



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

TESIS:

Evaluación de extractos bioactivos de la harina de *Brosimum alicastrum* obtenidos mediante CO₂ supercrítico y extracción con solvente

PARA OPTAR AL GRADO DE:

Maestra en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología

PRESENTA:

Ing. María del Rosario Cohuo Huchin

ASESOR:

Dr. Víctor Manuel Moo Huchin

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

10 de febrero de 2020



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Mérida, Yucatán, X.446/19
25/noviembre/2019

ASUNTO: Solicitud de autorización de impresión.

Daniel Arcángel López Sauri
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación
PRESENTE

En virtud de que la **C. María del Rosario Cohuo Huchin**, ha culminado satisfactoriamente la tesis "**Evaluación de extractos bioactivos de la harina de *Brosimum alicastrum* obtenido mediante CO₂ supercrítico y extracción con solvente**", participando exitosamente en el Seminario de Investigación de la misma y cubierto los requisitos necesarios para optar al grado de "Maestro en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología" le solicitamos se le otorgue la autorización correspondiente para realizar la impresión de su trabajo final, el cual avala como un producto de calidad la Comisión Revisora conformada por los que a continuación firman.

| | |
|------------------------------|--------------------------------|
| DIRECTOR | REVISOR |
| Víctor Manuel Moo Huchin | Luis Antonio Chel Guerrero |
| REVISOR | REVISOR |
| Enrique Sauri Duch | Víctor Manuel Toledo López |

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica.

Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez
Coordinadora de la Maestría en Ciencias
de los Alimentos y Biotecnología
C.p. Archivo
DALS/fja



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION





EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.

No. DE OFICIO: X-453/19

Mérida, Yucatán, **11/noviembre/2019**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**C. MARÍA DEL ROSARIO COHUO HUCHIN
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE.**

De acuerdo al fallo emitido por su director **Víctor Manuel Moo Huchin** y la comisión revisora integrada por Luis Antonio Chel Guerrero, Enrique Sauri Duch y Víctor Manuel Toledo López, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BIOACTIVOS DE LA HARINA DE *Brosimum alicastrum*
OBTENIDO MEDIANTE CO2 SUPERCRÍTICO Y EXTRACCIÓN CON SOLVENTE"**

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica

**DANIEL ARCANGEL LÓPEZ SAURI
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MERIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALS/fja



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911

C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 12601 y 12602

e-mail: depi_merida@tecnm.mx <http://www.itmerida.mx>



DEDICATORIA

A Dios por darme salud y fortaleza para terminar este proyecto.

Con gran cariño y amor, a mis padres y hermanas, quienes a pesar de los momentos difíciles que hemos pasado me han brindado su apoyo incondicional y por estar a mi lado en esta etapa del posgrado.

¡Gracias por estar siempre!

AGRADECIMIENTOS

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del TecNM/ITMérida por permitirme ser alumna de su programa y al CONACYT por la beca otorgada.

Al Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química-Uady por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Víctor Moo por darme la oportunidad de trabajar este proyecto, quien siempre estuvo al pendiente de mí y la disposición que tuvo para enseñarme y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Enrique Sauri, por la disposición de su laboratorio y el apoyo que me ha brindado en este tiempo. Al Dr. Luis Chel, por el apoyo para la realización de este trabajo y por formar parte de este proyecto.

A mis grandes amigos Jade y Diego, por su cariño, consejos y apoyo incondicional.

A todos los del laboratorio de instrumentación analítica por los buenos momentos vividos, por la amistad y la confianza que me han brindado.

A todos ustedes. GRACIAS

RESUMEN

El Ramón (*Brosimum alicastrum*), es un árbol predominante en la península de Yucatán y la semilla del fruto se utilizó como fuente de alimento para la población nativa Maya. En la actualidad, la semilla del ramón ha despertado el interés de diversos investigadores por su contenido de antioxidantes; sin embargo, es muy poca la información disponible al respecto. La información sobre la caracterización de la harina de ramón aportaría información de su valor funcional para el desarrollo de alimentos funcionales. Para generar dicha información es importante disponer de un método de extracción para el análisis cuantitativo y cualitativo de los compuestos presentes en el extracto. En este sentido, el trabajo tuvo como objetivo caracterizar los extractos de harina de ramón (CO₂ supercrítico y convencional, E-SL) mediante su contenido de compuestos antioxidantes, su actividad bioactiva *in vitro* y perfiles cromatográficos. En este trabajo, se utilizó un método de extracción secuencial CO₂ supercrítico de dos etapas; una primera extracción (E-CO₂) sin cosolvente, para determinar el tiempo dinámico de extracción y una segunda usando cosolvente en el sistema de extracción (E-CO₂-CO); previo a la segunda extracción, se evaluó el efecto de varias proporciones de etanol acuoso (25%, 50%, 75%) y etanol absoluto sobre el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT). Las variables de respuestas analizadas para la caracterización del extracto E-CO₂-CO, fueron comparados con los resultados obtenidos del extracto E-SL.

En la primera etapa, se estableció un tiempo dinámico de 30 min para la obtención de un extracto de antioxidantes que fue caracterizado por HPLC (tocoferoles, carotenoides, escualeno y fitoesteroles). Se identificó al fucosterol como el compuesto mayoritario con 5,997.27 mg/100 g extracto seco, seguido del estigmasterol con 561.45 mg/100 g extracto seco. En la segunda etapa, el uso EtOH absoluto, como cosolvente mejoró el rendimiento de extracción del CFT (de 2 hasta 12 mg EAG/100 g de harina, 25% y etanol absoluto, respectivamente). El extracto crudo E-CO₂-CO mostró un alto contenido de flavonoides totales (2.97± 0.12 g quercetina/100 g extracto seco) y taninos hidrolizables con 1.72 ± 0.17 g ácido tánico/100g extracto seco. El mismo extracto presentó alta actividad antioxidante con ABTS⁺ (649.29±20.50 mM Etrolox/100 g extracto seco); también mostró mayor porcentaje de inhibición de actividades de enzimas digestivas, α-amilasa pancreática y α-

glucosidasa de origen bacteriano en comparación con el extracto E-SL. El contenido de ácidos fenólicos (gálico, clorogénico, vanílico, cafeico, trans-cinámico y sinápico) y flavonoides (catequina) individuales fue mayor en el extracto E-SL en comparación con el extracto E-CO₂-CO. Se observó la presencia de un pico (no identificado) más alto a un tiempo de retención de 43 min en el extracto CO₂ supercrítico. Probablemente, este compuesto (individual o en sinergia) no identificado en el extracto sea el responsable de la propiedad de inhibición de las enzimas. Los resultados alcanzados brindan información importante sobre la composición de compuestos bioactivos de los extractos de la semilla de ramón de la península de Yucatán para darle un valor agregado al producto como alternativa a las harinas convencionales para la elaboración de panes, galletas.

ABSTRACT

The Ramon (*Brosimum alicastrum*), is a predominant tree in the Yucatan Peninsula and the fruit seed was used as a food source for the Mayan native population. Currently, the Ramon seed has aroused the interest of many researchers for its antioxidants content; however, there isn't enough available information about it. The information on the characterization of the ramon flour would provide information on its functional value for the development of functional foods. To generate such information it is important to use an extraction method for the quantitative and qualitative analysis of the compounds in the extract. Therefore, the objective of this work was to characterize the Ramon flour extracts (Supercritical and conventional CO₂, E-SL) through its antioxidants compounds content, *in vitro* bioactive activity and chromatographic profiles. In this work, a two stages supercritical CO₂ sequential extraction method was used; a first extraction (E-CO₂) without cosolvent to determine the extraction dynamic time and a second using cosolvent in the extraction system (E-CO₂-CO); prior the second extraction, the effect of various proportions of aqueous ethanol (25 %, 50 %, 75 %) and absolute ethanol on the total phenolic compounds (TFC) content was evaluated. The analyzed response variables for the E-CO₂-CO extract characterization were compared with the obtained results from the E-SL extract.

In the first stage, a 30 minutes dynamic time was established to obtain an antioxidants extract that was characterized by HPLC (tocopherols, carotenoids, squalene, phytosterols). Fucosterol was identified as the major compound with 5,997.27 mg/100 g dry extract, followed by the stigmasterol with 561.45 mg/100 g dry extract. In the second stage, the use of absolute EtOH as a cosolvent improved the extraction yield of TFC (from 2 to 12 mg EAG/100 g of flour, 25 % and absolute ethanol, respectively). The E-CO₂-CO crude extract showed a high content of total flavonoids (2.97 ± 0.12 g quercetin/100 g dry extract) and hydrolyzable tannins with 1.72 ± 0.17 g tannic acid/100 g dry extract. This extract showed high antioxidant activity with ABTS⁺ (649.29 ± 20.50 mM trolox/100 g dry extract). It also showed a higher activities inhibition of digestive enzymes, pancreatic α -amylase and α -glucosidase of bacterial origin compared to the E-SL extract. The phenolic acids content (gallic, chlorogenic, vanillic, caffeic, trans-cinnamic, and sinapic) and individual flavonoids

(chatequin) was higher in the E-SL extract compared to the E-CO₂-CO extract. The presence of a higher peak (unidentified) at a retention time of 43 min in the supercritical CO₂ extract was observed. Probably, this compound (individual or in synergy) unidentified in the extract is the responsible of the enzymes inhibition property. The achieved results provide important information on the bioactive compounds composition of the Ramón seed extracts from the Yucatan península to give an added value to the product as an alternative to the conventional flours for the elaboration of breads, cookies.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| RESUMEN | vi |
| ABSTRAC | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xiii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiv |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1. Compuestos Bioactivos | 3 |
| 2.1.1. Principales compuestos bioactivos estudiados en los vegetales..... | 4 |
| a) Compuestos fenólicos..... | 4 |
| b) Carotenoides | 8 |
| c) Tocoferoles y tocotrienoles | 11 |
| d) Fitosteroles y escualeno..... | 12 |
| 2.2. Bioactividad de los compuestos de productos vegetales | 15 |
| 2.3. Métodos de extracción de compuestos bioactivos..... | 19 |
| 2.3.1. Extracción con fluido supercrítico | 21 |
| 2.3.1.1. Propiedades de la región supercrítica..... | 22 |
| 2.4. Árbol de <i>Brosimum alicastrum</i> | 25 |
| 2.4.1. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la harina <i>B. alicastrum</i> | 26 |
| 3. OBJETIVOS..... | 28 |
| Objetivo general..... | 28 |
| Objetivos específicos | 28 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Estrategia general de trabajo..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Obtención de la harina..... | 31 |
| 4.3. Procedimientos de extracción..... | 31 |
| 4.3.1. Extracción sólido-líquido..... | 32 |
| 4.3.2. Extracción secuencial con CO ₂ supercrítico..... | 32 |
| 4.4. Caracterización del extracto por su contenido de compuestos bioactivos, bioactividad <i>in vitro</i> y perfil cromatográfico..... | 35 |
| 4.4.1. Determinación de la actividad inhibitoria de α -amilasa pancreática de los extractos de <i>B. alicastrum</i> | 36 |
| 4.4.2. Determinación de la actividad inhibitoria α -glucosidasa de los extractos de <i>B. alicastrum</i> | 37 |
| 4.5. Análisis estadístico..... | 39 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 40 |
| 5.1. Primera extracción: Extracción con CO ₂ supercrítico (E-CO ₂)..... | 40 |
| 5.1.1. Evaluación del efecto del tiempo dinámico de extracción en el rendimiento de extracto | 40 |
| 5.1.2. Caracterización del extracto por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitoesteroles y escualeno por HPLC..... | 42 |
| 5.2. Segunda extracción: Obtención de compuestos fenólicos de la harina residual de la primera extracción con CO ₂ supercrítico usando etanol (E-CO ₂ -Co)..... | 44 |
| 5.2.1. Efecto del etanol en la extracción de compuestos fenólicos con CO ₂ supercrítico | 44 |
| 5.2.2. Caracterización del extracto de la harina por su contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. | 46 |
| 5.2.3. Actividad inhibitoria de extractos <i>Brosimum alicastrum</i> sobre las enzimas digestivas de carbohidratos α -amilasa y α -glucosidasa..... | 48 |
| 5.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales de extractos de la harina <i>Brosimum alicastrum</i> por HPLC..... | 51 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 6. CONCLUSIONES | 55 |
| 7. ANEXOS..... | 56 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Flavonoides más abundantes y su fuente vegetal | 6 |
| Tabla 2. Compuestos no-flavonoides más abundantes y su fuente vegetal..... | 6 |
| Tabla 3. Clasificación, estructura química y efectos de los carotenoides | 8 |
| Tabla 4. Extractos de semillas, hojas, cáscaras como fuente de compuestos bioactivos y su actividad biológica..... | 15 |
| Tabla 5. Propiedades críticas de algunos disolventes usados para la extracción CO ₂ supercrítico | 23 |
| Tabla 6. Compuestos con actividad biológica extraídos con CO ₂ supercrítico..... | 24 |
| Tabla 7. Ácidos fenólicos encontrados en harina de nuez Maya Nut..... | 27 |
| Tabla 8. Cantidad de reactivos utilizados para el ensayo inhibición de α -amilasa | 37 |
| Tabla 9. Cantidad de reactivos utilizados para el ensayo inhibición de α -glucosidasa | 39 |
| Tabla 10. Contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno de extractos de harina <i>Brosimum alicastrum</i> obtenido por E-CO ₂ | 42 |
| Tabla 11. Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados e hidrolizables y actividad antioxidante de los extractos <i>Brosimum alicastrum</i> obtenidos por E-CO ₂ -Co y E-SL. | 46 |
| Tabla 12. Compuestos fenólicos individuales de extractos de harina <i>Brosimum alicastrum</i> obtenidos por E-CO ₂ -Co y E-SL | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles. | 11 |
| Figura 2. Estructura química del colesterol y los principales fitosteroles. | 13 |
| Figura 3. Estructura química del escualeno. | 14 |
| Figura 4. Interacción química entre un antioxidante y un radical libre. | 17 |
| Figura 5. Diagrama de Fases del CO ₂ | 21 |
| Figura 6. Distribución de árboles de <i>B. alicastrum</i> en Centroamérica y México. | 26 |
| Figura 7. Estrategia general de trabajo. | 30 |
| Figura 8. Obtención de la harina. | 31 |
| Figura 9. Extracción sólido-líquido. | 32 |
| Figura 10. Extracción con CO ₂ supercrítico. | 35 |
| Figura 11. Comportamiento de los valores de rendimiento de extracto seco acumulado de harina en función del tiempo de extracción dinámica con CO ₂ supercrítico a 60° C y 40 MPa. Letras diferentes en cada intervalo de tiempo indican valores significativamente diferentes (P≤0.05). | 41 |
| Figura 12. Efecto del etanol en el Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT) en la extracción con CO ₂ supercrítico (E-CO ₂ -Co), a 40°C y 20MPa. | 45 |
| Figura 13. Porcentaje de inhibición in vitro de la actividad α -amilasa de las diferentes cantidades de acarbosa o compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g}/\text{ensayo}$) del extracto de <i>B. alicastrum</i> | 50 |
| Figura 14. Porcentaje de inhibición in vitro de la actividad α -glucosidasa de las diferentes cantidades de acarbosa o fenólicas ($\mu\text{g}/\text{ensayo}$) de extracto de <i>B. alicastrum</i> | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto harina de <i>B. alicastrum</i> obtenidos por E-SL. (1) a. gálico, (2) a. clorogénico, (3) catequina, (4) a. vanílico, (5) a. cafeico (6) sinápico, (7) a. trans-cinámico | 53 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto de harina de <i>B. alicastrum</i> obtenidos por E-CO ₂ -Co. (1) a. clorogénico, (2), a. vanílico, (3) a. Cafeico (4), sinápico, (5) a. trans-cinámico. | 54 |
| Figura 17. Curva de calibración de Contenido de Fenoles Totales. | 57 |
| Figura 18. Curva de calibración de flavonoides. | 58 |
| Figura 19. Curva de calibración de Taninos Condensados. | 59 |
| Figura 20. Curva de calibración de taninos hidrolizables. | 59 |
| Figura 21. Curva de calibración de DPPH. | 63 |
| Figura 22. Curva de calibración del ABTS. | 64 |
| Figura 23. Curva de calibración del Poder Reductor. | 65 |

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un interés en la búsqueda de nuevas materias primas de origen vegetal o subproductos agroindustriales (cáscaras, semillas, granos y frutos) como fuente de compuestos o ingredientes activos para ser usadas en el desarrollo de alimentos funcionales o como nutracéuticos, snacks o aperitivos funcionales (alimentos ligeros que además de calmar el hambre en un tiempo corto, influye favorablemente en el estado nutricional del consumidor) como las galletas de cereal, barras a base de maíz que son adicionadas o enriquecidas con nutrientes o extractos ricos de compuestos bioactivos y extractos estandarizados en tabletas, cuyo consumo ha logrado demostrar una mejora de la salud humana (Montemurro, Pontonio, y Rizzello, 2019).

Las investigaciones actuales demuestran que la mejora y conservación de la salud, está asociado a la ingesta de nutrientes y sustancias no esenciales como los compuestos bioactivos, que son capaces de modular ciertas funciones en el organismo, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades degenerativas conservando en buen estado la salud humana (El-akabawy y El-sherif, 2019). Entre los compuestos más estudiados se encuentran los compuestos fenólicos; los cuales han demostrado ser potentes antioxidante naturales, capaces de eliminar o estabilizar radicales libres, principal causa para la generación de enfermedades crónico-degenerativas (Zaidi et al., 2019). Varios estudios confirman que la función antioxidante de los compuestos fenólicos se lleva a cabo por diferentes mecanismos de acción como secuestradores de radicales libres, capacidad para la modulación de enzimas, quelación metálica, así como sus efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes (Belščak-Cvitanović et al., et al 2018; Rodrigo, Miranda, y Vergara, 2011).

El *Brosimum alicastrum* o ramón es un árbol predominante en la península de Yucatán, que desde tiempos ancestrales sus semillas fueron usadas como una alternativa al maíz para el consumo humano. En la actualidad son muy pocas las poblaciones nativas de Yucatán que lo utilizan como fuente de alimento; sin embargo, sólo existe información respecto al valor nutrimental de su harina, pero escasa información respecto al contenido de compuestos con propiedades útiles a la salud. Se ha informado que la semilla de ramón contienen vitaminas, minerales, proteínas, etc. (Carter, 2015). En un estudio se ha informado que las semillas

tostadas de ramón adquiridos al Maya Nut Institute contienen ácidos fenólicos que en alimentos funcionales ha demostrado tener efectos deseables, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades degenerativas Ozer, (2016). Por su parte, Moo-Huchin et al. (2019) también reportaron que las semillas de ramón muestran mayor contenido de ácido clorogénico y que fue capaz de retardar la oxidación de lípidos de carne de cerdo. Sin embargo, la información disponible no es suficiente para dar por hecho el conocimiento de su composición bioactiva.

Disponer de un método de extracción es importante para el aislamiento e identificación de compuestos fenólicos. Aunque las técnicas convencionales han sido muy utilizadas por su eficiencia, facilidad de preparación de extractos y una amplia aplicación; dichas técnicas implican el uso de disolventes como alcoholes, acetona, éter di-etílico y acetato de etilo que resultan ser tóxicos para el consumo; además de que los tiempos de extracción suelen ser muy prolongados con la posibilidad de perder compuestos de interés, durante la extracción (Prado et al., 2015). Por otra parte, cuando se utilizan técnicas no convencionales es posible obtener otros metabolitos de interés con posibles aplicaciones en varias áreas, tal es el caso del uso de la extracción con CO₂ supercrítico. La extracción con fluido CO₂ supercrítico proporciona características atractivas que superan muchas de las limitaciones de las extracciones convencionales (Azmir et al., 2013), siendo un método que permite recuperar extractos de mayor pureza, es selectivo a ciertos compuestos, permite el uso de solventes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y bajo costo relativo a la producción de metabolitos (Cadena-carrera et al., 2019). Por estas razones, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar los extractos de la harina de ramón obtenidos por extracción con CO₂ supercrítico y extracción sólido-líquido mediante el contenido de compuestos fenólicos, fitoesteroles, escualeno, carotenoides y tocoferoles; además de evaluar su bioactividad *in vitro* mediante la inhibición de enzimas digestivas de carbohidratos α -amilasa y α -glucosidasa, como la evaluación de su actividad antioxidante.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Compuestos Bioactivos

Los alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas, cereales integrales, frutos secos y legumbres) son parte importante de la dieta, ya que contienen nutrientes, sustancias indispensables para el buen desarrollo y funcionamiento de nuestro cuerpo. Además de los nutrientes, los alimentos contienen otras sustancias aunque no son considerados como esenciales, tienen efectos importantes en la salud humana (Martínez-Navarrete et al., 2008), capaces de modular ciertas funciones fisiológicas en el organismo humano o animal, provocando un efecto farmacológico o toxicológico (Paulsen, 2010). Estas sustancias químicas son conocidas como compuestos bioactivos o fitoquímicos, producidas como metabolitos secundarios en las plantas a través de diferentes vías, principalmente mediante la vía del ácido shikímico y malónico (Azmir et al., 2013), tienen la función de proteger a las plantas contra depredadores. Además, dichos metabolitos imparten astringencia, sabor, color y olor de las frutas (Espinosa-pardo, Martínez, y Martínez-correa, 2014).

Generalmente, los compuestos bioactivos se dividen en alcaloides, compuestos azufrados (Azmir et al., 2013; Martínez-Navarrete et al., 2008), terpenos como los carotenoides, abundantes en vegetales de color amarillento a rojo como los tomates, mangos, papayas, etc., y fitosteroles como el sitosterol, estigmasterol y campesterol, que se encuentran principalmente en aceites de origen vegetal, cereales y semillas secas (Lagarda, García-Llatas, y Farré, 2006), las nitrogenadas (como la solanina en patatas) y los compuestos fenólicos que se dividen en dos grupos: los flavonoides y no flavonoides que están presentes en alimentos como el té, uva, vino y frutos secos por mencionar algunas (González, Hernández, Cooper, Núñez, y Reyes, 2015). Se ha demostrado que los compuestos tienen diferentes propiedades tales como antiinflamatorias, antimalaria (Veggi et al., 2014), antimicrobianos, antibacterianos y antioxidantes (Xu et al., 2017), en la prevención de enfermedades crónicas, como ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Alvarez, Cabred, Ramirez, y Fanovich, 2019). Las evidencias sobre la correlación entre la dieta y mejora de la salud, ha favorecido el uso de los compuestos bioactivos como principio activo para el tratamiento de desórdenes en el organismo humano y como ingredientes para el diseño, desarrollo de alimentos funcionales y como sustituto de antioxidantes sintéticos

para la conservación de los alimentos. En este sentido, el interés en la investigación de compuestos derivados de plantas, ha suscitado un gran interés entre nutriólogos, fabricantes de alimentos y consumidores por su seguridad y potencial valor terapéutico (Castro-López et al., 2017).

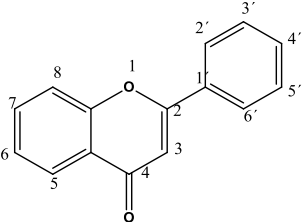
2.1.1. Principales compuestos bioactivos estudiados en los vegetales

a) Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos que en su estructura poseen un anillo aromático (fenol) unido a uno o más grupos hidroxilos (-OH) (Fig. 2), que engloban un amplio grupo con más de 8000 compuestos con diferentes estructuras, propiedades y actividad biológica (Azmir et al., 2013; Puga y Zubir, 2017). De acuerdo con la estructura química, se clasifican en flavonoides y no flavonoides, encontrándose en casi todos los alimentos de origen vegetal. De manera más específico, los flavonoides son compuestos fenólicos, que estructuralmente están compuestos por dos anillos de benceno (A y B), unidos por un anillo heterocíclico que contiene oxígeno (C). A su vez, estos compuestos se pueden dividir en varias subclases según la conexión entre los anillos B y C, la estructura del anillo B y las diferentes posiciones de los grupos (-OH) y glicosilación de los tres anillos (tabla 1) y los no flavonoides con una diversidad de compuestos fenólicos dentro de esta categoría (tabla 2) (Maleki, Crespo, y Cabanillas, 2019). Estas sustancias son las responsables de las características organolépticas (olor, sabor, color) de las materias vegetales. En los alimentos, los compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la oxidación lipídica y rancidez (Nipornram, Tochampa, Rattanatraiwong, y Singanusong, 2017), evitando la formación de sabores indeseables y pérdida de nutrientes esenciales. En el área de la salud, ha demostrado tener propiedades biológicas, tales como antimicrobiana, antiinflamatoria, antiviral, antialérgica (Silva, Rocha-Santos, y Duarte, 2016), también en la prevención de enfermedades como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (González-Aguilar et al., 2014); así como de su potencial antioxidante, mediante la eliminación de radicales libres generados por un desequilibrio de ciertas reacciones metabólicas del organismo, protegiendo a las células del daño causado por el estrés oxidativo (Puga y Zubir, 2017). En la actualidad, los extractos obtenidos de hojas, semillas, corteza de las plantas han

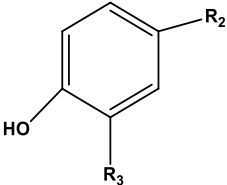
ganado popularidad en diversas áreas, debido a su seguridad y potencial terapéutico, lo que ha provocado un incremento en la demanda de alimentos funcionales y su uso para el tratamiento de enfermedades en todo el mundo. Recientemente, se aislaron flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, antocianinas y carotenoides de extractos de la planta *Crocus spp*, nativas del mediterráneo, demostrando su valor terapéutico como antiparasitario, inmunomodulador, antitumoral, antihipertensivo (Mykhailenko, Kovalyov, Goryacha, y Ivanauskas, 2019). Liu et al. (2018) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en kiwis verdes y rojos. De acuerdo con los resultados, los kiwis rojos mostraron mayor contenido de fenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante, siendo el ácido clorogénico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico los principales compuestos identificados. Por otro lado, Irakli, Chatzopoulou, y Ekateriniadou, (2018) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales de extractos obtenidos de hojas de olivo, en los cuales se encontró efectos significativos de actividad antioxidante, capaces de eliminar radicales libres. Shen et al. (2015) reportaron los resultados de sus estudios *in vivo* con animales sobre compuestos fenólicos extraídos en cebada negra, encontrando reducciones significativas en el colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad y el índice de arterosclerosis en comparación de animales control.

Tabla 1. Flavonoides más abundantes y su fuente vegetal

| <i>Grupos</i> | <i>Estructura básica</i> | <i>Sub- grupo</i> | <i>Más abundante</i> | <i>Fuente vegetales</i> |
|--------------------|---|----------------------|-------------------------|--|
| Flavonoides |  | Flavanonas | Eriodictiol | Limón (2.1 mg/1 00g), Jugo de limón (4.9 mg/ 100 ml) |
| | | | Naringenina | Toronja (21.3 mg/ 100g, Naranja (15.3 mg/100g) |
| | | Flavonas | Glicósidos de apigenina | Alcachofa (4.7 mg/100g) |
| | | | Glicósidos de luteolina | Pimiento (5.0 mg/100g), Uva morada (1.3 mg/ 100g) |
| | | Flavonoles | Quercetina | Cebollas (21.4 mg/ 100g) Espárragos (12.4 mg/ 100g) |
| | | | kaemferol | Col rizada (26.7 mg/ 100g) |
| | | | Miricetina | Perejil, y orégano (2-19.8 mg /100g) |
| | | Flavan-3-oles | Catequina | Cacao en polvo (19.7-127.7 mg/1 00 g) |
| | | | Epicatequina | Bayas y uvas moradas (0.5-6 mg/ 100 g) |
| | | Antocianidinas | Malvidina | Uva morada (34.7 mg/ 100g) |
| | | | Cianidina | Bayas (189.9 mg/1 00g) |
| | | | Delfinidina | Berenjena (13.8 mg/1 00g) |
| | | | Pelargonidina | Fresa (31.3 mg/ 100g) |
| Isoflavonas | Genisteína | Soya (64.8 mg/ 100g) | | |

Fuente: González-Aguilar et al. (2012)

Tabla 2. Compuestos no-flavonoides más abundantes y su fuente vegetal

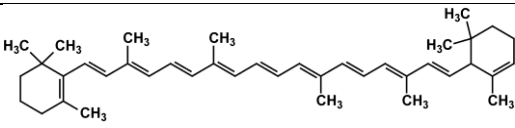
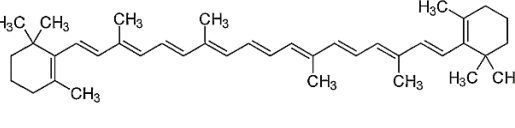
| Grupos | Estructura básica | Sub-grupo | Más abundante | Fuente vegetales |
|----------------|---|--|------------------|--|
| No flavonoides |  | Fenoles simples | Eugenol | Granos de café verde (0.0117 mg 4-vinilguayacol/ 100 g) |
| | | | Ácido ferúlico | |
| | | Ácidos fenólicos | Ácido elágico | Uvas (8.6 mg ácido gálico/100 g) |
| | | | Ácido gálico | Fresas (0.4- 2.9 mg ácido elágico /100g) |
| | | Taninos hidrolizables | Elagitaninos | Jugo de granada (156.1mg elagitaninos 100ml) Semilla frutas lorgan (156 mg galotaninos/100g) |
| | | | Galotaninos | |
| | | | Vanillina | |
| | | Ácidos hidroxicinámicos | p-cumárico | Papas en polvo (3.28-637 mg ácido clorogénico /100g) Grano de trigo (0.8-2.0 g ácido cafeico/ 100g) |
| | | | Ácido ferúlico | |
| | | | Ácido cafeico | |
| | | Cumarinas | Hidroxicumarinas | Aceite de la corteza de la canela 700 mg cumarinas/ 100 g |
| | | | Vainillina | |
| | | Xantonas | Mangiferina | Mangostán fruto asiático 8.7 mg mangostatina/ 100 g |
| Estilbenos | Resveratrol | Cacahuates (0.006 mg/ 100 g) y pistachos (0.007 mg/ 100 g) | | |
| | Piceido | | | |
| Chalconas | Dihidrochalconas | Tomates cherry (15.3 mg Chalconaringenina/ 100g) | | |
| | Chalconaringenina | | | |
| Lignanós | Secoisolariciresinol | Semillas de linaza 0.21-0.29 mg secoisolariciresinol/ 100g | | |
| Secoiridoides | Oleuropeína | Hojas de olivo (6000 mg Oleuropeína / 100 g) | | |

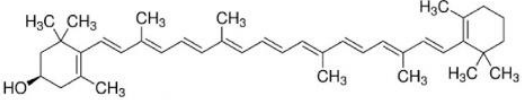
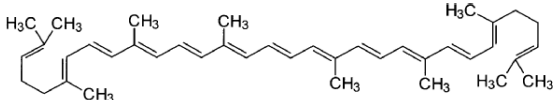
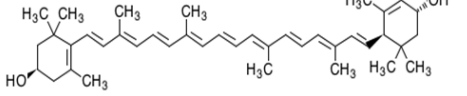
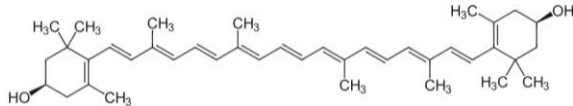
Fuente: González-Aguilar et al. (2012)

b) Carotenoides

Son pigmentos solubles en lípidos, responsables de la coloración amarillo, naranja y rojo de muchos alimentos de origen vegetal con poca presencia en alimentos de origen animal (Ngamwonglumlert, Devahastin, y Food, 2018). Químicamente son considerados como cloroplastos degenerados debido a la desorganización de su estructura, dando como resultado la formación de cromoplastos, sitio principal donde ocurre el proceso de la biosíntesis de estos compuestos (Martínez, Vicario, y Heredia, 2015). En cuanto a su clasificación, pertenecen al grupo de los isoprenoides, su estructura básica se compone de una cadena de polieno de 40 carbonos con grupos cíclicos (Jie Zhang, Zheng Sun, Peipei Sun, 2014). Su estructura química les da la característica de poder absorber luz, gracias a la presencia de los dobles enlaces conjugados, siendo cromóforos capaces de absorber luz ya que posee siete o más dobles enlaces conjugados (González-Aguilar et al., 2014). De acuerdo con varios estudios se ha logrado aislar 600-700 tipos de carotenoides, dividiéndose en dos grupos: los carotenos (hidrocarburos que no contienen oxígeno) como el α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, precursores de la vitamina A y licopeno, y las xantofilas (poseen una molécula de oxígeno en su estructura) como la luteína y zeaxantina (Tabla 3) (Ngamwonglumlert et al., 2018; Saini y Keum, 2018).

Tabla 3. Clasificación, estructura química y efectos de los carotenoides

| Carotenoides | Ejemplos | Estructura química | Efectos favorables | Alimentos |
|--------------|--------------------|--|---|--|
| Carotenos | α -caroteno |  | Disminuye riesgo de cáncer, y enfermedades cardiovasculares, mejora la respuesta del sistema inmune | Vegetales de color naranja, amarillo (zanahoria, pimiento, calabaza) |
| | β -caroteno |  | | |

| | | | | |
|-------------------|------------------------|--|--|--|
| | β -Criptoxantina |  | | |
| | Licopeno |  | Disminuye riesgo a cierto tipo de cáncer, tracto intestinal, mama, diabetes, etc. | Tomate, sandías duraznos, chabacanos. |
| Xantofilas | Luteína |  | Disminuye la degeneración macular, el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. | Vegetales de hoja verde oscura, col rizada, espinaca maíz, yemas de huevo, tomate. |
| | Zeaxantina |  | | |

Fuente: Eggersdorfer y Wyss, 2018; Khalid et al., 2018; Rodriguez-Concepcion et al., 2018; Saini y Keum, 2018.

Recientemente, se ha usado extractos de plantas como fuente de carotenoides, en la salud humana se ha logrado demostrar que presentan varias funciones, ayudando a prevenir de cáncer de próstata, enfermedades de la vista (cataratas y degeneración macular) y cardiovasculares; estos beneficios están relacionados con su actividad antioxidante (Chiu, Shen, Venkatakrishnan, y Wang, 2018; Eggersdorfer y Wyss, 2018; Khalid, Bilal, Iqbal, y Huang, 2018). En un estudio reciente de El-akabawy y El-sherif, (2019), se evaluó el efecto de la zeaxantina (ZE) sobre la colitis ulcerosa (inflamación intestinal), enfermedad caracterizada por la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo. El ensayo se realizó por inducción de ácido acético (AA) en ratas, previo a ésta, se administró por vía oral ZE (50 mg/kg) y un control positivo de prednisolona (5mg/kg), durante 14 días. En el día 15, se administró vía transrectal 3% de AA en solución salina. Después de 24 horas las ratas fueron sacrificadas y se examinaron los tejidos del colon. Los resultados indicaron que el tratamiento con ZE redujo significativamente el índice de actividad de la enfermedad mediante los efectos antioxidantes y modulación de la citoquina proinflamatoria. Se concluyó que es posible usar la zeaxantina como un agente terapéutico

para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Por otro lado, Chen, Huang, y Chen, (2019) reportan los efectos positivos del licopeno extraído de tomates, papayas y sandías, en trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC), la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, epilepsia, depresión, isquemia cerebral. La administración del licopeno muestra efectos neuroprotectores, mediante varios mecanismos como la inhibición del estrés oxidativo y la neuroinflamación, la inhibición de la apoptosis neuronal. Además, el licopeno puede prevenir las neuro-toxicidades inducidas por el glutamato monosódico (MSG). También, se ha evaluado el efecto favorable de la Astaxantina como un potente ceto-carotenoide, para las enfermedades periféricas y centrales. Entre las actividades biológicas más estudiadas se encuentran las antiinflamatorias, antiapoptosis, antioxidante, anticáncer, antiobesidad, actividad cardioprotector y antidiabéticas (Fakhri, Abbaszadeh, Dargahi, y Jorjani, 2018). Por lo anterior, la búsqueda de nuevos y eficientes antioxidantes al parecer va dirigida a los carotenoides, que a través de su consumo podría disminuir la incidencia de ciertas enfermedades.

c) Tocoferoles y tocotrienoles

Los tocoles, son compuestos de naturaleza lipídica con actividad biológica que se agrupan como vitamina E. En este grupo se incluyen a los α , β , γ , y δ - tocoferoles, como también α , β , γ , y δ - tocotrienoles, que difieren en su estructura química en el número y posición del grupo metilo (-CH₃) del anillo cromanol. De acuerdo con su enlace químico, los tocoferoles tienen enlaces saturados en la cadena lineal, mientras que los tocotrienoles poseen enlaces insaturados (Figura 1).

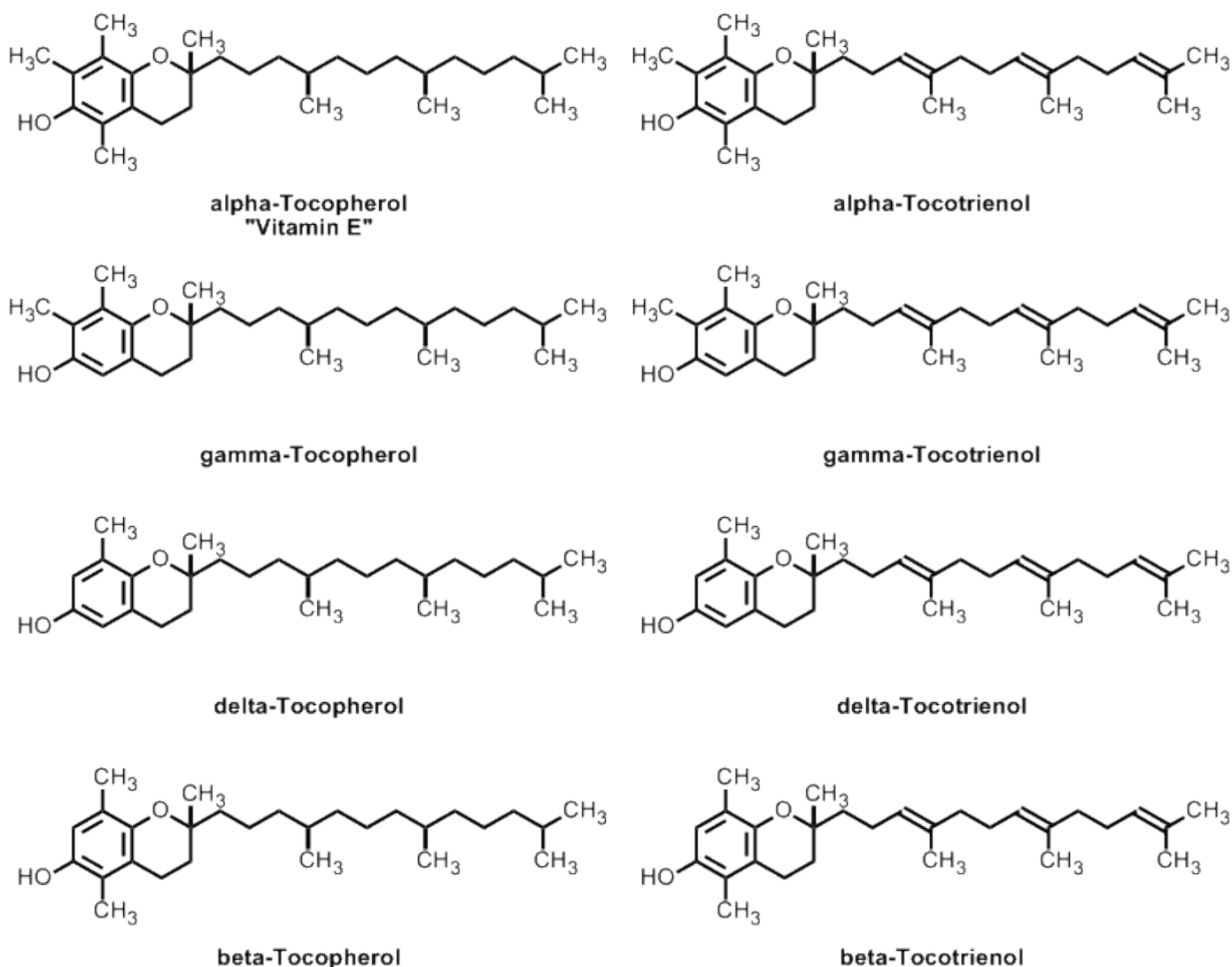


Figure 1. Estructura química de los tocoferoles y tocotrienoles.

Las propiedades antioxidantes de los tocoferoles se determinan por la capacidad de donar hidrogeno y facilidad de disociar el enlace del grupo metilo en las dos posiciones orto, en este caso el α -tocoferol, es el principal antioxidante del grupo de tocoferoles. En contraste, se dice que las cadenas insaturadas de los tocotrienoles permiten un mayor acceso a regiones internas eliminando desechos, contribuyendo a su capacidad antioxidante. También se ha encontrado que estos compuestos actúan sinérgicamente con otros tocoferoles, compuestos fenólicos, esteroides; confirmándose que los tocotrienoles tienen mayor actividad antioxidante que los tocoferoles solos. También se ha hallado que los grupos metilos incrementan su actividad antioxidante, mientras que los dobles enlaces de los tocotrienoles disminuyen su biodisponibilidad. En los alimentos con mayor contenido de tocoferoles se encuentran el aceite de maíz, soya y oliva, almendras, nueces, cacahuates algodón, girasol, granos, y en el tejido adiposo de los animales (González-Aguilar et al., 2014). De manera general, las propiedades más estudiadas de los tocoles son: antiinflamatoria, prevención de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, prevención de la oxidación del colesterol LDL en plasma (antioxidante), reducción de enfermedades cardiovasculares, Alzheimer (Azzi, 2018; Saini y Keum, 2016).

d) Fitosteroles y escualeno

Los fitosteroles, son compuestos bioactivos que se encuentran en pequeñas cantidades en alimentos de origen vegetal y que el organismo humano absorbe escasamente, reduciendo los niveles de colesterol en la sangre. Los fitosteroles son conocidos como el colesterol de las plantas, ya que su estructura química es muy similar al colesterol de origen animal, pero difiere en el C-24 de la cadena lateral, en la posición de los dobles enlaces y en la rotación óptica de los carbonos quirales (figura 2).

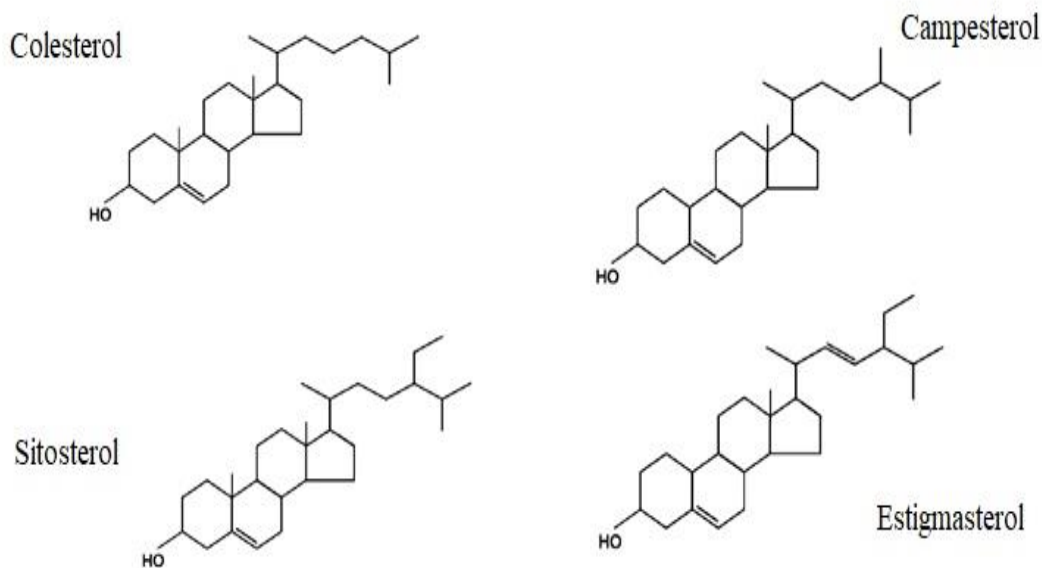


Figura 2. Estructura química del colesterol y los principales fitosteroles.

Su principal función es estabilizar la doble capa de fosfolípido de la membrana celular de los vegetales. En el reino vegetal, se conocen más de 200 diferentes tipos, de los cuales los más abundantes son el β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Mouritsen et al., 2017; Wang et al., 2019). Se ha informado que una ingesta diaria de 2-3 g de fitosteroles, es capaz de disminuir de un 10 a 15% la absorción del colesterol LDL de la dieta y el endógeno de las células intestinales evitando riesgos de padecer enfermedades cardíacas (Bot, Unilever, y Vlaardingen, 2018; Ras y Trautwein, 2017; Wang et al., 2019). De acuerdo, a la literatura consultada el mecanismo exacto de la reducción del colesterol, no se ha comprendido en su totalidad. Sin embargo, el que se acepta comúnmente ocurre mediante un efecto de competencia entre el colesterol y los esteroides vegetales por un lugar en las micelas intestinales. El colesterol solo es ligeramente soluble en estas micelas y poco absorbidos en el intestino, lo que conduce a una disminución general de los niveles de colesterol en la sangre y un aumento efectivo en la excreción fecal de colesterol (Bot et al., 2018; Ras y Trautwein, 2017). Además de lo anterior, poseen efectos anticancerígeno, antiinflamatorio, antibacterial, antitumoral y efectos antioxidantes (Unilever, y Vlaardingen, 2018; Wang et al., 2019). Se ha demostrado que estas propiedades no solo se presentan en fitoesteroides

obtenidos en plantas; también ha sido observado en fitoesteroles extraídos de algas marinas, principalmente el fucosterol de las algas pardas (Mouritsen et al., 2017). Entre los alimentos de origen vegetal con mayor contenido de fitosteroles son los aceites, frutos secos, semillas, legumbres y cereales enteros. Por ejemplo, las semillas de sésamo con 714 mg/ 100 g, semillas de girasol (514 mg/ 100 g), pistachos (214 mg/ 100g), nueces de macadamia (116 mg/ 100 g), lentejas (57 mg/ 100g) (Merino et al., 2014). Sin embargo, el aporte de fitosteroles mediante esta fuente muchas veces no alcanza para lograr los efectos deseados contra el colesterol. Por eso, en la actualidad existen alimentos enriquecidos con fitosteroles como en grasas para untar, yogures y leche, especialmente en países europeos (Herchi et al., 2009; Ras y Trautwein, 2017).

Otro de los componentes lipídicos importantes es el escualeno, que es un hidrocarburo poliinsaturado ($C_{30}H_{50}$) de la familia de los triterpenoides que consta de seis enlaces dobles aislado (figura 3), encontrado en las plantas y tejidos de animales donde juegan un papel como precursor para la biosíntesis del fitosterol y colesterol, respectivamente (Rosales-garcía et al., 2017); así como en la síntesis de esteroides, las hormonas y la vitamina D y E en el cuerpo humano (Hataminia, Farhadian, Karimi, y Ebrahimi, 2018).

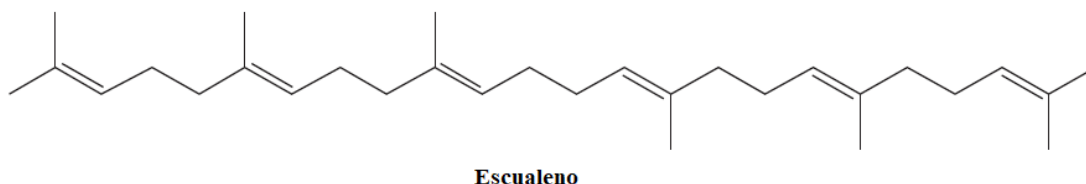


Figura 3. Estructura química del escualeno.

El escualeno fue extraído por primera vez, en aceite de hígado de tiburón también es posible encontrarlo en otras fuentes, como el germen de trigo, salvado de arroz, aceitunas (Reddy y Couvreur, 2009), semillas oleaginosas, aceite de oliva, (Rosales-García et al., 2017), aceite de amaranto y algas (Budge y Barry, 2019). En algunas investigaciones, se ha logrado demostrar el efecto terapéutico como antioxidantes, antitumoral, anticancerígeno, en contra de infecciones bacterianas y fúngicas (Xiao et al., 2016), también se ha utilizado para tratar

enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas y trastornos neurodegenerativos (Rameshkumar et al., 2018). Además, la emulsión que contiene el escualeno se usa generalmente para administrar medicamentos actuando como adyuvantes en las vacunas (Hataminia et al., 2018).

2.2. Bioactividad de los compuestos de productos vegetales

En décadas pasadas, la sociedad ha estado buscando un estilo de vida saludable, basado en el consumo de alimentos funcionales y extractos naturales para el tratamiento y/o prevención de ciertas enfermedades. Lo que ha llevado a varios sectores, como en la industria de los alimentos, investigadores y profesionales de la salud, a la búsqueda de nuevas alternativas de obtención de compuestos bioactivos, con efectos favorables en el organismo, aumentando la esperanza de vida del mundo actual. En este sentido, en los últimos años se ha incrementado los reportes de la actividad de compuestos bioactivos cuya fuente natural son las semillas, hojas, cáscaras de diferentes plantas, entre las más estudiadas son su actividad antioxidante, la capacidad que tienen para inhibir actividades enzimáticas y las relacionadas con la obesidad y diabetes (Tabla 4). La evaluación *in vitro* de la bioactividad de los productos vegetales es necesaria porque permite seleccionar extractos con un alto potencial terapéutico, como alternativa para el tratamiento de enfermedades (Vadivelan, Gopala Krishnan, y Kannan, 2019).

Tabla 4. Extractos de semillas, hojas, cáscaras como fuente de compuestos bioactivos y su actividad biológica

| Extracto vegetal | Actividad biológica estudiada | Referencia |
|------------------------------|---|---|
| Semilla de chía | Antioxidante | (Alcântara et al., 2019) |
| Semilla de uva | Antioxidante y quelante | (Kadri et al., 2019) |
| Manzana (fruta completa) | Antidiabética | (Li et al., 2019) |
| Hojas de espárrago racemosus | Antioxidantes, acción anticolinesterasa, antiinflamatorias y antidiabéticos | (Vadivelan, Gopala Krishnan, y Kannan, 2019) |
| Cáscara de banano | Antioxidantes y antimicrobianas | (Vu, Scarlett, y Vuong, 2018) |
| Hojas de rábano | Capacidad antioxidante y citotoxicidad. | (Goyeneche, Fanovich, Rodriguez Rodrigues, Nicolao, y Di Scala, 2018) |

| | | |
|--|--|--|
| Cáscaras de cítricos | Anticancerígena | (Nair y Baby, 2017) |
| Semilla de guaraná | Antimicrobiana, antigenotóxica, antidepresiva y anti amnésica. | (Larisa et al., 2016) |
| Semillas de <i>Momordica dioica</i> | Antioxidante, inhibición de α -amilasa (enzima digestiva) | (Rao, Mohan, y Srinivas, 2016) |
| Semilla de <i>Sweitenia mahagoni</i> | Inhibición de α -glucosidasa (enzima digestiva) | (Wresdiyati, Diah, Winarto, y Febriyani, 2015) |
| Hojas de Té (<i>Camellia sinensis</i> L.) | Antidiabética | (Kong, Wu, Sun, Wang, y Xu, 2014) |
| Hojas de plantas de malasia | Antidiabética y antihipertensiva | (Hadira, 2011) |

a) Antioxidante

En los últimos años, ha crecido exponencialmente la demanda de antioxidantes de extractos naturales, debido al grado de toxicidad que puede llegar a presentar la utilización y consumo prolongado de antioxidantes sintéticos. Un antioxidante es aquel compuesto, que a bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, tiene la capacidad de retardar su oxidación (Granato, 2018), la actividad de un compuesto bioactivo está dada al grado de hidroxilación de los anillos aromáticos y de la posición de los grupos hidroxilo(-OH) (González-Aguilar et al., 2014).

Los antioxidantes en el cuerpo humano actúan como un sistema de defensa ante un daño celular causado por el estrés oxidativo generado de la producción de radicales libres (agentes químicos que tienen un par de electrones desapareados o moléculas inestables) y otros agentes oxidantes. Una de las formas básicas para estabilizar a un radical libres es por la transferencia de un átomo de hidrogeno por parte del antioxidante, desde su grupo hidroxilo (figura 4). Los radicales libres en exceso pueden causar lesiones en los lípidos, proteínas de la membrana celular y el ADN generando graves daños y dando lugar a enfermedades como el cáncer, aterosclerosis, envejecimiento, diabetes, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer (Shen et al., 2015). El organismo del cuerpo humano posee su propio sistema de defensa conformado por enzimas, como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como vitamina C, vitamina E, flavonas y caroteno (Altaf, Sajjad, y Khan, 2019). Hoy en día, se han estudiado que los

principales compuestos a los que se le atribuye la capacidad de secuestrar los radicales libres, son los compuestos fenólicos, carotenoides (Veggi et al., 2014), ácido ascórbico y tocoferoles (Ferrentino et al., 2018). En este sentido, los productos y subproductos de origen vegetal pueden ser considerados como una importante fuente para la obtención de extractos ricos en compuestos con actividad antioxidante.

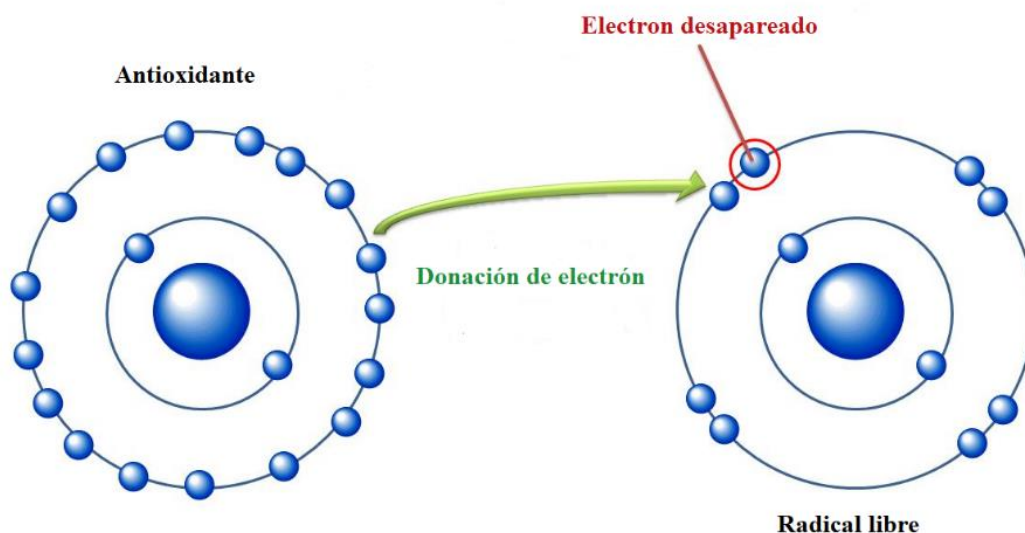


Figura 4. Interacción química entre un antioxidante y un radical libre.

b) Anti hiperglucemiantes

La Diabetes mellitus (DM) es el resultado del conjunto de patologías fisiológicas y bioquímicas, que generan una mala producción o función de la insulina producida en las células β -pancreáticas, caracterizada por el alto nivel de glucosa en la sangre. Comúnmente, existen dos principales tipos de diabetes DM, la diabetes tipo 1 (insulinodependiente) que se caracteriza por una producción insuficiente de insulina, se presenta en la edad temprana principalmente en niños y adolescentes. La DM tipo 2 normalmente se presenta en la edad adulta, cuando el cuerpo no es capaz de utilizar con eficacia la insulina (resistencia a la insulina), lo que conduce a la hiperglucemia (Seetaloo et al., 2019; Spínola, Llorent-Martínez, y Castilho, 2019).

En el año 2017 se estimó que alrededor de 425 millones de personas de 20 a 79 años, en todo el mundo fueron diagnosticadas con diabetes tipo 2, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las muertes causadas por la diabetes tienen lugar antes de los 70 años. Por lo que lamentablemente se espera que sea la séptima causa de mortalidad en 2030 (OMS, 2018; Tong et al., 2014). Por ello, la diabetes es considerada uno de los principales problemas de salud pública más grave que prevalece en todas las poblaciones alrededor del mundo, lo que ha generado una enorme preocupación a científicos, personal de la salud pública, para hacer frente a este gran desafío que ha generado y seguirá generando consecuencias económicas y muertes en todo el mundo.

Para hacer frente a este enorme problema, se han creado estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes con este padecimiento (Tong et al., 2014). Las estrategias se basan principalmente en la estimulación de la secreción de insulina, inhibición de los transportadores de glucosa (Li et al., 2019) y la más empleada actualmente es la disminución del metabolismo de los carbohidratos (inhibición de las actividades de la enzima α -la amilasa y α -glucosidasa) (Bose et al., 2019). El metabolismo de los carbohidratos comienza en la boca, donde la enzima salival se encarga de descomponer el almidón complejo y luego la digestión continúa en el estómago, mediante la α -amilasa pancreática presente en el estómago, el almidón se degrada en disacáridos y oligosacáridos. Al llegar al intestino delgado la enzima α -glucosidasa que se encuentra en el epitelio del intestino se encarga de romper los enlaces de los disacáridos y oligosacáridos en carbohidratos más simples como la glucosa y la fructosa para después ser absorbidos, elevando el nivel de azúcar en el torrente sanguíneo (Mohamed et al., 2012). Se han utilizado varios medicamentos para controlar la absorción de los carbohidratos. Por ejemplo, la sulfonilurea y la biguanida se usan para controlar el nivel de glucosa postprandial en la sangre, y la metformina se usa para estimular la secreción de insulina (Li et al., 2019). Así como también el uso de la acarbosa, voglibosa y miglitol. Sin embargo, se han reportado que el uso prolongado de estos medicamentos, trae consigo efectos adversos como flatulencia, diarrea, dolor abdominal, náuseas (Li et al., 2019; Spínola et al., 2019; Zaidi et al., 2019). Ante los efectos secundarios que se han presentado, se han buscado nuevas y mejores alternativas basadas en extractos de frutas, semillas, cortezas y hojas como fuente de compuestos biológicamente activos, que han demostrado tener efectos favorables y significativos para el tratamiento de enfermedades

comunes y crónicas. Por ejemplo, los ácidos fenólicos en fresas y manzanas podrían disminuir la captación de glucosa. La procianidina, extraída de la semilla de uva podría activar el receptor de insulina y mejorar la vía de señalización de la insulina (Li et al., 2019; Zaharudin, Staerk, y Dragsted, 2019). Los flavonoides y polifenoles obtenidos en extractos de hojas de Yacón (planta de origen andino), mostraron inhibición en las actividades de la enzima α -amilasa (Mendoza, 2015). Por otro lado, Dekdouk et al.(2015) reportó las actividades inhibitorias de los extractos de frutas *Olea europaea* L. (frutas italianas y argelinas) sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa. Lo anterior ha generado conciencia a la población en general, aumentando la demanda de productos naturales para el tratamiento de cualquier padecimiento debido a su bajo costo y relativa seguridad, incluida una baja incidencia de efectos secundarios gastrointestinales graves.

2.3. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

La recuperación de compuestos bioactivos en vegetales se ha convertido en un tema de interés debido a la demanda que ha surgido de las investigaciones y reportes de los beneficios que aporta el integrar en la dieta productos que contengan sustancias bioactivas. El aumento de la demanda de antioxidantes en el mercado internacional no solo implica la búsqueda de nuevas fuentes de bioactivos; además se espera mejorar los métodos de extracción, garantizando la seguridad para su consumo y su actividad biológica. El método de extracción es el paso más importante del proceso analítico que permite caracterizar cualitativo y cuantitativamente los compuestos bioactivos de una matriz vegetal y su actividad biológica.

La extracción, es el proceso de separación de uno o más componentes que consiste en una transferencia de masa o difusión donde los compuestos presentes en la matriz compleja se transfieren al solvente usado para la extracción (Maleti, 2019; Panja, 2017). Este proceso es el primer paso para el estudio o análisis de cualquier compuesto bioactivo (Maleti, 2019; Pimentel-moral, Borrás-linares, y Lozano-Sánchez, 2018); elegir un método extracción adecuado podría ser una tarea difícil debido a la complejidad de la matriz. Varias de las técnicas permanecen casi igual a través de cientos de años; otras han sido modificadas de acuerdo a las necesidades o la finalidad de extraer compuestos. De acuerdo con Azmir et al. (2013) algunos de los objetivos comunes que presentan los métodos de extracción son:

- a) Extraer compuestos bioactivos de una muestra vegetal compleja.
- b) Aumentar la selectividad de los métodos analíticos.
- c) Aumentar la sensibilidad del bioensayo aumentando la concentración de compuestos de interés.
- d) Convertir los compuestos bioactivos en una forma más adecuada para la detección y separación.
- e) Proporcionar un método con buena eficiencia y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz de la muestra.

Por lo que un método de extracción ideal debe ser rápido, seguro, no destructivo, menos costoso y que ahorra tiempo (Moreira, Alexandre, Pintado, Saraiva, 2019). Los métodos de extracción se dividen en dos tipos, convencionales o tradicionales y no convencionales (emergentes, alternativos o métodos de extracción verdes). Los métodos de extracción tradicionales son fáciles de operar debido a que no utilizan grandes equipos. Sin embargo, implican el uso de grandes volúmenes de solventes, temperaturas elevadas y requieren tiempos prolongados de extracción. Por el ejemplo, la extracción con Soxhlet, maceración e hidrodestilación (Sharayei, Azarpazhooh, Zomorodi, y Ramaswamy, 2018). Ante las grandes limitaciones que han presentado los métodos de extracción tradicionales se han buscado alternativas que permitan descubrir o diseñar procesos de extracción con requerimiento mínimo de energía, minimizar el tiempo de operación, mejorar el rendimiento del proceso evitando la degradación térmica de los compuestos de interés (Goyeneche et al., 2018), utilizando solventes alternativos no peligrosos garantizar la obtención de extractos seguros y de alta calidad (da Silva et al., 2016). Entre las técnicas prometedoras se encuentran la extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por enzimas, extracción por pulsos eléctricos y extracción con fluido supercrítico (Saini y Keum, 2018). La extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una alternativa que ha logrado mejorar procesos de extracción, lo cual permite la utilización de energía de microondas (campo magnético con una frecuencia que varía de 300 MHz a 3000 MHz). La energía de microonda impacta directamente sobre los materiales, lo que causa movimientos entre las moléculas lo que genera calor mediante la conversión de la energía electromagnética en energía térmica (Azmir et al., 2013; Pimentel-moral et al., 2018). El calentamiento es generado por la conducción iónica de los aniones disueltos y la

rotación dipolar del disolvente, lo que conduce a la ruptura de la matriz celular, liberando los compuestos en el disolvente (Yuan et al., 2017). Otra de las técnicas más empleadas actualmente es la extracción con fluidos supercríticos, que ha demostrado ser un método capaz de brindar mayor rendimiento de extracción; además, de que el extracto obtenido es libre de residuos de solventes tóxico (Soto-Armenta et al., 2019).

2.3.1. Extracción con fluido supercrítico

El fluido supercrítico (FSC) fue usado por primera vez, en la industria para en el descafeinado de café y té, extracción de sabores amargos del lúpulo, etc. (Petrovič Slobodan et al., 2013). También se han empleado como una alternativa para la eliminación de pesticidas en el área agroindustrial, para la extracción de aceites vegetales y obtención de una gran variedad de compuestos bioactivos. Un FSC es cualquier sustancia que se encuentran por encima de sus valores de temperatura-presión crítica, que tiene la propiedad de comportarse como un gas, difundiéndose dentro de la matriz vegetal y como un líquido, disolviendo sustancias (figura 5) (Espinosa-pardo et al., 2014b; Martinez, y Martinez-correa, 2014a).

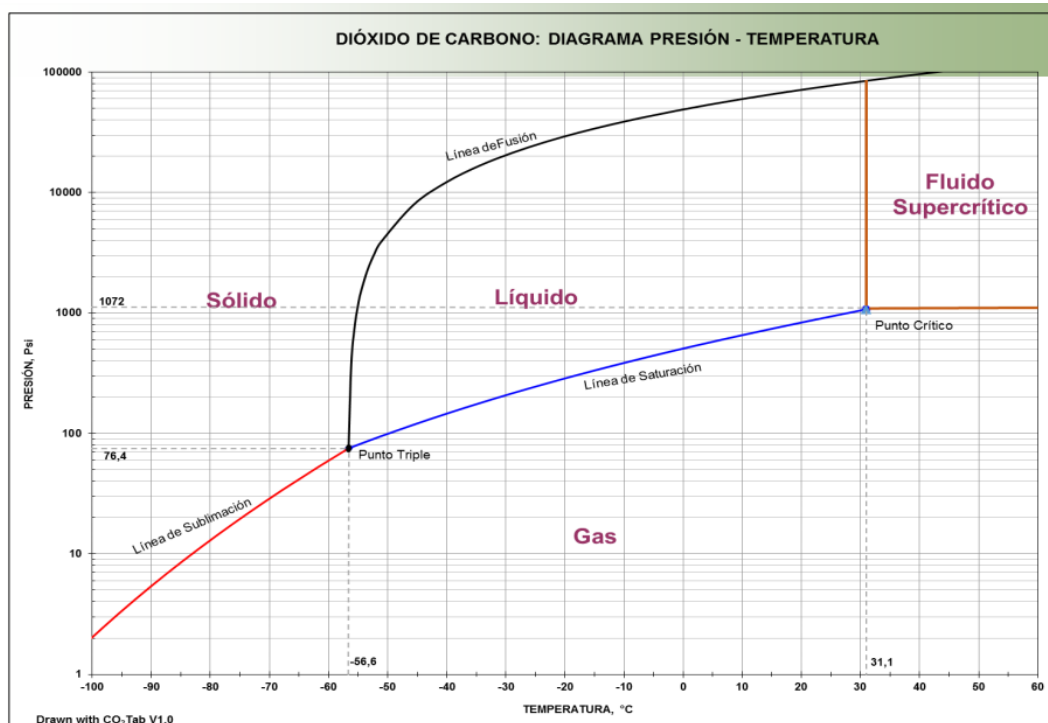


Figura 5. Diagrama de Fases del CO₂.

Azmir et al. (2013), en sus reportes sobre la discusión de los métodos de extracción (clásicos y emergentes) mencionan varias ventajas del uso de FSC en la extracción de compuestos bioactivos en productos naturales; (1) el fluido supercrítico tiene un mayor coeficiente de difusión y una viscosidad más baja que un disolvente líquido, lo que lleva a una mayor penetración a la matriz de la muestra y transferencia de masa favorable. (2) la selectividad del fluido supercrítico es más alta que la del solvente líquido, ya que su poder de solvatación se puede ajustar cambiando la temperatura y/o la presión. (3) es un método ideal para la extracción de compuestos termolábiles. (5) el FSC puede dar mayor rendimiento de extracto, utilizando pequeñas cantidades de disolvente en el sistema de extracción, con la facilidad de eliminar los residuos del disolvente mediante la despresurización, obteniendo mayor calidad de extracto final.

2.3.1.1. Propiedades de la región supercrítica

1. La densidad por encima del punto crítico depende de la presión y la temperatura. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante o si disminuye la temperatura a presión constante.
2. La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas favorables.
3. Poseen una baja tensión superficial lo que permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos.
4. La difusividad es alta en los líquidos, por lo que la transferencia de materia es más favorable.

Existen varias sustancias que pueden ser usadas en su estado supercrítico para la obtención de compuestos de interés. En la Tabla 5 se presentan las propiedades críticas y densidades de algunas sustancias usadas en la extracción con FSC.

Tabla 5. Propiedades críticas de algunos disolventes usados para la extracción CO₂ supercrítico

| Disolvente | Propiedad crítica | | |
|------------------------|---------------------|------------------|--------------------|
| | Temperatura (°C) | Presión (bar) | Densidad (g/ml) |
| Eteno | 10.1 | 50.5 | 0.2 |
| Agua | 374.2 | 214.8 | 0.322 |
| Metanol | 239 | 78.9 | 0.272 |
| Dióxido de carbono | 31.1 | 72.0 | 0.47 |
| Etano | 32.3 | 47.6 | 0.2 |
| Óxido nitroso | 36.7 | 71.7 | 0.46 |
| Hexafluoruro de azufre | 45.8 | 37.7 | 0.73 |
| n-buteno | -139.9 | 36 | 0.221 |
| n-pentano | 196 | 32.9 | 0.237 |
| Acetona | 235 | 47 | 0.28 |
| Etanol | 243.4 | 72 | 0.28 |
| Metano | -82.6 | 46 | 0.17 |
| n-butano | 152 | 70.6 | 0.23 |
| n-propano | 96.7 | 42.4 | 0.22 |
| n-hexano | 234.2 | 30.1 | 0.23 |

Fuente: Gil-Chávez, Heredia; González-Aguilar et al. (2012)

2.3.2. CO₂ como fluido supercrítico para la extracción de compuestos bioactivos

En las últimas décadas el fluido supercrítico ha surgido como una tecnología verde, prometedora para el aislamiento y extracción de extractos naturales, como saborizantes, fragancias, aceites de especias, oleoresina, antioxidantes naturales, colorantes naturales pesticidas naturales y compuestos bioactivos (Azmir et al., 2013). El CO₂ es la sustancia más utilizada en la extracción con FSC para la recuperación de bioactivos en vegetales, debido que ha presentado ciertas características importantes es un solvente generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés), es inerte, de baja polaridad, no es tóxico y no es inflamable, con parámetros críticos modestos (31.180 ° C, 7.38 MPa), alta

disponibilidad, obtención de extracto con alta pureza (Ferrentino et al., 2018; Lúcia et al., 2019).

Además, ha demostrado un comportamiento óptimo como disolvente de extracción para compuestos termolábiles. Por lo tanto, la extracción con CO₂ supercrítico (E-CO₂) se puede utilizar como una alternativa a los métodos convencionales para extraer y/o fraccionar compuestos funcionales (Rosario Goyeneche et al., 2018). Aunque es considerada una alternativa para la extracción segura, su naturaleza como sustancia de polaridad moderada, no es capaz de extraer compuestos con alto peso molecular y de naturaleza polar (Veggi et al., 2014); por lo que se requiere la adición de cosolvente al CO₂ supercrítico para aumentar la afinidad y solubilidad para una mayor recuperación de compuestos polares. El agua (polaridad= 9) y el etanol (polaridad=5.2) son los más usados como so-solventes debido a su bajo costo, además de ser reconocidos como sustancias GRAS, con la posibilidad de ser usadas directamente en alimentos o productos farmacéuticos. Además el uso de mezclas de agua y etanol ha demostrado ser más efectivo en la extracción de compuestos fenólicos (Monroy, Rodrigues, Sartoratto, y Cabral, 2016). Ante lo mencionado, el FSC parece ser un método adecuado para la extracción de bioactivos, que permitan caracterizar su fuente original. En la tabla 6 se muestra algunos de los compuestos obtenidos en vegetales, las condiciones a las que fueron obtenidas y sus propiedades bioactivas evaluadas.

Tabla 6. Compuestos con actividad biológica extraídos con CO₂ supercrítico.

| Fuente | Condiciones evaluadas | Compuesto extraído | Propiedades | Referencia |
|---|---|--|---|----------------------------------|
| Hojas de rábano | 35°C-400 bar y 40°C- 400 bar | Flavonoides | Antioxidantes, antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias y vasodilatadoras. | <i>(Goyeneche et al., 2018)}</i> |
| Orojo de manzana | 30 MPa-45°C etanol (5%) | Fenoles totales | Antioxidantes | <i>(Ferrentino et al., 2018)</i> |
| Aceite de semilla de uvas (<i>Vitis vinifera L</i>) | Temperatura 50 °C, presión 50 MPa y caudal de CO ₂ 8 g / min | Tocoferoles, tocotrienoles compuestos fenólicos y carotenoides | Antioxidantes | <i>Hatem Ben Mohamed, (2016)</i> |

| | | | | |
|---|---|-------------------------------|--|---------------------------------------|
| Semillas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) | 17.9 MPa, 40.0 ° C, 104.6 min y 1.6 ml / min. | Ácido clorogénico | Antioxidante | (Daraee, Ghoreishi, & Hedayati, 2019) |
| Pulpa de palma de durazno (<i>Bactris gasipaes</i>) | La mejor condición de extracción fue 300 bar- 60 ° C, 3.00 l / min durante 91 min | Fenoles y flavonoides totales | Antioxidantes | (Espinosa-pardo et al., 2014) |
| Hojas de grosella | 60 °C, 40 MPa 0-60 min | Polifenoles y flavonoides | Antibacterial, anticancerígeno, antiviral y antiinflamatorio | (Martinez-Correa et al., 2012) |

2.4. Árbol de *Brosimum alicastrum*.

El ramón (*Brosimum alicastrum*), uno de los árboles abundantes en las selvas de Centroamérica y con amplia distribución en México (Figura 6), pertenece a las familia de las *Moracea* (Carter, 2015). Su nombre científico viene de la palabra griega “*brosimos*”, que significa comestible. En México, particularmente en la península de Yucatán se le conoce comúnmente como “ramón” que deriva del verbo ramonear, haciendo referencia al consumo de semillas, plántulas y hojas por ganado vacuno y otros animales domésticos. Los ejemplares pueden alcanzar 45 m de altura y 1.5m de diámetro en algunas selvas de México y pueden producir de 95 a 100 kg de semillas al año (Hernandez, Munguía Gil, y Monforte, 2015).

En cuanto a la importancia antropocéntrica, en la península de Yucatán se han utilizado como forraje para la alimentación del ganado, como árboles de traspatio. Resaltando el uso de sus semillas como sustituto de maíz para el consumo humano, debido a su alto valor nutrimental, contenido de fibra, calcio, potasio, ácido fólico, hierro, zinc, proteínas y vitaminas A, B, C y E (Carter, 2015).

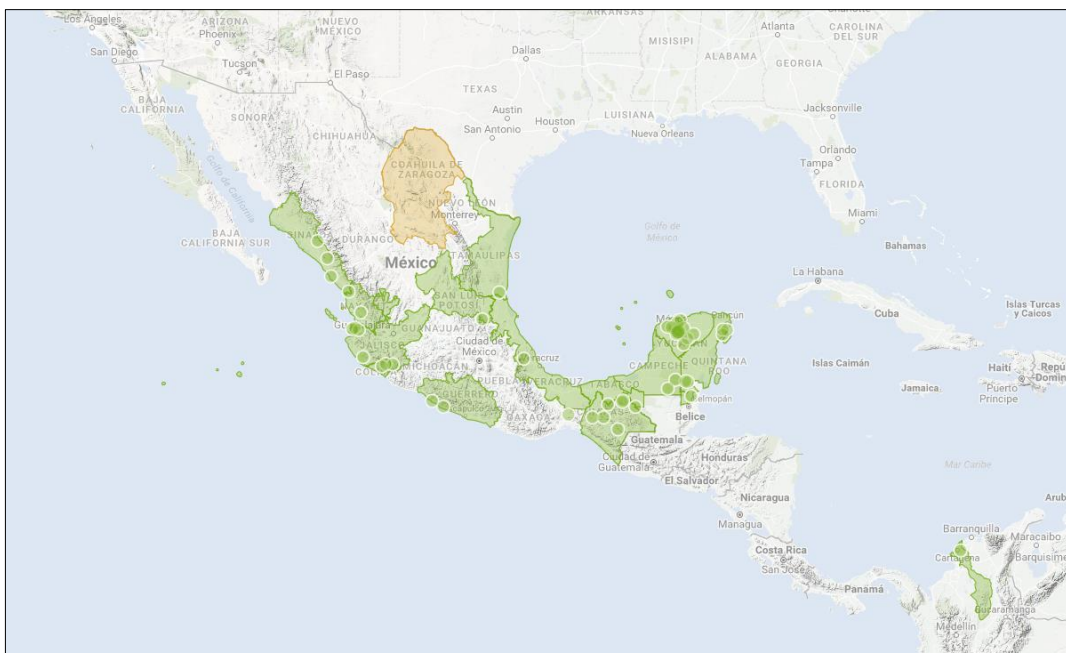


Figura 6. Distribución de árboles de *B. alicastrum* en Centroamérica y México.

Actualmente, aunque las semillas no están disponibles como el frijol comercialmente, son consumidas tostadas como sustituto de café y las semillas molidas hacen una harina para ser usadas como sustituto de las harinas convencionales para hacer galletas o panes (Domínguez-zárate, Maillard-Berdeja, y Totosaus, 2019). Sin embargo, el valor nutrimental y las propiedades terapéuticas no se han esclarecido en su totalidad, debido a la poca información que existen en la literatura sobre su caracterización, por lo que ha generado la búsqueda y desarrollo de nuevas investigaciones científicas, con la finalidad de darle un valor agregado a estas semillas como ingrediente para la formulación de alimentos o aperitivos funcionales.

2.4.1. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la harina *B. alicastrum*

Ozer, (2017), reportó el contenido fenólico y capacidad antioxidante de la nuez Maya o ramón tostado adquirido en la empresa Maya Nut Institute. Este reporte, surgió del estudio de comparación entre nueces comerciales, nuez, cacahuete, almendra y nuez maya (ramón). De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que la nuez Maya tiene un alto contenido de compuestos fenólicos 2467 ± 85 mg GAE/100 g de extracto seco Maya comparado con la nuez, cacahuete y almendra (812 ± 51 , 430 ± 18 y 87.5 ± 2 mg GAE/100 g

de extracto seco, respectivamente). También se demostró que la nuez Maya tiene altos niveles de actividad de eliminación de radicales libres, con un $79 \pm 2.7\%$ para DPPH y $92.5 \pm 5.2\%$ para ABTS (Ozer, 2017). Identificándose a los ácidos fenólicos como los principales polifenoles encontrados en la harina de ramón, en la tabla 7 se presenta un resumen de estos compuestos que se identificaron.

Tabla 7. Ácidos fenólicos encontrados en harina de nuez Maya Nut

| Compuesto fenólico | $\mu\text{g/ g de nuez Maya}$ |
|--------------------|-------------------------------|
| P- Hidroxibenzoico | 326.2 |
| Ácido Vanílico, | 103.9 |
| Epicatequina | 53 |
| Ácido Gálico | 27.1 |
| Ácido Cafeico | 17.1 |
| Ácido P- Cumárico | 13.5 |

Fuente: Ozer, (2017)

Por otro lado, Moo-Huchin et al. (2019) reportan el contenido de compuestos fenólicos, y actividad antioxidante de extractos etanólico de la semilla de ramón. De acuerdo con el resultado, se encontró mayor contenido de ácido gálico (1.29 ± 0.003 mg/100 g de peso seco harina), ácido clorogénico (31.04 ± 0.68 mg/100 g peso seco harina) y ácido vanílico (24.03 ± 0.39 mg/100 g peso seco harina). Su propiedad antioxidante se evaluó al reducir el contenido de TBA usando un modelo de peroxidación lipídica. Finalmente, se confirmó una alta correlación entre el contenido de compuesto fenólicos y flavonoides totales, lo que indica que estos compuestos fueron los responsables de la actividad antioxidante.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el contenido de compuestos bioactivos y la actividad *in vitro* de extractos de la harina de *Brosimum alicastrum* obtenidos por extracción con CO₂ supercrítico y extracción sólido-líquido.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del tiempo de extracción dinámico en el rendimiento de la extracción CO₂ supercrítica (primera extracción).
- Caracterizar el extracto obtenido de *B. alicastrum* mediante el contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno por HPLC.
- Evaluar el efecto de etanol como cosolvente en la extracción CO₂ supercrítico para incrementar el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en la harina residuo de la primera extracción.
- Obtener un extracto alcohólico de la harina de *B. alicastrum* utilizando el método de extracción sólido-líquido.
- Evaluar el efecto del método de extracción en el contenido de compuestos fenólicos, bioactividad *in vitro* y el perfil cromatográfico de extractos obtenidos por CO₂ supercrítico con cosolvente y extracción sólido líquido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estrategia general de trabajo

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Instrumentación Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida en colaboración con el Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química-Uady. Primeramente, se obtuvo la harina a partir del procesamiento de las semillas de *Brosimum alicastrum* recolectadas en Calkiní, Campeche. Para el logro de los objetivos propuestos en esta investigación, se planteó una estrategia de trabajo que consistió en una extracción secuencial (de dos extracciones) con CO₂ supercrítico y una extracción sólido-líquido (E-SL), como se presenta en el diagrama (figura 7). Para el estudio de la extracción con CO₂ supercrítico se realizó una primera extracción sin el uso de cosolvente (E-CO₂). Los datos experimentales obtenidos de la primera extracción fueron utilizados para un estudio cinético de extracción, a fin de determinar el tiempo de extracción dinámica en el sistema de extracción y el extracto crudo lipofílico obtenido se caracterizó por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno por HPLC. Para la segunda extracción la harina residual o resultante (harina que quedó dentro de la celda de la primera extracción) fue expuesta a una nueva extracción con CO₂ supercrítico utilizando etanol como cosolvente en el sistema de extracción, para obtener un extracto crudo más polar (E-CO₂-Co). Previo a la segunda extracción, se evaluaron el efecto de varias concentraciones de etanol: agua a fin de extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales de la harina. Tras determinar la concentración de cosolvente a utilizar en el sistema E-CO₂-Co, se obtuvieron extractos crudos más polares de la harina y se caracterizó por su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados e hidrolizables, actividad antioxidante, su actividad inhibitoria para enzimas digestivas de carbohidratos (α -amilasa y α -glucosidasa) y el perfil de compuestos fenólicos individuales por HPLC. Por otra parte, se obtuvo un extracto alcohólico de *B. alicastrum* mediante la extracción sólido-líquido

y se analizaron las mismas variables de respuesta que en la extracción E-CO₂-Co. Los resultados obtenidos fueron comparados.

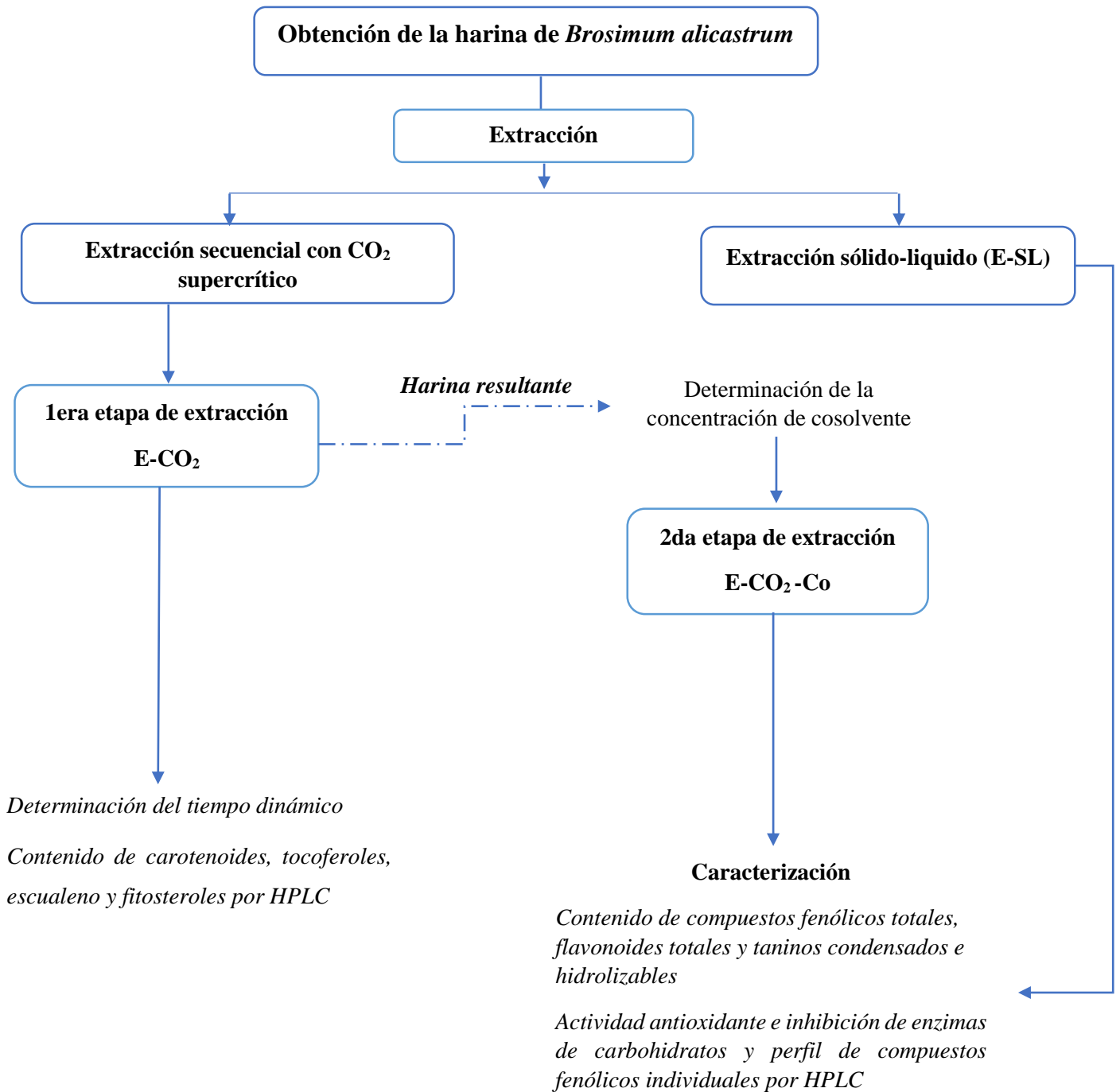


Figura 7. Estrategia general de trabajo.

4.2. Obtención de la harina

Las semillas del árbol de Ramón (*Brosimum alicastrum*) se recolectaron en la región de Calkiní, Campeche en septiembre de 2017. Las semillas fueron seleccionadas considerando que fueran libres de daño mecánico y con un tamaño homogéneo; las cuales fueron acondicionadas, retirando la testa y secadas en una estufa de convección (SHELL LAB 1350FX-10) a 70 °C durante 72 h hasta obtener el 10% de humedad. Al finalizar el tiempo de secado, las semillas fueron trituradas y molidas en una licuadora (Osterizer®) hasta obtener el polvo. El polvo que se obtuvo se pasó por un tamiz de malla No. 100 (0.149 mm), hasta obtener la harina que fue almacenada a 4°C en bolsas de polietileno hasta su uso.



Figura 8. Obtención de la harina.

4.3. Procedimientos de extracción

Los extractos de harina fueron obtenidos a partir de dos métodos de extracción: CO₂ supercrítico y extracción sólido-líquido. En este trabajo se propuso una extracción CO₂ supercrítico secuencial de dos extracciones a modo estática-dinámica para extraer selectivamente los principales compuestos bioactivos de la harina de ramón. Se realizó una primera extracción con solo CO₂ supercrítico (sin cosolvente); mientras que la segunda extracción consistió en exponer la harina resultante de la primera extracción a una nueva extracción con CO₂ supercrítico usando etanol absoluto como cosolvente. Por otro lado, también se obtuvo un extracto alcohólico de la harina de ramón por el método de extracción sólido-liquido.

4.3.1. Extracción sólido-líquido

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Camaal-Chuc et al. (2018), utilizando etanol acuoso y agitación mecánica. Se pesó 1 g de harina en un tubo de ensayo con tapa, se añadió 44 ml de etanol/agua (1:1, v/v), se llevó a baño maría a 75.8°C con agitación constante durante 48 min, posteriormente se filtró y centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y finalmente se secó en la estufa a 60°C durante 48 h o hasta obtener un extracto seco.

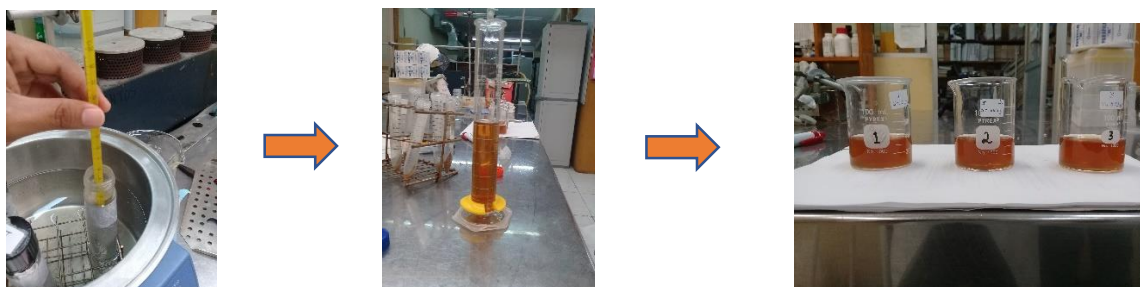


Figura 9. Extracción sólido-líquido.

Todas las extracciones fueron realizadas por triplicado.

El rendimiento de extracción (%) para extractos obtenidos fue determinado por la ecuación presentada a continuación, expresadas en base de extracto seco.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa del extracto seco (g)}}{\text{masa de la muestra (g)}} \times 100$$

4.3.2. Extracción secuencial con CO₂ supercrítico

La extracción con CO₂ supercrítico se realizó usando un equipo de extracción modelo SFT-150 SFE/SFR System, con una celda de extracción de 100 ml, separador de CO₂ y colector de extracto, tanque de aire y CO₂, bombas, medidor de flujo (Figura 8). Los principales

procedimientos de extracción fueron: cargar la cámara de extracción con la harina de ramón, cambiar las condiciones de CO₂ en el tanque a condiciones supercríticas (esto se logra por un enfriamiento, aumentando la presión y finalmente aumentando la temperatura). Se permitió que el CO₂ en las condiciones supercríticas elegidas entre a la cámara de extracción para la extracción estática o remojo, luego se deja el paso del CO₂ supercrítico a través de la muestra para la extracción dinámica durante el tiempo correspondiente. El CO₂ que contiene el extracto se dirige a la primera cámara de separación, en donde el gas se expande a presión atmosférica y se obtiene el extracto.

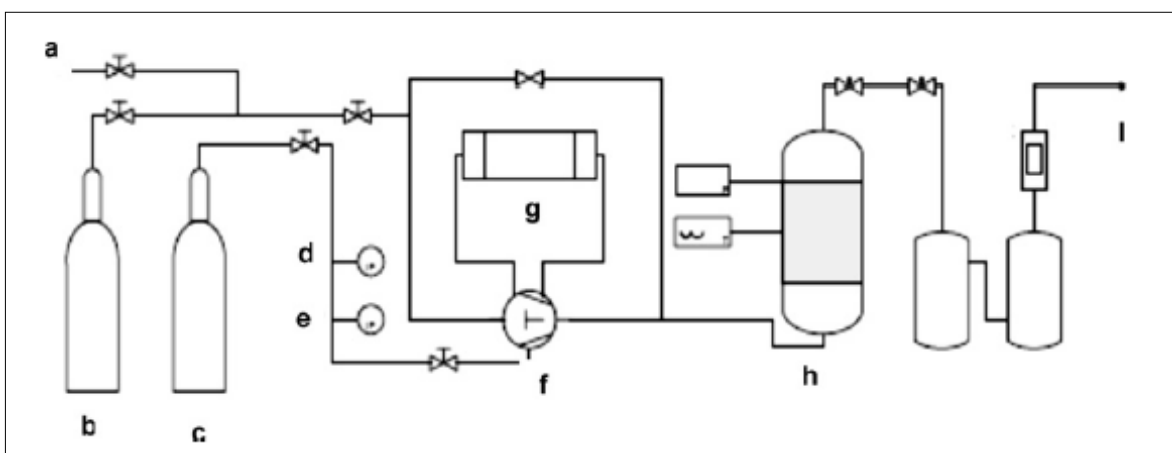


Figura 1. Diagrama general del equipo de fluido supercrítico. (a) purga, (b) tanque de CO₂, (c) tanque de aire, (d) y (e) manómetros, (f) bomba de diafragma, (g) enfriador, (h) cámara de extracción, (i) separador de CO₂ y colector de extracto.

El procedimiento de extracción se llevó a cabo en dos extracciones, la primera extracción se realizó con el propósito de recuperar y caracterizar el extracto crudo lipofílico o de baja polaridad de la harina. En base a esta extracción, se realizó un estudio cinético de extracción, con la finalidad de determinar el tiempo de extracción dinámica en el sistema CO₂ supercrítico, necesaria que permita la mayor extracción de compuestos solubles. Las condiciones utilizadas en la extracción solo con CO₂ supercrítico (E-CO₂) fueron las descritas por Martínez-Correa et al. (2012a y 2017b) y Uribe et al. (2011), con algunas modificaciones. 50 g de harina fina se sometió a una extracción estática a 60 °C, 40 MPa durante 30 min. Posteriormente, se hizo pasar el flujo de CO₂ (1.8 g/min) a través de la muestra durante 60 min (extracción dinámica). Los extractos fueron recuperados en un vial

ámbar por despresurización del sistema y fueron pesados para calcular el rendimiento acumulado de extracción. Los extractos secos obtenidos se reconstituyeron en 4 ml de EtOH: agua (1:1 v/v) y fueron almacenados en congelación -20°C, hasta su uso.

En un trabajo realizado por Monroy et al. (2016), describen que el uso de cosolvente en el sistema de extracción supercrítica es capaz de modificar la polaridad del CO₂, mejorando el poder de solvatación e incrementando el rendimiento de extracción de compuestos. Por lo tanto, en este trabajo se realizó una segunda extracción con CO₂ supercrítico usando EtOH como cosolvente (E-CO₂-Co), con la finalidad de incrementar la obtención de compuestos más polares de la harina.

Previo a la segunda extracción (E-CO₂-Co), se evaluó el efecto de varias mezclas etanol: agua en la extracción con CO₂ supercrítico, con ligeras modificaciones en las condiciones en el sistema. El estudio se llevó a cabo mediante cuatro extracciones de la harina, previamente mezcladas con solventes (etanol: agua y solo etanol absoluto) a diferentes concentraciones con la finalidad de determinar la concentración de etanol que permita obtener mayor rendimiento de compuestos fenólicos. La extracción se llevó a cabo con la harina residual o resultante (20 g) de la primera extracción, se mezcló con 20 ml de solvente (EtOH: H₂O al 25, 50, 75 y 100 %), seguido de la extracción estática con CO₂ supercrítica, a 40°C, 20 MPa durante 30 min, finalmente se dejó el paso del CO₂ a través de la muestra durante 30 min (extracción estática). Cada extracción se realizó por triplicado. El extracto seco obtenido de cada extracción se reconstituyó con 4 ml etanol: agua (1:1, v/v) y fueron almacenados en congelación -20°C, hasta su uso.

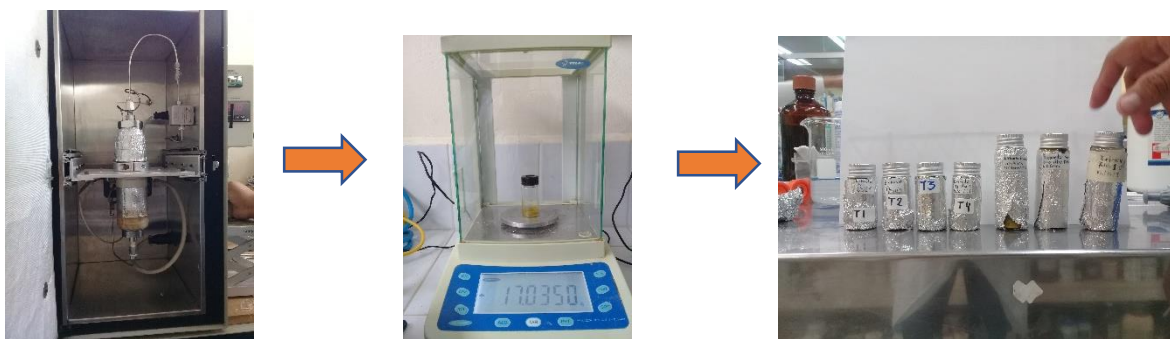


Figura 10. Extracción con CO_2 supercrítico.

El rendimiento de extracción (%) para los extractos obtenidos fue determinado por la ecuación presentada a continuación, expresadas en base de extracto seco.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa del extracto seco (g)}}{\text{masa de la muestra (g)}} \times 100$$

Los extractos obtenidos fueron caracterizados por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles, escualeno, compuestos fenólicos, actividad *in vitro* y el perfil cromatográfico.

4.4. Caracterización del extracto por su contenido de compuestos bioactivos, bioactividad *in vitro* y perfil cromatográfico

Los extractos E- CO_2 obtenidos en la primera extracción fueron caracterizados mediante el contenido de carotenoides (α -caroteno, luteína), tocoferoles (α -tocoferol, γ -tocoferol), fitosteroles (estigmasterol, fucosterol) y escualeno siguiendo las metodologías descritas por Can-Cauich et al. (2019), descritas en la sección de anexos (7.3.2, 7.3.3 y 7.3.4).

Mientras que los extractos obtenidos en la segunda extracción supercrítico (E- CO_2 -Co) y sólido-líquido (E-SL) se caracterizaron y compararon por su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados, taninos hidrolizables, actividad antioxidante, inhibición de la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa, perfil de compuestos fenólicos individuales por HPLC. Los métodos analíticos se realizaron siguiendo los

procedimientos descritos por Can-Cauich et al. (2017, 2019) y Moo-Huchin et al. (2014) que se encuentran en el apartado de anexos (7.2, 7.3 y 7.4).

4.4.1. Determinación de la actividad inhibitoria de α -amilasa pancreática de los extractos de *B. alicastrum*.

La capacidad de los extractos para inhibir la actividad de la α -amilasa se realizó de acuerdo a la técnica de Islam, (2014) con algunas modificaciones. El extracto seco fue reconstituido en buffer de fosfato de sodio (0.02 M, pH 6.9, con NaCl 0.006 M) para alcanzar 600, 950 y 3500 μg de compuestos fenólicos totales/ensayo. En un tubo de ensayo se agregaron 500 μL de extracto más 20 μL de α -amilasa pancreática (5 U/ml, disuelta en buffer de fosfato de sodio; es decir 2.5 mg en 5 ml de buffer agitado durante 20 min). El tubo de ensayo se incubó a 37 °C durante 15 min. Después de la incubación, 200 μL de una solución de almidón (1%, en buffer de fosfato de sodio, previamente calentado a 90°C durante 5 min) fue añadido al tubo de ensayo e incubado nuevamente a 37°C por 60 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 200 μL de una solución de yodo (2%, en agua destilada) más 5 mL de agua destilada, el procedimiento realizado se resume en la tabla 8. Se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 565 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. La acarbosa (A8980 Sigma-Aldrich) fue usada como estándar a cantidades de 2, 6 y 10 μg / ensayo. La actividad de inhibición de la α -amilasa fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \left\{ - \left[1 - \frac{(AM \text{ ó } AA - ABS) - ABM}{ABE} \right] * 100 \right\}$$

Donde:

AM o AA: Absorbancia de la muestra o acarbosa

ABE: Absorbancia del blanco de la enzima

ABS: Absorbancia del blanco del sustrato

ABM: Absorbancia del blanco de muestra

Tabla 8. Cantidad de reactivos utilizados para el ensayo inhibición de α -amilasa

| Soluciones (μL) | (E-CO ₂ -Co, E-SL, EA) | BM | BS | BE | BL _{cal} |
|---|-----------------------------------|------------------------|------|------|-------------------|
| Buffer fosfato de sodio | 0 | 500 | 200 | 520 | 720 |
| Extracto o Acarbosa | 500 | 0 | 500 | 0 | 0 |
| Enzima α -amilasa pancreática | 20 | 20 | 20 | 0 | 0 |
| Condiciones de incubación | | 37°C por 15 min | | | |
| Solución de almidón (1.5 % en Buffer de fosfatos) | 200 | 200 | 0 | 200 | 0 |
| Condiciones de incubación | | 37°C por 60 min | | | |
| Solución de yodo (2% en agua destilada) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Agua destilada | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 | 5000 |

E-CO₂-Co (extracto obtenido por CO₂ supercrítico), *E-SL* (extracto obtenido por sólido-líquido), *EA* (extracto de acarbosa), *BM* (Blanco del extracto o acarbosa), *BS* (Blanco de sustrato), *BE* (Blanco de la enzima), *BL_{cal}* (blanco para calibrar el equipo espectrofotométrico).

4.4.2. Determinación de la actividad inhibitoria α - glucosidasa de los extractos de *B. alicastrum*.

Para el ensayo de inhibición de α -glucosidasa, se empleó la metodología reportada por Colantuono, Ferracane y Vitaglione (2016) con algunas modificaciones. El extracto seco fue reconstituido en buffer de fosfato de sodio (0.02 M, pH=6.9) para alcanzar 600, 950 y 3500 μg de compuestos fenólicos totales/ensayo. 100 μL de extracto fueron añadidos en un tubo de ensayo más 200 μL α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae* 1.0 U/mL) a una concentración de 1 mg/10 mL de buffer de fosfato. La mezcla fue pre-incubada por 10 min a 25°C. Después del tiempo, se agregaron 50 μl de p-nitrofenil- α -d-glucopiranosido (5 mM

disuelto en buffer de fosfatos) para iniciar la reacción. Posteriormente, se adicionó buffer de fosfato de sodio hasta alcanzar un volumen de 1000 µL. La mezcla fue incubada durante 5 minutos a 25 °C. Tras la incubación, 100 µl de una solución de 0.01 M Na₂CO₃ fueron adicionados a la mezcla para detener la reacción, la cantidad de extracto y procedimiento se resume en la tabla 9. La cantidad de (P-NPG) liberado fue determinado espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia de la solución a 405 nm. Para efecto de comparación se utilizó acarbosa (A8980 Sigma-Aldrich) a cantidades de 6, 30 y 60 µg/ensayo.

El porcentaje de inhibición fue calculado como sigue:

$$\frac{[(ACP - ACN) - (AM - ABM)]}{(ACP - ACN)} \times 100$$

En donde:

ACP: Absorbancia del 100% de actividad enzimática (reacción la enzima + sustrato).

ACN: Absorbancia de 0% de actividad enzimática (reacción únicamente el sustrato sin la enzima)

AM: Absorbancia de la mezcla de reacción enzimática (reacción enzima + sustrato+ muestra)

ABM: Absorbancia del blanco de la muestra (reacción sin la enzima, únicamente sustrato + muestra).

Tabla 9. Cantidad de reactivos utilizados para el ensayo inhibición de α -glucosidasa

| Soluciones en μL | (E-CO ₂ -Co, E-SL, EA) | BM | CP | CN | BL _{cal} |
|---|-----------------------------------|-----------------------|-----|-----|-------------------|
| Extracto o estándar | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Enzima α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 200 | 0 | 200 | 0 | 0 |
| Pre-incubación | | 10 min a 25 °C | | | |
| Solución P-NPG | 50 | 50 | 50 | 50 | 0 |
| Buffer de fosfato de sodio | 650 | 850 | 750 | 950 | 1000 |
| Incubación | | 5 min a 25 °C | | | |
| Carbonato de sodio Na ₂ CO ₃ 0.01 M en Buffer de fosfatos | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

E-CO₂-Co (extracto obtenido por CO₂ supercrítico), *E-SL* (extracto obtenido por sólido-líquido), *EA* (Extracto de acarbosa), *BM* (Blanco muestra: extracto o acarbosa, según corresponda), *CP* (control positivo, 100% de actividad enzimática), *CN* (control negativo, 0% de actividad enzimática), *BL_{cal}* (blanco para calibrar el equipo espectrofotométrico).

4.5. Análisis estadístico

Se realizaron tres extracciones por tratamiento y las mediciones fueron realizadas por triplicado para cada repetición. Los resultados se reportaron como promedio \pm desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) mediante el software estadístico Statgraphics Plus versión 2.1 (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA) y se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, en donde las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron significativas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Primera extracción: Extracción con CO₂ supercrítico (E-CO₂)

La primera extracción con CO₂ supercrítico, se realizó para extraer o recuperar la fracción no polar de los compuestos presentes en la harina de ramón y caracterizar su composición bioactiva. Los datos experimentales de la extracción fueron utilizados para estudiar el efecto del tiempo de la extracción dinámica sobre el rendimiento de extracto. Los extractos obtenidos en la extracción fueron caracterizados por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitoesteroles y escualeno.

5.1.1. Evaluación del efecto del tiempo dinámico de extracción en el rendimiento de extracto

Para la obtención de extractos ricos en compuestos activos a tiempos cortos en un sistema de extracción con CO₂ supercrítico sin tener un gasto excesivo de CO₂ que comprometa la viabilidad económica, se estudió el efecto del tiempo de la extracción dinámica que permitiera obtener un alto rendimiento de la extracción, lo cual corresponde a un tiempo en la que se permite el paso de flujo constante del CO₂ supercrítico a través de la muestra expuesta en una celda de extracción hasta la extracción completa (Uribe et al., 2011).

La figura 9 muestra el comportamiento de los valores de rendimiento de extracto crudo acumulado obtenido de la extracción de harina en un intervalo de tiempo de extracción con CO₂ supercrítico durante 60 min.

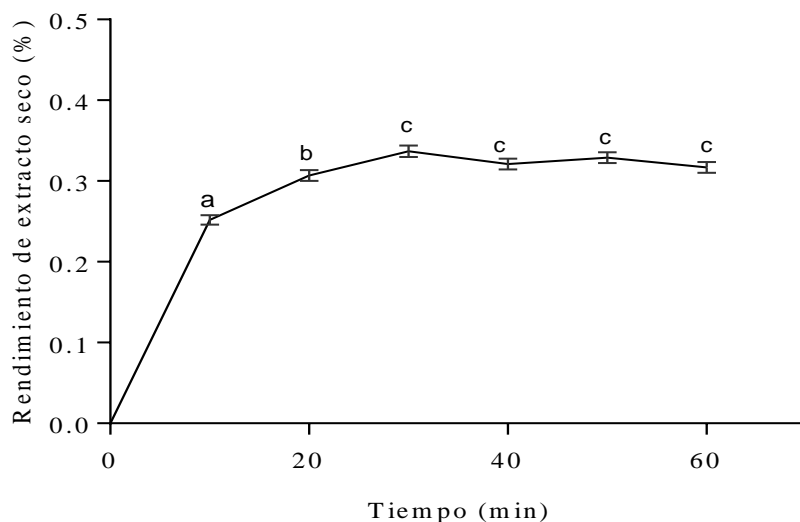


Figura 11. Comportamiento de los valores de rendimiento de extracto seco acumulado de harina en función del tiempo de extracción dinámica con CO₂ supercrítico a 60° C y 40 MPa. Letras diferentes en cada intervalo de tiempo indican valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Por otra parte, se ha mencionado por algunos autores que la curva general de extracción CO₂ supercrítico es caracterizada por tres períodos basados en la transferencia de masa: a) extracción de solutos que se encuentran en la superficie de la matriz vegetal (extracción lineal o constante (EL)); b) agotamiento parcial de los solutos en la superficie (extracción descendiente (ED) y finalmente, c) extracción completa de algún metabolito extraíble controlada por difusión (EC) o por que el sistema ha llegado a la capacidad máxima de extracción (CME) (López-Padilla, Ruiz-Rodriguez, Reglero, y Fornari, 2017; Rocha-Uribe et al., 2019; Sovová, Nobre, y Palavra, 2016). Considerando lo anterior y de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que durante los primeros 10 min, el rendimiento acumulado de extracción incrementa de forma lineal respecto al tiempo (EL); mientras que la región ED se mostró entre 10 y 30 min de extracción. Tras 30 min de extracción, el rendimiento acumulado se mantuvo sin cambios significativos hasta 60 min (EC o CME).

Según los valores de rendimiento acumulado, que se observa en la Figura 9, la mayor recuperación de extraíbles (0.35%) resultó a 30 min; el cual fue establecido como el tiempo

de extracción dinámica. El valor de rendimiento alcanzado en este trabajo es comparable al reportado por Santos et al. (2017) en extractos de raíz de *Rumex acetosa L.* (de 0.2 a 8.3%) y Lúcia et al. (2019) quienes obtuvieron un rendimiento que varió de 0.73% (15 MPa, 60°C con 2 ml/ min) a 1.73% (20 MPa, 40°C, 4 ml/ min) en extracto de hojas de *Eugenia involucrata*.

5.1.2. Caracterización del extracto por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno por HPLC

Las semillas y nueces son bien conocidas por sus propiedades farmacológicas para mantener una buena salud humana debido a la presencia de compuestos bioactivos minoritarios con características liposolubles, como fitosteroles, tocoferoles y carotenoides. Conjuntamente, estos compuestos han demostrado ser potentes antioxidantes, que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades causadas por el estrés oxidativo y/o como aditivos en los alimentos retrasando la oxidación lipídica (Can-Cauich et al., 2019). Por ello, dentro de la primera etapa de este estudio de investigación se llevó a cabo la recuperación y caracterización del extracto crudo lipofílico de harina de ramón obtenido con CO₂ supercrítico sin cosolvente, con el propósito de separar esta fracción y dejar expuestas a los compuestos más polares para una segunda extracción con CO₂ supercrítico usando etanol. El extracto de la harina obtenido en la primera extracción se caracterizó por su contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno (Tabla 10).

Tabla 10. Contenido de carotenoides, tocoferoles, fitosteroles y escualeno de extractos de harina *Brosimum alicastrum* obtenido por E-CO₂

| Composición | Contenido (mg/100 g extracto seco) |
|------------------------------|------------------------------------|
| Compuestos Fenólicos Totales | 1.30 ± 0.05 |
| Luteína | 45.34 ± 0.33 |
| β-caroteno | 68.24 ± 0.93 |

5. Resultados y discusión

| | |
|---------------------|-----------------------|
| α -tocoferol | 34.64 \pm 2.34 |
| γ -tocoferol | 29.12 \pm 0.47 |
| Estigmasterol | 561.45 \pm 60.08 |
| Fucoesterol | 5,997.27 \pm 120.49 |
| Escualeno | 53.32 \pm 0.92 |

Los valores presentados son medias \pm desviación estándar (n=3).

Los compuestos predominantes en el extracto crudo de ramón fueron esteroides, principalmente el fucoesterol con 5,997.27 mg/100 g extracto seco y estigmasterol con 561.45 mg/100 g extracto seco, seguido por los carotenoides y escualeno. De acuerdo con algunos trabajos publicados para extractos de nueces y semillas, la presencia de fucoesterol es muy poco o escasamente reportado, debido a que los principales esteroides que se han reportado en variedades de nueces, pistachos, girasol, almendra y semillas de calabaza son β -sitosterol y estigmasterol, incluso a concentraciones más bajas a los reportados en este trabajo (Vu et al., 2019; Wang et al., 2019). Por otra parte, Can-Cauchich et al. (2019) lo reporta en aceites de semillas de calabaza y Wong et al. (2018) en algas marinas, haciendo énfasis en la importancia de estos productos como fuente importante de fucoesterol.

Las organizaciones reguladoras como la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA) y la estadounidense, Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), recomiendan incorporar a la dieta la ingesta de fitosteroides, debido a algunos estudios que se han dado a conocer sobre los efectos favorables en la disminución de la absorción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el intestino, causando un descenso en la concentración de colesterol en la sangre y previniendo riesgo de enfermedades cardiovasculares (Bot et al., 2018). Por lo tanto, los resultados mostrados son importantes para considerar la harina de ramón como ingrediente bioactivo para el desarrollo de alimentos funcionales o en su caso incorporarlos a alimentos específicos.

5.2. Segunda extracción: Obtención de compuestos fenólicos de la harina residual de la primera extracción con CO₂ supercrítico usando etanol (E-CO₂-Co)

Con la finalidad de mejorar la recuperación de compuestos fenólicos y obtener otros compuestos bioactivos, la harina residuo de la primera extracción fue sometida a una segunda extracción con CO₂ supercrítico usando EtOH. Los extractos obtenidos fueron caracterizados por su contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, actividad inhibitoria de enzimas digestivas y perfil cromatográfico. Los resultados fueron comparados con los valores obtenidos de la extracción por E-SL.

5.2.1. Efecto del etanol en la extracción de compuestos fenólicos con CO₂ supercrítico

Una de las principales limitaciones que presenta el sistema CO₂ supercrítico es la poca selectividad para la extracción de compuestos orgánicos de mediana o alta polaridad. Por ello, se han buscado estrategias usando modificadores o cosolvente dentro del proceso para mejorar la eficiencia de extracción y la selectividad para compuestos bioactivos de matrices vegetales (Jiao y Kermanshahi, 2018).

La figura 10 muestra el efecto de varias concentraciones de EtOH: agua y etanol absoluto en la extracción de polifenoles de la muestra de harina de *B. alicastrum* previamente extraída con E-CO₂. A diferencia de las mezclas etanol en agua, el etanol absoluto mostró la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales de la harina de ramón que varió de 2 hasta 12 mg EAG/100 g de harina.

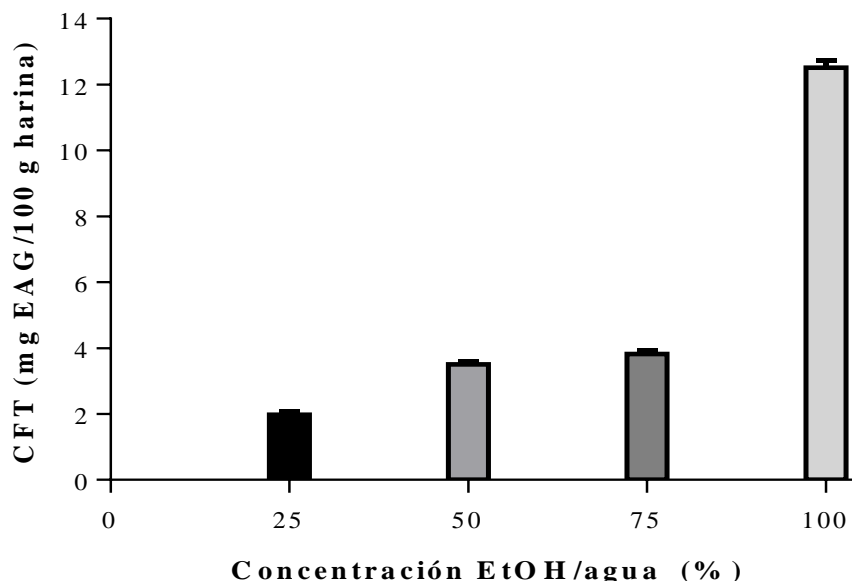


Figura 12. Efecto del etanol en el Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT) en la extracción con CO_2 supercrítico (E- CO_2 -Co), a $40^\circ C$ y $20 MPa$.

De acuerdo con algunos autores, los grupos -OH del etanol en estado supercrítico son capaces de formar enlaces de hidrógeno con los solutos, aumentando la solubilidad y la recuperación de los compuestos fenólicos del medio extractor (Lu, Boughner, Liotta y Eckert, 2002; Valle, Robert y Fuente, 2018). Por su parte, Reder et al. (2018), en uno de sus trabajos menciona que el etanol puede causar un hinchamiento de las partículas mejorando la solubilidad y difusión de los compuestos fenólicos. Los efectos positivos en la extracción de compuestos fenólicos, usando EtOH en el proceso también fueron observados por Martínez-correa et al. (2016) en hojas de *Artemisia annua L* y Cadena-Carrera et al. (2019) lo reporta en la extracción de compuestos fenólicos en hojas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*).

De acuerdo con el rendimiento de extracto obtenido en la primera extracción (0.35%), en este trabajo se pudo observar que sometiendo la harina residual a una segunda extracción con CO_2 supercrítico + EtOH, mejora el rendimiento de extracción hasta un 0.69 %, el contenido de compuestos fenólicos totales y selectividad hacia ciertos compuestos bioactivos en los extractos de la harina de *B. alicastrum*.

5.2.2. Caracterización del extracto de la harina por su contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos del contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos de ramón obtenidos por E-CO₂-Co y extracción sólido-líquido (E-SL). El valor del rendimiento de extracción alcanzado con E-CO₂-Co fue menor a lo obtenido con E-SL (0.69 y 18 % p/p, respecto a la muestra seca, respectivamente). El valor del rendimiento de extracto alcanzado con CO₂ supercrítico en este trabajo fue ligeramente superior al reportado por Radojkovi et al. (2016), con valores de 0.30 % (20 MPa, 60 min) a 0.65 % (40 MPa, 90 min) para extractos de hojas de *Morus*.

Tabla 11. Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos condensados e hidrolizables y actividad antioxidante de los extractos *Brosimum alicastrum* obtenidos por E-CO₂-Co y E-SL.

| Compuestos fenólicos | Métodos de extracción | |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| | E-CO ₂ -Co | E-SL |
| Compuestos fenólicos totales (g ácido gálico/100g ES) | 2.45 ± 0.15 ^a | 7.19 ± 0.06 ^b |
| Flavonoides totales (g Quercetina/100 g ES) | 2.97 ± 0.12 ^b | 2.01 ± 0.04 ^a |
| Taninos condensados (g Catequina/100 g ES) | 0.45 ± 0.04 ^a | 0.49 ± 0.00 ^a |
| Taninos hidrolizables (g Ácido tánico/100g ES) | 1.72 ± 0.17 ^b | 0.82 ± 0.08 ^a |
| Actividad antioxidante | | |
| ABTS ⁺ (mM Trolox/100g ES) | 649.29 ± 20.50 ^b | 471.83 ± 3.20 ^a |
| DPPH (mM Trolox/100g ES) | 58.31 ± 0.34 ^a | 83.28 ± 3.63 ^b |
| Poder reductor (mg ácido ascórbico/100 g ES) | 11.68 ± 0.68 ^a | 86.82 ± 1.95 ^b |

Los valores presentados son medias ± desviación estándar (n=3). Letras diferentes presentaron diferencias estadísticamente significativas (p > 0.05).

De acuerdo con los resultados, el contenido de compuestos fenólicos totales del extracto obtenido por extracción sólido-líquido fue superior al extraído por CO₂ supercrítico (7.19 ± 0.06 y 2.45 ± 0.15 g EAG/ 100 g extracto seco, respectivamente). Ésta diferencia quizá pueda explicarse, debido a la falta de selectividad del disolvente usado en la extracción convencional, que es capaz de arrastrar una gran cantidad de compuestos de naturaleza no fenólicos como las proteínas, saponinas y ácidos orgánicos que pudieran reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, sobreestimando el contenido de compuestos fenólicos por la presencia de otros compuestos. Resultados similares fueron observados por Vieitez, Maceiras, Jachmanián, y Alborés, (2018) en varios extractos de hierbas (Cedro de romero, Boldo y yerba mate) extraídos CO₂ supercrítico y convencional.

El contenido de tanino condensado de los extractos de ramón fue similar entre ambos métodos de extracción. Respecto al contenido de flavonoides totales y taninos hidrolizables obtenidos con E-CO₂-Co los valores alcanzados fueron 2.97 ± 0.12 g QE/100 g extracto seco y 1.72 ± 0.17 g ácido tánico/100 g extracto seco, respectivamente con bajo rendimiento de extracción, observando que el método es selectivo a ciertos compuestos fenólicos; lo cual pudiera mejorar la pureza del compuesto y la actividad bioactiva. Es probable que bajo las condiciones del sistema de extracción CO₂ supercrítica con cosolvente utilizado, existe una ruptura de las interacciones electrostáticas y de van der Waals entre los compuestos no extraíbles (flavonoides) y las cadenas de los polisacáridos (fibra dietética) o proteínas (Palafox et al., 2011); lo que pudiera permitir una mayor recuperación de taninos y flavonoides.

Generalmente, el contenido de compuestos fenólicos está relacionado con la actividad antioxidante de los extractos, en este trabajo la actividad de los compuestos se evaluó utilizando tres ensayos (ABTS⁺, DPPH y poder reductor) que se consideran simples y con alta reproducibilidad. Respecto al ensayo ABTS⁺, la actividad antioxidante del extracto de harina obtenido por E-CO₂-Co presentó el valor más alto de 649.29 ± 20.50 mM ET/100 g extracto seco, respecto al E-SL (471.83 ± 3.20 mM ET/100 g extracto seco). El valor reportado para E-CO₂-Co es mayor a lo reportado por Mazzutti et al. (2019) para extracto de hojas de *Sida rhombifolia* (360 ± 0.01 mM ET/100g extracto). Como se puede observar en la tabla 11, el extracto E-CO₂-Co dio menor contenido de CFT, pero mayor contenido de

flavonoides totales y taninos hidrolizables. Probablemente éstos últimos contribuyen en la mayor actividad antioxidante para E-CO₂-Co medida por ABTS⁺. Además, es posible que la mayor actividad antioxidante se deba a que el método de CO₂ supercrítico es más selectivo y que posiblemente el solvente utilizado pudo haber arrastrado compuestos que presente mayor actividad antioxidante como se muestra en los perfiles cromatográficos en el apartado 5.4 (figuras 13 y 14).

En cuanto al ensayo DPPH y poder reductor, la actividad antioxidante más alta se obtuvo en los extractos E-SL con 83.28±3.63 mM Trolox/100 g extracto seco y 86.82±1.95 mg ácido ascórbico/100 g ES, respectivamente cuando se compara con E-CO₂-Co. La mayor actividad antioxidante DPPH para E-SL puede atribuirse al contenido de compuestos fenólicos y posiblemente a otros compuestos que fueron extraídos (proteínas, aminoácidos) y posiblemente ácidos orgánicos como reportan (Can-Cauich et al., 2019; Domínguez-Zárate et al., 2019).

5.2.3. Actividad inhibitoria de extractos *Brosimum alicastrum* sobre las enzimas digestivas de carbohidratos α -amilasa y α -glucosidasa

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2015, aproximadamente 1.6 millones de muertes fue causada por la diabetes, según las proyecciones para 2030 será la séptima causa de muerte en el mundo. Una estrategia terapéutica para el tratar la diabetes es disminuir la hiperglucemia postprandial (aumento de los niveles de glucosa en la sangre después de las comidas) (Vadivelan et al., 2019). Se ha demostrado que los compuestos fenólicos de los extractos vegetales juegan un papel importante en la inhibición de las actividades de enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, impidiendo que el almidón sea hidrolizado con reducción de la liberación de altos contenidos de azúcar.

Estudios realizados por algunos autores, menciona que el mecanismo de inhibición de las enzimas por los flavonoides es reversible no-competitivo (Prasad, Sharavanan, y Sivaraj, 2019). Sin embargo, es un tema complejo que requiere un estudio más profundo debido a que los tipos de inhibición dependen del compuesto específico utilizado. En cuanto a la eficiencia y mecanismo de acción no solo depende de la estructura química del compuesto bioactivo,

sino de las posibles interacciones que puedan tener con ciertas moléculas, como las proteínas (Takahama y Hirota, 2018) y de los mecanismos adicionales que provocan estas interacciones de los flavonoides o taninos a otros compuestos. Se ha descrito que ciertos alimentos ricos en flavonoides redujeron la hiperglucemia a través de mecanismo indirectos como la estimulación de la secreción de la insulina de las células β -pancreáticas, modulación de la liberación de la glucosa del hígado, activación de los receptores de insulina y la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina (Barrett, Farhadi, y Smith, 2018).

En este trabajo, se investigó la propiedad de inhibición de las enzimas mencionadas para los extractos E-CO₂-CO y E-SL. La figura 11 muestra el porcentaje de la actividad inhibitoria de extractos de ramón (E-CO₂-CO y E-SL) sobre la enzima α -amilasa aislada del páncreas porcino que hidroliza **enlaces α** del almidón 200 μ l al 1.5%. A medida que incrementó la cantidad de compuestos fenólicos en el ensayo también incrementó el valor de la inhibición de la enzima, alcanzando un 30% de inhibición al usar 3,500 μ g de compuestos fenólicos/ensayo, para el extracto E-CO₂-CO; mientras que el extracto obtenido por E-SL el mayor porcentaje de actividad fue 7% con 3,500 μ g de compuestos fenólicos/ensayo. Para ambos métodos, el porcentaje de inhibición fue menor en comparación al control positivo, acarbosa que presentó 80% en 10 μ g por ensayo. Se sabe que la acarbosa disminuye la absorción de carbohidratos en el intestino y es considerado como un fármaco coadyuvante en el tratamiento de la diabetes, por eso se utilizó como control positivo. De acuerdo con lo obtenido, los resultados no presentan correlación significativa con el contenido de compuestos fenólicos para los extractos de ramón.

La figura 12 muestra el porcentaje de inhibición de los extractos de ramón sobre la enzima α -glucosidasa, una enzima que hidroliza enlaces α -1,4 de carbohidratos y su inhibición es un prominente objetivo en el control de la diabetes mellitus no dependiente de la insulina. En el presente trabajo se observó que los extractos E-CO₂-CO con 100 y 500 μ g de compuestos fenólicos/ensayo (3% y 12 % de inhibición, respectivamente) también mostraron mayor actividad inhibitoria en comparación con los valores reportados para el extracto E-SL, usando 50 μ l de P-NPG; sin embargo, menores que los valores encontrados con los extractos con la acarbosa, ésta última muestra los valores de inhibición más alto.

En ambos ensayos se observa que el extracto E-CO₂-CO exhibe mayor inhibición de las enzimas que el extracto E-SL; este hecho puede ser explicado porque el extracto obtenido por CO₂ supercrítico tiene mayor contenido de flavonoides y taninos hidrolizables reportados (tabla 11).

En una investigación bibliográfica exhaustiva, no se encontraron reportes de extractos de semillas obtenidos por CO₂ supercrítico y sus efectos sobre las enzimas digestivas. Sin embargo, trabajos de Wang et al. (2018) reportan que los flavonoides de hojas de lotus (*Nelumbo nucifera gaertn*), mostraron efectos sobre la inhibición de la α -amilasa hasta un 76% de actividad inhibitoria. Vadivelan et al. (2019) en sus trabajos reportan que además de los flavonoides, los taninos, ácidos fenólicos y saponinas de extractos de las hojas de *Asparagus racemosus* posiblemente sean los compuestos que hayan presentado actividad para inhibir la α -amilasa y α -glucosidasa. Por lo que se requieren más estudios experimentales para identificar al compuesto o compuestos que le dan la actividad bioactiva al extracto E-CO₂-CO con rendimiento bajo y estudiar su mecanismo de acción.

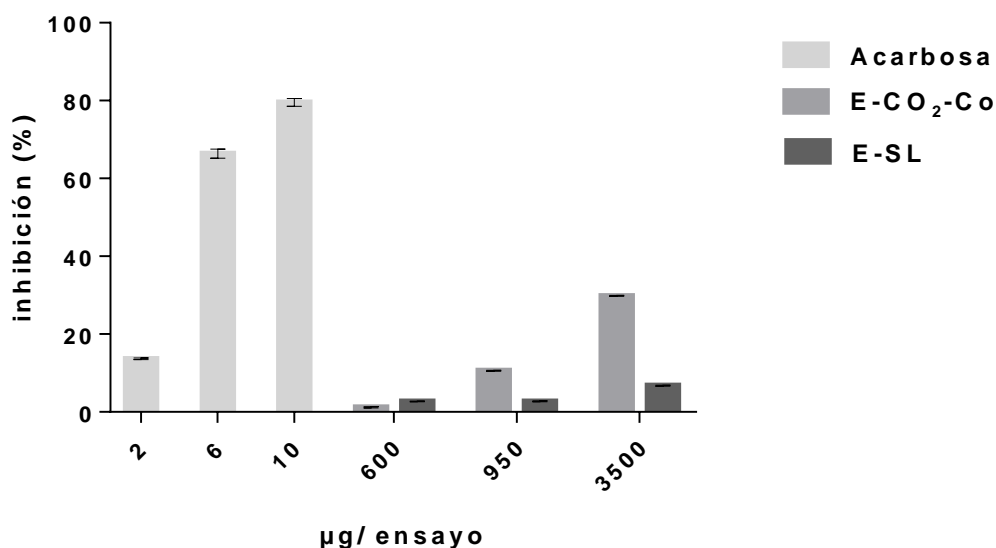


Figura 13. Porcentaje de inhibición in vitro de la actividad α -amilasa de las diferentes cantidades de acarbosa o compuestos fenólicos totales ($\mu\text{g}/\text{ensayo}$) del extracto de *B. alicastrum*.

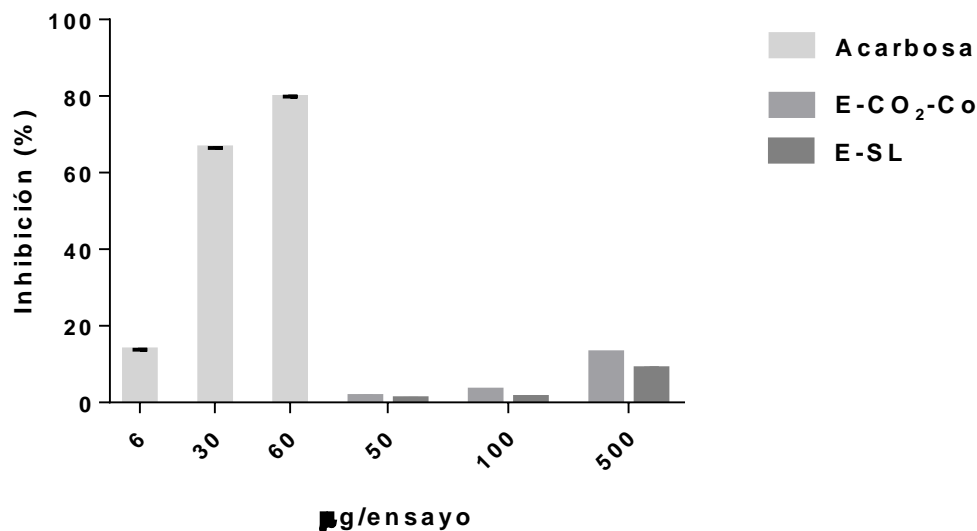


Figura 14. Porcentaje de inhibición in vitro de la actividad α -glucosidasa de las diferentes cantidades de acarbosa o fenólicas ($\mu\text{g}/\text{ensayo}$) de extracto de *B. alicastrum*.

5.2.4. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales de extractos de la harina *Brosimum alicastrum* por HPLC

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales de los extractos de la harina de *B. alicastrum* obtenidos en la segunda extracción, se llevó a cabo mediante un análisis por HPLC. Los contenidos de cada uno de los compuestos fenólicos identificados se muestran en la tabla 12, presentando valores significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) entre cada método. Ambos extractos (E-CO₂-Co y E-SL) se compararon en función del contenido de los compuestos fenólicos plenamente identificados con estándares auténticos. Dicha caracterización permitió identificar la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos de harina. De acuerdo con los perfiles cromatográficos (figuras 13 y 14), el CO₂ supercrítico fue más selectivo, ya que solo se lograron extraer aproximadamente 18 compuestos; mientras que la E-SL se obtuvo 30 compuestos, de los cuales solo se identificaron siete entre ácidos fenólicos y flavonoides.

La Tabla 12 muestra la composición individual de ácidos fenólicos y flavonoides identificados de cada método de extracción. El extracto crudo obtenido por E-SL resultó con el mayor contenido de ácido gálico, ácido clorogénico, catequina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido trans-cinámico y ácido sinápico en comparación con el extracto obtenido por E-CO₂-Co. Al comparar los perfiles en la misma escala, se observó que algunos de los compuestos identificados son comunes para ambos extractos, aunque en menor concentración para los extractos E-CO₂-Co. Es importante resaltar que el cromatograma E-CO₂-Co muestra un pico más alto a un tiempo de retención de 43 min a diferencia de la E-SL; sin embargo, este compuesto no fue posible identificar debido a la falta de estándares. De acuerdo con el tiempo de elución y la composición de la fase móvil, éste compuesto presenta característica de mediana a baja polaridad, tentativamente similar a un flavonoide (Seal, Chaudhuri, y Pillai, 2016). Este hecho, demuestra que el uso de CO₂ supercrítico es un método selectivo, obteniendo extractos con mayor pureza, que hace que sea una alternativa para la extracción de compuestos potentemente bioactivas.

Tabla 12. Compuestos fenólicos individuales de extractos de harina *Brosimum alicastrum* obtenidos por E-CO₂-Co y E-SL

| Número de compuesto | Compuestos fenólicos | Métodos de extracción | |
|---------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | E-CO ₂ -Co | E-SL |
| 1 | Ácido gálico | ND | 311.42 ± 26.65 ^b |
| 2 | Ácido clorogénico | 14.83±0.96 ^a | 507.65 ± 44.32 ^b |
| 3 | Catequina | ND | 248.72 ± 35.25 ^b |
| 4 | Ácido vanílico | 51.15 ± 2.97 ^a | 450 ± 17.10 ^b |
| 5 | Ácido cafeico | 4.15 ± 0.01 ^a | 44.15 ± 0.73 ^b |
| 6 | Ácido trans-cinámico | 8.03 ± 0.32 ^a | 48.29 ± 1.65 ^b |
| 7 | Ácido sinápico | 16.37 ± 2.82 ^a | 458.43 ± 41.54 ^b |

Los valores presentados son medias ± desviación estándar (n=3), expresados como (mg/ 100 g extracto seco)

Los ácidos fenólicos identificados en este trabajo concuerdan con los identificados previamente por Moo-Huchin et al. (2019) en extractos de harina de *B. alicastrum*. Por otro lado, Ozer, (2016) presenta resultados distintos para extractos ramón que fueron adquiridas en la empresa Maya Nut Institute. Este autor no reportó la presencia de ácido clorogénico, pero si la del ácido vanílico ácido gálico, ácido cafeico y otros compuestos como el p-hidroxibenzoico y epicatequina. La ausencia o presencia de ciertos compuestos de las semillas pueden atribuirse a la zona geográfica donde fueron recolectadas, al método utilizado para la obtención de sus extractos y por el tratamiento térmico aplicado a la nuez maya.

Por lo tanto, este estudio proporciona información nueva y relevante acerca de la composición bioactiva, su actividad antioxidante y enzimática de los extractos de *B. alicastrum*. Sin embargo, este aporte no es lo suficiente para conocer la composición bioactiva y las actividades o propiedades que pudiera tener la harina de ramón, por lo que se sugiere realizar una investigación más profunda sobre la caracterización de la harina de ramón.

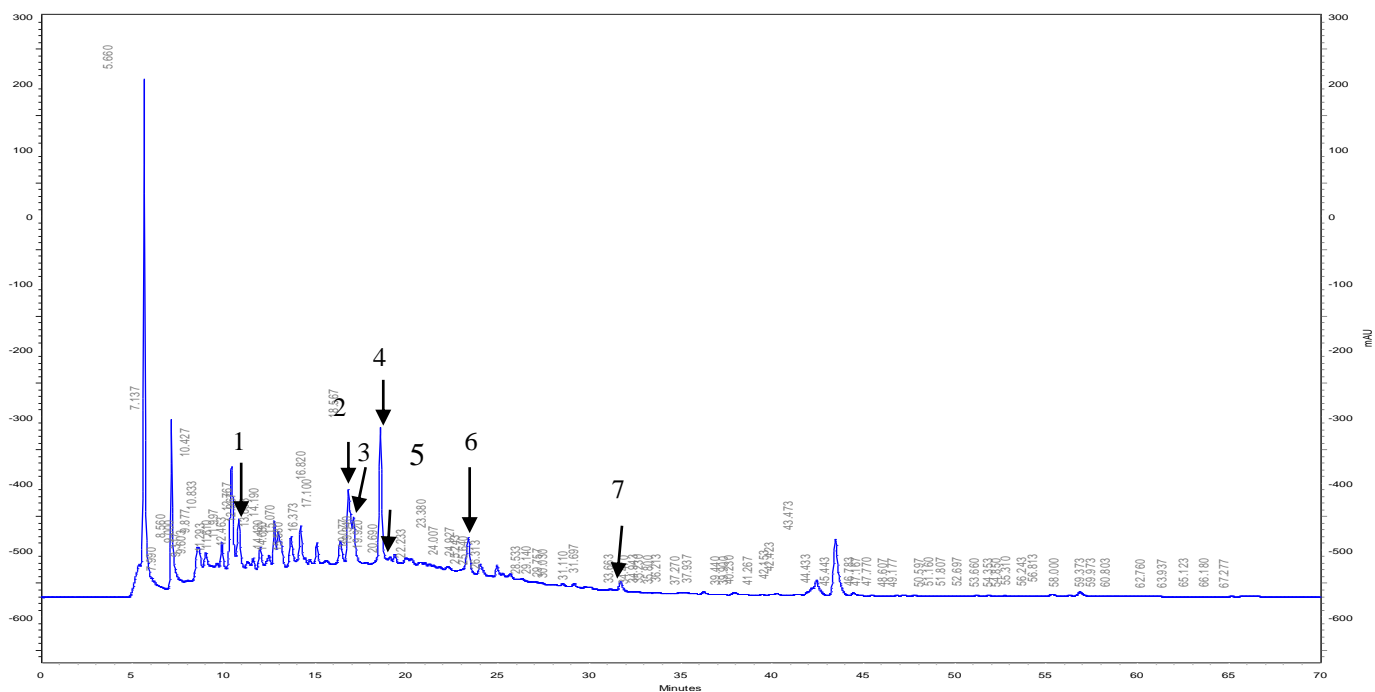


Figura 15. Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto harina de *B. alicastrum* obtenidos por E-SL. (1) a. gálico, (2) a. clorogénico, (3) catequina, (4) a. vanílico, (5) a. cafeico (6) sinápico, (7) a. trans-cinámico

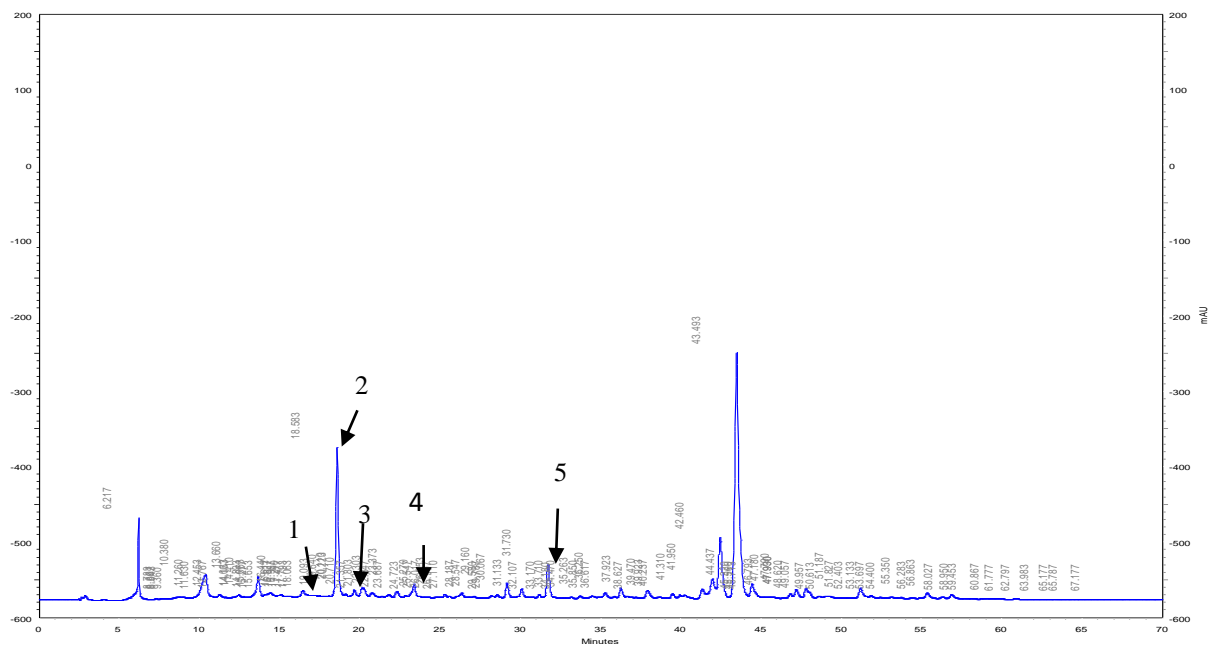


Figura 16. Perfil cromatográfico de compuestos fenólicos individuales presentes en el extracto de harina de *B. alicastrum* obtenidos por $E\text{-CO}_2\text{-Co}$. (1) *a. clorogénico*, (2), *a. vanílico*, (3) *a. Cafeico* (4), *sinápico*, (5) *a. trans-cinámico*.

6. CONCLUSIONES

-El tiempo dinámico de 30 min permitió obtener la mayor cantidad de extraíbles en el sistema de extracción CO₂ supercrítico de la harina de ramón.

-El extracto de harina obtenido solo con CO₂ supercrítico presentó bajo rendimiento de extracción; se caracterizó por su contenido de β -caroteno, luteína, α y γ -tocoferol, fucosterol, estigmasterol y escualeno. La mayoría de estos compuestos cuantificados no han sido reportados en la harina de *Brosimum alicastrum*.

-A medida que aumenta el contenido de etanol como cosolvente en la extracción CO₂ supercrítico también incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales de la harina. Por tanto, en este trabajo el uso de etanol absoluto como cosolvente aumenta el rendimiento de extracción.

-Cuando se comparan ambos extractos (E-CO₂-CO y E-SL), el extracto de harina obtenido con CO₂ supercrítico con cosolvente resultó con mayor contenido de flavonoides totales, taninos hidrolizables, mayor actividad antioxidante (ABTS⁺) e inhibición de las dos enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa.

-El contenido de flavonoides y ácidos fenólicos individuales fue mayor en el extracto E-SL en comparación con el extracto E-CO₂-CO. Sin embargo, se observó la presencia de un pico (no identificado) más alto a un tiempo de retención de 43 min en el extracto CO₂ supercrítico. Probablemente, este compuesto (individual o en sinergia) no identificado en el extracto sea el responsable de la propiedad de inhibición de las enzimas.

-En este trabajo se confirma que la cuantificación de compuestos antioxidantes de la harina es dependiente del método de extracción a utilizar. Además, el utilizar métodos distintos favorece un análisis más detallado de la composición de la harina de ramón, un producto vegetal poco caracterizado. Este hallazgo, ha permitido tener un mayor conocimiento de la composición en compuestos bioactivos de la harina de semilla de *Brosimum alicastrum*, útil para promover su uso como ingrediente bioactivo para la formulación y desarrollo de alimentos y aperitivos funcionales.

7. ANEXOS

7.1.Extracción sólido-líquido

Se pesó 1 g de harina en un tubo de ensayo con tapa, se añadió 44 ml de etanol/agua (1:1, v/v), se llevó a baño maría a 75.8°C con agitación constante durante 48 min, posteriormente se filtró y centrifugó a 2500 rpm por durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y finalmente se secó en la estufa a 60°C por 48 h o hasta obtener un extracto seco (Camaal-Chuc et al., 2018).

7.2. Análisis de Compuestos Bioactivos

7.2.1. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido CFT se determinó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Moo-Huchin et al. (2014). 50 µL del extracto (0.1386 g de extracto E-CO₂-CO y 0.1804 g E-SL fueron reconstituidos en 4 ml y 10 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v, respectivamente) se mezcló con 3 mL de agua destilada y 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N en agua destilada). Se dejó reposar 5 min, 750 µL de Na₂CO₃ (20% v/v H₂O) y 950 µL de agua destilada fueron añadidos a los extractos; después se dejaron reposar por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra fue leída a 765 nm con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. Los resultados fueron expresados como g equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de extracto seco. La curva de calibración se realizó con concentraciones entre 100 y 1000 ppm de ácido gálico (figura 15).

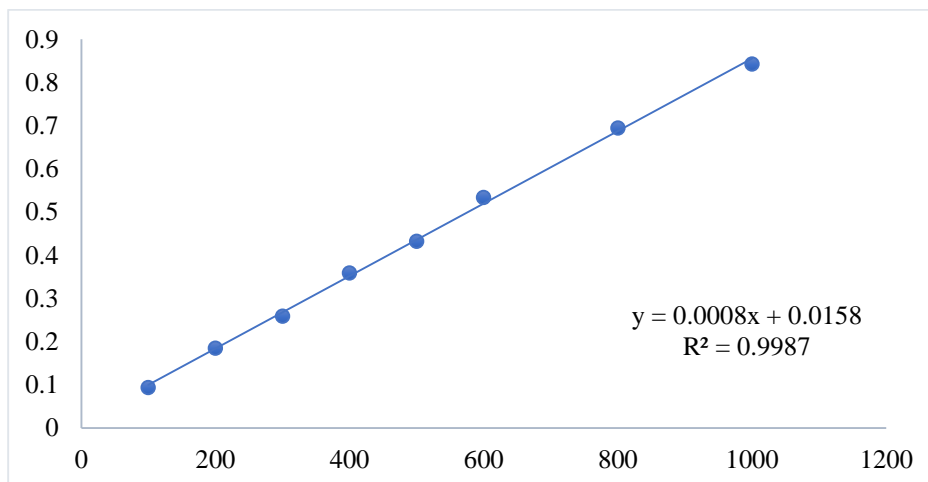


Figura 17. Curva de calibración de contenido de fenoles totales.

7.2.2. Contenido de flavonoides totales

Se determinó mediante el método descrito por Moo-Huchin et al., (2014). Donde 1 mL del extracto (0.1386 g de extracto E-CO₂-CO y 0.1804 g de E-SL fueron reconstituidos en 4 ml y 10 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v, respectivamente) se mezcló con 4 mL de agua destilada y 300 µL de nitrito de sodio NaNO₂ (5 % v/v, H₂O) se dejó reposar por 5 min. Después del tiempo de equilibrio, 300 µL de la disolución de cloruro de aluminio AlCl₃ (10 % v/v, metanol) se adicionó a la mezcla. Después de 1 min, se agregó 2 ml de hidróxido de sodio NaOH 1M y 2.400 ml de agua destilada, la mezcla fue homogenizada y leída a una absorbancia de 415 nm con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. La concentración de flavonoides totales se expresó como g equivalentes de quercetina (EQ)/ 100 g de extracto seco. La curva de calibración se realizó con concentraciones entre 25-1000 ppm de quercetina (figura 16).

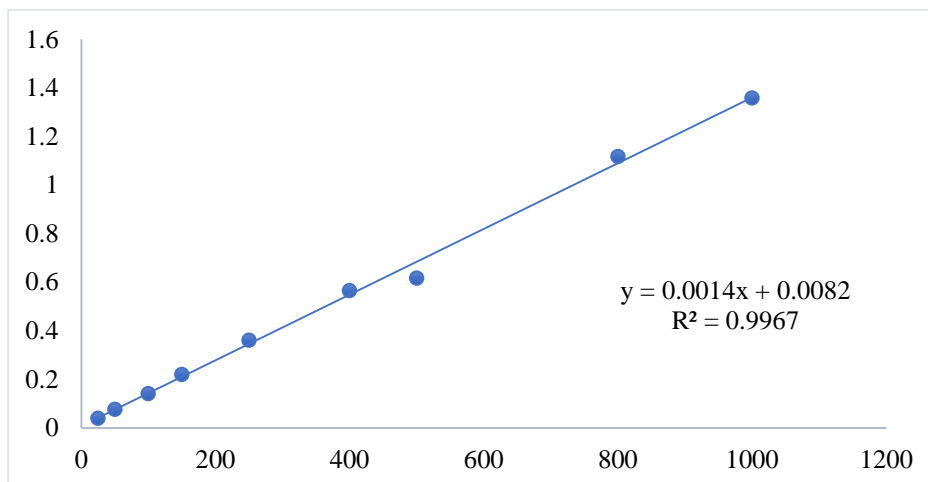


Figura 18. Curva de calibración de flavonoides.

7.2.3. Taninos condensados

El contenido de taninos condensados de extractos de *Brosimum alicastrum* se determinó por el método vanillin-HCL descrito por Selcuk y Erkan (2015). 0.5 mL de extracto (0.1386 g de extracto E-CO₂-CO y 0.1804 g de E-SL fueron reconstituidos en 4 ml y 10 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v, respectivamente) fue mezclado con 3 mL de reactivo de vanillin (4%, en metanol). A esta mezcla se adicionó 1.5 mL de HCl concentrado y nuevamente fue mezclado con un vórtex. La solución fue mantenida en la obscuridad por 15 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 500 nm. Se utilizó un blanco preparado usando el mismo procedimiento, pero reemplazando 0.5 mL de extracto con el disolvente utilizado en la extracción. Se prepararon seis diferentes concentraciones de soluciones de catequina (5-300 ppm) para la curva de calibración (figura 17). Los resultados fueron expresados como g equivalentes a catequina por 100 g de extracto seco.

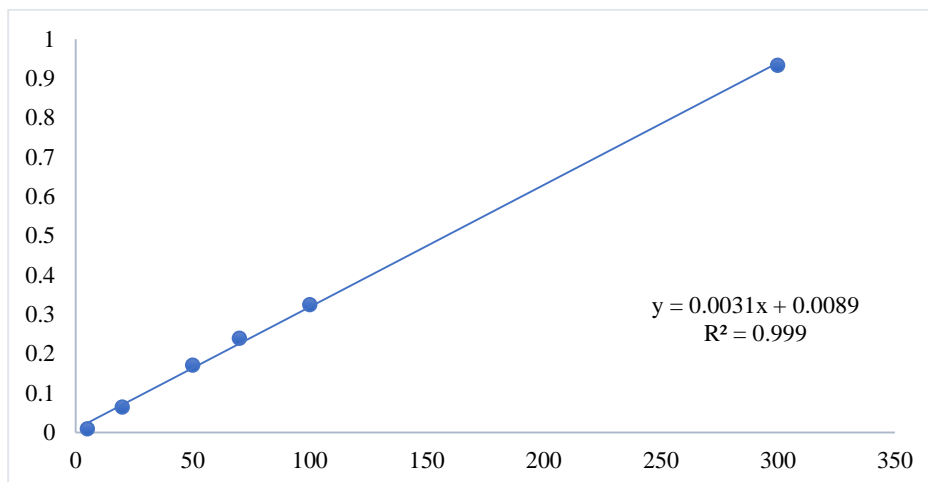


Figura 19. Curva de calibración de taninos condensados.

7.2.4. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizados de los extractos etanólicos fueron determinados por el método descrito por Willis y Allen (1998) modificado por Cam y Hisil (2010). 1 mL de extracto (0.1386 g de E-CO₂-CO y 0.1804 g de E-SL fueron reconstituídos en 4 ml y 10 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v, respectivamente) fue mezclado con 5 mL de 2.5% KIO₃ en un tubo de ensayo con un vórtex. Se determinó la absorbancia de la mezcla con color rojo a 550 nm contra un blanco de agua. Se prepararon seis diferentes concentraciones de soluciones de ácido tánico (500-5000 ppm) para la curva de calibración (figura 18). El resultado final fue expresado como g equivalente a ácido tánico por g de extracto seco.

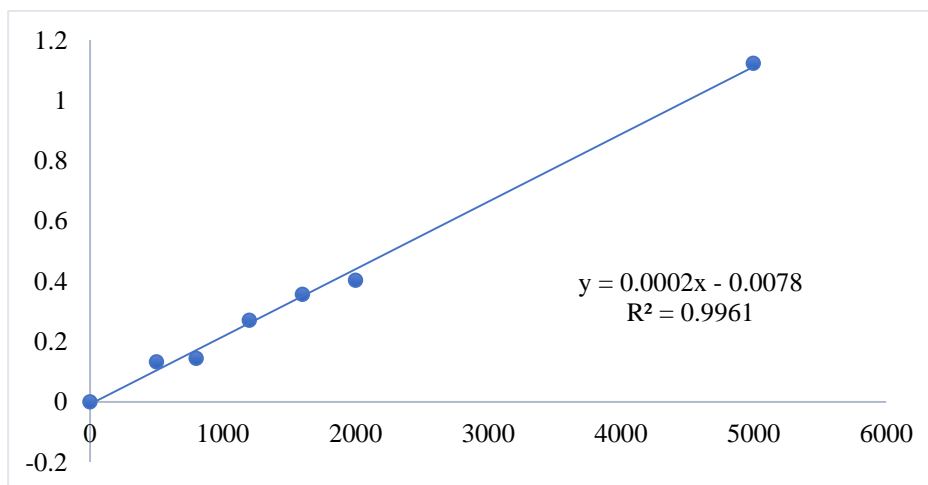


Figura 20. Curva de calibración de taninos hidrolizables.

7.3. Análisis de compuestos bioactivos por HPLC

7.3.1. Compuestos fenólicos individuales

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos descrito por Can-Cauich, Sauri-duch, Moo-huchin, y Cuevas-glory, (2019) fue realizado con el HPLC-1220 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un inyector manual (Loop de 20 μ l) y un detector UV-Vis. El instrumento fue controlado por el OpenLAB paquete de software CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). Los extractos se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita en las secciones 4.4.1 y 7.1. En este trabajo, solo el extracto E-SL, se evaporó a 50°C en un evaporador rotatorio (Buchi R - 205, Labortechnik, Suiza). 1.0011g de extracto seco E-SL y 0.0397 g de E-CO₂-CO fueron reconstituidos en 3 ml de metanol más 3 ml con agua HPLC. Los extractos se centrifugaron y se filtraron con filtros Millipore de 0.45 μ m (GMF Whatman). Los extractos se analizaron con las siguientes condiciones cromatográficas: columna Nucleosil C18 (250 mm, 4,6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μ m); temperatura de la columna, 25°C; longitud de onda de detección, 280 nm; velocidad de 0.5 ml / min; volumen de inyección de 20 μ l; la fase móvil fue agua/ácido fórmico (99: 1, v / v; disolvente A) y acetonitrilo grado HPLC (disolvente B); la fase móvil se filtró bajo vacío sobre filtros de membrana de 0.45 μ m y desgasificado por inmersión en un baño de ultrasonidos durante 15 min.; el gradiente lineal fue 2-100% (B) de 0 a 70 min; y la velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.5 mL/min, mantenida durante 70 min. Después de cada corrida, la columna se equilibró durante 10 min bajo las condiciones iniciales. Se preparó una mezcla estándar añadiendo con precisión la cantidad de cada compuesto (2 mg) (Ácido gálico, ácido clorogénico, catequina, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido ferúlico, quercetina, ácido trans-cinámico y 4-Hidroxicinámico) a un matraz aforado de 25 ml y se diluyó hasta la marca con metanol HPLC. Se obtuvo una curva de calibración por estándar (diferentes concentraciones de 0.001-0.1mg/mL). Todas las soluciones se filtraron y se inyectaron en el HPLC para determinar sus tiempos de retención. Las curvas de calibración fueron calculadas usando un análisis de regresión lineal utilizando el valor r^2 ($r^2=0,99$) para todas las muestras. Los compuestos fenólicos en las muestras se

identificaron de acuerdo con su orden de elución y comparando sus tiempos de retención con estándares auténticos. La concentración de compuestos fenólicos fue expresada como mg/100 g extracto seco.

7.3.2. Carotenoides

La identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC se llevó a cabo usando la metodología descrita por Can-cauich et al., (2019). El sistema HPCL y la columna utilizada fueron los mismos descritos en la sección 7.3.1.

0.2476 g de extracto seco (E-CO₂-CO) se reconstituyó en 2 ml de n- hexano grado HPLC y se filtró a través de una membrana Millipore Millex-HV de 0,45 µm. Las condiciones de detección fueron las siguientes: el volumen de inyección fue de 20 µL; la longitud de onda fue de 476 nm; la temperatura fue de 25 ° C; La fase móvil fue acetonitrilo: 1-butanol (7: 3, v / v, disolvente A) y cloruro de metileno (disolvente B). El gradiente de elución fue: 99% (A) y 1% (B) inicialmente, aumentando al 4% (B) en 20 minutos y el caudal de la fase móvil fue de 1 ml / minuto, mantenido durante 20 minutos.

La cuantificación se llevó a cabo con la preparación de una curva de calibración para cada estándar disuelto en una solución de metanol: cloruro de metileno (0,001 y 0,01 mg / ml). Las curvas de calibración se obtuvieron utilizando un análisis de regresión lineal, con una linealidad con un valor de $R^2 = 0,99$. Los carotenoides en el extracto de la muestra se identificaron según el orden de elución y comparando el tiempo de retención con estándares auténticos. El contenido de carotenoides (β -caroteno y luteína) se calculó con la interpolación de las áreas de los picos correspondientes. El resultado final fue expresado como mg/100 g extracto seco.

7.3.3. Tocoferoles

Los 0.2476 g del extracto seco (E-CO₂-CO) se reconstituyó en 2 ml n-hexano para identificar los tocoferoles; α -tocoferol y γ -tocoferol.

La identificación y cuantificación de los tocoferoles de los extractos se realizó con el mismo sistema de HPLC y la columna de la sección 7.3.1. La condición de detección fueron las

siguientes: volumen de inyección fue 20 μL a una longitud de onda de 292 nm; temperatura de determinación fue 30° C y la fase móvil usada fue acetonitrilo: metanol: cloruro de metileno (60:38:2, v/v, A). El sistema de operación fue un flujo de 0.2 ml/min. Se prepararon curvas de calibración para cada estándar mediante el análisis de diferentes concentraciones en un rango de 0.025 y 0.5 mg/mL. Todas las soluciones fueron filtradas e inyectadas en el Sistema HPLC para determinar los tiempos de retención. Las curvas de calibración fueron obtenidas usando un análisis de regresión lineal, ajustando a una linealidad con valor de $R^2=0.99$. Los tocoferoles en las muestras fueron identificados de acuerdo al orden de elución y por comparación del tiempo de retención con estándares (α -tocoferol y γ -tocoferol), su contenido se calculó por la interpolación de las áreas de los picos. Los resultados fueron expresados como mg/100 g extracto seco.

7.3.4. Esteroles y Escualeno

La identificación y cuantificación de los esteroles (fucosterol y estigmasterol) y escualeno en 0.2476 g de extracto seco (E-CO₂-CO) se realizó con el mismo sistema de HPLC y la columna utilizada en el análisis de compuestos fenólicos (anexo 7.3.1). Las condiciones de detección fueron las siguientes: volumen de inyección de 20 μL a una longitud de onda de 206 nm a una temperatura de 50° C; la fase móvil fue metanol: agua (98.5:1.5, v/v, A) (95:5, v/v, A). El sistema fue operado isocráticamente a un flujo de 1.5 mL/min. Los esteroles y el escualeno en las muestras fueron identificados de acuerdo al orden de elución y por comparación del tiempo de retención con estándares. La cuantificación de esteroles, se utilizó el colesterol como estándar interno. Para la cuantificación de escualeno, se utilizó una curva de calibración mediante un análisis de regresión lineal, ajustado a una linealidad con valor de $R^2=0.99$ realizada con soluciones estándar de escualeno (Supelco, Sigma) (Can-cauich et al., 2019). Los resultados fueron expresados como mg/100 g extracto seco.

7.4. Actividad antioxidante

7.4.1. Ensayo DPPH

Para determinar la capacidad de captación de radicales libres DPPH de los extractos se utilizó la metodología descrita por Moo-Huchin et al., (2014) modificado por Can-cauich et al., (2017). La solución stock se preparó mezclando 2.5 mg de radical DPPH con 100 mL de metanol puro dejándolo agitar por 30 min o hasta ajustar a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 con el mismo disolvente a 515 nm. Tras ajustar el blanco con metanol, una alícuota de 100 μ L de extracto (0.1007 g de E-CO2-CO se reconstituyó en 5.5 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v y 1.0011 g de E-SL en 6ml de metanol acuoso 1:1, v/v) fue añadido a 3.9 mL de solución de DPPH. La disminución de la absorbancia a 515 nm fue medido a intervalos de 1 min por 5 min y luego cada 5 min hasta lograr la estabilidad utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. El porcentaje de inhibición se calculó como $(\text{absorbancia}_{\text{control}} - \text{absorbancia}_{\text{muestra}}) / \text{absorbancia}_{\text{control}} * 100$ y el resultado fue expresado como mM equivalentes a Trolox (ET)/ 100 g extracto seco, usando una curva de calibración con concentraciones de 200 a 1200 μ M ET (figura 19).

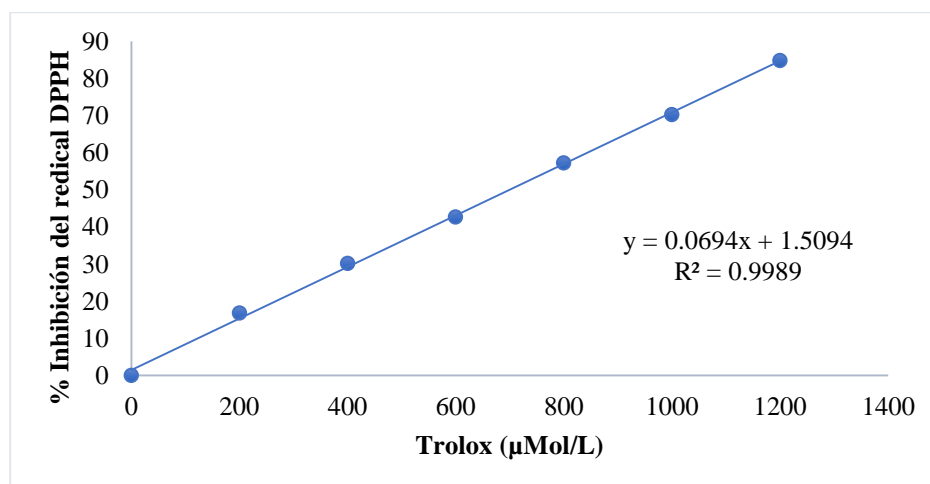


Figura 21. Curva de calibración de DPPH.

7.4.2. Ensayo ABTS

Se determinó empleando el método descrito por Moo-Huchin et al., (2014) modificado por Can-cauich et al., (2017) El catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se generara mediante la mezcla de 19.2 mg de

ABTS \bullet^+ con 5 ml de agua destilada y 88 μ L de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (0.0378 g/mL en agua destilada). La solución se homogeniza y se incuba en oscuridad a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ C$) durante 18 h; entonces 1 mL de esta solución de ABTS \bullet^+ se diluirá en 100 mL de etanol. El radical fue ajustado a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Tras ajustar el blanco con etanol. Posteriormente en una cubeta de espectro de 4 ml, se adiciono 3970 μ L de solución de ABTS \bullet^+ y 30 μ L de extracto (0.1007 g extracto seco, E-CO₂-CO se reconstituyó en 5.5 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v). La disminución de la absorbancia a 734 nm fue medido a intervalos de 1 min por 10 min y luego cada 5 min hasta que las variaciones de absorbancia esté en torno a 0.003/minuto, lo cual indicaría que la reacción se ha completado, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. El porcentaje de inhibición fue calculada como: $(\text{absorbancia}_{\text{control}} - \text{absorbancia}_{\text{muestra}} / \text{absorbancia}_{\text{control}}) * 100$ y el resultado se expresara como mM equivalentes a Trolox (ET)/ 100 g extracto seco, mediante una curva de calibración con concentración de 100 a 3000 μ M ET (figura 20). En caso de tener una concentración alta de antioxidantes, se diluyó 10 veces.

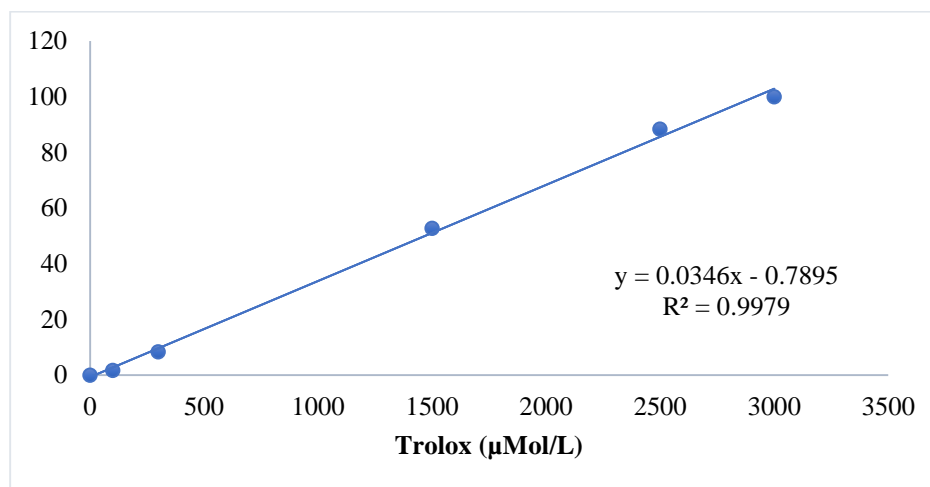


Figura 22. Curva de calibración del ABTS.

7.4.3. Ensayo Poder reductor

La evaluación del poder reductor del ion férrico (Fe^{3+}) se determinó mediante la metodología descrita por Can-cauich et al., (2017). Se tomó 2.5 ml de extracto (0.1007 g extracto seco, E-CO₂-CO se reconstituyó en 5.5 ml de EtOH acuoso 1:1, v/v) se mezcló con 2.5 ml de buffer de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y con 2.5 ml de ferricianuro de potasio (1% v/v, H₂O). Después

de un período de incubación de 20 min (55 °C), a la mezcla reaccionante se le adicionaron 2.5 ml de ácido tricloroacético (10% v/v, H₂O) y se homogeniza con un vórtex. De esta solución se tomaron 5 ml y se mezclaron con 5 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 1 ml cloruro férrico (0.1% v/v, H₂O), el cual se dejaron reposar por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. El incremento de esta variable da a entender un aumento en el poder reductor de los extractos. Para la cuantificación de la actividad antioxidante poder reductor se utilizó una curva de calibración concentraciones de 5 a 40 µM vitamina C /L (figura 21). El resultado fue expresado como mg ácido ascórbico/ 100 g de extracto seco,

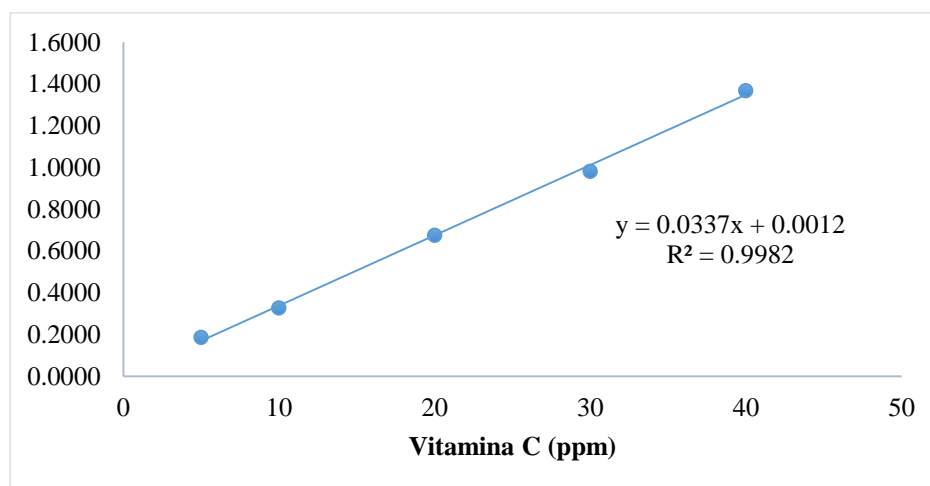


Figura 23. Curva de calibración del Poder Reductor.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, M. A., de Lima Brito Polari, I., de Albuquerque Meireles, B. R. L., de Lima, A. E. A., da Silva Junior, J. C., de Andrade Vieira, É., ... de Magalhães Cordeiro, A. M. T. (2019). Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chemistry*, 275, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.133>
- Altaf, M. M., Sajjad, M., & Khan, A. (2019). *Diversity of Bioactive Compounds and Their Therapeutic Potential. New Look to Phytomedicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00002-1>
- Alvarez, M. V., Cabred, S., Ramirez, C. L., & Fanovich, M. A. (2019). Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds. *Journal of Supercritical Fluids*, 143(July 2018), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.012>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
- Barrett, A. H., Farhadi, N. F., & Smith, T. J. (2018). Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.002>
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). *Overview of polyphenols and their properties. Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813572-3.00001-4>
- Bose, B., Tripathy, D., Chatterjee, A., Tandon, P., & Kumaria, S. (2019). *Secondary metabolite profiling, cytotoxicity, anti-inflammatory potential and in vitro inhibitory activities of Nardostachys jatamansi on key enzymes linked to hyperglycemia, hypertension and cognitive disorders. Phytomedicine* (Vol. 55). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.08.010>
- Bot, A., Unilever, R., & Vlaardingen, D. (2018). Phytosterols, 17–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21626-0>
- Budge, S. M., & Barry, C. (2019). MethodsX Determination of squalene in edible oils by transmethylation and GC analysis, 6, 15–21.
- Cadena-carrera, S., Parolo, D., Bella, A., Cé, R., Cruz, B., Miguel, J., & Hense, H. (2019). The Journal of Supercritical Fluids Biological activity of extracts from guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes .) obtained by supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent, 152. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104543>
- Can-cauich, C. A., Sauri- Duch, E., Betancur-ancona, D., Chel-guerrero, L., González-aguilar, G. A., Cuevas-glory, L. F., ... Moo-huchin, V. M. (2017). Tropical fruit peel powders as functional ingredients : Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity, 37, 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.028>
- Can-cauich, C. A., Sauri- Duch, E., Moo-huchin, V. M., & Cuevas-glory, L. F. (2019). iEffect of

- extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.153>
- Carter, C. T. (2015). Chemical and Functional Properties of Brosimum Alicastrum Seed Powder (Maya Nut , Ramón Nut), 165.
- Castro-lópez, C., Ventura-sobrevilla, J. M., González-, M. D., Rojas, R., Ascacio-valdés, J. A., Aguilar, C. N., & Martínez-ávila, G. C. G. (2017). Autonomous University of Coahuila , Department of Food Science and Technology . Autonomous University of Nuevo Leon , Laboratory of Chemistry and Biochemistry Email addresses. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>
- Chen, D., Huang, C., & Chen, Z. (2019). Biomedicine & Pharmacotherapy A review for the pharmacological effect of lycopene in central nervous system disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111(October 2018), 791–801. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.151>
- Chiu, H., Shen, Y., Venkatakrishnan, K., & Wang, C. (2018). *Food for Eye Health : Carotenoids and Omega-3 Fatty Acids*. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21740-X>
- Colantuono, A., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2016). In vitro bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies. *Food and Function*, 7(10), 4247–4258. <https://doi.org/10.1039/c6fo00942e>
- da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- Daraee, A., Ghoreishi, S. M., & Hedayati, A. (2019). *Supercritical CO2 extraction of chlorogenic acid from sunflower (Helianthus annuus) seed kernels: modeling and optimization by response surface methodology*. *Journal of Supercritical Fluids* (Vol. 144). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.001>
- Dekdouk, N., Malafrente, N., Russo, D., Faraone, I., Tommasi, N. De, Ameddah, S., ... Milella, L. (2015). Phenolic Compounds from Olea europaea L . Possess Antioxidant Activity and Inhibit Carbohydrate Metabolizing Enzymes In Vitro, 2015.
- Delgado-zamarreño, M. M., Fernández-prieto, C., & Pérez-martín, L. (2015). Determination of tocopherols and sitosterols in seeds and nuts by. *FOOD CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.083>
- Domínguez-zárate, P. A., Maillard-berdeja, K. V., & Totosaus, A. (2019). Propiedades tecnofuncionales del aislado proteico y de harina de semilla de ramón (Brosimum alicastrum) RESUMEN: ABSTRACT: Palabras clave: Brosimum alicastrum , ramón , propiedades tecnofuncionales , aislado proteico , harina . Key words : Brosimum alicastrum , maya nut , tecnofunctional properties , protein isolate , flour . Área : Cereales , leguminosas y oleaginosas . INTRODUCCIÓN, 4, 1–6.
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
- El-akabawy, G., & El-sherif, N. M. (2019). Biomedicine & Pharmacotherapy Zeaxanthin exerts protective effects on acetic acid-induced colitis in rats via modulation of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111(January), 841–851.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.001>
- Espinosa-pardo, F. A., Martínez, J., & Martínez-correa, H. A. (2014). Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO₂.
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., & Jorjani, M. (2018). SC. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.012>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Foods, C., Montemurro, M., Pontonio, E., & Rizzello, C. G. (2019). *Quinoa Flour as an Ingredient to Enhance the Nutritional and Functional Features of Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814639-2.00036-8>
- González, F., Hernández, N., Cooper, B., Núñez, L., & Reyes, M. (2015). Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. *Vertientes*, 18(1), 16–21. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2015/vre151c.pdf>
- Goyeneche, R., Fanovich, A., Rodríguez Rodríguez, C., Nicolao, M. C., & Di Scala, K. (2018). Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity. *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.004>
- Hataminia, F., Farhadian, N., Karimi, M., & Ebrahimi, M. (2018). A novel method for squalene extraction from pumpkin seed oil using magnetic nanoparticles and exploring the inhibition effect of extracted squalene on angiogenesis property. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 0, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.017>
- Herchi, W., Harrabi, S., Sebei, K., Rochut, S., Boukhchina, S., Pepe, C., & Kallel, H. (2009). Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(10), 880–885. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.001>
- Horassani, M. E. A. S. (2005). Phytosterol Composition of Nuts and Seeds Commonly Consumed in the United States, 9436–9445.
- Irakli, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Industrial Crops & Products Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds : Oleuropein , phenolic acids , phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops & Products*, 124(July), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.070>
- Islam, M. (2014). In vitro α -amylase inhibitory activity and in vivo hypoglycemic effect of methanol extract of *Citrus macroptera* Montr. fruit, 4(6), 473–479. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1173>
- Jiao, G., & Kermanshahi, A. (2018). SC. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.042>
- Jie Zhang, Zheng Sun, Peipei Sun, T. C. and F. C. (2014). Function potential in human health, (c). <https://doi.org/10.1039/c3fo60607d>
- Kadri, S., El Ayed, M., Mabrouk, M., Limam, F., Elkahoui, S., Aouani, E., & Mokni, M. (2019). Characterization, anti-oxidative effect of grape seed powder and in silico affinity profiling of polyphenolic and extra-phenolic compounds for calpain inhibition. *Journal of Pharmaceutical*

- and Biomedical Analysis*, 164, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.003>
- Khalid, M., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Huang, D. (2018). Author ' s Accepted Manuscript related applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.027>
- Khokhar, S., Roe, M., & Swan, G. (2012). Journal of Food Composition and Analysis Carotenoid and retinol composition of South Asian foods commonly consumed in the UK. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.11.005>
- Kim, S., & Karadeniz, F. (n.d.). *Biological Importance and Applications of Squalene and Squalane. Marine Medicinal Foods* (1st ed., Vol. 65). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00014-7>
- Kong, D., Wu, J., Sun, S., Wang, Y., & Xu, P. (2014). A Comparative Study on Antioxidant Activity and Inhibitory Potential against Key Enzymes Related to Type 2 Diabetes of Four Typical Teas, 2(9), 652–658. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-9-20>
- Lagarda, M. J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1486–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.052>
- Larisa, L., Marques, M., Pier, G., Aparecida, B., Aguiar, A., Stéfano, A., ... Mello, P. De. (2016). Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds : Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chemistry*, 212, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.028>
- Li, D., Sun, L., Yang, Y., Wang, Z., Yang, X., Zhao, T., ... Guo, Y. (2019). Young apple polyphenols postpone starch digestion in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*, 56(January), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.009>
- Liu, Y., Qi, Y., Chen, X., He, H., Liu, Z., Zhang, Z., ... Ren, X. (2018). PT. *Food Research International*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.038>
- López-Padilla, A., Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., & Fornari, T. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of *Calendula officinalis*: Kinetic modeling and scaling up study. *Journal of Supercritical Fluids*, 130(March), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.033>
- Lu, J., Boughner, E. C., Liotta, C. L., & Eckert, C. A. (2002). Nearcritical and supercritical ethanol as a benign solvent: Polarity and hydrogen-bonding. *Fluid Phase Equilibria*, 198(1), 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(01\)00754-3](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(01)00754-3)
- Lúcia, I., Barzotto, M., Andressa, K., Antônio, E., Sene, A. C., Newton, S., & Vieira, L. (2019). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves : Influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143(June 2018), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.003>
- M., M., C., S.-G., & S., D. B. (2009). El ramón: fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *Biodiversitas*, 7–10.
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299(March). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
- Maleti, E. (2019). Extraction Methods of Polyphenol From Grapes : Extractions of Grape Polyphenols. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00010-4>
- Martinez-correa, H. A., Bitencourt, R. G., Carolina, A., Kayano, A. V, Magalhães, P. M., Costa, F.

- T. M., & Cabral, F. A. (2016). Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO₂, ethanol and water. *Industrial Crops & Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.007>
- Martínez-Correa, H. A., Cabral, F. A., Magalhães, P. M., Queiroga, C. L., Godoy, A. T., Sánchez-Camargo, A. P., & Paviani, L. C. (2012). Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. *Journal of Supercritical Fluids*, *63*, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.12.016>
- Martínez-Correa, H. A., Paula, J. T., Kayano, A. C. A. V., Queiroga, C. L., Magalhães, P. M., Costa, F. T. M., & Cabral, F. A. (2017). Composition and antimalarial activity of extracts of *Curcuma longa* L. obtained by a combination of extraction processes using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, *119*, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.017>
- Martínez-Navarrete, N., del Mar Camacho Vidal, M., & José Martínez Lahuerta, J. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, *12*(2), 64–68. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(08\)75623-2](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(08)75623-2)
- Martínez, A. J. M., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2015). Enviar Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos.
- Mazzutti, S., Maria, C., Oliveira, M., Regina, S., & Ferreira, S. (2019). PT SC. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.013>
- Mendoza, D. (2015). Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus* Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extracto, (July).
- Merino, J., Masana, L., Guijarro, C., Ascaso, J., Lagares, M., & Civeira, F. (2014). Recomendaciones para la utilización clínica de los alimentos enriquecidos con fitoesteroles/fitoestanoles en el manejo de la hipercolesterolemia. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, *26*(3), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2014.03.001>
- Mohamed, E. A. H., Yam, M. F., Siddiqol, M. J. A., Asmawi, M. Z., Sadikun, A., Ang, L. F., ... Chan, S. H. (2012). Potent alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 176. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-176>
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., & Cabral, F. A. (2016). the supercritical carbon dioxide in the extraction of phenolics. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.07.019>
- Moo-Huchin, V. M., Canto-Pinto, J. C., Cuevas-Glory, L. F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., & Betancur-Ancona, D. (2019). Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chemical Papers*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00716-x>
- Moo-Huchin, Víctor M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vázquez, E., De Lourdes Vargas Y Vargas, M., ... Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, *152*, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.013>

8. Referencias bibliográficas

- Moreira, S. A., Alexandre, E. M. C., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2019). Effect of emergent non-thermal extraction technologies on bioactive individual compounds profile from different plant materials, *115*(May 2018), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.046>
- Mouritsen, O. G., Bagatolli, L. A., Duelund, L., Garvik, O., Ipsen, J. H., & Cohen, A. (2017). Effects of seaweed sterols fucosterol and desmosterol on lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, *205*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.03.010>
- Mykhailenko, O., Kovalyov, V., Goryacha, O., & Ivanauskas, L. (2019). Phytochemistry Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus *Crocus*: A review. *Phytochemistry*, *162*(February), 56–89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.004>
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., & Food, A. (2018). Carotenoids, 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21608-9>
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2017). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus Reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>
- Ozer, H. K. (2016). ce pt us cr t, *2912*(November). <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1252389>
- Panja, P. (2017). Ac ce p te d cr t. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Paulsen, B. S. (2010). Highlights through the history of plant medicine. *Bioactive Compounds in Plants - Benefits and Risks for Man and Animals*, *50*(November 2008), 18–29.
- Pimentel-moral, S., Borrás-linares, I., & Lozano-sánchez, J. (2018). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *156*, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.050>
- Prado, J. M., Vardanega, R., Debieu, I. C. N., Angela, M., Meireles, D. A., Gerschenson, L. N., ... Chemat, S. (2015). *Conventional extraction. Food Waste Recovery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800351-0/00006-7>
- Prasad, B. J., Sharavanan, P. S., & Sivaraj, R. (2019). Efficiency of *Oryza punctata* extract on glucose regulation: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities. *Grain & Oil Science and Technology*, *2*(2), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.04.007>
- Puga, C. D., & Zubir, S. (2017). Polifenoles y capacidad antioxidante in vitro de extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana*, (April 2016).
- Radojkovi, M., Zekovi, Z., Vidovi, S., Mandi, A., Mi, A., Radojkovi, M., & Zekovi, Z. (2016). *Accepted Manuscript*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.004>
- Rameshkumar, R., Satish, L., Pandian, S., Rathinapriya, P., Sagina, A., Shanmugaraj, G., ... Ramesh, M. (2018). Industrial Crops & Products Production of squalene with promising antioxidant properties in callus cultures of *Nilgiranthus ciliatus*. *Industrial Crops & Products*, *126*(June), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.031>
- Rao, P. S., Mohan, G. K., & Srinivas, P. (2016). In vitro alpha-amylase inhibition and in vivo antioxidant potential of *Momordica dioica* seeds in Streptozotocin-induced oxidative stress in diabetic rats. *SAUDI JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.010>

- Ras, R. T., & Trautwein, E. A. (2017). Consumer purchase behaviour of foods with added phytosterols in six European countries : Data from a post-launch monitoring survey, *110*(May), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.003>
- Reddy, L. H., & Couvreur, P. (2009). Squalene : A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *61*(15), 1412–1426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.005>
- Reder, A., Souza, C. De, Guedes, A. R., Manoel, J., Rodriguez, F., Bombardelli, M. C. M., & Corazza, M. L. (2018). The Journal of Supercritical Fluids Extraction of *Arctium Lappa* leaves using supercritical CO₂ + ethanol : Kinetics , chemical composition , and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*, *140*(April), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.011>
- Rodr, R. (2013). Analytical Methods. <https://doi.org/10.1039/c3ay26295b>
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, *412*(5–6), 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.034>
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., ... Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, *70*, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Rosales-garcía, T., Jiménez-martínez, C., Cardador-martínez, A., Campo, S. T. M., Galicia-luna, L. A., Téllez-medina, D. I., & Dávila-ortiz, G. (2017). Squalene Extraction by Supercritical Fluids from Traditionally Puffed *Amaranthus hypochondriacus* Seeds, 2017.
- S, A. N., Sr, R. K., Nair, A. S., & Baby, S. (2017). Graphical abstract PT. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.011>
- Saini, R. K., & Keum, Y. (2018). Carotenoid extraction methods : A review of recent developments. *Food Chemistry*, *240*(April 2017), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, *82*, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.025>
- Santos, Ê. R. M., Oliveira, H. N. M., Oliveira, E. J., Azevedo, S. H. G., Jesus, A. A., Medeiros, A. M., ... Sousa, E. M. B. D. (2017). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of *Rumex Acetosa* L . roots : Yield , composition , kinetics , bioactive evaluation and comparison with conventional techniques. *The Journal of Supercritical Fluids*, *122*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.11.019>
- Seal, T., Chaudhuri, K., & Pillai, B. (2016). Identification and Quantification flavonoids in three wild edible plants , *Houttuynia cordata* , *Solanum gilo* and *Solanum kurzii* of North - Eastern region in India , using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *8*(8), 859–867.
- Seetaloo, A. D., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy Kannan, R. R., & Mahomoodally, M. F. (2019). Potential of traditionally consumed medicinal herbs, spices, and food plants to inhibit key digestive enzymes geared towards diabetes mellitus management — A systematic review. *South African Journal of Botany*, *120*, 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.015>
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., & Ramaswamy, H. S. (2018). SC. *LWT - Food Science*

- and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>
- Shen, Y., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). In Vitro and In Vivo Antioxidant activity of Polyphenols Extracted from Black Highland Barley. *FOOD CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.083>
- Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Ruiz-Mercado, C. A., Lope-Navarrete, M. C., & Rocha-Uribe, J. A. (2019). Extraction yield and kinetic study of *Lippia graveolens* with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.018>
- Sovová, H., Nobre, B. P., & Palavra, A. (2016). Modeling of the kinetics of supercritical fluid extraction of lipids from microalgae with emphasis on extract desorption. *Materials*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/ma9060423>
- Sp, L., & Hadira, O. (2011). In vitro Inhibitory Potential of Selected Malaysian Plants Against Key Enzymes Involved in Hyperglycemia and, 77–86.
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2019). Polyphenols of *Myrica faya* inhibit key enzymes linked to type II diabetes and obesity and formation of advanced glycation end-products (in vitro): Potential role in the prevention of diabetic complications. *Food Research International*, 116, 1229–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.010>
- SUSTENTABLE LA REGIÓN SUR DEL ESTADO DE YUCATÁN Victor Hernandez Santos, D. DE, Munguía Gil, A., & Adolfo Monforte Méndez, G. (2015). Caracterización De La Producción Con Árboles De Ramón (*Brosimum Alicastrum Sw.*) Y Sus Derivados Para El, 1–24.
- Takahama, U., & Hirota, S. (2018). Interactions of flavonoids with α -amylase and starch slowing down its digestion. *Food and Function*, 9(2), 677–687. <https://doi.org/10.1039/c7fo01539a>
- Tong, T., Li, J., Ko, D. O., Kim, B. S., Zhang, C., Ham, K. S., & Kang, S. G. (2014). In vitro antioxidant potential and inhibitory effect of seaweed on enzymes relevant for hyperglycemia. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 2037–2044. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0277-z>
- Uribe, J. A. R., Perez, J. I. N., Kaul, H. C., Rubio, G. R., & Alcocer, C. G. (2011). Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 56(2), 174–178. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.12.007>
- Vadivelan, R., Gopala Krishnan, R., & Kannan, R. (2019). Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 9(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.10.004>
- Valle, M., Robert, P. S., & Fuente, J. C. De. (2018). Cosolvent effect of ethanol on the solubility of lutein in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.08.012>
- Veggi, P. C., Prado, J. M., Bataglion, G. A., Eberlin, M. N., & Meireles, M. A. A. (2014). Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril L.*) bark by supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 89, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.016>
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). The Journal of Supercritical Fluids Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology GRAPHICAL ABSTRACT. *The Journal of Supercritical*

- Fluids*, 133(August 2017), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
- Vu, D. C., Lei, Z., Sumner, L. W., Coggeshall, M. V., & Lin, C. (2019). Journal of Food Composition and Analysis Identification and quantification of phytosterols in black walnut kernels, 75(April 2018), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.016>
- Vu, H. T., Scarlett, C. J., & Vuong, Q. V. (2018). Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods*, 40(July 2017), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>
- Wang, Mengmeng, Zhang, L., Wu, X., Zhao, Y., Wu, L., & Lu, B. (2019). LWT - Food Science and Technology Quantitative determination of free and esterified phytosterol profile in nuts and seeds commonly consumed in China by SPE / GC – MS. *LWT - Food Science and Technology*, 100(August 2018), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.077>
- Wang, Mengting, Shi, J., Wang, L., Hu, Y., Ye, X., Liu, D., & Chen, J. (2018). Inhibitory kinetics and mechanism of flavonoids from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaf against pancreatic α -amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 2589–2596. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.035>
- Wong, C. H., Gan, S. Y., Tan, S. C., Gany, S. A., Ying, T., Gray, A. I., ... Phang, S. M. (2018). Fucosterol inhibits the cholinesterase activities and reduces the release of pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide and amyloid-induced microglial cells.
- Wresdiyati, T., Diah, S. S. A., Winarto, A. D. I., & Febriyani, V. (2015). Alpha-Glucosidase Inhibition and Hypoglycemic Activities of *Sweitenia mahagoni* Seed Extract. *Institut Pertanian Bogor*, 22(2), 73–78. <https://doi.org/10.4308/hjb.22.2.73>
- Xiao, H., Yao, Z., Peng, Q., Ni, F., Sun, Y., Zhang, C. X., ... Zhong, Z. X. (2016). Extraction of Squalene from camellia oil by silver ion complexation. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.05.041>
- XU, C. C., WANG, B., PU, Y. Q., TAO, J. S., & ZHANG, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721–731. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6)
- Yuan, Y., Xu, X., Jing, C., Zou, P., Zhang, C., & Li, Y. (2017). Microwave assisted hydrothermal extraction of polysaccharides from *Ulva prolifera*: Functional properties and bioactivities. *Carbohydrate Polymers*, (August), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.061>
- Zaharudin, N., Staerk, D., & Dragsted, L. O. (2019). Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. *Food Chemistry*, 270(July), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.142>
- Zaidi, H., Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Debbache, N., Pacheco, R., Serralheiro, M. L., & Araujo, M. E. (2019). Biological properties of phenolic compound extracts in selected Algerian honeys—The inhibition of acetylcholinesterase and α -glucosidase activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 25(November 2018), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.11.008>