor de cítricos *Limonium sinuatum* cuando la

concentración de etanol se incrementó debido a que la polaridad fue más semejante a la polaridad de los antioxidantes.

Dada la alta actividad antioxidante de las muestras de cascara de naranja seca, se realizaron más estudios. Se realizó una extracción convencional por maceración empleando etanol al 50% debido a que este solvente fue el más efectivo en la extracción de polifenoles con ultrasonido. La extracción por maceración obtuvo un TPC significativamente más bajo ( $28.1 \pm 0.55$  mg GAE / g bs) que el obtenido por el método de EAU ( $p < 0.05$ ). Además, la actividad antioxidante observada para la muestra macerada fue menor que la exhibida por todas las muestras de cascara seca obtenidas mediante ultrasonido, lo que implica que el método de EAU mejora la preservación de la actividad antioxidante, como sugiere Jovanovic et al (2017).

Tabla 3. Parámetros de la extracción asistida por ultrasonido del diseño factorial 2x3, contenido de fenoles totales (TPC) y actividad antioxidante

Método de extracción	Pretratamiento	[Solvente]	TPC (mg GAE/g bs)	Actividad antioxidante	
				Inhibición DPPH (%)	$\mu\text{mol TEAC/g bs}$
UAE	Cáscara fresca	Etanol 96	$37.6 \pm 2.45^b$	$57.9 \pm 3.47^b$	$558.7 \pm 51.32^b$
UAE	Cáscara fresca	Etanol 50	$40.9 \pm 3.44^a$	$37.4 \pm 0.25^d$	$253.9 \pm 3.65^d$
UAE	Cáscara fresca	Agua	$37.9 \pm 0.48^b$	$50.8 \pm 0.25^c$	$452.7 \pm 3.65^c$
UAE	Cáscara seca	Etanol 96	$22.8 \pm 0.34^c$	$67.6 \pm 0.55^a$	$701.1 \pm 8.17^a$
UAE	Cáscara seca	Etanol 50	$32.7 \pm 0.55^c$	$67.6 \pm 0.13^a$	$701.8 \pm 1.94^a$
UAE	Cáscara seca	Agua	$22.7 \pm 0.94^c$	$69.5 \pm 1.93^a$	$730.0 \pm 28.60^a$
Maceración	Cáscara seca	Etanol 50	$28.1 \pm 0.55^d$	$50.0 \pm 0.91^c$	$441.6 \pm 13.48^c$

GAE Equivalentes de ácido gálico, TEAC Equivalentes de Trolox. Diferentes letras en la misma columna denotan diferencia significativa.



### 9.3. Análisis de la composición de compuestos fenólicos de extractos de cáscara seca de naranja agria mediante UPLC-PDA

Considerando que el pretratamiento de secado de la cáscara de naranja agria resultó en la mayor actividad antioxidante, los tratamientos de EAU correspondientes a las tres concentraciones de solventes diferentes se seleccionaron para perfilar los compuestos fenólicos mediante UPLC-PDA. Los compuestos fenólicos se identificaron en función de sus tiempos de retención y se cuantificaron de acuerdo a las curvas de calibración estándar. El análisis de cromatografía de los tres extractos mostró cromatogramas similares, con dos picos principales atribuidos a la naringina y la neohesperidina respectivamente (Fig. 2). También se detectaron picos cromatográficos menores, lo que indica la presencia de ácido cumárico, morina, ácido cafeico, ácido clorogénico, diosmina y ácido elágico (Fig. 2). El contenido fenólico también se calculó sumando las concentraciones de todos los compuestos identificados en el cromatograma, que indicaron el máximo TPC para E50D ( $39.41 \pm 5.22$  mg/g bs).

Se observó un comportamiento similar utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, aunque el valor fue ligeramente superior. La WD presentó la concentración más baja ( $11.21 \pm 1.39$  mg/g bs) (Tabla 4). Se cuantificaron contenidos de 14.06, 12.31 y 3.11 mg/g bs de naringina y 13.32, 3.33 y 12.87 mg/g bs de neohesperidina en los extractos de E50D, E96D y WD respectivamente. Entre otros compuestos observados, el ácido elágico no se detectó en el extracto de WD, esto puede atribuirse a el anillo aromático que le confiere propiedades lipofílicas y lo hace insoluble en agua (Li et al. 2013a). Los compuestos fenólicos como la naringina, narirutina y didimina se han identificado previamente en extractos de frutas de naranja agria por Jayaprakasha et al. (2008). Además, Safdar et al. (2017) y Karimi et al. (2012) informaron que la naringina y la neohesperidina son los flavonoides glicosilados predominantes en la cascara de otra variedad de cítricos y en las flores de naranja agria, respectivamente. Sin embargo, ningún estudio previo ha identificado y cuantificado los compuestos fenólicos evaluados en el documento actual. Sawalha et al. (2009) registraron naringina a  $5.1 \pm 0,2$  mg / g bs de cáscaras de naranja agria. Este compuesto fenólico principal presente en las cáscaras de cítricos ha mostrado efectos beneficiosos para la salud, como las

actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas (Bacanlı et al. 2015; Li et al. 2013b).

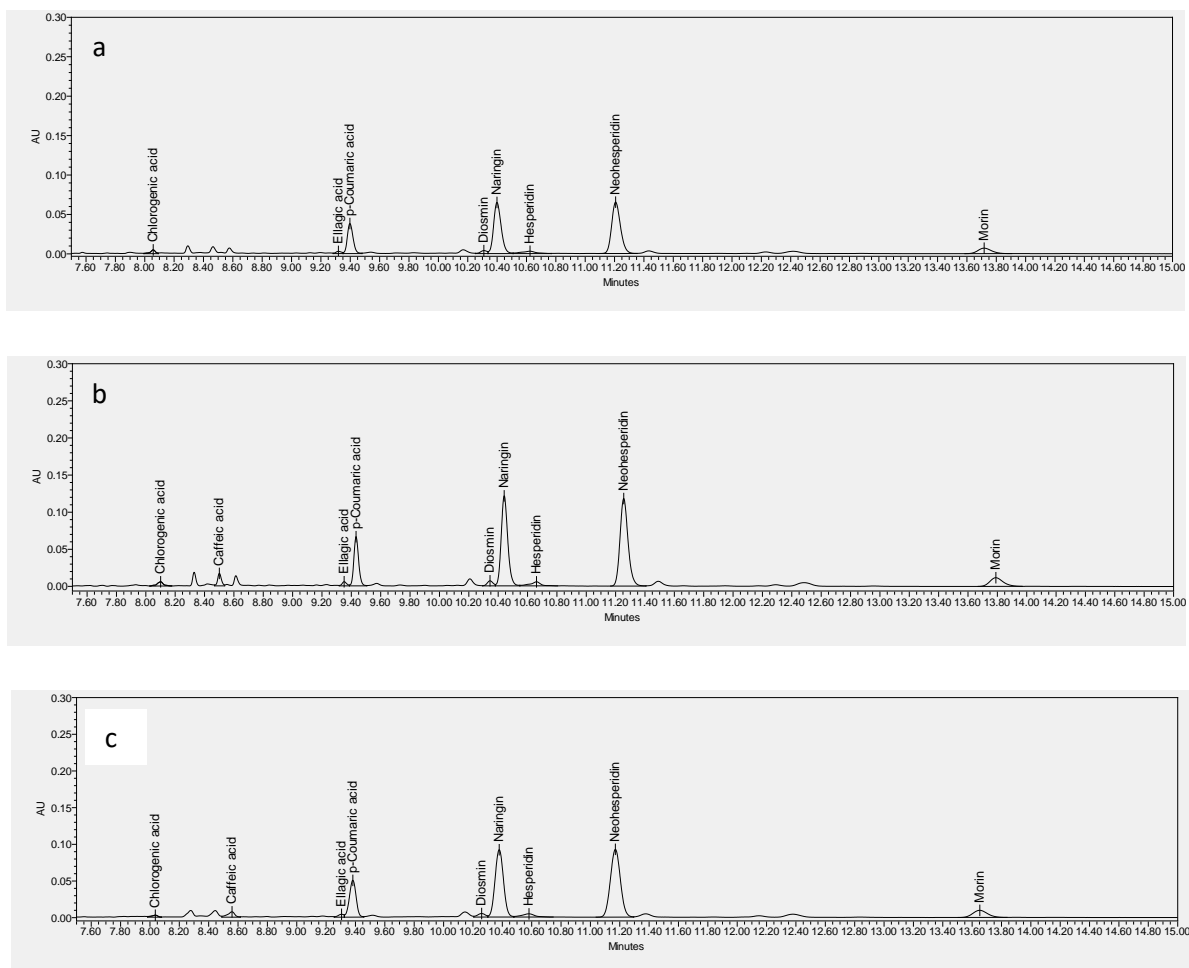


Figura 2. Cromatograma de compuestos fenólicos de cáscara de naranja agria utilizando diferentes solventes de extracción

Tabla 4. Perfil de compuestos fenólicos de extractos de cascáras secas obtenido mediante UPLC

Compuestos fenólicos (mg/g bs)	Concentración de solvente		
	Etanol 96	Etanol 50	Agua
Ácido cafeico	0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>c</sup>
Ácido clorogénico	0.87 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.13 <sup>c</sup>
Ácido cumárico	3.98 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.00 <sup>c</sup>
Diosmina	3.04 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.00 <sup>c</sup>
Ácido elágico	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.05 <sup>b</sup>	ND
Hesperidina	0.90 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.00 <sup>c</sup>
Morina	2.74 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.00 <sup>c</sup>
Neohesperidina	13.32 ± 0.04 <sup>a</sup>	12.87 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.00 <sup>c</sup>
Naringina	12.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	14.06 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.10 <sup>c</sup>
Total	32.86 ± 0.11	39.41 ± 5.22	11.21 ± 1.39

Diferentes letras en la misma fila denotan diferencia significativa. ND No detectado

#### 9.4. Análisis UPLC-PDA ESI-MS

Los datos de espectroscopía y espectrometría obtenidos mediante el análisis UPLC – PDA ESI – MS se presentan en la Tabla 5. Los parámetros del espectrómetro de masas se ajustaron hasta que los iones cuasi-moleculares [M-H] fueron los más intensos. Los espectros de masas de derivados del ácido hidroxicinámico tal como el ácido cafeico, p- cumárico y ácido sinápico mostraron fragmentos de [M-H-44] representando derivados del anion 2-phenyl-ethen 2-ide producidos por la pérdida de hidrogeno y dióxido de carbono de la estructura química (Fang et al., 2002). Además, el ácido sinápico mostró un fragmento de [MH-16], atribuido al grupo hidroxilo, mientras que el ácido clorogénico mostró un fragmento correspondiente a la pérdida de [M-H163] - (ácido cafeico), liberando el anión del ácido (-) - quinico. (detectado). Diosmina exhibió un fragmento de [M-H-308], asociado con la pérdida de rutinosido, liberando la aglicona (Barreca et al. 2011). Es notable que la pérdida de rutinosido en ambas moléculas difiere en una unidad que puede explicarse por la ionización de la rutina que se produce en la aglicona, que posteriormente se fragmenta, generando el disacárido ramnosa-glucosa [309]. Diosmina es potencialmente ionizada en el

disacárido [309-1], después de lo cual, se produce una fragmentación, con una probable transferencia de carga transformándola en aglicona. Morina mostró el fragmento [M-H-16] -, que representa la pérdida de un hidróxido.

Tabla 5. Datos de espectroscopia y espectrometria de compuestos fenólicos

<b>Compuestos</b>	<b>Espectro UV (nm)</b>	<b>MS (<i>m/z</i>)<sup>a</sup></b>
Ácido clorogénico	244.6, 325.6	[M-H] <sup>-</sup> 353.04 (72.9), 190.94 (100)
Ácido cafeico	239.9, 324.4	[M-H] <sup>-</sup> 178.91 (58.6), 134.85 (100.0)
Ácido elágico	243.3, 367.3	[M-H] <sup>-</sup> 300.99 (100)
Ácido p- cumárico	225.7, 308.9	[M-H] <sup>-</sup> 162.98 (100.0), 118.94 (17.1) [M-H] <sup>-</sup> 223.0 (100.0), 207.87 (49.1),
Ácido sinápico	323.2	179.08 (3.5), 164.25 (3.2), 148.87 (4.3), 95.85 (5.8)
Diosmina	251.7, 346.6	[M-H] <sup>-</sup> 607.18 (100.0), 299.05 (18.0), 283.28 (18.7), 255.29 (25.6)
Naringina	282.6, 329.2	[M-H] <sup>-</sup> 579.19 (100.0)
Hesperidina	283.8, 329.2	[M-H] <sup>-</sup> 609.18 (100.0)
Neohesperidina	283.8	[M-H] <sup>-</sup> 609.21 (100.0)
Morina	251.7, 295.7, 351.4	[M-H] <sup>-</sup> 300.94 (100.0), 285.11 (12.9), 94.74 (50.9)

## 9.5. Análisis de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos parcialmente purificados

Los compuestos fenólicos se purificaron parcialmente usando un sistema avanzado automatizado de purificación ultrarrápida y se determinó la actividad antioxidante, identificación y cuantificación de las fracciones. Se obtuvo un informe modificado del sistema de purificación a una longitud de onda de 290 nm (Figura 3a). Se muestran cuatro picos formados por 11 fracciones de fenólicos purificados que se combinaron para obtener 4 fracciones finales (Fig. 3a) denominadas F1, F2, F3 y F4 respectivamente. La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos obtenidos en cada fracción fueron determinados mediante UPLC.

La figura 3b muestra los principales compuestos fenólicos presentes en F1, F2, F3 y en el extracto crudo. Se observó que el ácido clorogénico fue el compuesto más prevalente (38.31%) en F1, seguido de un compuesto desconocido codificado como NC-1 (31,50%) y ácido cafeico (30,19%) y 11.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TPC. El ácido cumárico predominó (98,12%) en F2, seguido del ácido elágico (1,88%), lo que dio como resultado la fracción más purificada, con un TPC de 5.97  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . F3 presentó el mayor número de compuestos, pero predominó la naringina (48.64%) y neohesperidina (48.17%), con cantidades menores de hesperidina (2.08%) y diosmina (1.98%), lo que resultó en una fracción final con 43.4  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de TPC. Debido a la menor concentración de TPC en F4 en comparación con las otras, la identificación fue difícil. Los compuestos fenólicos presentes en el extracto crudo pueden tener diferentes actividades antioxidantes a las fracciones, por lo que el extracto crudo y las fracciones purificadas se fijaron a una concentración de 4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , para evaluar las actividades antioxidantes individuales. Los datos se compararon para determinar la influencia de los diferentes compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante. El extracto crudo tuvo la mayor actividad antioxidante (88  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ), seguido por F2, que mostró la mayor actividad antioxidante entre las fracciones (68  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ). Estos resultados sugieren que puede ocurrir un comportamiento sinérgico en el extracto crudo, debido a la combinación de los nueve compuestos presentes en la muestra, como lo mencionaron Shiraishi et al. (2018), quienes evaluaron los compuestos fenólicos presentes en uvas de mesa.

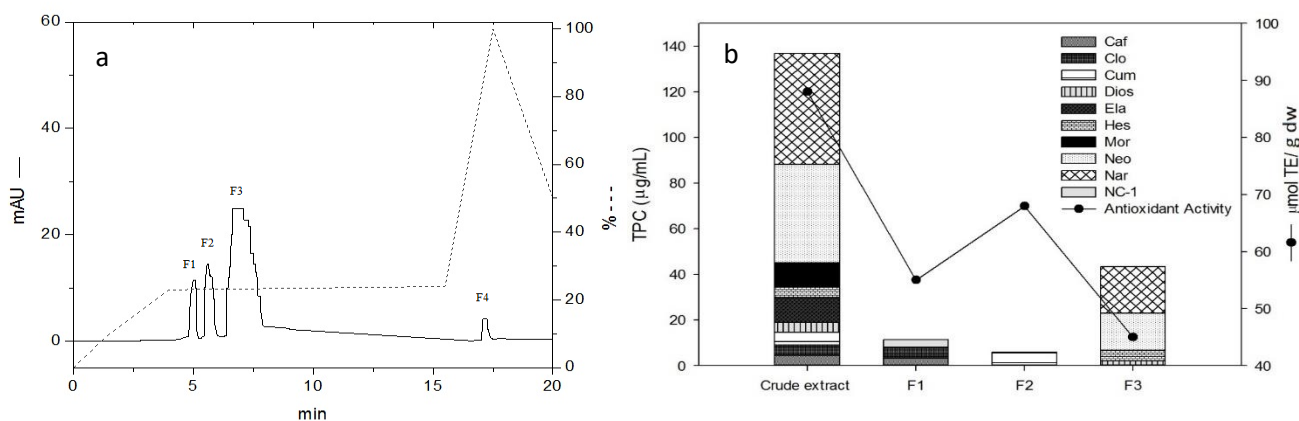


Figura 3. Cromatograma modificado a 290 nm de las fracciones obtenidas mediante el sistema de separación Isolera One. a) Perfil fenólico de fracciones obtenidas mediante cromatografía líquida de alta resolución y b) actividad antioxidante expresada como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de peso seco ( $\mu\text{mol TE/g bs}$ )

## 10. CONCLUSIÓN

Se desarrolló con éxito un método rápido y eficiente para extraer compuestos fenólicos de las cáscaras de *C. aurantium* utilizando la extracción asistida por ultrasonido. El mayor TPC y actividad antioxidante se identificó en las cáscaras frescas extraídas con etanol acuoso al 50% y los extractos acuosos de cáscaras secas, respectivamente. Nueve compuestos fenólicos, incluidos cuatro ácidos fenólicos y cinco flavonoides, fueron identificados y cuantificados por UPLC-PDA y confirmados por ESI-MS. Naringina y neohesperidina fueron los compuestos más abundantes. Las determinaciones de la actividad antioxidante de cuatro fracciones obtenidas mediante la purificación automatizada del extracto de cáscaras indicaron un efecto sinérgico potencial de todos los compuestos fenólicos identificados. La cáscara de naranja agria es una fuente potencial de compuestos fenólicos con actividad antioxidante que se puede usar en la producción de alimentos funcionales.

## 11. REFERENCIAS

AOAC (1990) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. In: Horwitz W, Latimer G (eds) 2015th edn. Maryland, USA, p 10.

Bacanlı M, Başaran AA, Başaran N (2015) The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem Toxicol* 81:160–170. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.0150278-6915>.

Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G (2011) Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chem* 129:417–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.093>.

Casquete R, Castro SM, Martín A, Ruiz-Moyano S, Saraiva JA, Córdoba MG, Teixeira P (2015) Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels. *Innov Food Sci Emerg Technol* 31:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.07.005>.

Castro-López C, Ventura-Sobrevilla JM, González-Hernández MD, Rojas R, Ascacio-Valdés JA, Aguilar CN, Martínez-Ávila GCG (2017) Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. *Food Chem* 237:1139–1148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>.

Covarrubias-Cárdenas AG, Martínez-Castillo JI, Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, García-Cruz NU, Pacheco N (2018) Antioxidant capacity and UPLC–PDA ESI–MS phenolic profile of *Stevia rebaudiana* dry powders extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Agronomy* 8:170. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090170>.

Díaz-García MC, Obón JM, Castellar MR, Collado J, Alacid M (2013) Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chem* 138:938–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.061>.

Ersus S, Cam M (2007) Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chem Nat Compd* 43:607–609. <https://doi.org/10.1007/s10600007-0203-1>.

Fang N, Yu S, Prior RL (2002) LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J Agric Food Chem* 50:3579–3585. <https://doi.org/10.1021/jf0201327>.

Ferreira SS, Silva AM, Nunes FM (2018) Citrus *reticulata* Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. *Ind Crop Prod* 111:141–148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.009>.

Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:627–650.

Heleno SA, Diz P, Prieto MA, Barros L, Rodrigues A, Barreiro MF, Ferreira ICFR (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chem* 197:1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>

Hosseini SS, Khodaiyan F, Yarmand MS (2016) Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydr Polym* 140:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.051>

Jayaprakasha GK, Girenavar B, Patil BS (2008) Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresour Technol* 99:4484–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.067>

Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC (2004) Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem* 52:3389–3393. <https://doi.org/10.1021/jf049899k>.

Jonsson JL, Alriksson B, Nils-Olof N (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 6:16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>

Jovanovic AA, Đordjević VB, Zdunic GM, Pljevljaković DS, Šavikin KP, Godićevac DM, Bugarski BM (2017) Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep Purif Technol* 179:369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>.

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A, Jaafar HZE (2012) Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules* 17:1203–1218. <https://doi.org/10.3390/molecules17021203>.

Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S (2006) Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 96:254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>

Li B, Harich K, Wegiel L, Taylor LS, Edgar KJ (2013a) Stability and solubility enhancement of ellagic acid in cellulose ester solid dispersions. *Carbohydr Polym* 92:1443–1450. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.051>

Li H, Yang B, Huang J, Xiang T, Yin X, Wan J, Luo F, Zhang L, Li H, Ren G (2013b) Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting b-catenin signaling pathway. *Toxicol Lett* 220:219–228. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.006>

Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, Pedrosa MM, Cuadrado C, Hernandez T, Díaz S, Esteban RM (2009) The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chem* 114:1063–1068. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.070>.

Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque de Castro MD (2015) Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: influence of sample pretreatment on composition. *Talanta* 144:349–355. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.054>

Moufida S, Marzouk B (2003) Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* 62:1283–1289. [https://doi.org/10.1016/S00319422\(02\)00631-3](https://doi.org/10.1016/S00319422(02)00631-3)

Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, Khodir M (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem* 187:507–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>

Papoutsis K, Pristijono P, Golding JB, Stathopoulos CE, Bowyer MC, Scarlett CJ, Vuong QV (2018) Screening the effect of four ultrasound-assisted extraction parameters on hesperidin and phenolic acid content of aqueous citrus pomace extracts. *Food Biosci* 21:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.001>

Pico Y (2013) Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends Anal Chem* 43:84–99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005>.

Que F, Mao L, Fang X, Wu T (2008) Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata*)



Duch.) flours. *Int J Food Sci Technol* 43:1195–1201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01590.x>

Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi JP, Kumar VH, Kekuda TR (2012) Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chem Sci Trans* 1:303–310. <https://doi.org/10.7598/cst2012.182>

Safdar MN, Kausar T, Jabbar S, Mumtaz A, Ahad K, Saddozai AA (2017) Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J Food Drug Anal* 25:488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>

SAGARPA (2012) Mexico, quinto productor mundial de citricos. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201209B068.aspx>. Accessed 21 Dec 2017

Sawalha SMS, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez Gutierrez A (2009) Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chem* 116:567–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>.

Shiraishi M, Shinomiya R, Chijiwa H (2018) Varietal differences in polyphenol contents, antioxidant activities and their correlations in table grape cultivars bred in Japan. *Sci Hortic* 227:272–277. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.032>

Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A (2005) Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem* 89:549–554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>

Xu BJ, Chang SKC (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* 72:S159–S166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>

Xu DP, Zheng J, Zhou Y, Li Y, Li S, Li HB (2017) Ultrasoundassisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem* 217:552–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.013>

**CAPÍTULO 2: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PERFIL FENÓLICO  
MEDIANTE UPLC-PDA ESI-MS DE EXTRACTOS DE HOJAS  
SECAS DE *Stevia rebaudiana* OBTENIDOS MEDIANTE  
EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO**

Capítulo publicado en versión en inglés en la revista *Agronomy* (2018) 8, 170.

**RESUMEN**

Las hojas de estevia utilizadas comúnmente como edulcorantes naturales en productos alimenticios han aumentado en importancia para el suministro de antioxidantes debido a su alto contenido de compuestos fenólicos. En este estudio, se evaluó la influencia del proceso de secado en las hojas de estevia, en relación con el contenido fenólico y la actividad antioxidante durante una cinética de secado a 40 ° C durante 7 h. Se evaluó el efecto de la concentración de disolvente y el tiempo de extracción utilizando un diseño factorial 3<sup>2</sup> sobre el contenido total de polifenoles (TPC) y sobre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las hojas secas de estevia mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) como método alternativo. Los contenidos de glicósidos de esteviol también se evaluaron mediante un método convencional y por EAU. La identificación, cuantificación y purificación de fenoles se realizó mediante cromatografía líquida- ionización por electro spray- espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS), cromatografía líquida- arreglo de diodos (UPLC-PDA) y purificación automática avanzada, respectivamente. El tiempo de secado afectó el contenido de humedad de las hojas de estevia. Se alcanzó un peso constante después de seis horas de secado y se observó una mayor actividad antioxidante, mientras que el TPC más alto se obtuvo después de siete horas de secado. El TPC más alto ( $91.57 \pm 8.8$  mg GAE/g bs) y la actividad antioxidante ( $603.24 \pm 3.5$   $\mu$ mol TE/g bs) en el método de EAU se obtuvo cuando se utilizó etanol al 50% a los 5 min. Los glicósidos de esteviol extraídos mediante EAU se registraron con un contenido de  $93,18 \pm 1,36$  mg/g bs y  $98,97 \pm 1,75$  mg/g bs para esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente. Se identificaron y cuantificaron seis compuestos fenólicos, incluidos cuatro ácidos fenólicos y dos flavonoides, mediante UPLC-PDA, y se confirmó mediante ESI-MS que informó su patrón de fragmentación. Diosmina y el ácido clorogénico fueron los compuestos más abundantes con valores de 2032.36  $\mu$ g/ml y 434.95  $\mu$ g/ml, respectivamente. Como novedad,

encontramos que la actividad antioxidante evaluada en fracciones parcialmente purificadas sugirió que la actividad biológica podría atribuirse al efecto sinérgico de los seis fenoles presentes en el extracto de hojas de estevia. Además de sus propiedades edulcorantes, las hojas de estevia constituyen una fuente potencial de compuestos polifenólicos, con actividad antioxidante que podría utilizarse como aditivo alimentario.

Palabras claves: hojas de estevia, cinética de secado, EAU, fenoles, actividad antioxidante, purificación parcial.

## 12. INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* es una planta herbácea perenne compuesta por hojas que contienen una fuente natural de glucósidos diterpénicos, esto permite que se utilicen ampliamente como sustituto no calórico del azúcar, debido a que es de 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa (Kim et al., 2011). Se emplea tradicionalmente en bebidas no alcohólicas, productos de panadería y goma de mascar (Goyal y Goyal, 2010). Además de los glucósidos, los extractos de hojas de estevia contienen fitoquímicos, como los fenoles, que son los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos (Kim et al., 2011; Najafian y Moradi, 2017). Recientemente, estos fitoquímicos han tomado importancia en la salud humana ya que los agentes protectores contra el daño oxidativo se deben a sus capacidades para retrasar o inhibir la formación y propagación de radicales libres (Kumar et al., 2015, Fattore et al., 2016). En un esfuerzo por prolongar la vida útil y preservar la calidad de las hojas de estevia antes de la extracción de los compuestos fenólicos, se recomienda un proceso de deshidratación para reducir el contenido de humedad, simplificar el proceso de extracción y aumentar el rendimiento de los compuestos fitoquímicos (Periche et al., 2015; Castillo Tellez et al., 2018). Estudios anteriores han demostrado la influencia del proceso de secado en aspectos de la calidad de las hojas de estevia, como el color, la vitamina C, el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante (Garau et al., 2007, Vega-Gálvez et al., 2009). Lemus-Mondaca et al. (2016) afirmó que había un aumento en el contenido total de fenoles (TPC) y la actividad antioxidante después de secar las hojas de estevia a 30, 40, 50, 60 y 70 ° C, con el valor más alto alcanzado a 40 ° C.

Recientemente, ha surgido un desarrollo significativo de técnicas de extracción para compuestos fenólicos (Katsampa et al., 2015, Kovac̆evic' et al., 2018). La extracción asistida por ultrasonido (EAU) se ha utilizado con éxito y se considera un método sustentable (Medina-Torres et al., 2017). Diversos estudios han mostrado las EAU como un método con alta recuperación de compuestos en comparación con otros métodos de extracción. Además, se pueden usar solventes con diferentes polaridades, lo que permite la extracción de compuestos con estructuras químicas variadas (Falleh et al., 2012). Zlabur et al. (2015) mostraron un mayor rendimiento de extracción de TPC en extractos acuosos de hojas de estevia empleando EAU en comparación con un método de extracción convencional. Muanda et al. (2016) reportó que los principales compuestos fenólicos en extractos acuosos e hidroalcohólicos de hojas de estevia obtenidos mediante maceración fueron la quercetina deshidratada, el ácido protocatéuico y la quercetina glucosilada.

La identificación y cuantificación de fenoles se realiza comúnmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Lemus-Mondaca et al. (2016) reportaron la identificación de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido transferúlico y rutina en extractos de hojas de estevia extraídas por el método de maceración. Muanda et al. (2011) identificaron por medio de cromatografía fase reversa compuestos presentes en extractos acuosos y metanol-agua de hojas de estevia. Además, se utilizan técnicas cromatográficas específicas, como la purificación ultra rápida automatizada avanzada de compuestos fenólicos para identificar los efectos individuales o sinérgicos de diferentes compuestos antioxidantes. En un estudio previo, Covarrubias-Cárdenas et al. (2018) obtuvo fracciones fenólicas mediante purificación ultrarrápida a partir de extractos de naranja agria, la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones indicó que la actividad biológica puede atribuirse al efecto sinérgico de los nueve fenoles presentes en el extracto de naranja agria.

Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo: (a) Determinar la influencia del proceso de secado sobre el TPC y la actividad antioxidante para producir polvo de hoja de estevia; (b) evaluar el efecto de la concentración de solvente y el tiempo de extracción sobre el TPC y la actividad antioxidante de los extractos de hojas de estevia obtenidos mediante EAU como un método alternativo; (c) realizar una purificación parcial de fenoles, para evaluar la fracción con mayor actividad antioxidante; y (d) identificar y cuantificar los compuestos

fenólicos presentes en las muestras mediante cromatografía de líquidos (UPLC-PDA) Ionización por electrospray- espectrometría de masas (ESI-MS).

### **13. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 13.1. Material vegetal y reactivos

Las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) se obtuvieron de un productor local en Yucatán México. Reactivo de Folin-Ciocalteu, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido ferúlico, diosmina, rutina, metanol y acetonitrilo fueron obtenidos en Sigma Aldrich. Se utilizó agua ultrapura en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### 13.2. Cinética de secado

El proceso de secado se realizó a 40 ° C en un deshidratador de secado de hojas de estevia. Las hojas de estevia se seleccionaron según el color y la frescura de acuerdo con un análisis visual esto para obtener un grupo homogéneo vapor (Jersa, 148-09, México, México) a velocidad de aire constante hasta que se logró un peso constante después de 7 h. El muestreo se realizó cada hora, las hojas se mantuvieron en un desecador para evitar la hidratación. El contenido de humedad se determinó en hojas de estevia frescas y en las muestras obtenidas durante la cinética de secado empleando una termobalanza (Ohaus MB-45-2A0, Greifensee, Suiza).

La extracción de fenoles en las muestras de hojas de estevia se realizó de acuerdo con el método de maceración descrito por Lemus-Mondaca et al. (2016) con ligeras modificaciones. Brevemente, 10 g de la muestra de hojas de estevia se homogeneizaron en agua a una relación de 1:10 (g / ml). Posteriormente, los extractos se mantuvieron en agitación durante 2 horas a 50 ° C, luego las muestras se filtraron a través de un papel de filtro Whatman® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) (número 1) en condiciones de vacío y se almacenaron a 4 ° C para un análisis adicional.

#### 13.3. Contenido de fenoles totales y determinación de actividad antioxidante

El TPC presente en los extractos de hojas de estevia se realizó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (1927) y se expresó como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de

muestras de peso seco a través de una curva de calibración de ácido gálico de 25 a 600 ppm. Se adicionaron 250 µl de reactivo Folin Ciocalteau 1N a 20 µl de extracto diluido de hoja de estevia y se agitó vigorosamente. Después de 8 minutos, se agregaron 1250 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5% y 480 µl de agua destilada a la mezcla de extracción de hojas de estevia. La absorbancia de la reacción se midió a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-vis (Thermo Fisher Scientific, Biomate 3S, Madison, WI, EE. UU.). Para determinar la actividad antioxidante, se llevó a cabo un ensayo de actividad de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de acuerdo con Chen et al. (2011). El efecto de eliminación de radicales DPPH de la muestra se expresó con base a la curva de calibración de Trolox, como µmol de Trolox equivalente (TE) por g de peso de fruta seca. En resumen, se agregaron 100 µL de extracto de muestra a 2900 µL de DPPH 0.01 mM en metanol, luego se almacenaron en la oscuridad durante 30 minutos a 24 ° C. La eliminación del radical DPPH se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{[Aa - (Ab - Ac)]}{Aa} \times 100$$

Dónde:

Aa: Absorbancia del blanco de la solución de DPPH•

Ab: Absorbancia de la mezcla que contiene DPPH• y la muestra

Ac: Absorbancia de la solución en blanco

La evaluación de la extracción asistida por ultrasonido de las hojas secas de estevia se llevó a cabo mediante un diseño factorial 3<sup>2</sup> para determinar los factores con mayor influencia en el proceso de extracción de fenoles. Tiempo de extracción (5, 10 y 15 min) y concentración del solvente (50 % etanol en agua (v/v), 25 % etanol en agua (v/v) y 100 % agua) fueron utilizados como factores con tres niveles distintos. El proceso de extracción asistida por ultrasonido se realizó utilizando 4 g de hojas secas y molidas de estevia sumergidas en 200 mL de cada solvente con el porcentaje de etanol indicado. Las muestras fueron sonicadas de manera independiente utilizando una sonda de ultrasonido de 13 mm de diámetro acoplada a

una salida de potencia neta (procesador ultrasónico, modelo GEX130PB, Newtown, CT, EE. UU.), a una frecuencia fija de 20 kHz y una potencia de 130 W para 5, 10 o 15 min al 80% de la radiación. Después de la sonicación, las muestras se filtraron a través de un papel de filtro Whatman® (número 1) en condiciones de vacío y se almacenaron a 4 ° C para un análisis adicional. Se evaluó una muestra de control utilizando el método de maceración con hojas secas de estevia y agua como solvente, con una relación sólido / solvente de (1:10 g / ml). La determinación del TPC y la actividad antioxidante de las muestras se realizó como se describe anteriormente.

La extracción de glicósidos de esteviol se llevó a cabo utilizando polvo de estevia, se utilizó una relación sólido: solvente (agua) de 1:10 (g / ml). Las muestras fueron sonicadas por una sonda de ultrasonido (Procesador ultrasónico, Newtown, CT, EE. UU, frecuencia 20 kHz, potencia 130 W) a 80% de amplitud. Se realizó una muestra de control utilizando el método de maceración con hojas secas de estevia y agua como solvente, se empleó la relación sólido: solvente (1:10 g / ml). Posteriormente, los extractos se mantuvieron bajo agitación durante 2 horas a 50 ° C.

#### 13.4 Perfil y cuantificación de glicósidos de esteviol y fenoles mediante UPLC-PDA

Los glucósidos de esteviol y los perfiles cromatográficos de fenoles de los extractos de hojas secas se realizaron utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución clase Acquity H (UPLC) (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipada con una bomba cuaternaria (UPQSM), inyector automático (UPPDALTC) y detector de matriz de fotodiodos PDA  $\epsilon$ l (UPPDALTC). El software Empower 3 (Waters, 2010, Milford, MA, EE. UU.) se utilizó para la adquisición y el procesamiento de datos. La separación cromatográfica de los glicósidos de esteviol se llevó a cabo utilizando una Waters Acquity UPLC Spherisorb NH2 4.6  $\times$  250 mm  $\times$  5  $\mu$ m, a temperatura ambiente con un caudal lineal de 0,5 ml min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección a 10  $\mu$ L. La cuantificación se realizó por medio de curvas analíticas estándar preparadas individualmente y mezclando estándares de esteviósido y rebaudiósido A en concentraciones de 10 a 200 ppm.

La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando una columna Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2,1 mm ID (Waters, Milford, MA, EE. UU.) a temperatura ambiente, con un flujo de 0,2 ml  $\text{min}^{-1}$  y un volumen de inyección programado de 1.56 a 2  $\mu\text{L}$ . La fase móvil consistió en dos solventes, (A) 0.1% de ácido fórmico en agua ultra pura y (B) 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Las condiciones de elución fueron: 0–2 min 100% A isocrático; 2 min de gradiente lineal de 100% a 90% de A, 2 min de gradiente lineal de 90% a 77% de A, 1 min 77% de A isocrático, 10,5 min de gradiente lineal de 77% a 76,5% de A, 0,5 min 0% de A isocrático, gradiente lineal de 6 min del 0% al 50% de A y gradiente lineal de 6 min del 50% al 100%. El detector de matriz de fotodiodos se ajustó a 290 nm con una resolución de 4,8 nm para la detección del analito. La cuantificación se realizó por medio de curvas estándar analíticas preparadas individualmente y mezclando estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido elágico, diosmina y rutina a concentraciones de 1 a 100 ppm.

### 13.5. Análisis mediante UPLC–PDA ESI–MS

El análisis cromatográfico UPLC-PDA ESI-MS se realizó con el mismo equipo Waters Acquity descrito anteriormente acoplado a un detector de espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (MS). El software MassLynx V4.1 (Waters, Milford, MA, EE. UU., 2014) se utilizó para la adquisición y el procesamiento de datos. El detector de espectrómetro de masas se usó en el modo de ionización por electrospray negativa (ESI), con un voltaje capilar de 4.0 kV, voltaje de cono de 50 V, temperatura de desolvatación a 350 ° C, temperatura de fuente a 150 ° C y energía de colisión de 1 V. Argón de alta pureza fue utilizado como gas de colisión. El nitrógeno, suministrado por el generador de nitrógeno Peak Scientific NM32LA (Inchinnan, Escocia, Reino Unido), se usó como fuente de desolvatación del gas a 650 L  $\text{h}^{-1}$  y un cono de gas a 50 L  $\text{h}^{-1}$ . Los espectros de masas se registraron en modo de exploración completa en un rango de 20 m / z hasta 700 m / z. La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se logró con las mismas condiciones que en el análisis cuantitativo mediante UPLC-PDA.

### 13.6. Purificación parcial de compuestos fenólicos

La purificación de compuestos fenólicos se realizó utilizando un sistema de purificación ultra rápido automatizado (Biotage System, Model Isolera One, Suecia). Cuatro ml de la muestra



se concentraron al 50% mediante evaporación utilizando un equipo BUCHI R-215, posteriormente se cargó automáticamente en un cartucho Biotage de 30 g de SNAP C18. Así mismo se cargó el extracto acuoso obtenido por maceración (método de control). La elución se llevó a cabo a un flujo de 25 ml / min utilizando un gradiente de (A) 0,1% de ácido fórmico en agua ultra pura y (B) 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. El gradiente se programó de la siguiente manera: Volumen de tres columnas (CV) de 0% B isocrático; Gradiente lineal de 2 CV de 0% a 10% B; Gradiente lineal de 2 CV de 10% a 23% de B; 1 CV de 23% B isocrático; Gradiente lineal de 10,5 CV de 23% a 24% de B; Gradiente lineal de 2 CV de 24% a 100%, 2,8 CV de 100% a 76% B, gradiente lineal de 3,1 CV de 76% a 50%, 2 y 0,7 CV de 0% B. El monitoreo de pico por detección UV se realizó a una longitud de onda de 290 nm. El disolvente de acetonitrilo se eliminó de las fracciones mediante evaporación rotatoria, después de lo cual las fracciones se sometieron a la determinación de antioxidantes y la identificación y cuantificación de los compuestos de polifenol como se explicó anteriormente. Para la determinación de la actividad antioxidante, el TPC de las fracciones obtenidas por maceración y el método UAE se fijaron a 18 µg / mL para revelar resultados comparables.

### 13.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el diseño factorial  $3^2$  se analizaron mediante un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) utilizando un valor de  $p \leq 0.05$  y las diferencias significativas se determinaron mediante una prueba de rangos múltiples utilizando el software de Statgraphics Centurion XVI (versión XVI, Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

## 14. RESULTADOS

### 14.1 Cinética de secado de hojas de estevia

#### 14.1.2. Contenido de humedad

La cinética de secado de las hojas de estevia se realizó a 40 ° C durante todo el proceso para evaluar con mayor precisión el efecto del tiempo de calentamiento en la reducción del contenido de humedad, el contenido de fenoles y la actividad antioxidante. La Figura 4 muestra la reducción del contenido de humedad con valores de 76.28% para hojas frescas de

estevia en el momento inicial y al 11.57% a las 7 h de secado, tiempo en el cual la muestra ya no presentó una reducción adicional en el contenido de humedad y las hojas alcanzaron un peso constante. Castillo-Téllez et al. (2018) acordaron que el mejor momento para recolectar y almacenar las hojas de estevia es cuando se vuelven quebradizas con un 10 % a un 12% de contenido de humedad. Los estudios previos también determinaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en TPC después de que el secado al aire alcanzó el valor más alto a 40 ° C con  $55.05 \pm 2.27$  mg GAE / 100 g bs, según lo informado por Lemus-Mondaca et al. (2016). Una mejor comprensión de estos procesos de deshidratación de las hojas de estevia permitirá mayores rendimientos de los compuestos activos.

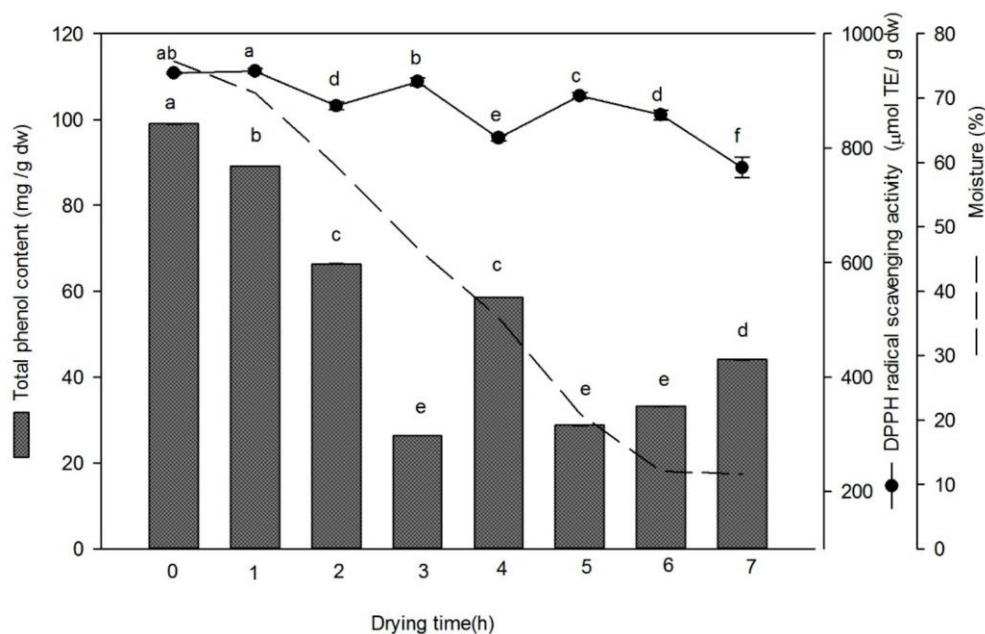


Figura 4. Efecto del tiempo de secado a 40 ° C sobre el contenido de fenoles totales (TPC) y actividad antirradical 2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH) de hojas de estevia.

#### 14.2. Determinación de compuestos fenólicos totales

El efecto del tiempo de secado en los compuestos fenólicos totales extraídos de las hojas de estevia mediante el método de extracción por maceración también se muestra en la Figura 4. Los valores obtenidos se encuentran en el rango de  $26.29 \pm 0.03$  mg GAE / g bs a  $98.99 \pm 0.03$  mg GAE / g bs. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de polifenoles.

El mayor contenido de TPC se encontró en hojas de estevia frescas en el tiempo de secado inicial con 98.99 mg GAE / g bs, mientras que los valores más bajos se obtuvieron en los tiempos de secado de 3 h, 5 h y 6 h. Un comportamiento similar fue observado por Periche et al. (2016) donde obtuvieron niveles más altos de fenoles en las hojas de estevia fresca ( $44.4 \pm 1.04$  mg GAE / g de estevia) que en las secas (31.5 mg equivalentes). Capecka et al. (2005) también obtuvieron valores de contenido de fenoles más bajos para las hojas secas de la sombra del bálsamo de limón que las hojas frescas. Una vez que las hojas de estevia alcanzaron un peso constante, se observó una diferencia estadística entre el tiempo de secado de 6 y 7 h con valores de  $33.139 \pm 0.06$  y  $44.08 \pm 0.07$  mg de GAE / g bs respectivamente.

### 14.3. Inhibición de actividad radical DPPH

Los resultados de la actividad antioxidante relacionadas al proceso de secado de las hojas de estevia mostraron valores de  $765.89 \pm 18.12$  a  $934.68 \pm 4.46$   $\mu\text{mol TE/g bs}$  (Figura 4). Se observó una mayor actividad antioxidante en el momento inicial del secado con un contenido de humedad aproximadamente del 70%. Lemus-Mondaca et al. (2016) obtuvieron un comportamiento similar, identificaron mayor actividad antioxidante en las hojas de estevia fresca que en las secas. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron valores más altos de actividad antioxidante. Aunque el mayor contenido de fenoles en las hojas de estevia se observó a las 7 h de secado, este no fue el caso de la actividad antioxidante. La mayor actividad antioxidante se observó en un tiempo de secado de 6 h, mientras que el tiempo de secado de 4 h mostró el valor más bajo lo que lo convierte en el tratamiento de secado menos adecuado.

Previamente se ha reportado que los compuestos de glucósidos y fenoles que son característicos de la composición de las hojas de estevia tienen un gran número de grupos hidroxilo que contribuyen a su actividad antioxidante. Periche et al. (2015) discutieron la influencia del método de secado en la actividad antioxidante de las hojas de estevia y observaron que la cantidad de antioxidantes era menor en las hojas de estevia frescas que en las hojas secas obtenidas por diferentes métodos de secado.

#### 14.4. Evaluación de la extracción asistida por ultrasonido

##### 14.4.1. Contenido de fenoles totales y actividad radical DPPH

Se utilizó un diseño factorial  $3^2$  para evaluar el efecto de la concentración de solvente y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hojas secas de estevia. El TPC de los tratamientos obtenidos del diseño factorial varió de  $59.64 \pm 2.5$  mg GAE / g bs a  $91.57 \pm 8.8$  mg GAE / g bs (Tabla 6). El valor más alto de TPC se obtuvo cuando se utilizó etanol al 50% a los 5 minutos y el valor más bajo se registró cuando se utilizó agua a los 15 minutos (Tabla 6). El análisis de varianza (ANOVA) revela un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) del factor de disolvente en el TPC. También se evaluó un método de extracción de maceración convencional que utiliza agua como disolvente para comparar con los EAU. El valor TPC obtenido a partir de este método de maceración ( $44.08 \pm 0.07$  mg GAE / g bs) fue más bajo que el valor más bajo obtenido por los EAU ( $59.64 \pm 2.5$  mg GAE / g bs). Muanda et al. (2011) reportaron un TPC más bajo ( $20.85 \pm 0.40$  mg GAE / g bs) de hojas de estevia usando una metodología de extracción convencional y agua como disolvente, sin embargo, también informaron el uso de metanol-agua como un disolvente que obtuvo un TPC más alto ( $25.25 \pm 0.21$  mg GAE / g bs) que con el agua. Sin embargo, los valores obtenidos por Muanda et al. (2011) fueron más bajos que el TPC obtenido en este estudio. La selección de la polaridad del disolvente empleada para la extracción depende en gran medida del compuesto que se extrae y del uso final de los extractos. En el caso de las mezclas de etanol y agua, el agua puede crear un medio más polar, lo que favorece la extracción de compuestos con polaridad similar (Nayak et al., 2015) y tiene la ventaja de una fácil concentración por evaporación. Además, la clasificación de etanol como Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) permite su uso como solvente de extracción para productos que pueden usarse en la industria alimentaria (Rodrigues et al., 2015).

Tabla 6. Parámetros del diseño factorial 3<sup>2</sup> de la extracción asistida por ultrasonido, contenido de fenoles totales y actividad radical DPPH

Tratamiento	Solvente	Tiempo de extracción (min)	TPC (mg GAE/g bs)	Actividad antioxidante		
				Inhibición DPPH (%)	( $\mu$ mol TE/g bs)	
Mac	control	agua	120	44.08 $\pm$ 0.07 <sup>e</sup>	71.92 $\pm$ 1.69 <sup>e</sup>	431.73 $\pm$ 18.12 <sup>d</sup>
	1	agua	5	73.83 $\pm$ 14.1 <sup>abcd</sup>	70.20 $\pm$ 4.28 <sup>e</sup>	413.21 $\pm$ 45.7 <sup>cd</sup>
	2	agua	10	63.45 $\pm$ 11.0 <sup>cd</sup>	75.34 $\pm$ 3.00 <sup>de</sup>	467.20 $\pm$ 33.6 <sup>de</sup>
EAU	3	agua	15	59.64 $\pm$ 2.5 <sup>de</sup>	54.08 $\pm$ 4.27 <sup>f</sup>	240.84 $\pm$ 45.7 <sup>f</sup>
	4	Etanol 25	5	82.14 $\pm$ 6.0 <sup>abc</sup>	82.68 $\pm$ 1.97 <sup>bc</sup>	546.72 $\pm$ 21.1 <sup>ab</sup>
	5	Etanol 25	10	74.74 $\pm$ 6.8 <sup>abcd</sup>	79.17 $\pm$ 1.03 <sup>cd</sup>	509.17 $\pm$ 11.0 <sup>bc</sup>
	6	Etanol 25	15	71.76 $\pm$ 6.1 <sup>bcd</sup>	79.98 $\pm$ 0.17 <sup>cd</sup>	517.88 $\pm$ 1.8 <sup>bc</sup>
	7	Etanol 50	5	91.57 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>	87.96 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	603.24 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
	8	Etanol 50	10	77.55 $\pm$ 8.1 <sup>abcd</sup>	87.91 $\pm$ 1.02 <sup>ab</sup>	602.67 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>
	9	Etanol 50	15	85.95 $\pm$ 7.4 <sup>ab</sup>	86.20 $\pm$ 1.01 <sup>ab</sup>	584.35 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>

Mac: Maceración, EAU: Extracción Asistida por Ultrasonido. Letras distintas en la en la misma columna denotan diferencia significativa a  $p < 0.05$  TPC, Contenido de fenoles totales; GAE, Equivalentes a ácido gálico; TE, Equivalente a Trolox

El método convencional (maceración) consiste en ablandar y romper la pared celular de la planta para liberar los fitoquímicos solubles mediante el calor transferido a través de la convección y la conducción (Azwanida, 2015). Durante el proceso de sonicación según Vinatoru et al. (2017), los sólidos suspendidos en un solvente promueven burbujas asimétricas que colapsan, actuando como chorros de solvente a velocidades extremadamente altas y dirigidas al material vegetal lo que hace a la EAU extremadamente efectiva.

Para la respuesta de actividad antioxidante, el ANOVA reveló un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de ambos factores (concentración de solvente y tiempo de extracción) individualmente y en su interacción. La respuesta de la actividad antioxidante varió de 54.08  $\pm$  4.27% a 87.96  $\pm$  0.32% (Tabla 6). Se observó una mayor actividad antioxidante cuando se utilizó etanol al 50%, a los 5 minutos de extracción (87.96%). Yildiz-Ozturk et al. (2015) reportaron actividades de captación de radicales DPPH del 92,49% utilizando el método de EAU y empleando metanol como solvente. La actividad antioxidante de las hojas secas de estevia extraídas por el método de maceración presentó valores más bajos (431.73  $\pm$  18.12  $\mu$ m TE/g

bs) en comparación con los mejores tratamientos obtenidos por EAU, siendo significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) según el análisis de LSD.

#### 14.5. Perfil de glicósidos de esteviol y compuestos fenólicos en extractos de hojas secas de estevia mediante UPLC

Los perfiles de glucósidos de esteviol y compuestos fenólicos del extracto de hoja seca de estevia obtenida mediante EAU y el método convencional se muestran en la Tabla 7. El perfil de glucósidos de esteviol obtenidos por EAU indicó la presencia de esteviósido y rebaudiósido A con contenidos de  $93.18 \pm 1.36$  mg / g bs y  $98.97 \pm 1.75$  mg / g bs respectivamente. Zlabur et al. (2015) determinó el contenido de esteviósido (96.48 mg / g de extracto) y rebaudiósido A (36.92 mg / g de extracto) de extractos de hojas de estevia utilizando EAU, sin embargo, en el presente estudio se obtuvo un mayor contenido de rebaudiósido A. El uso del método de extracción por maceración mostró valores de glucósidos de esteviol más altos que el esteviósido ( $30.3 \pm 0.27$  mg / g bs) y rebaudiósido A ( $36.81 \pm 0.65$  mg / g bs). Además del esteviósido y el rebaudiósido A cuantificados en los extractos de hojas de estevia, el rebaudiósido C ( $10.8 \pm 1.91$  mg / g bs) solo se observó en el extracto de maceración.

Martins et al. (2016), evaluaron una maceración dinámica de hojas de estevia utilizando diferentes concentraciones de etanol (agua, etanol 70% y 90%), sus resultados mostraron que el 70% de etanol extrae un mayor contenido de esteviósido y rebaudiósido en comparación con el agua y el 90% de etanol. Estos resultados son consistentes con los valores más altos obtenidos en la EAU.

Con respecto a los compuestos polifenólicos, el tratamiento de extracción con etanol al 50% y 10 min de extracción que resultó en la mayor actividad antioxidante se seleccionó para la determinación del perfil fenólico mediante UPLC-PDA y se presentó en la Tabla 7. Para comparar los resultados, el extracto de maceración también fue seleccionado para la determinación del perfil fenólico. Los compuestos fenólicos se identificaron en función de sus tiempos de retención y se cuantificaron de acuerdo con sus respectivas curvas de calibración estándar. El análisis por cromatografía de fase inversa de extractos de hojas de estevia mostró un total de 6 compuestos fenólicos para ambos extractos. Se observaron

mayores cantidades de cada compuesto fenólico en el extracto obtenido por EAU en comparación con la maceración. Entre los compuestos fenólicos, diosmina (111,67 mg / g bs) y ácido clorogénico (23,90 mg / g bs) fueron los más abundantes en el extracto de hojas de estevia de la EAU. En un estudio previo, Muanda et al. (2011) reportaron menores cantidades de ácido clorogénico extraído de extracto metanol-agua de hojas de estevia. También se detectaron picos cromatográficos menores que indican la presencia de ácido cafeico, ácido elágico, ácido ferúlico y rutina. Compuestos como el ácido cafeico y la rutina también se han identificado en estudios anteriores (Ciulu et al., 2017, Formigoni et al., 2018).

Tabla 7. Glucósidos de esteviol y contenido de polifenoles de extractos obtenidos por maceración y extracción asistida por ultrasonido

Tipo de compuestos	Compuestos específicos	Métodos de extracción	
		Maceración	UAE
Glucósidos de esteviol (mg/g bs)	Esteviósido	30.3 ± 0.27 <sup>a</sup>	93.18 ± 1.36 <sup>b</sup>
	Rebaudiósido A	36.81 ± 0.65 <sup>a</sup>	98.97 ± 1.75 <sup>b</sup>
	Rebaudiósido C	10.8 ± 1.91 <sup>a</sup>	ND
	Total	77.91 <sup>a</sup>	192.15 <sup>b</sup>
Compuestos fenólicos (mg/g bs)	Ácido clorogénico	24.16 ± 0.13 <sup>a</sup>	23.90 ± 0.04 <sup>b</sup>
	Ácido cafeico	2.58 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.27 ± 0.03 <sup>b</sup>
	Ácido elágico	6.72 ± 0.05 <sup>a</sup>	14.84 ± 0.05 <sup>b</sup>
	Rutina	3.05 ± 0.07 <sup>a</sup>	6.12 ± 0.04 <sup>b</sup>
	Ácido ferúlico	1.41 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.07 <sup>b</sup>
	Diosmina	36.71 ± 13.27 <sup>a</sup>	111.67 ± 0.12 <sup>b</sup>
	Total	98.4 ± 13.19 <sup>a</sup>	163 ± 0.04 <sup>b</sup>

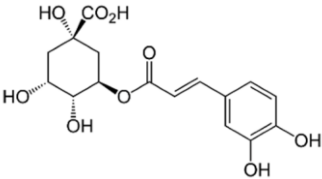
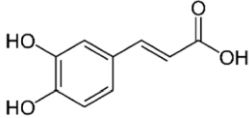
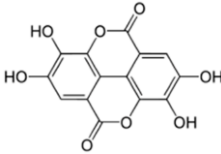
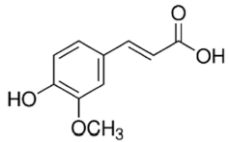
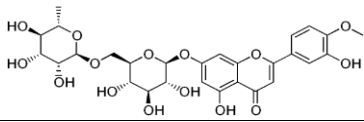
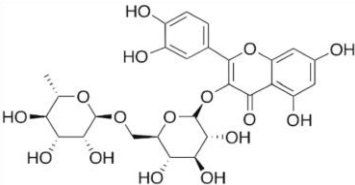
Diferentes letras en la misma fila denotan diferencia significativa para  $p < 0.05$

#### 14.6. Análisis mediante UPLC-PDA ESI-MS

Los datos de espectroscopia y espectrometría obtenidos mediante el análisis UPLC-PDA-ESI-MS se presentan en la Tabla 8. Los parámetros del espectrómetro de masas se ajustaron hasta que los iones cuasi moleculares [M-H] fueron los más intensos. Los espectros de masas de derivados del ácido hidroxicinámico tales como el ácido cafeico y ferúlico mostraron fragmentos de [M-H-44]. Diosmina exhibió fragmentos de [M-H-308] -, que correspondían

a la pérdida de rutinosido, liberando aglicona [30]. El ácido clorogénico mostró un fragmento atribuido a la pérdida de [M-H-163] - ácido cafeico y la liberación del anión del ácido (-) - quínico (detectado). Los espectros de masas de ácido elágico y la rutina mostraron fragmentos de [M-H-300.99] y [M-H-610.23] atribuidos a la pérdida de un protón, estos resultados son similares a los reportados en estudios previos (Ledesma-Escobar et al., 2017, De Andrade et al., 2018).

Tabla 8. Parámetros del espectrómetro de masas de compuestos fenólicos

Compuestos	Espectro UV (nm)	MS ( $m/z$ ) <sup>1</sup>	Formula estructural *
Ácido clorogénico	244.6, 325.6	[M4H] <sup>-</sup> 353.04 (72.9), 190.94 (100)	
Ácido cafeico	239.9, 324.4	[M4H] <sup>-</sup> 178.91 (58.6), 134.85 (100.0)	
Ácid elágico	243.3, 367.3	[M4H] <sup>-</sup> 300.99 (100)	
Ácido ferúlico	217.34, 322.34	[M4H] <sup>-</sup> 193.03 (100), 179.00 (1.50)	
Diosmina	251.7, 346.6	[M4H] <sup>-</sup> 607.18 (100.0), 299.05 (18.0), 283.28 (18.7), 255.29 (25.6)	
Rutina	255.34, 354.34	[M4H] <sup>-</sup> 611.28 (1.97), 610.23 (8.88), 609.18 (34.46), 516.41 (2.05)	

<sup>1</sup> ionización por electrospray modo negativo (ESI). \* La fórmula estructural se obtuvo mediante el software gratuito ChemDraw Prime.



#### 14.7. Análisis del perfil de fenoles y actividad antioxidante de muestras parcialmente purificadas

Se llevó a cabo una purificación parcial de los fenoles obtenidos de los extractos de hojas de estevia extraídas mediante EAU y maceración. También se determinó la actividad antioxidante, la identificación y cuantificación de las fracciones fenólicas parcialmente purificadas de las hojas de estevia. La Figura 5A muestra un cromatograma modificado de purificación parcial de las hojas de estevia extraídas por EAU utilizando la longitud de onda de 290 nm, por lo que el cromatograma muestra tres picos que representan las tres fracciones expresadas como F1, F2 y F3. La Figura 5A mostró un pico en un tiempo de retención de 23 minutos, que se atribuye al cambio de gradiente determinado durante la separación de los compuestos. Lo anterior se pudo corroborar mediante el análisis del espectro UV que no mostró ningún compuesto fenólico.

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos obtenidos en cada fracción se determinaron mediante UPLC tal como se explicó en la sección de materiales y métodos. La Figura 5B muestra los principales compuestos fenólicos presentes en F1 y F2, así mismo se expresaron los compuestos obtenidos en el extracto crudo para fines de comparación. La fracción 3 no mostró ningún compuesto fenólico, por lo tanto, no se muestra en la Figura 5B. Los resultados cromatográficos indicaron que la F1 mostró ácido clorogénico como el compuesto que presentó el mayor porcentaje en la fracción (60.06%) seguido de un compuesto desconocido codificado como NC-1 (13.83%), ácido cafeico (11.35%), ácido elágico (6.61). %) rutina (6.60%) y un NC-2 (1.52%) con 29.75  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de TPC de la fracción. F2 mostró la presencia de diosmina como el compuesto predominante (70,94%) seguido de los compuestos desconocidos codificados como NC-1 (15,22%), NC-2 (7,46%) y ácido ferúlico (6,34%) con un TPC de 76,65  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

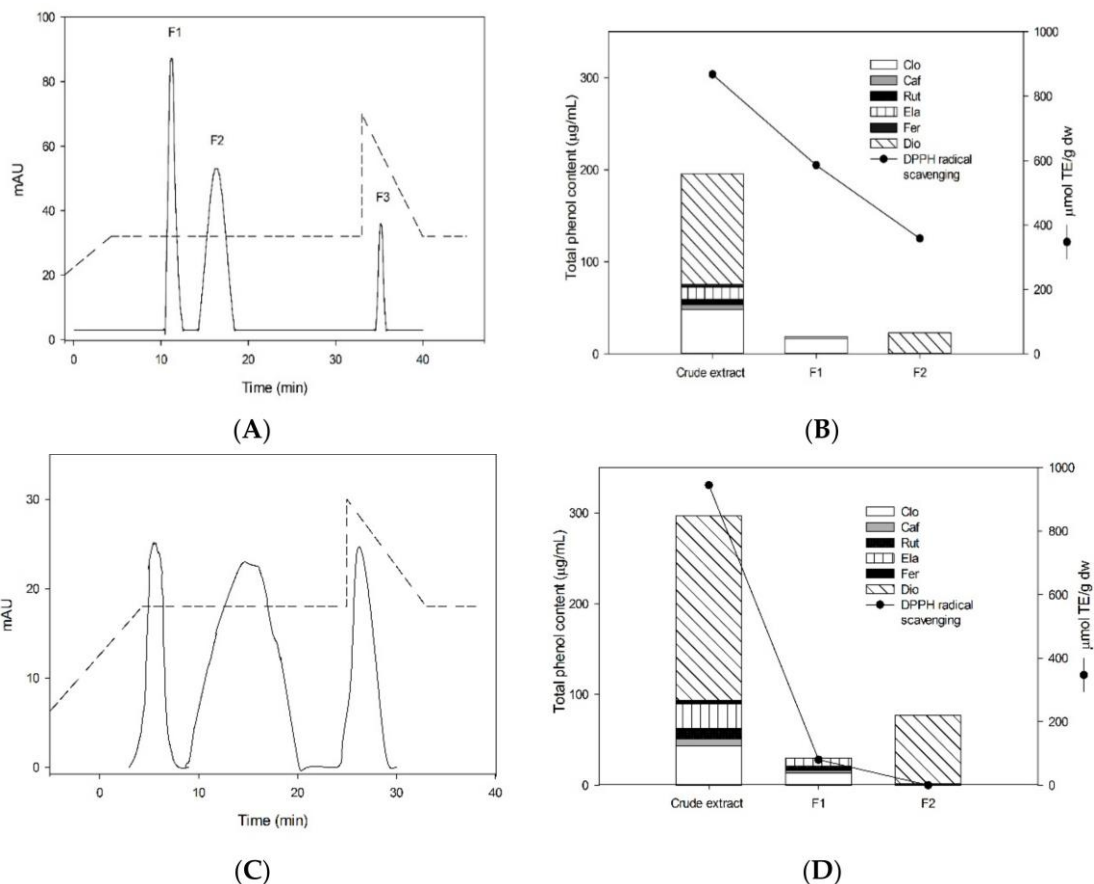


Figura 5. Cromatograma modificado a 290 nm de la separación de las fracciones de EAU (A) y maceración (C) obtenida mediante un sistema Isolera Prime Perfiles fenólicos de las fracciones de la EAU (B) y maceración (D) obtenidos por UPLC y actividad antioxidante expresada como  $\mu\text{mol TE/g dw}$  de cada fracción fijada a una concentración de  $18 \mu\text{g/ml}$  (B). Caf, ácido cafeico; clo, ácido clorogénico; rut, rutina; ela, ácido eláxico; fer, ácido ferúlico; Dio, diosmina.

Los datos de purificación parcial del extracto de hojas de estevia obtenido mediante el método de maceración se muestran en la figura 5C, se muestra el cromatograma modificado del extracto, mediante el cual se identifican tres picos que representan las tres fracciones expresadas como F1, F2 y F3. El tercer pico codificado como F3 también se atribuye al cambio de gradiente determinado durante la separación de los compuestos. La Figura 5D muestra los principales compuestos fenólicos presentes en F1 y F2, así mismo se muestran los compuestos obtenidos en el extracto crudo para fines de comparación. La fracción 3 no mostró ningún compuesto fenólico, por lo que no se muestra en la Figura 5D. Los resultados cromatográficos indicaron que la F1 exhibió ácido clorogénico como el compuesto principal (74.31%), seguido de ácido cafeico (14.02%) y tres compuestos desconocidos codificados como NC-1 (5.43%), NC-2 (3.70%) y NC-3 (2.54%) con  $93.61 \mu\text{g/ml}$  TPC de la fracción.

Aunque la cantidad de fenoles fue mayor en las fracciones obtenidas por maceración, la EAU reveló dos compuestos que no estaban presentes en el extracto obtenido por maceración: ácido elálgico y rutina, F2 mostró valores más bajos de diosmina (65,94%) y ácido ferúlico (3,51%) en comparación con las fracciones de la EAU, mientras que otros compuestos como NC-1 (30.55%) también se obtuvieron con 115.22  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de TPC.

Los compuestos fenólicos presentes en el extracto crudo pueden tener diferentes actividades antioxidantes. Por lo tanto, los extractos crudos y las fracciones obtenidas después de la purificación se fijaron a 18  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para evaluar mejor la actividad antioxidante. En este documento se presenta una comparación entre los datos para obtener información relacionada con la influencia de los diferentes compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante. El extracto crudo obtenido mediante EAU presentó mayor actividad antioxidante (944  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ) que el extracto crudo de maceración (867.31  $\pm$  36.36  $\mu\text{mol TE} / \text{bs}$ ). La actividad antioxidante de la F1 del extracto por maceración fue mayor (585.51  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ) que la F1 de EAU (80.00  $\pm$  6.29  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ). Aunque los fenoles predominantes en la F2 fueron la diosmina y el ácido ferúlico, la EAU no reveló actividad antioxidante a diferencia del extracto de maceración F2 (358.13  $\pm$  20.31  $\mu\text{mol TE} / \text{g bs}$ ). Con respecto a estos resultados, se puede sugerir que la actividad antioxidante es mayor debido a un efecto sinérgico por la mezcla de compuestos fenólicos presentes en el extracto crudo.

## **15. CONCLUSIONES**

Los cambios fitoquímicos en las variables de contenido de fenoles y actividad antioxidante ocurrieron durante el proceso de secado de las hojas de estevia. Los resultados de la comparación de la composición de glucósidos de esteviol y la composición de compuestos fenólicos de las hojas de estevia secas extraídas con un método convencional (maceración) y EAU proporcionaron las mejores condiciones para producir una extracción más exitosa de compuestos fenólicos. El mayor contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante se obtuvieron cuando se utilizó etanol al 50% como solvente a los 5 minutos de extracción. Como contribución principal de este trabajo se puede concluir que seis compuestos fenólicos, incluidos cuatro ácidos fenólicos y dos flavonoides, se identificaron y cuantificaron mediante UPLC-PDA y se confirmaron mediante espectrometría de masas ESI-MS que mostró su patrón de fragmentación. Diosmina y el ácido clorogénico fueron los compuestos más

abundantes en los extractos de hojas de estevia. La novedad de este estudio radica en la atribución de la actividad biológica al efecto sinérgico de los seis fenoles presentes en el extracto etanólico al 50%, debido a que la actividad antioxidante fue mayor cuando los compuestos fenólicos estaban juntos. El extracto de hoja de estevia no solo es un edulcorante, sino también una fuente potencial de compuestos fenólicos que pueden usarse en la producción funcional de alimentos.

## 16. REFERENCIAS

Azwanida, N, A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med. Aromat. Plants* **2015**, *4*, 3–8.

Barreca, D.; Bellocco, E.; Caristi, C.; Leuzzi, U.; Gattuso, G. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chem.* **2011**, *129*, 417–422.

Capecka, E.; Mareczek, A.; Leja, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* **2005**, *93*, 223–226.

Castillo Téllez, M.; Pilatowsky Figueroa, I.; Castillo Téllez, B.; López Vidaña, E.C.; López Ortiz, A. Solar drying of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves using direct and indirect technologies. *Sol. Energy* **2018**, *159*, 898–907.

Chen, M.L.; Yang, D.J.; Liu, S.C. Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 1179–1185.

Ciulu, M.; Quirantes-Piné, R.; Spano, N.; Sanna, G.; Borrás-Linares, I.; Segura-Carretero, A. Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *108*, 106–112.

Covarrubias-Cardenas, A.; Patrón-Vasquez, J.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; García-Cruz, N.U.; Pacheco, N. Antioxidant capacity and ULPC-PDA-ESI-MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *J. Food Sci. Technol.* **2018**. submitted.

De Andrade, N.; César, P.; Gómez-Alonso, S.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. *Food Chem.* **2018**, *252*, 61–71.

Falleh, H.; Ksouri, R.; Lucchessi, M.E.; Abdelly, C.; Magné, C. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots. *Trop. J. Pharm. Res.* **2012**, *11*, 243–249.

Fattore, M.; Montesano, D.; Pagano, E.; Teta, R.; Borrelli, F.; Mangoni, A.; Seccia, S.; Albrizio, S. Carotenoid and flavanoid profile and antioxidant activity in “ Pomodorino Vesuviano” tomatoes. *J. Food Compost Anal.* **2016**, *53*, 61–68.

Folin, O.; Ciocalteau, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 627–648.

Formigoni, M.; Gimenez, P.; Avíncola, S.; Jorge, V.; Benossi, L.; Sergio, A.; Jorge, E.; Claudio, S. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of estevia. *Food Chem.* **2018**, *241*, 452–459.

Garau, M.C.; Simal, S.; Rosselló, C.; Femenia, A. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1014–1024.

Goyal, S.K.; Goyal, R.K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, *61*, 1–10.

Katsampa, P.; Valsamedou, E.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *77*, 535–543

Kim, I.S.; Yang, M.; Lee, O.H.; Kang, S.N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT–Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1328–1332.

Kovac̃ević, D.; Maras, M.; Barba, F.; Granato, D.; Roohinejad, S.; Mallikarjunan, K.; Montesano, D.; Lorenzo, J.; Putnik, P. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertono leaves: A review. *Food Chem.* **2018**, *268*, 513–521.

Kumar, Y.; Yadav, D.N.; Ahmad, T.; Narsaiah, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 796–812

Ledesma-Escobar, C.A.; Priego-Capote, F.; Robles-Olvera, V.J.; de Castro, M.L. Changes in the composition of the polar fraction of Persian lime (*Citrus latifolia*) during fruit growth by LC-QTOF MS/MS analysis. *Food Chem.* **2017**, *234*, 262–268.

Lemus-Mondaca, R.; Ah-Hen, K.; Vega-Gálvez, A.; Honores, C.; Moraga, N.O. *Stevia rebaudiana* Leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2016**, *71*, 49–56.

Martins, P.M.; Thorat, B.N.; Lanchote, A.D.; Freitas, L.A.P. Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resour. Technol.* **2016**, *2*, 247–253.

Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sánchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* **2017**, *7*, 47.

Muanda, F.N.; Soulimani, R.; Diop, B.; Dicko, A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1865–1872.

Najafian, S.; Moradi, M. Polyphenolic compounds (HPLC analysis) and Antioxidant Activity of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) by FRAP and DPPH Assay in greenhouse and free space condition. *Int. J. Farm. Allied Sci.* **2017**, *3*, 49–55.

Nayak, B.; Dahmoune, F.; Moussi, K.; Remini, H.; Dairi, S.; Aoun, O.; Khodir, M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* **2015**, *187*, 507–516.

Periche, A.; Castello, M.L.; Heredia, A.; Escriche, I. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem.* **2015**, *172*, 1–6.

**CAPÍTULO 3: MICROENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS  
POLIFENOLICOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ESTEVIA  
(*Stevia rebaudiana*) Y NARANJA AGRIA (*Citrus aurantium* ) EN UNA  
MATRIZ BIOPOLIMERICA MÚLTIPLE**

**RESUMEN**

Debido a la creciente tendencia por conservar las propiedades biológicas de compuestos bioactivos como los polifenólicos mediante diversos mecanismos de encapsulación, el presente capítulo tuvo por objetivo establecer las condiciones de formación de las dispersiones a partir de los extractos polifenólicos de estevia y naranja, así como de los agentes encapsulantes (goma arábica, fructanos de agave y quitosano), además de caracterizar y evaluar el método de formación de encapsulados en función a su eficiencia de encapsulación y actividad biológica. Los resultados obtenidos indicaron que las curvas de titulación entre los agentes encapsulantes permitió conocer la mejor relación de goma:fructanos:quitosano [2:1:1] que permitieran una mejor estabilidad de soluciones. Adicionalmente se evaluaron diferentes relaciones de extractos de estevia y naranja para determinar los mejores rendimientos de encapsulación. Los rendimientos obtenidos a partir del secado de soluciones mostraron porcentajes de encapsulación de fenoles totales entre 66% y 70.45%, mostrando que la formulación B (Naranja (1) - Estevia (2)) presentó los rendimientos más altos con 70.45 %. Posteriormente, se obtuvo un valor máximo de liberación de compuestos de 46.18%. La caracterización de las micropartículas mediante espectroscopia de infrarrojo, termogravimetría, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X permitieron establecer los atributos de la interacción entre los agentes de pared y los compuestos fenólicos.

## 17. INTRODUCCIÓN

Estudios previos han mostrado un creciente interés en la búsqueda de fuentes vegetales con compuestos fitoquímicos con potencial biológico que puedan emplearse como aditivos en la elaboración de alimentos funcionales. La naranja agria (*Citrus aurantium*) es un fruto que se caracteriza por tener un sabor amargo otorgado principalmente por su alto contenido de compuestos fenólicos como naringina y neohesperidina (Sawalha, Arraez-Roman, Segura-Carretero, & Fernandez-Gutierrez, 2009). Por otra parte, se ha evaluado que las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana*) empleadas principalmente por su contenido de glicósidos de esteviol, compuestos responsables del poder edulcorante también tienen en su composición compuestos fenólicos (Lemus-Mondaca, Vega-Galvez, Zura-Bravo, & Kong, 2012)(Muanda, Soulimani, Diop, & Dicko, 2011).

Se ha reportado que los compuestos fenólicos tienen potencial biológico como antioxidantes y antibacterianos(Zou, Xi, Hu, Nie, & Zhou, 2016). No obstante, la actividad biológica de dichos compuestos se ve afectado por factores externos como luz, temperaturas elevadas y pH por lo que se han desarrollado métodos de conservación. La microencapsulación es un proceso que emplea agentes poliméricos para crear una barrera que protege al compuesto bioactivo y que permite la liberación controlada bajo ciertas condiciones (Aguiar et al., 2016). Las propiedades del o los agentes que conforman la pared de la microcápsula definen características como tamaño, forma, estabilidad y liberación del compuesto bioactivo(Dias, Botrel, Fernandes, & Borges, 2017; Ray, Raychaudhuri, & Chakraborty, 2016).

La goma arábiga representa uno de los materiales de pared más empleados en la microencapsulación debido a su solubilidad y baja viscosidad en comparación con otras gomas(Fernandes, Borges, & Botrel, 2014). Debido a sus capacidades de emulsificación y formación de películas, el quitosano también ha sido empleado como agente encapsulante de compuestos susceptibles a condiciones externas (Kumar et al., 2017). Por otro lado, los fructanos de agave son polímeros que actúan principalmente como prebióticos pero que debido a sus propiedades tecnológicas y funcionales son utilizados como estabilizadores y como medio de liberación de fármacos de liberación lenta.

Una de las técnicas utilizadas en el proceso de microencapsulación es el secado por aspersion el cual consiste en la atomización de una solución y el paso de las gotas atomizadas a través de una fuente de aire caliente que permite la formación de micropartículas (Dias et al., 2017)

Tomando en consideración las propiedades biológicas y de encapsulación del quitosano, goma arábica y fructanos de agave, se utilizaron como agentes de pared para la formación de una matriz compleja con el objetivo de conservar la actividad biológica obtenida a partir de compuestos fenólicos de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia.

## **18. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **18.1. Material biológico y reactivos**

Las hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) y las cáscaras de naranja agria se obtuvieron de un productor local en Yucatán, México.

Folin-Ciocalteu, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido ferúlico, naringina, neohesperidina, diosmina, rutina, metanol, acetonitrilo (grado HPLC), CaCl<sub>2</sub>, cloruro de p-yodonitrotetrazolio (Sigma Aldrich San Luis, MI, EE.UU). Goma seyal (Acacia seyal), fructanos de agave y quitosano (bajo peso molecular, grado de desacetilación (93.1 %), viscosidad (72.1 cps) se obtuvieron de un distribuidor local y Sigma Aldrich respectivamente. Se preparó agua ultra pura en un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). El caldo Mueller-Hinton y el caldo nutritivo se adquirieron con un distribuidor local, (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

### **18.3. Extracción de polifenoles**

La extracción de polifenoles a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia se realizó de manera independiente mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) de acuerdo a lo establecido por (Covarrubias-Cárdenas et al., 2018)

### **18.4. Cuantificación de polifenoles totales**

La cuantificación de polifenoles se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico reportado por Folin & Ciocalteu, (1927) con las siguientes modificaciones. Se tomaron 250 µL del reactivo de Folin y se mezclaron con 20 µL del extracto, se dejó en reposo durante 8 minutos y se agregaron 1250 µL de una solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 7.5 % y 480 µL de agua destilada. Posteriormente se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura



ambiente y se realizaron las lecturas a la longitud de onda de  $\lambda = 760$  nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Biomate 3S Madison WI USA).

## 18.5. Actividad biológica

### 18.5.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante el análisis de reducción del radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de acuerdo a lo establecido por (Lemus-Mondaca, (2016);Chen et al (2011 ). La actividad antioxidante DPPH de la muestra se expresó con base a la curva de calibración de Trolox, como  $\mu\text{m}$  equivalentes de Trolox (TEAC) por gramo de muestra seca. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del extracto a 2900  $\mu\text{L}$  de una solución de DPPH en metanol al 0.01 mM , posteriormente se almacenó durante 30 min a 24 ° C.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{[Aa-(Ab-Ac)]}{Aa} \times 100$$

Donde:

Aa: Absorbancia del blanco de la solución de DPPH•

Ab: Absorbancia de la mezcla que contiene DPPH• y la muestra

Ac: Absorbancia de la solución en blanco

### 18.5.2. Actividad antibacteriana

La actividad biológica se evaluó frente a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, los cuales fueron adquiridos en el cepario del CIATEJ, Unidad Sureste. Las cepas fueron reactivadas en caldo nutritivo y sembradas en placa para la evaluación de su viabilidad y pureza.

### 18.5.3. Concentración mínima inhibitoria

La Concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó empleando micro-placas de 96 pozos donde se realizaron microensayos de siete diluciones seriadas del extracto polifenólico y de los compuestos liberados de las microcapsulas empleando solución salina al 0.85 % para

realizar la dilución. Se mezclaron de manera independiente 50  $\mu\text{L}$  del extracto polifenólico y extracto liberado con 100  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo Mueller-Hinton y 50  $\mu\text{L}$  de inóculo de cada bacteria con una concentración final de  $1.5 \times 10^8$  células/mL. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, después de este tiempo se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de solución de cloruro de p-yodinitrotetrazolio (0.2 mg/mL) como indicador del crecimiento. Después de una hora de incubación se verificó la presencia de cambio de color rosado como indicador de crecimiento, el valor de la primera concentración de polifenoles en donde no se presentó cambio de coloración fue registrado como el valor de CMI.

#### 18.6. Evaluación de la relación de agentes de pared

Se preparó una solución al 20% (p/p) de goma arábica y una al 2% (p/p) de fructanos de agave, ambos fueron disueltos en agua destilada y una solución de quitosano al 0.2% (p/p) misma que fue disuelta en ácido acético al 1%. Las soluciones preparadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 h para asegurar la completa hidratación de los materiales. Se ajustó a 4.5 el pH de las soluciones. Se determinó el potencial zeta ( $\zeta$ ) de los polisacáridos y extractos de naranja y estevia empleando un Zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Las soluciones de los polisacáridos se diluyeron a una concentración de 1mg/ml. El potencial se determinó mediante la medición de la dirección y velocidad de la dispersión de biopolímeros a lo largo del campo eléctrico. Posteriormente, se prepararon soluciones de goma seyal a 1mg/mL, de fructanos a 2 mg/mL y de quitosano a 5 mg/mL con la finalidad de realizar una curva aditiva entre los polímeros de cargas opuestas. La mezcla fue transferida a un autotitulado MPT-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Posteriormente se adicionó la solución de quitosano a la solución de goma: fructanos hasta sobrepasar el punto isoelectrico de la mezcla. Con base a la curva de titulación entre los polímeros de carga opuesta se obtuvo una relación de goma: fructano: quitosano de (2: 1:1) mezclando cada una de las soluciones stock de los polímeros a un pH constante de 4.5.

#### 18.7. Diseño experimental de formulaciones

Con el objetivo de determinar las mejores condiciones para la encapsulación de polifenoles se realizó un diseño experimental factorial 2x4. Se seleccionaron dos niveles para el factor concentración de polifenoles (50 mg y 100mg) y cuatro niveles para el factor relación de mezcla de extractos y se evaluaron por duplicado dando un total de 8 formulaciones (A:

naranja (2): estevia (1), B: naranja (1): estevia (2), C: naranja (1):estevia (0), D: naranja (0): estevia (1)).

#### 18.8. Microencapsulación mediante secado por aspersion

Las formulaciones se secaron en un secador por aspersion (GEA Niro equipado con un atomizador rotatorio). Las condiciones empleadas fueron las descritas por Paini et al., (2015) la temperatura de entrada y salida fue de 140 C ° y 80°C, respectivamente y un flujo de 20mL/ min. El polvo obtenido fue almacenado en frascos ambar y en un desecador para su posterior caracterización.

#### 18.9. Eficiencia de encapsulación

El porcentaje de eficiencia de encapsulación de los compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%E: \frac{\text{Concentración inicial de fenoles} - \text{Concentración de los compuestos no encapsulados}}{\text{Concentración inicial de fenoles}} \times 100$$

En donde la concentración inicial de fenoles corresponde a la concentración del extracto fenólico adicionado para formar los encapsulados; mientras que la concentración de los compuestos no encapsulados, corresponde al contenido de fenoles en la superficie. El análisis de los compuestos se realizó mediante la cuantificación por UPLC.

#### 18.20. Eficiencia de liberación

El porcentaje de eficiencia de liberación de los fenoles encapsulados se evaluó utilizando cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 1% (pH: 5.12) Se determinó el contenido de fenoles en superficie mediante lavados de las micropartículas en una solución de metanol: agua (1:1). Posteriormente se utilizaron 5 mg de las micropartículas y se dispersaron en 5 mL de CaCl<sub>2</sub>, las soluciones fueron sonicadas mediante una sonda de ultrasonido (Ultrasonic Processor, USA, frecuencia 20kHz, Power 130 W) durante 5 min a una amplitud de onda del 80%. Finalmente se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min.

Enseguida se seleccionaron las formulaciones con los porcentajes de encapsulación mas altos y se les realizó el siguiente procedimiento para la liberación de compuestos fenólicos.

Las micropartículas se colocaron en una estufa de vacío a temperatura de 200°C durante 20 min. Se realizaron lavados de las micropartículas en una solución de metanol: agua (1:1 ) como ya se describió anteriormente. Posteriormente se les adicionó nitrógeno líquido (N) a las micropartículas y se trituraron con el mortero. Se adicionó cloruro de calcio al 1% y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. El análisis se realizó mediante la cuantificación por UPLC, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%EL: \frac{\text{Concentración de los compuestos polifenolicos en el sobrenadante}}{\text{Concentración inicial}} \times 100$$

#### 18.21. Análisis UPLC-PDA de compuestos fenólicos

Ambos extractos y las micropartículas previamente liberadas fueron filtradas a través de un filtro de 0.45 µm. Los perfiles cromatográficos se realizaron empleando un equipo Waters UPLC Acquity H Class (Milford, MA, USA) equipado con una bomba cuaternaria (UPQSM), un inyector automático (UPPDALTC) y un detector de arreglo de diodos PDA eλ (UPPDALTC). El software Empower 3 (Waters, Milford, MA, EE.UU., 2010) fue empleado para la adquisición de datos y procesamiento. La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se llevó a cabo usando una columna Waters Acquity UPLC BEH C18, 1.7 µm, 100 x 2.1 mm I.D (Milford, MA, EE.UU) con un volumen de flujo de 0.2 mL min<sup>-1</sup> y un volumen de inyección programado de 1.56 a 2 µL. La fase móvil consistió de dos solventes, (A) Ácido fórmico al 0.1 % en agua ultra pura y (B) Ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo. El gradiente se programó como se describe a continuación: 100% A (inicial 2.0 min), 90.0% A (2.0-4.0 min), 77.0% A (4.0-6.0 min), 77.0% A (6.0-7.0 min), 76.5% A (7.0 – 17.5 min), 0% A (17.5 – 18.0 min), 50 % A (18.0 – 24.0 min) y 100% A (24.0 - 30 min 160 min ). El detector de fotodiodos se fijó a 290 nm con una resolución de 4.8 nm para la detección del analito.

La concentración de los compuestos fenólicos fue determinada a partir de las curvas estándar a concentraciones de 1 a 100 ppm con un límite de cuantificación de 1 ppm (ácido cafeico,

ácido p- cumárico, naringina, neohesperidina, ácido clorogenico, ácido ferúlico, diosmina y rutina). El contenido de fenoles totales se expresó como la suma de todos los compuestos obtenidos mediante UPLC.

## 18.22. Caracterización de quitosano y micropartículas

### 18.22.1 Determinación del grado de acetilación

El porcentaje de acetilación se determinó por espectroscopia de RMN- $H^1$  de acuerdo al método reportado por Hirai et al. (1991) calculando la relación de la intensidad (I) de las señales del protón del metil-(1-4)2 acetomido-2-dexoxy- $\beta$ -D-glucano y la referencia de los protones H-2 al H-6. Los espectros de RMN- $H^1$  se obtuvieron a 80° C utilizando un espectrómetro Bruker AVANCE III ( $\nu = 400$  MHz). Se disolvieron 10 mg de quitosano en HCl al 1% en agua deuterada ( $D_2O$ ), se mantuvo bajo agitación magnética constante durante 12 h y se tomó una alícuota para realizar el análisis.

### 18.22.2. Determinación del peso molecular por cromatografía de exclusión de tamaño

La determinación del peso molecular (PM) se realizó mediante la cuantificación por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Se disolvió el quitosano en buffer de acetato de amonio (0.15 mol/L) y ácido acético (0.20 mol/L) a pH = 4.5, que también fue usado como eluyente a velocidad de flujo constante (0.5 mL/min). Las soluciones de quitosano ( $C_p = 0.5$  g/L) se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45  $\mu m$  (Millipore) y luego se inyectaron ( $\nu = 100$   $\mu L$ ) en columnas TSK2500 y TSK6000 (Tosoh Bioscience). De acuerdo con el grado medio de acetilación (DA) del quitosano, se utilizó el valor de incremento del índice de refracción ( $dn/dc$ ) para determinar el peso molecular medio (PM) y la dispersidad ( $\mathcal{D}$ )

### 18.22.3. Análisis de espectroscopia de Infrarrojo Transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo de las muestras fueron generadas empleando un espectrofotómetro Agilent Cary 630 con una resolución de 4  $cm^{-1}$  y un intervalo de longitud de onda de 500-4500  $cm^{-1}$ .

#### 18.22.4. Análisis de difracción de rayos X

Las micropartículas fueron analizadas mediante un difractómetro (Bruker® D8 Advance, Billerica, MA, USA) empleando una radiación incidente de CuK $\alpha$  ( $\lambda= 1.5418 \text{ \AA}$ ), en el rango de  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $50^\circ$  (scan:  $0.05^\circ$ ) a una velocidad de  $1^\circ/\text{min}$ . El voltaje operado fue de 40 kV a una corriente de 40 mA.

#### 18.22.5. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó bajo una atmósfera de helio en un flujo de 60 mL/min, utilizando un equipo TGA Q500 (TA Instruments). Se pesaron alrededor de 10 mg de muestra, utilizando una charola de aluminio. La velocidad de calentamiento programada fue  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar los  $500^\circ\text{C}$ .

Los datos se analizaron utilizando el software Universal Analysis 2000, versión 4.7a (TA Instruments, New Castle, EUA).

#### 18.22.6. Morfología y tamaño de partícula

Las características morfológicas y estructurales de las micropartículas se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM FEG FEI, Quanta 250) a un aumento de 1000x.

## 19. RESULTADOS

### 19.1. Contenido de fenoles totales y actividad biológica de los extractos

El extracto de estevia mostró un contenido de polifenoles totales de  $77.55 \pm 8.1 \text{ mg/g bs}$  (Tabla 9). Resultados similares fueron los obtenidos por Periche, Castello, Heredia, & Escriche (2015) al obtener un total de polifenoles de  $80 \text{ mg EAG/g bs}$  mediante el empleo de un baño de ultrasonido como método de extracción de polifenoles de hojas de estevia. El extracto de naranja mostró un contenido de polifenoles de  $32.7 \pm 0.55 \text{ mg/g bs}$ , estos valores fueron superiores a los extractos de naranja agria obtenidos por Jayaprakasha, Girenavar, & Patil, (2008) así como en otro tipo de extractos cítricos ( $32.48 \pm 0.36 \text{ mg GAE/g}$ ).

Los resultados de la determinación de actividad antioxidante del extracto de estevia (Tabla 9) mostraron valores superiores a los obtenidos por Periche et al., (2015) quien reportó 131 mg Trolox/ g bs para un extracto de hojas de estevia obtenido mediante extracción convencional. Respecto a la actividad antioxidante del extracto de naranja se observó mayor inhibición de radicales en comparación con lo obtenido en el extracto de estevia.

Los resultados de actividad antimicrobiana mostraron la actividad del extracto de hojas de estevia contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (Tabla 9). El extracto presentó mejor actividad frente a *E. coli* y *S. typhimurium* al inhibir el crecimiento bacteriano con una menor concentración de polifenoles. Por otra parte se observó que el extracto de naranja requirió una concentración menor de fenoles para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, así mismo se observó que esta concentración fue menor que la utilizada para inhibir el crecimiento de *S. aureus* con extracto de estevia.

Tabla 9. Contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos de estevia y naranja agria.

Extracto	TPC ( mg/ g bs)	Actividad antioxidante ( $\mu\text{m Trolox/ g bs}$ )	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
			<i>S.aureus</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>E.coli</i>
Extracto de estevia	77.55 $\pm$ 8.1	602.67 $\pm$ 10.9	21.08	25.29	21.08
Extracto de naranja agria	32.7 $\pm$ 0.55	701.8 $\pm$ 1.94	16.20	43.20	43.20

## 19.2. Evaluación de la relación de agentes de pared

La goma seyal presentó un potencial de  $-29.5 \pm 3.31$  mV (Tabla 10). La carga eléctrica de los polisacáridos depende de los grupos iónicos que tienen a lo largo de la cadena. La goma seyal presenta muchos grupos carboxilo en el monomero principal de su estructura lo que permite que sea un polímero aniónico. El quitosano presentó un potencial de  $47.1 \pm 2.46$  mV, la carga eléctrica positiva se debe a la protonación del grupo amino presente en las unidades glucosamina. Ambos extractos fenólicos de estevia y naranja agria presentaron carga negativa de  $-29.43 \pm 2.56$  y  $-12.1 \pm 1.25$  respectivamente.

La figura 6 muestra el cambio del potencial zeta en la dispersión de goma:fructano (3 mg/mL) conforme se va adicionando una dispersión de quitosano (5 mg/mL) . El sistema [ga:fru: qui] mostró un incremento progresivo en la carga neta conforme el sistema iba en aumento a la relación de [2:1:0] – [2:1:3]. Posteriormente se observó un cambio en la carga y pasó de negativa (-20 mV) a positiva [ 2:1:3]- [2:1:5], pasando por el punto isoeléctrico (PI) cuando se requirieron 3 g de la mezcla ga:fru por cada 1.22 g de quitosano. Finalmente, el potencial se mantuvo alrededor de 40 mV conforme la relación del sistema fue en aumento.

Tabla 10. Potencial zeta de agentes de pared y extractos fenólicos

<b>Solución</b>	<b>Potencial zeta</b>
Goma seyal	-29.5±3.31
Quitosano BPM	47.1±2.46
Extracto de estevia	-29.43±2.56
Extracto de naranja	-12.1± 1.25

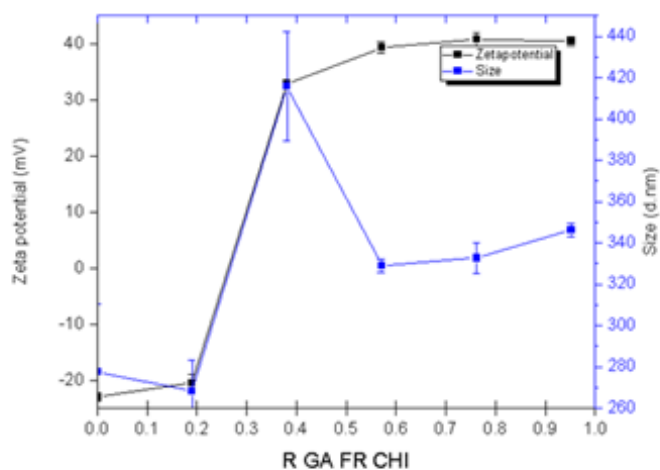


Figura 6. Seguimiento del potencial zeta ( $\zeta$ ) durante la titulación de la dispersión goma: fructano: quitosano.



### 19.3. Diseño experimental de formulaciones

Los rendimientos de secado mostraron que la formulación B Naranja (1) - Estevia (2) presentó los rendimientos más altos con 70.45 % (Tabla 11). Los rendimientos de microencapsulación se asocian a las condiciones del equipo. Estudios previos han empleado variables como las temperaturas de secado del equipo para conocer si existen pérdidas en los compuestos encapsulados durante el proceso de secado (Tonon et al., 2011). Diversos estudios han indicado que los rendimientos bajos pueden estar relacionados con las altas temperaturas de secado y la degradación de polifenoles (Oskan et al., 2019). Da Costa et al., (2012) determinó en un estudio que una temperatura de entrada mayor a 160° C da lugar a una degradación de polifenoles. En el presente estudio se obtuvieron valores superiores a 37%. Aliakbarian et al. (2015) obtuvo rendimientos de encapsulación de polifenoles similares al emplear maltodextrina (70.5 %) o goma arábiga (69.2%) como únicos agentes encapsulantes.

Se obtuvieron porcentajes de encapsulación de fenoles totales entre 66% y 100% (Tabla 11). Se observó que los tratamientos D Naranja (0) -Estevia (1) con 50 mg/L y E Naranja (2) - Estevia (1) con 100 mg/L obtuvieron porcentajes de encapsulación del 100 %. Por otra parte se obtuvo que los porcentajes más bajos se presentaron en las formulaciones que no contenían extracto de estevia en ninguna de las dos concentraciones de fenoles empleadas, Naranja (1)-Estevia (0) con 50 y 100 mg/mL.

Por otro lado, la encapsulación de compuestos fenólicos individuales mostró un intervalo de 42.75 % a 100% (Tabla 12). Estudios previos han reportado porcentajes del 60% a 80% al encapsular naringina un compuesto fenólico mayoritario en cítricos (Pai, Vangala, Ng, Ng, & Tan, 2015). Otros reportes han mostrado porcentajes de 59.85 % para ácido gálico ( Lamarra et al., 2016), 86% para hesperidina ( Tisirigotis- Mmanuecka et al., 2017). La eficiencia de encapsulación está relacionada con el compuesto encapsulado y los agentes de pared debido a que se pueden formar nuevos enlaces entre grupos funcionales de ambas estructuras y como consecuencia se mejora la eficiencia de encapsulación. Otro aspecto importante es la polaridad del compuesto y su afinidad hacia la mezcla de agentes de pared de goma: fructano: quitosano.

Tabla 11. Rendimientos de secado, porcentaje de encapsulación y porcentaje de liberación de compuestos fenólicos

Formulación	Polifenoles adicionados (mg)	Rendimiento de secado (%)	Porcentaje de encapsulación	Porcentaje de liberación
A naranja (2): estevia (1)		64.50	88.85± 0.14 <sup>d</sup>	6.81 ± 0.16 <sup>f</sup>
B naranja (1): estevia (2)		37	95.95± 0.05 <sup>c</sup>	3.78 ± 0.0 <sup>g</sup>
C naranja (1):estevia (0)	50	59.78	75.57± 0.04 <sup>e</sup>	25.12 ± 0.07 <sup>c</sup>
D naranja (0): estevia (1)		41.79	100± 0.0 <sup>a</sup>	46.18 ± 0.0 <sup>a</sup>
E naranja (2): estevia (1)		55.13	100±0.0 <sup>a</sup>	10.27 ± 0.10 <sup>d</sup>
F naranja (1): estevia (2)		70.45	95.41±0.03 <sup>c</sup>	7.94 ± 0.29 <sup>e</sup>
G naranja (1):estevia (0)	100	44.75	65.88± 0.03 <sup>f</sup>	36.90 ± 0.11 <sup>b</sup>
H naranja (0): estevia (1)		51.53	96.86± 0.02 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>h</sup>

Tabla 12. Porcentaje de encapsulación de compuestos fenólicos individuales

Formulación	Compuestos fenólicos (%)								
	Clo	Caf	Neo	Nar	Cum	Fer	Rut	Dio	
A N(2):E(1)	46.80±0.07 <sup>h</sup>	90.85±0.2 <sup>e</sup>	84.60±0.02 <sup>b</sup>	84.88±0.42 <sup>b</sup>	81.6±0 <sup>c</sup>	100± 0 <sup>a</sup>	100± 0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
B N(1):E(2)	96.83±0.03 <sup>d</sup>	97.58±0.21 <sup>b</sup>	82.65±0.01 <sup>c</sup>	85.09±0.01 <sup>b</sup>	74.09±3.26 <sup>d</sup>	42.75±0.24 <sup>c</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
C N(1):E(0)	87.85±0.05 <sup>f</sup>	83.83± 0.11	75.14±0.04 <sup>d</sup>	74.44±0.04 <sup>c</sup>	70.27± 0.0	ND	ND	ND	
D N(0):E(1)	97.26±0.03 <sup>b</sup>	92.86±3.70 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	86.16± .32 <sup>b</sup>	100± 0 <sup>a</sup>	95.01±0 <sup>b</sup>	
E N(2):E(1)	96.47±0.0 <sup>e</sup>	75.77±0.20 <sup>g</sup>	87.32±0.04 <sup>a</sup>	94.93±0.18 <sup>a</sup>	93.16±0.03 <sup>b</sup>	100±0.79 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
F N(1):E(2)	97.07±0.01 <sup>c</sup>	96.76±0.07 <sup>c</sup>	72.32±0.02 <sup>e</sup>	74.15±0.03 <sup>c</sup>	73.48±0.13 <sup>d</sup>	100±0.10 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	
G N(1):E(0)	74.29±0.34 <sup>g</sup>	76.24±0.21 <sup>f</sup>	64.41± 0 <sup>f</sup>	63.55±0.01 <sup>d</sup>	99.51±0.02 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	
H N(0):E(1)	99.47±0.04 <sup>a</sup>	100 ± 0.2 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	100±0 <sup>a</sup>	

N:Naranja, E:Estevia Clo: ácido clorogénico, Caf: ácido cafeico, Neo:Neohesperidina, Nar: Naringina, Cum: ácido cumarico, Fer: ácido ferúlico, Rut: rutina, Dio:diosmina, ND No detectado

Respecto al porcentaje de liberación de fenoles totales con  $\text{CaCl}_2$  se obtuvo un valor máximo de 46.18 %, donde la formulación D naranja (0): estevia (1) con 50 mg/L obtuvo el valor mas alto (Tabla 11). Estudios previos donde evaluaron la liberación de insulina mostraron que la liberación fue menor y más lenta en membranas formadas solo con quitosano en comparación con membranas formadas con quitosano: goma: pectina y iones calcio las cuales mostraron un aumento del 72% en la liberación y una disminución en el tiempo (Tsai et al., 2014).

Por otro lado se ha observado que los polifenoles interactúan fuertemente con el quitosano a través de enlaces hidrógeno por lo que los bajos porcentajes de liberación se pueden asociar a la capacidad de las micropartículas de retener los compuestos lo que podría explicar los porcentajes de liberación obtenidos de compuestos individuales en donde se observó que la formulación F naranja (1): estevia (2) mostró los valores de liberación más altos con 66.25% y 58.67% (Tabla 13) para naringina y neohesperidina respectivamente. Otros estudios han obtenido 23 % (Lauro et al., 2007) y 60 % de liberación de naringina (Pai, Vangala, Ng, Ng, & Tan, 2015). Así mismo se observó que a diferencia de otras formulaciones donde no se detectó ácido ferúlico, en la formulación F se obtuvo un 26.85% de liberación. Estudios previos han mostrado que la inclusión de ciertos fenoles como el ácido ferúlico en una matriz de quitosano reduce la pérdida del mismo y mejora su estabilidad térmica frente a procesos mecánicos, esto como resultado de la inmovilización molecular del ácido ferúlico después de su acoplamiento al quitosano (Sarecka et al., 2015).

Así mismo se debe considerar la estructura molecular de cada compuesto, es decir el grado y posición de los grupos hidroxilo (Hu y Luo., 2016).

Tabla 13. Porcentaje de compuestos fenólicos liberados con CaCl<sub>2</sub>

Formulación		Compuestos fenólicos (%)								
		Clo	Caf	Neo	Nar	Cum	Fer	Rut	Dio	
A	N(2):E(1)		1.72 ± 0.03	5.31± 0.29	37.94± 0.06	45.68± 1.14	ND	ND	ND	ND
B	N(1):E(2)		0.33± 0.0	0.54± 0.23	35.25± 0.02	37.07± 0.03	ND	ND	ND	ND
C	N(1):E(0)	50	11.39 ±0.64	3.85± 0.69	27.07± 0.02	27.74 ± 0.0	ND	ND	ND	ND
D	N(0):E(1)		ND	ND	ND	ND	ND	0.76± 0.19	ND	ND
E	N(2):E(1)		0.75± 0.0	0.79± 0.22	11.58± 0.11	12.77± 0.50	ND	ND	ND	ND
F	N(1):E(2)		2.91± 0.79	1.32± 0.08	58.67± 0.06	66.25± 0.08	ND	26.85± 0.0	ND	ND
G	N(1):E(0)	100	28.58± 0.31	26.17± 0.14	38.55± 0.14	39.26± 0.12	ND	ND	ND	ND
H	N(0):E(1)		0.59 ± 0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Como se mostró en la tabla 11, los porcentajes de encapsulación y liberación indicaron que la mayor parte adicionada de los extractos fue retenida dentro de la matriz durante la formación de las micropartículas en el secador por aspersion lo que sugiere la estabilidad de las micropartículas. Con base a estos resultados se seleccionaron las formulaciones con los porcentajes de encapsulación más altos que correspondieron a la formulación D naranja (0): estevia (1) y E naranja (2): estevia (1) y se llevó a cabo la liberación de las micropartículas empleando un pretratamiento de secado a 200 ° C seguido de la trituración con nitrógeno y liberación con CaCl<sub>2</sub>. Los resultados (Tabla 14) mostraron que el tratamiento de liberación que empleó temperatura de 200 ° C para el secado de las microcápsulas liberó 28.02 % de diosmina en la formulación D naranja (0): estevia (1) un compuesto que no fue detectado en las liberaciones donde no se utilizaron altas temperaturas, no fue así para la formulación E. Por otro lado, se observó que las micropartículas de la formulación E naranja (2): estevia (1) liberadas con nitrógeno y CaCl<sub>2</sub> sin la aplicación de temperatura liberaron 3.31 % de ácido clorogénico.

#### 19.4. Evaluación de la actividad antioxidante de las microcápsulas

Los resultados demostraron una actividad antioxidante menor a la reportada previamente en los extractos (Tabla 14). Estos resultados se podrían asociar con los escasos analitos individuales liberados y a su bajo porcentaje de liberación. Como ya se reportó en el capítulo anterior la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se puede deber a un efecto sinérgico entre ellos.

Tabla 14. Determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos liberados

Sin temperatura + N		Temperatura+ N	
(µm Trolox/ g bs)		(µm Trolox/ g bs)	
D naranja (0): estevia (1)	ND	D naranja (0): estevia (1)	145.45 ± 1.97
E naranja (2): estevia (1)	143.36 ± 0.98	E naranja (2): estevia (1)	ND

Otros estudios han determinado que los valores de actividad antioxidante de un extracto encapsulado de café verde disminuyeron cuando se utilizó goma arábica y maltodextrina indicando un efecto perjudicial debido a la mezcla de ambos agentes (Ballesteros et al. 2017).

#### 19.5. Caracterización de las micropartículas

##### 19.5.1. Análisis mediante espectrometría de infrarrojo

El espectro infrarrojo de *A. seyal*, fructanos de agave, quitosano, extractos de estevia y naranja agria y micropartículas se obtuvieron entre 800 y 400  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro infrarrojo de la goma Acacia (figura 7c) mostró cuatro bandas principales en la longitud de onda entre 1700 y 1020  $\text{cm}^{-1}$ . Lo anterior puede atribuirse parcialmente a las proteínas presentes en la goma. Lopez-Torrez et al. 2015 menciona que las bandas presentes entre 1120 and 1140  $\text{cm}^{-1}$  pueden formarse debido a un alto contenido de cadenas de arabinosil junto con grupos metil del ácido 4-O-Me-glucurónico. En el espectro de la figura 7 se puede observar un pico a 2359 y 3749  $\text{cm}^{-1}$  mismos que se han sido asociados al estiramiento de -CH y C = O respectivamente.

En el espectro de quitosano (figura 7b) se observan las bandas pertenecientes a los grupos funcionales de la molécula. Se aprecia una banda correspondiente al estiramiento del OH a 3424  $\text{cm}^{-1}$ . Así mismo se observó una banda a 1017  $\text{cm}^{-1}$  asociada a los estiramientos

asimétricos C-O-C así como las bandas a 1544 y 1652 atribuidas al estiramiento del enlace C = O y N-H característicos del grupo amida (Pérez et al, 2015).

El espectro FTIR de los fructanos de agave se muestra en la figura 7b. La transmitancia de la banda a 3270-2936  $\text{cm}^{-1}$  es atribuida al estiramiento de los grupos hidroxilo. Así mismo hay bandas en el intervalo de 3200-2950 $\text{cm}^{-1}$  que están asociadas al estiramiento de C-H.

La Figura 7a muestra el espectro FTIR del extracto de naranja y estevia. En el espectro del extracto de estevia se observó un desplazamiento de la banda 1730  $\text{cm}^{-1}$  a 1550  $\text{cm}^{-1}$  el cual es asociado a al estiramiento de C = O en aldehídos secundarios y amidas.

El espectro de la naranja agria mostró tres bandas principales entre 1700- 1000  $\text{cm}^{-1}$ , de acuerdo a la figura 7 estos picos se atribuyen a las vibraciones de estiramiento del grupo CO y al estiramiento del grupo a C= C.

La figura 7d muestra que los espectros de los diferentes tratamientos de micropartículas siguieron el mismo patrón. Así mismo se logró observar que la banda del extracto de estevia (Fig 7a) localizada a 3200  $\text{cm}^{-1}$  y asociada a vibraciones del estiramiento del enlace O-H disminuyó en los espectros de las micropartículas lo que podría sugerir que los H se encuentren comprometidos. Se observó que la banda de 2600  $\text{cm}^{-1}$  del extracto de estevia no está presente en los espectros de las micropartículas, esto puede deberse a un enlace covalente que se formó en la matriz.

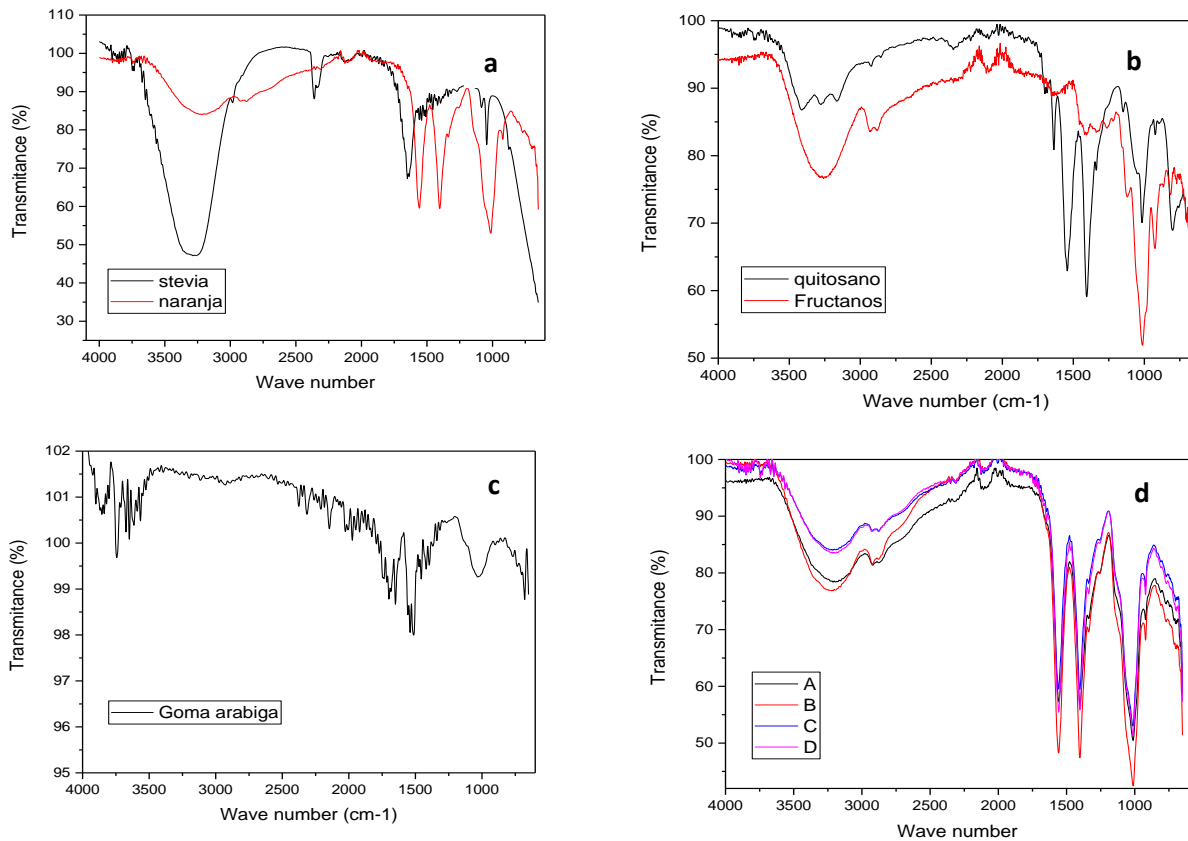


Figura 7. Espectros infrarrojo de agentes de pared y micropartículas

### 19.5.2. Difracción de rayos X

En la figura 8 se presenta el patrón de difracción de rayos - X para quitosano. Se observa un pico bien definido de mayor intensidad a  $2\Theta = 19.65^\circ$  y uno menor a  $9.43^\circ$ . Lo anterior hace referencia a una fase cristalina y amorfa. Yuan, Chesnutt, Haggard, & Bumgardner, 2011 obtuvieron un patrón similar mencionando que los picos a  $2\Theta \sim 10^\circ$  y  $20^\circ$  son indicativo de material hidratado y parcialmente cristalino.

En la figura 8 se observan los siguientes tratamientos de encapsulados [A Naranja (1) Estevia (2)], [B Naranja (2) Estevia (1)] 50 mg y control. Al comparar los patrones de difracción se observaron picos entre  $2\Theta = 11.5^\circ$  y  $45^\circ$ . Ambos tratamientos A y B mostraron

un patrón similar donde se observaron dos picos de mayor intensidad uno a  $11.5^\circ$  y otro a  $30^\circ$ . Con respecto al control, el análisis sugiere un cambio en la cristalinidad en ambos tratamientos adicionados con el polifenol. Un comportamiento similar se observó para los encapsulados [E Naranja (1) Estevia (2)] y [F Naranja (1) Estevia (2)] 100 mg.

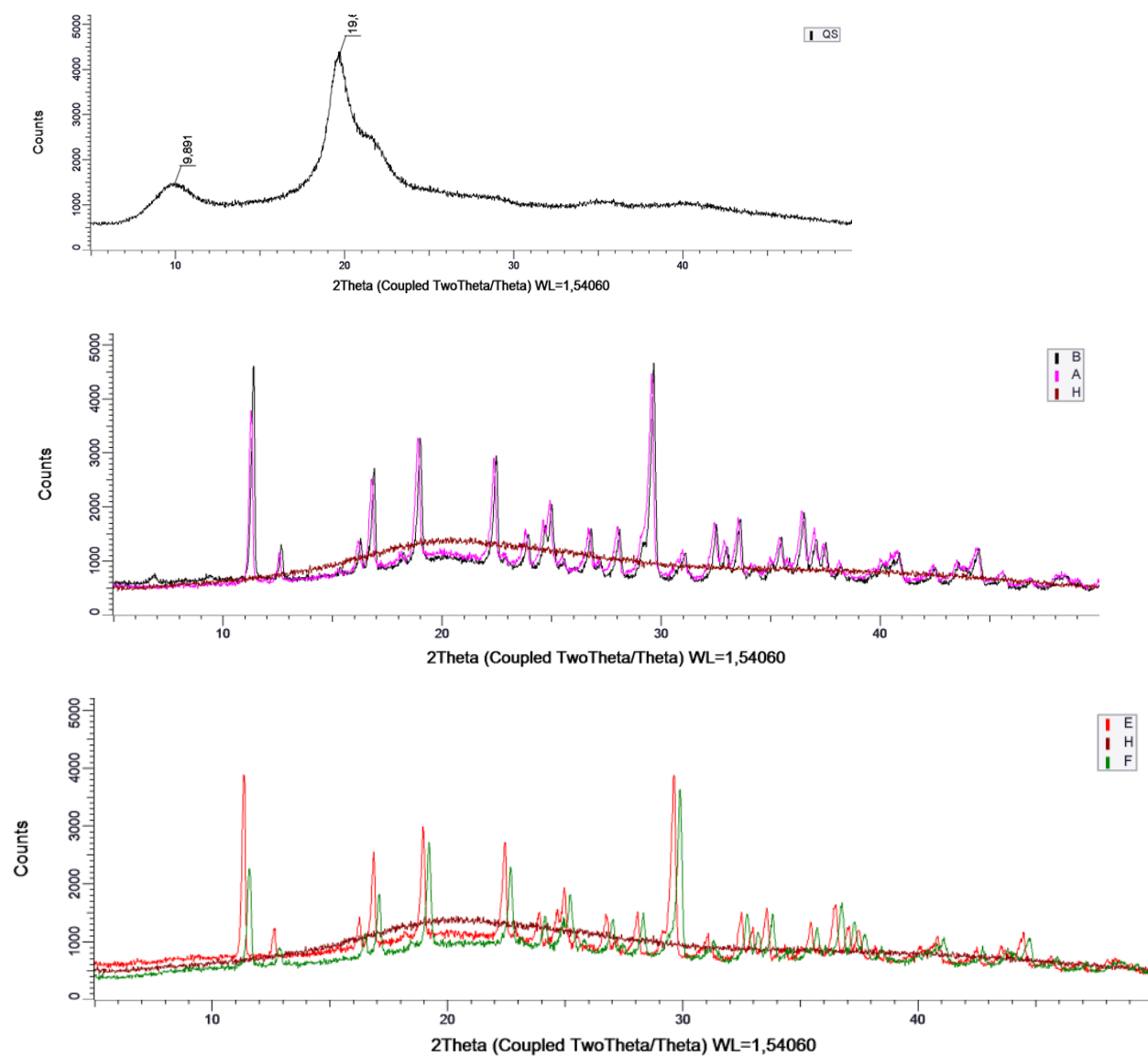


Figura 8. Patrón de difracción de rayos X



### 19.5.3. Análisis de los encapsulados mediante termogravimetría

Mediante termogravimetría (TGA) se obtuvieron los termogramas que se presentan en la figura 9, correspondientes al encapsulado A Naranja (2) Estevia (1)] 50mg, E Naranja (2) Estevia (1)] 100mg, la goma arábica y el quitosano. En estos se observa que la pérdida de masa del quitosano comienza cerca de los 200° C, esta temperatura es similar a lo reportado por (Kumar et al., 2017). La goma arábica presentó dos pérdidas de masa, una a 40- 100°C la cual se puede asociar a la pérdida de agua y la segunda a 200- 300 °C misma que puede asociarse a la degradación térmica del compuesto. Estos resultados son similares a los obtenidos por Miyuki et al. (2016). En tanto, los encapsulados A y B mostraron una pérdida de peso a 150-290 °C correspondiente a una pérdida de masa total del 33%.

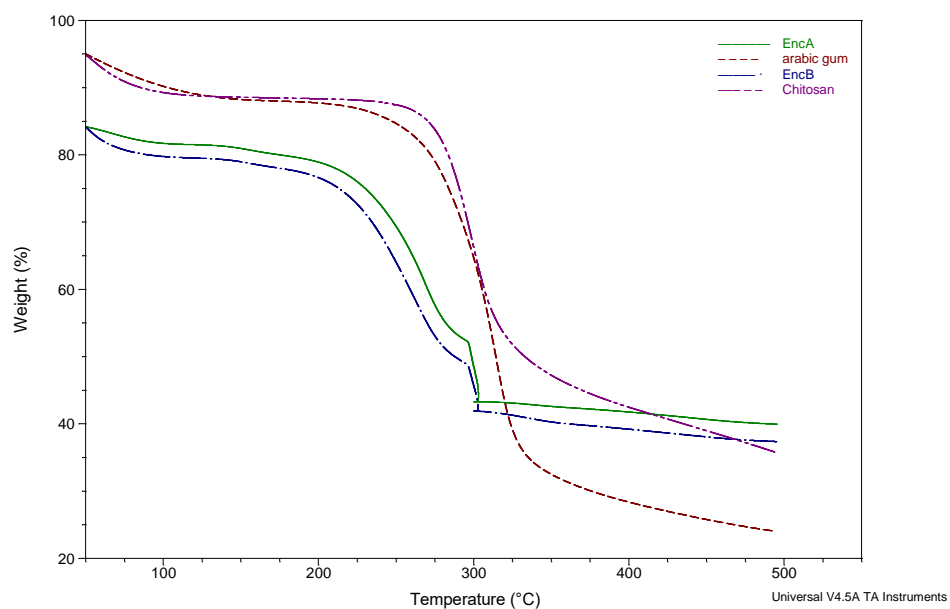


Figura 9. Curvas TGA de quitosano, goma arábica, encapsulado A, encapsulado E.

### 19.5.4. Morfología y tamaño de partícula

Las micrografías se muestran en la figura 10. Se observó que las microcápsulas obtenidas tienden a la formación de aglomerados esféricos, presencia de hendiduras en la superficie

con partes lisas y rugosas, las cuales son debidas a las condiciones de proceso utilizadas, así como a los agentes empleados para su formación. Esta observación es similar a lo obtenido por (Quispe-Condori, Saldaña, & Temelli, 2011). De acuerdo con Sun-Waterhouse, Wadhwa, & Waterhouse (2013) y Shu, Yu, Zhao, & Liu (2006) la forma irregular de las microcápsulas puede deberse a la rápida pérdida de agua durante el proceso de secado. El tamaño de las micropartículas adicionadas con polifenoles osciló entre 15.15 $\mu\text{m}$ -19 $\mu\text{m}$  con un promedio de tamaño de partícula de 16.69  $\mu\text{m}$ , mientras que el tamaño de las micropartículas sin polifenoles fue entre 12.95  $\mu\text{m}$  y 17.07 $\mu\text{m}$  con un promedio de 14.59  $\mu\text{m}$ .

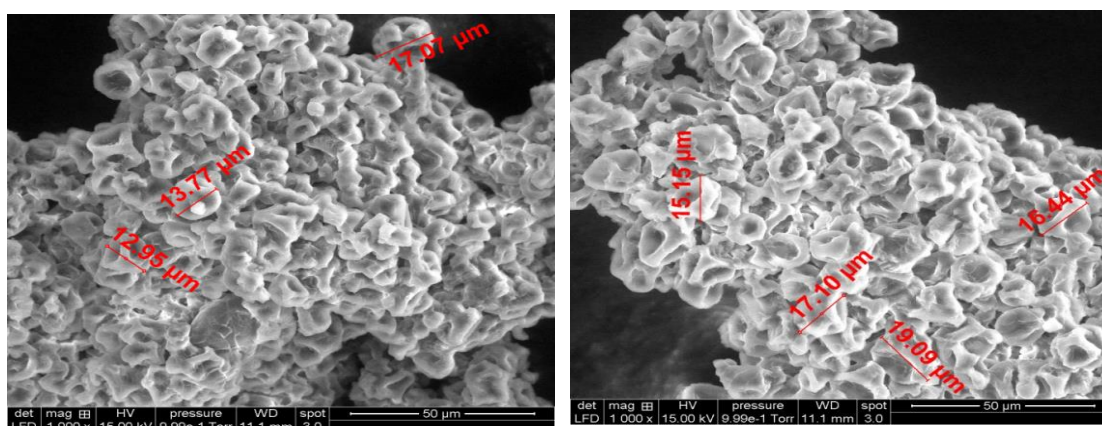


Figura 10. Micrografías de las micropartículas sin (izquierda) y con (derecha) adición de fenoles

## 20. CONCLUSIÓN

El empleo de polisacáridos como la goma arábiga, fructanos y quitosano en un método de secado por aspersión permitió la obtención de micropartículas con altos porcentajes de encapsulación contribuyendo a la conservación de los compuestos fenólicos.

La determinación de la concentración y relación de extractos de estevia y naranja en las formulaciones causaron diferencias significativas en los porcentajes de encapsulación y liberación de los compuestos fenólicos.

La titulación potenciométrica permitió establecer las concentraciones para la formación de las soluciones de biopolímeros. Los resultados mostraron que la dispersión empleada de goma: fructano: quitosano se formó cuando los polímeros se mezclaron en una relación 2:1:1.

La caracterización de las micropartículas mediante espectroscopia de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X permitieron representar la interacción entre los agentes de pared y los compuestos fenólicos.

## 21. REFERENCIAS

- Chen, M.L.; Yang, D.J.; Liu, S.C. Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2011, 46, 1179–1185.
- Covarrubias Cardenas, A., Vasquez Patron, J., Espinosa Andrews, H., Talavera Ayora, T., Garcia Cruz, U., & Pacheco, N. (2018). Antioxidant capacity and UPLC–PDA ESI–MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 5106–5114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13197-018-3451-0>
- Da Costa, S. B., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Serra, A. T., Martins, M. M., Da Costa, M. L. B. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043>
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. D. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.001>
- Fernandes, R. V. D. B., Borges, S. V., & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.083>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.
- Jayaprakasha, G., Girenavar, B., & Patil, B. S. (2008). Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*, 99(10), 4484–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.067>
- Kumar, L. R. G., Chatterjee, N. S., Tejpal, C. S., Vishnu, K. V, Anas, K. K., Asha, K. K., Mathew, S. (2017). International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying : Characterization and oxidative stability studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1986–1995. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.114>
- Lemus-Mondaca, R. et al. (2016). Stevia rebaudiana Leaves: Effect of drying process

- temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Human Nutrition*, *71*, 49–56.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zura-Bravo, L., & Kong, A. H. (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, *132*(3), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>
- Miyuki, P., Maria, L., Francisco, B. De, Hoscheid, J., Landucci, K., Sabbatini, D., ... Cardoso, C. (2016). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Development of arabic and xanthan gum microparticles loaded with an extract of *Eschweilera nana* Miers leaves with antioxidant capacity, *499*, 103–112.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(9), 1865–1872. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.002>
- Pai, D. A., Vangala, V. R., Ng, J. W., Ng, W. K., & Tan, R. B. H. (2015). Resistant maltodextrin as a shell material for encapsulation of naringin: Production and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, *161*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.037>
- Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R., & Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.022>
- Periche, A., Castello, M. L., Heredia, A., & Escriche, I. (2015). Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in Stevia rebaudiana leaves. *Food Chemistry*, *172*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.029>
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A., & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(9), 1880–1887. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.005>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, *13*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Sawalha, S. M. S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS. *Food Chemistry*, *116*(2), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.003>
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying, *76*, 664–669. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062>
- Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S. S., & Waterhouse, G. I. N. (2013). Spray-Drying Microencapsulation of Polyphenol Bioactives: A Comparative Study Using Different Natural Fibre Polymers as Encapsulants. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(9), 2376–2388. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0946-y>
- Tsai, R. Y., Chen, P. W., Kuo, T. Y., Lin, C. M., Wang, D. M., Hsien, T. Y., & Hsieh, H. J. (2014). Chitosan/pectin/gum Arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application. *Carbohydrate Polymers*, *101*(1), 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.008>
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption

and Pre-Osteoblastic Cell Cultures, 1399–1416. <https://doi.org/10.3390/ma4081399>  
Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits.  
*Food Chemistry*, 196, 885–896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>

## **CAPÍTULO 4: EFECTO DE LA ADICIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE POLIFENOLES OBTENIDOS DE NARANJA AGRIA Y ESTEVIA EN LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS, FISICOQUÍMICAS Y SENSORIALES DE UN PRODUCTO DE PANADERÍA**

### **RESUMEN**

Se determinó el efecto de la adición de micropartículas de polifenoles de naranja agria y estevia en función de las propiedades biológicas, fisicoquímicas y sensoriales de un producto de panadería. Los parámetros fisicoquímicos de las muestras de masa y galletas revelaron que los valores de  $b^*$  correspondientes a las coordenadas amarillo- azul de todas las muestras de masa no se vieron afectados por la adición de micropartículas y también tendieron a la disminución de la luminosidad en comparación con el control. Con respecto a las galletas, los valores de color mostraron resultados similares a los obtenidos en la masa con excepción del valor  $L^*$  (luminosidad). Los análisis de las propiedades reológicas de las masas de galletas mostraron que el tratamiento de masa adicionada con extracto de naranja obtuvo los valores de viscosidad más altos mientras que la masa adicionada con las micropartículas la viscosidad más baja, así mismo se observó que el tratamiento de masa adicionado con micropartículas obtuvo una  $G'$  y una  $G''$  más baja lo que parece indicar que es la mejor opción al tener los valores más bajos de ambos módulos. En la evaluación sensorial se obtuvo que las galletas adicionadas con micropartículas tuvieron el mismo sabor que las adicionadas con ambos extractos. Visualmente, no hubo diferencia significativa entre las galletas control y las adicionadas con micropartículas. Las galletas elaboradas con harina de trigo y avena y adicionadas con micropartículas de polifenoles obtenidos a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia mostraron buenas características fisicoquímicas y sensoriales. La evaluación de las propiedades reológicas permitieron conocer el comportamiento de las masas cuando se le adicionaron las micropartículas.

## 22. INTRODUCCIÓN

El uso de subproductos agroindustriales con propiedades biológicas obtenidos de diversas fuentes vegetales y su adición como ingredientes potenciales bioactivos para la obtención de alimentos funcionales es cada vez más recurrente (Martins, Pinho, & Ferreira, 2017). Material vegetal como las cáscaras de naranja agria y hojas de estevia presentan un alto contenido de polifenoles y se ha determinado que tienen una alta actividad antioxidante y antimicrobiana (Covarrubias et al. 2018ab). Estudios previos han evaluado la adición de extractos fenólicos de cítricos (Caleja et al., 2018; Reshmi et al., 2017) y estevia (Gongora Salazar et al. 2018) como ingredientes bioactivos potenciales para la producción de productos de panadería. No obstante, la actividad biológica se ve limitada por su inestabilidad frente a factores ambientales por lo que el método de microencapsulación se ha utilizado principalmente en la conservación de estos compuestos bioactivos aunque también se ha evaluado su uso para enmascarar sabores astringentes o amargos propios de los extractos y que pudieran ser desagradables al consumidor. De acuerdo con Martins et al. (2017) la incorporación de nuevos ingredientes en las formulaciones tiene un impacto en las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales del producto. Urzua et al. (2017) adicionó microcápsulas de extractos de hojas de oliva en una matriz de masa de almidón y determinó que aun después de freír, la masa presentaba actividad antioxidante resaltando de esta forma la importancia de la microencapsulación para la preservación de los efectos benéficos. Así mismo se ha observado que la masa de productos de panadería presenta propiedades reológicas complejas mismas que pueden verse afectadas por la incorporación de las micropartículas. Por lo tanto, el objetivo fue determinar el efecto de la adición de micropartículas de polifenoles de naranja agria y estevia en función de las propiedades biológicas, fisicoquímicas y sensoriales de un producto de panadería.

## **23. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **23.1. Material biológico y reactivos**

Folin-Ciocalteu, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Cloruro de calcio, etanol 96°(Sigma Aldrich San Luis, MI, EE.UU). Las harinas de trigo y avena se obtuvieron de un comercio local.

### **23.2. Extracción de polifenoles**

La extracción de polifenoles a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia se realizó de manera independiente mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) de acuerdo a lo establecido por Covarrubias -Cárdenas et al.( 2018ab).

### **23.3. Obtención de micropartículas**

Se seleccionó la formulación de micropartículas Naranja (2) -Estevia (1) previamente descrita en el capítulo3, para su evaluación en las galletas.

### **23.4. Preparación de la masa**

Los ingredientes utilizados para la formulación estándar de galletas adicionadas con micropartículas fueron: harina de trigo comercial (49.8 g), harina de trigo integral (24.92 g), azúcar (49.85 g), grasa (39.87 g), agua (26.79 g), polvo para hornear (0.77 g), 0.99 g de sal y 8,57 g de micropartículas. Para fines comparativos se prepararon cuatro formulaciones más: formulación agregada con extracto de estevia (a), extracto de naranja agria (b), extracto de naranja agria -estevia (c) y una formulación sin ningún extracto como control. Se hornearon a 200 ° C durante 15 min. Después de hornear, las galletas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron en un lugar seco para posteriores análisis.



### 23.5. Determinación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

La determinación del contenido de fenoles totales (TPC) de las galletas se realizó mediante el método modificado de Folin y Ciocalteu (1927) y se expresó en mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de peso seco a través de una curva de calibración de ácido gálico.

La actividad antioxidante se evaluó mediante la inhibición del radical DPPH de acuerdo a la metodología establecida por Vazquez-Flota et al. (2007) y se expresó como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (TE) por gramo de galleta.

### 23.6. Caracterización fisicoquímica

El contenido de humedad se calculó de acuerdo a la A.O.A.C (1990) empleando una termobalanza Ohaus MB-45, Suiza. Se determinó grasa (NMX-F-089-S-1978), proteína (A.O.A.C 2001) y cenizas (NMX-F-066-S-1978). Los parámetros de color ( $L^*$ , a y b) de las masas y galletas se determinó mediante un colorímetro (Mini Scan EZ VA, USA).

### 23.7. Determinación de las propiedades reológicas de la masa de galletas

Las mediciones reológicas se realizaron utilizando un reómetro equipado con un sistema de medición de placas paralelas (40 mm de diámetro). Las muestras de masa se cargaron y comprimieron hasta un espacio de 2 mm y se retiró cuidadosamente el exceso de masa. Las muestras se dejaron reposar durante 5 minutos. Se realizó una prueba de flujo de cizallamiento constante en el rango de tasa de corte de 0.01 a  $10 \text{ s}^{-1}$  para estudiar el comportamiento del flujo. La prueba de barrido de frecuencia se realizó en el rango de frecuencia de 0,1 a 100 rad / s a una amplitud de tensión de 0,05%. Los datos experimentales de las curvas de flujo fueron ajustados de acuerdo al modelo de Carreau- Yasuda. Todas las mediciones reológicas se realizaron por duplicado.

### 23.8. Evaluación sensorial

Las propiedades sensoriales de las galletas fueron evaluadas por un panel sensorial semi entrenado. El análisis sensorial se realizó 24 h después de retirar las galletas del horno. Se pidió a los panelistas que evaluaran la apariencia, el olor y el sabor. La aceptabilidad general de las galletas se calculó a partir de la media de los parámetros sensoriales anteriores. Se evaluaron cinco puntos (menor preferencia = 1, mayor preferencia = 5).

## 24. RESULTADOS

### 24.1. Determinación del contenido total de fenoles y actividad antioxidante

Los resultados correspondientes a la determinación de fenoles totales y actividad biológica indicaron que la actividad antioxidante fue no detectable. De acuerdo con Granato et al. (2018) la actividad antioxidante involucra interacciones complejas entre factores intrínsecos y extrínsecos relacionados con el sistema alimentario por lo que posiblemente un ensayo *in vitro* como la inhibición del radical DPPH no puede predecirlo.

### 24.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y análisis proximales

Los parámetros fisicoquímicos de las muestras de masa y galletas (Tabla 15) revelaron que los valores de  $b^*$  correspondientes a las coordenadas amarillo- azul de todas las muestras de masa no se vieron afectados por la adición de micropartículas y también tendieron a tener menos luminosidad que el control y que la masa adicionada con extracto de naranja- estevia, esto además de asociarse a la pigmentación de las micropartículas también puede deberse a que se utilizó una harina comercial las cuales suelen llevar un proceso de blanqueado. Los valores de  $a^*$  (rojo- verde) mostraron que no hubo diferencias significativas en relación al control. Con respecto a las galletas, los valores de color mostraron resultados similares a los obtenidos en la masa con excepción del valor  $L^*$ , las galletas adicionadas con micropartículas no mostraron una diferencia significativa en comparación con el control. Después del horneado el valor de luminosidad de las galletas disminuyó.

Los resultados de los análisis proximales de las galletas se muestran en la tabla 1. Se reportó un porcentaje de humedad máximo del 5%, lo que resulta importante desde el punto de vista de conservación. Adicionalmente, estos valores se encuentran dentro de los lineamientos

indicados por la Norma Mexicana (NOM-147-SSA1-1996) en la cual se menciona un porcentaje de humedad máximo de 15% para productos de panificación. Los resultados de cenizas indicaron diferencias significativas entre las galletas adicionadas con micropartículas ( $1.75 \pm 0.14$ ) y el resto de las formulaciones. Respecto al contenido de proteína y grasa, los análisis no mostraron diferencias significativas entre formulaciones.

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas y análisis proximales de muestras de masa y galletas

			Control	Extracto naranja	Extracto mezcla	Extracto estevia	Micropartículas
Masas	Color	L*	$52.50 \pm 0.66^b$	$47.74 \pm 6.21^{ab}$	$49.35 \pm 0.12^c$	$50.14 \pm 0.44^{bc}$	$50.35 \pm 0.79^c$
		a	$6.59 \pm 0.35^b$	$8.31 \pm 1.06^{ab}$	$5.36 \pm 0.12^a$	$4.95 \pm 0.68^b$	$4.68 \pm 0.43^{ab}$
		b	$21.69 \pm 0.85^a$	$24.59 \pm 1.45^a$	$21.84 \pm 1.15^a$	$22.21 \pm 0.35^a$	$20.10 \pm 0.0^a$
Galletas	Color	L*	$53.77 \pm 1.14^a$	$47.74 \pm 6.21^{ab}$	$42.20 \pm 1.18^b$	$48.84 \pm 2.09^{ab}$	$49.16 \pm 2.98^{ab}$
		a	$7.36 \pm 0.64^b$	$8.31 \pm 1.06^{ab}$	$10.01 \pm 0.31^a$	$6.16 \pm 1.83^b$	$8.72 \pm 0.06^{ab}$
		b	$23.22 \pm 0.16^a$	$24.59 \pm 1.45^a$	$23.16 \pm 3.01^a$	$24.47 \pm 0.01^a$	$26.63 \pm 0.81^a$
		Humedad (%)	$3.33 \pm 0.07^b$	$5.43 \pm 0.15^a$	$2.30 \pm 0.18^b$	$3.16 \pm 0.12^b$	$4.75 \pm 0.89^a$
		Cenizas (%)	$0.76 \pm 0.02^{bc}$	$0.66 \pm 0.01^c$	$0.89 \pm 0.03^b$	$0.87 \pm 0.10^b$	$1.75 \pm 0.14^a$
		Proteína (%)	$2.44 \pm 0.03^e$	$6.39 \pm 0.07^c$	$8.44 \pm 0.32^a$	$5.54 \pm 0.29^d$	$7.10 \pm 0.10^b$
		Grasa (%)	$14.84 \pm 0.00^a$	$15.60 \pm 0.0^b$	$15.78 \pm 0.00^c$	$14.11 \pm 0.0^d$	$11.11 \pm 0.0^e$

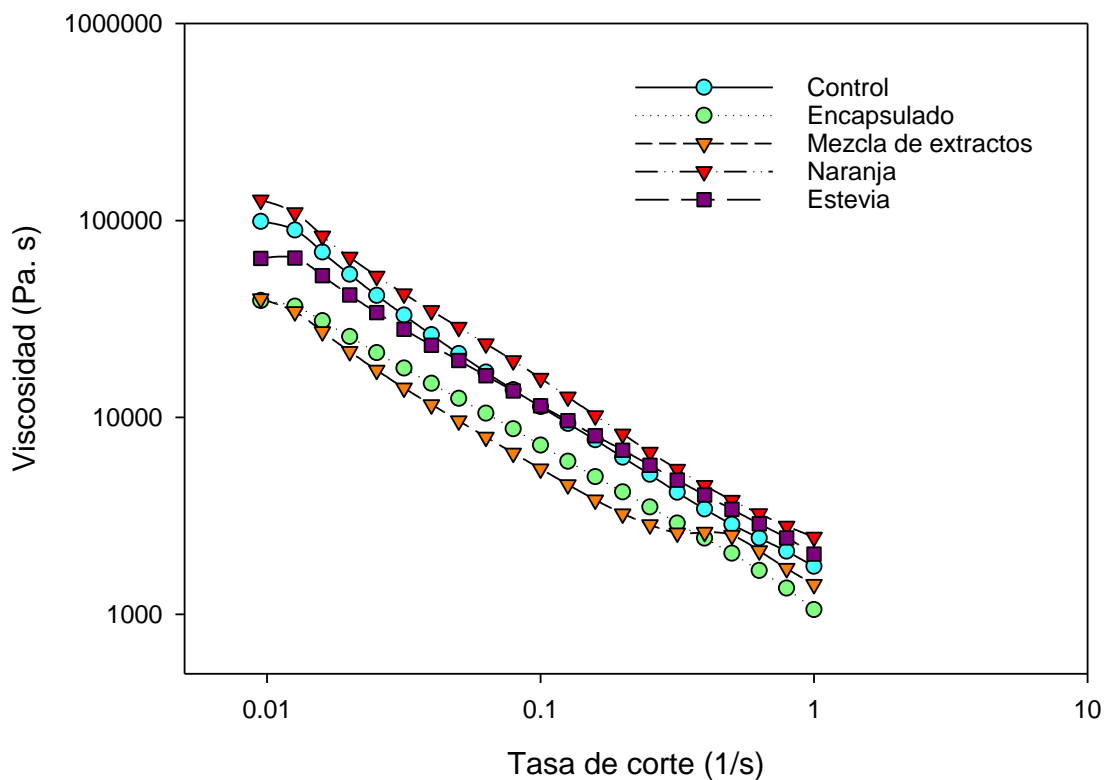
Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencia significativa

### 24.3. Determinación de las propiedades reológicas de la masa de galletas

Las propiedades de viscosidad de la masa fueron determinadas utilizando una prueba de flujo de corte. Los datos experimentales de viscosidad aparente en función de la tasa de corte de las masas adicionadas con extractos fenólicos y micropartículas se muestran en la figura 11. Se observó un comportamiento de adelgazamiento por cizalla, que de acuerdo con Moreira et al. (2013) es un comportamiento normal en las masas. A cada velocidad de corte evaluada, la viscosidad aparente disminuyó. El tratamiento de masa adicionada con extracto de naranja obtuvo los valores de viscosidad más altos mientras que la masa adicionada con las micropartículas la viscosidad más baja. Estos resultados difieren con lo obtenido por Motta et al. (2017) quien obtuvo mayor viscosidad en masa adicionada con gomas. Esto pudiera

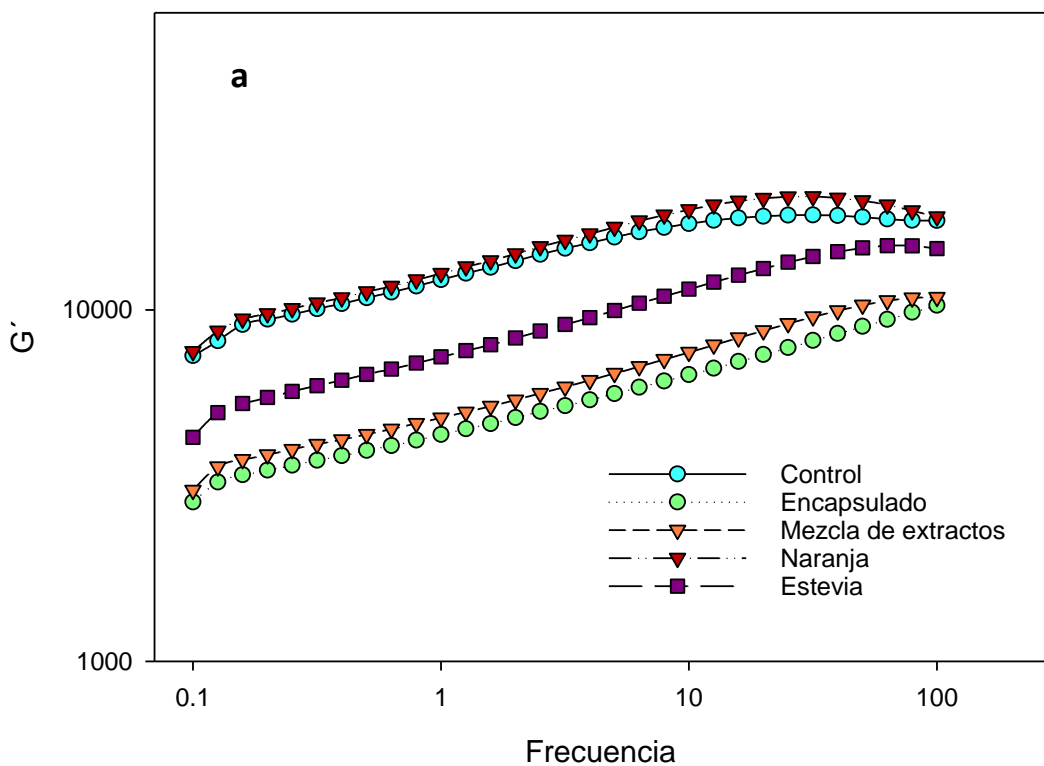
deberse tanto que las concentraciones de agentes poliméricos empleadas en la formación de micropartículas como la cantidad adicionada de micropartículas a la masa fue menor.

Figura 11. Curva de flujo para muestras de masa de galletas adicionadas con extractos de naranja, estevia y micropartículas en función de la tasa de corte.



Las propiedades reológicas de las muestras de masa se muestran en la figura 12. Se observó que en todos los tratamientos el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) fueron dependientes de la frecuencia y ambos incrementaron. Aparentemente ambos módulos permanecieron constantes en los rangos de frecuencia evaluados.

Se observó que el tratamiento de masa adicionado con micropartículas obtuvo una  $G'$  y una  $G''$  más baja lo que parece indicar que es la mejor opción al tener los valores más bajos de ambos módulos y por lo tanto una mejor firmeza de la masa.



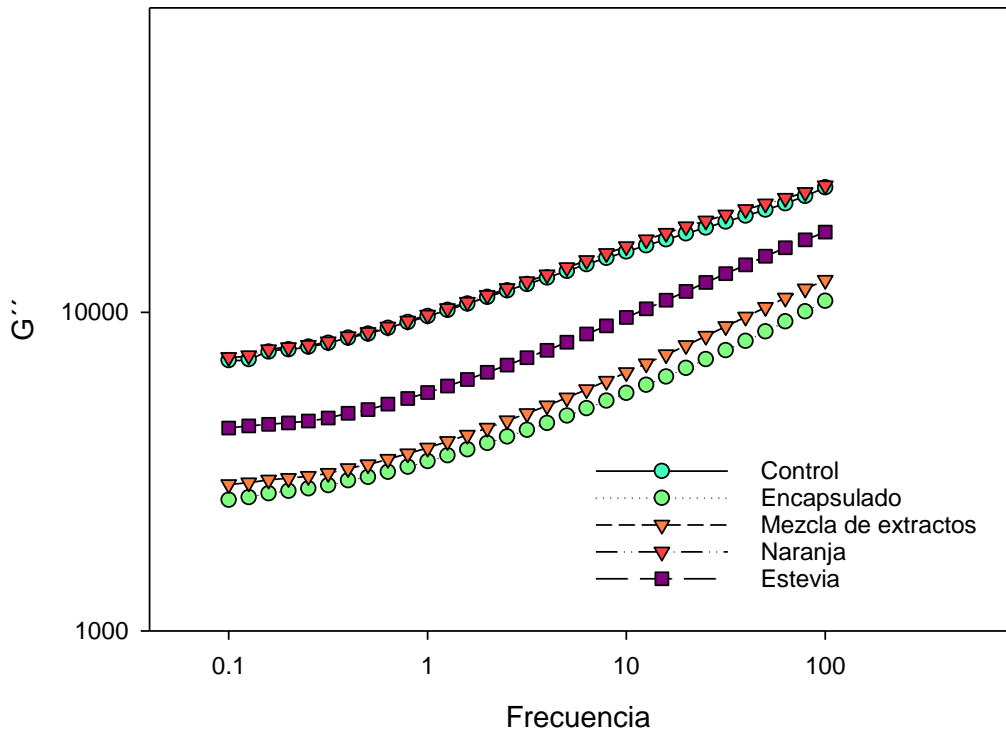


Figura 12. Módulo de almacenamiento  $G'$  (a) y pérdida  $G''$  (b) vs frecuencia angular de masa de galletas adicionada con extractos de naranja, estevia y micropartículas.

#### 24.4. Determinación de la evaluación sensorial

La tabla 16 muestra los resultados de la evaluación sensorial en la que se evaluaron los atributos de apariencia, olor y sabor de las galletas adicionadas con microcápsulas, extracto de naranja agria, extracto de estevia y extracto de naranja agria- estevia. Los datos de ANOVA mostraron que el atributo sensorial del olor fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ). Los resultados resaltaron que la puntuación máxima (hasta 4) se obtuvo con las galletas adicionadas con extracto de naranja agria. Con respecto al atributo del sabor, las galletas adicionadas con micropartículas fueron similares a las galletas adicionadas con extracto de naranja agria-estevia. Las galletas adicionadas con micropartículas fueron similares al control en cuanto al atributo de apariencia, mientras que las adicionadas con extracto de estevia obtuvieron la puntuación más baja. Este resultado se debió principalmente a su color verde nativo que no lo hace agradable al consumidor. Resultados similares fueron obtenidos

por Gongora et al. (2018) que mostraron que las galletas hechas con 100% de estevia se consideraron indiferentes en el sabor, la textura y los atributos de aceptación en general.

Tabla 16. Resultados del análisis sensorial de preferencia para galletas

	Apariencia	Olor	Sabor
Control	3.30 ± 1.34 <sup>a</sup>	2.75 ± 1.25 <sup>b</sup>	3.3 ± 1.13 <sup>a</sup>
Galletas adicionadas con micropartículas	3.20 ± 1.36 <sup>ab</sup>	2.65 ± 1.09 <sup>b</sup>	2.4 ± 1.31 <sup>b</sup>
Galletas adicionadas con extracto de naranja	2.85 ± 1.57 <sup>ab</sup>	4.05 ± 1.43 <sup>a</sup>	3.2 ± 1.58 <sup>ab</sup>
Galletas adicionadas con extracto de estevia	2.40 ± 1.54 <sup>c</sup>	1.65 ± 1.09 <sup>c</sup>	2.75 ± 1.62 <sup>ab</sup>
Galletas adicionadas con extracto de naranja-estevia	3.25 ± 1.21 <sup>ab</sup>	3.09 ± 0.64 <sup>a</sup>	3.45 ± 1.36 <sup>a</sup>

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa

## 25. CONCLUSIÓN

Las galletas elaboradas con harina de trigo y avena y adicionadas con micropartículas de polifenoles obtenidos de a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia mostraron buenas características fisicoquímicas y sensoriales.

La evaluación de las propiedades reológicas permitió conocer el comportamiento de las masas cuando se le adicionaron las micropartículas.

## 26. REFERENCIAS

- A.O.A.C.Official method 2001.11. Protein (crude) in animal feed, forage ( plant tissue), grain and oilseeds.
- Covarrubias- Cárdenas Ana., Martínez-Castillo, J.I. Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., García-Cruz U., Pacheco N. 2018a. Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of *Stevia rebaudiana* dry powder extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Agronomy*. 8, 170.
- Covarrubias- Cárdenas Ana., Patrón Vásquez J.A. Espinosa-Andrews H., Ayora-Talavera T., García-Cruz U., Pacheco N. 2018b. Antioxidant capacity and UPLC–PDA ESI–MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*. 55: 5106-5114.
- Caleja C., Barros L., Barreira J., Ciric, A. Socovik, M., Calhella, R., Beatriz, M., Oliveira, PP., Ferreria I. 2018. Suitability of lemon balm (*Melissa officinalis* L) extract rich in rosmarinic as a potential enhancer of functional properties in cupcakes. *Food Chemistry*. 250: 67-74.
- Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:627–650.
- Gongora Salazar, VE. Vasquez Encalada, S., Corona Cruz, A., Segura Campos, M. 2018. *Stevia rebaudiana*: A sweetener and potential bioactive ingredient in the development of functional cookies *Journal of Functional Foods*. 44. 183-190.
- Motta Romero, H., Santra D., Rose D., Zhang, Y. 2017. Dough rheological properties and texture of gluten free pasta based on proso Millet flour. *Journal of Cereal Science*. 74: 238-243.
- Martins, W.E., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O. 2017. Food Industry by products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science and Technology*. 67:106-128.
- Moreira, R., Chenlo, F., Torres, M.D.2013. Effect of chia (*Sativa hispánica* L) and hydrocolloids on the reology of gluten free doughs based on chestnut flour. *LWT-Food Science and Technology*. 50:160-166.
- NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
- NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos
- Norma oficial mexicana NOM-147-SSA1-1996, bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, semolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, semolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales
- Reshmi, SK., Sudha, ML., Shashirekha, MN. 2017. Strach Digestibility and predicted glycemic index in the bread fortified with pomelo (*Citrus máxima*) fruit segments. *Food Chemistry*. 237:957-965.
- Urzua, C., Gonzalez, E., Dueik, V., Bouchon P., Giménez B., Robert, P. 2017. Olive leaves extract encapsulated by spray drying in vaccum fried starch-gluten doughs. *Food and Bioproducts Processing*. 106: 171- 180



Vazquez-Flota, F., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-Gonzalez, M., Gutierrez-Carbajal, G., Velazquez-Garcia, C., & Nieto-Pelayo, Y., 2007. Biosynthesis of capsaicinoids, the pungent principle of peppers. *Rev. Fitotec. Mex.*, 30(4), pp.353–360.

## **27. CONCLUSIONES GENERALES**

El mayor TPC y actividad antioxidante se identificó en las cáscaras de naranja frescas extraídas con etanol acuoso al 50% y los extractos acuosos de cáscaras secas, respectivamente mediante el método de extracción asistida por ultrasonido.

Se identificaron y cuantificaron mediante UPLC-PDA nueve compuestos fenólicos en cáscaras de naranja agria de los cuales la naringina y neohesperidina fueron los mas predominantes.

Se observaron cambios fitoquímicos en el contenido de fenoles y actividad antioxidante durante la cinética de secado de las hojas de estevia. El mayor contenido de fenoles totales y actividad antioxidante se obtuvieron cuando se utilizó etanol al 50% a los 5 minutos de extracción.

Se identificaron y cuantificaron mediante UPLC-PDA y se confirmaron mediante espectrometría de masas ESI-MS seis compuestos fenólicos, incluidos cuatro ácidos fenólicos y dos flavonoides en el extracto de hojas obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido.

Las determinaciones de la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas mediante la purificación automatizada de los extractos de cáscara de naranja agria y hojas de estevia indicaron un efecto sinérgico potencial de todos los compuestos fenólicos identificados

La determinación de la concentración y relación de extractos de estevia y naranja en las formulaciones de las micropartículas causaron diferencias significativas en los porcentajes de encapsulación y liberación de los compuestos fenólicos.

La titulación potenciométrica permitió establecer las concentraciones para la formación de las soluciones de biopolímeros. Los resultados mostraron que la dispersión empleada de goma:fructano:quitosano se formó cuando los polímeros se mezclaron en una relación 2:1:1.

La caracterización de las micropartículas mediante espectroscopia de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos-X permitieron representar la interacción entre los agentes de pared y los compuestos fenólicos.

Las galletas elaboradas con harina de trigo y avena y adicionadas con micropartículas de polifenoles obtenidos de a partir de cáscaras de naranja agria y hojas de estevia mostraron buenas características fisicoquímicas y sensoriales

La evaluación de las propiedades reológicas permitió conocer el comportamiento de las masas cuando se le adicionaron las micropartículas

## **28. PERSPECTIVAS**

Debido a que los porcentajes de liberación de compuestos fenolicos de las microparticulas no alcanzaron el 50 %, una de las perspectivas es la mejora del proceso de liberación para alcanzar porcentajes mas altos al obtenido. Algunas de las opciones que podrian utilizarse como metodologia serian cineticas de liberacion donde se utilicen mecanismos empleando enzimas que participan en los procesos de digestion.

Respecto a la evaluación de la actividad antioxidante tanto de extractos sin encapsular como los encapsulados, se recomienda evaluar otros metodoss que permitan resolver alguna otra interacción entre compuestos.

En relación a los parámetros que se evaluaron de las galletas, se considera que realizar los parametros de textura aportaría información valiosa acerca de los atributos mecanicos y de superficie ademas que se consideran importantes en el control de calidad.

## **29. ANEXOS**

### **Congresos Nacionales**

Efecto del secado de hojas de estevia sobre la capacidad antioxidante y contenido de compuestos polifenólicos. VIII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste, 19-21 octubre, 2016. Mérida Yucatán.

Microencapsulación de una mezcla de compuestos antioxidantes de extractos de estevia (*Stevia rebaudiana*) y naranja agria (*Citrus aurantium*) en una matriz múltiple. XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, 1-4 de mayo, 2018. San José del Cabo, B.C.S.

### **Congresos Internacionales**

Polyphenol profile and biological activity from sour citrus peel flour (*Citrus aurantium*) to use as food additive. Latin Food 2016, 9-11 de noviembre, 2016. Cancún Q. Roo.

Evaluation of extraction conditions on the antioxidant activity of stevia extracts and its application as functional sweetener in bakery products, Reverse Engineering of Processed Foods. 25 septiembre- 4 de octubre, 2017. Campinas, S.P, Brasil.

### **Publicaciones**

Ana G. Covarrubias-Cárdenas, José Isabel Martínez-Castillo, Nelly Medina-Torres, Teresa Ayora-Talavera, Hugo Espinosa-Andrews, N. Ulises García-Cruz, Neith Pacheco. 2018. Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of *Stevia rebaudiana* Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Agronomy*. 8, 170.

Covarrubias-Cárdenas Ana, Patrón-Vázquez Jesús, Espinosa-Andrews Hugo, Ayora-Talavera Teresa, García-Cruz Ulises, Pacheco Neith. 2018. Antioxidant capacity and UPLC-PDA ESI-MS polyphenolic profile of *Citrus aurantium* extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*. 55: 5106-5114.