



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Química

**EFFECTO DE ENZIMAS COMERCIALES SOBRE LA LIBERACIÓN DE
COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES Y
EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES**

Tesis que presenta:

JOSÉ GABRIEL BERNAL JASSO

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal**

Comité Tutorial

Tutor: Dr. Fidel Guevara Lara

Asesora: Dra. Nora Lilia Vasco Méndez

Asesor: Dr. Juan Jáuregui Rincón

Aguascalientes, Ags., Noviembre de 2018

CARTAS DE LIBERACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

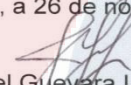
M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

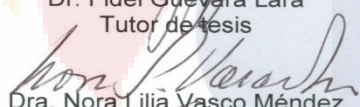
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **JOSÉ GABRIEL BERNAL JASSO** con ID 226266 quien realizó la tesis titulada **EFFECTO DE ENZIMAS COMERCIALES SOBRE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre”
Aguascalientes, Ags., a 26 de noviembre de 2018.


Dr. Fidel Guevara Lara
Tutor de tesis


Dra. Nora Lilia Vasco Méndez
Asesor de tesis


Dr. Juan Jauregui Rincón
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

JOSE GABRIEL BERNAL JASSO
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"EFECTO DE ENZIMAS COMERCIALES SOBRE LA LIBERACION DE COMPUESTOS FITOQUIMICOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES Y EVALUACION DE SUS PROPIEDADES FUNCIONALES"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 26 de noviembre de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

A **mi familia** por creer y haber estado para mí en todo momento.

A mi tutor, el **Dr. Fidel Guevara Lara** por todos sus sabios consejos, por haber compartido sus conocimientos y por su valiosa guía en la realización de este trabajo de tesis.

A mis asesores de tesis, al **Dr. Juan Jáuregui Rincón** y a la **Dra. Nora Lilia Vasco Méndez** por todos sus consejos y recomendaciones.

A la **M. en C. Ma. Lorena Sandoval Cardoso** por su gran apoyo, consejos y ayuda en el trabajo de laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio, a **Zitlaly, Michelle, Juan Manuel** por brindarme su amistad y estar conmigo en aquellos momentos difíciles.

A la **M. en C. Itzel Mireya Gutiérrez Ruiz**, quien, con su valiosa guía, me apoyó de sobremanera y sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo de tesis.

Al **Dr. Arturo Valdivia Flores** y a la **M. en C. Erika Janet Rangel Muñoz**, quienes con todo gusto me facilitaron el uso de sus equipos.

A mis amigos los **M. en C. Leobardo González** y **Alfonso Maximiliano Claros** por brindarme su valiosa amistad.

A la **L. Q. A. Liliana López Guerrero** por su gran apoyo y cariño incondicional y quien cada que la necesité siempre estuvo para mí.

Y finalmente al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.



DEDICATORIA

A MIS PADRES Y A MI HERMANO

Por ser una parte fundamental en mi día a día y todos mis logros son de ellos también.

A MI TÍO CLAUDIO†

Por haber sido una persona que siempre me enseñó con su ejemplo y el cómo se puede salir adelante día a día con trabajo duro, responsabilidad y esfuerzo.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Compuestos fenólicos	1
1.1.1 Definición.....	1
1.2 Clasificación de compuestos fenólicos	1
1.2.1 Flavonoides	3
1.2.2 No Flavonoides	4
1.3 Subproductos Agroindustriales	6
1.4 Métodos de extracción de antioxidantes en subproductos agroindustriales.....	9
1.4.1 Métodos convencionales	9
1.4.2 Métodos no convencionales	11
1.4.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	12
1.4.2.2 Extracción por campo eléctrico pulsado (PEF).....	13
1.4.2.3 Extracción por medio de líquidos presurizados	14
1.4.2.4 Extracción por medio de fluidos supercríticos (SFE)	14
1.4.2.5 Extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada.....	16
1.4.2.6 Destilación molecular.....	17
1.4.2.7 Extracción asistida por enzimas (EAE).....	17
1.4.2.7.1 Beneficios de la extracción asistida por enzimas	22
1.4.2.7.2 Desarrollo del proceso para la extracción asistida por enzimas.....	22
1.4.2.7.3 Preparaciones fibrolíticas comerciales	24
1.5 GUAYABA.....	25
1.5.1 Subproductos de la guayaba.....	26
1.6 COLIFLOR	27
1.6.1 Subproductos de coliflor	28
1.7 HUITLACOQUE	29
1.7.1 Descripción del huitlacoche	29
1.7.2 Compuestos fenólicos del huitlacoche	31
1.7.3 Subproductos de huitlacoche.....	33
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	35

4. OBJETIVO GENERAL	35
5. OBJETIVOS PARTICULARES	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 Obtención de subproductos de guayaba, coliflor y huitlacoche.....	35
6.2 Preparaciones enzimáticas comerciales	36
6.3 Secado y molienda de las muestras	36
6.4 Medición de actividades enzimáticas en las preparaciones comerciales	38
6.5 Determinación de proteína en las muestras enzimáticas.....	41
6.6 Determinación de humedad.....	42
6.7 Extracción de compuestos fenólicos	42
6.8 Contenido de fenoles totales	42
6.9 Flavonoides	43
6.10 Taninos condensados	43
6.11 Taninos hidrolizables	44
6.12 Evaluación del poder reductor por el método de FRAP	44
6.13 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del DPPH.....	45
6.14 Establecimiento de las condiciones enzimáticas.....	45
6.15 Análisis Estadístico	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1 Actividades enzimáticas de las preparaciones fibrolíticas evaluadas.	49
7.2 Contenido de humedad.....	53
7.3 Compuestos polifenólicos extraíbles en las muestras de subproductos agroindustriales y medición de su capacidad antioxidante.....	53
7.4 Compuestos polifenólicos no extraíbles (taninos condensados e hidrolizables) en las muestras de subproductos agroindustriales y medición de su capacidad antioxidante.....	58
7.5 Experimento previo en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales	64
7.6 Aplicación de MSR con un diseño central compuesto (DDC) sobre subproducto de guayaba	68
8. CONCLUSIONES	76
9. RECOMENDACIONES	77
10. ANEXOS	78
11. REFERENCIAS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del fenol. 1

Figura 2. Estructura química de flavonoides2

Figura 3. Estructura química de no flavonoides.3

Figura 4. Compuestos bioactivos encontrados en matrices vegetales formando interacciones con redes lignocelulósicas 18

Figura 5. Extracción asistida por enzimas de compuestos bioactivos de una fuente vegetal24

Figura 6. Planta de guayaba (*Psidium guajava*).25

Figura 7. Coliflor (*Brassica oleracea* Var. Boytris).....28

Figura 8. Características del huitlacoche, agallas sobre los granos de maíz inducidas por el hongo fitopatógeno *U. maydis*30

Figura 9. Subproducto de guayaba después de someterlo a proceso de secado y molienda37

Figura 10. Subproducto de coliflor utilizado en los ensayos.....37

Figura 11. Subproducto de huitlacoche utilizado en los ensayos38

Figura 12. Comparación de medias de las diferentes actividades enzimáticas evaluadas en las dos preparaciones fibrolíticas comerciales.....51

Figura 13. Contenido de fenoles totales solubles de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando DPPH como radical libre y método FRAP.56

Figura 14. Contenido de taninos condensados de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando la técnica de FRAP.....60

Figura 15. Contenido de taninos hidrolizables de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando DPPH como radical libre.63

Figura 16. Contenido de fenoles en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales.....65

Figura 17. Contenido de flavonoides en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales.....67

Figura 18. Parámetros estimados ordenados para las diferentes respuestas evaluadas.71

Figura 19. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de compuestos fenólicos de subproducto de guayaba.72

Figura 20. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de flavonoides en subproducto de guayaba74

Figura 21. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de compuestos fenólicos de subproducto de guayaba.75

Figura 22.Curvas de calibración para los ensayos de A) xilanasas, B) exoglucanasas, C) β – glucosidasas, D) endoglucanasas y E) pectinasas.78

Figura 23. Curva de calibración de BSA79

Figura 24. Curva de calibración de fenoles solubles totales.....79

Figura 25. Curva de Calibración de Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) Usando DPPH Como Radical Libre80

Figura 26. Curva estándar de Catequina ensayo Flavonoides80

Figura 27. Curva estándar de Protoantocianidina ensayo Taninos condensados81

Figura 28. Curva estándar de Trolox ensayo FRAP.....81

Figura 29. Perfil de predicción para los modelos ajustados aplicando la función de deseabilidad y maximizando las tres variables de respuesta simultáneamente.83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de subproductos generados por la industria de procesamiento de frutas y verduras.....8

Tabla 2. Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraídos por diferentes disolventes. (Selvamuthukumaran & Shi, 2017). 11

Tabla 3. Propiedades críticas de varios solventes utilizados en SFE..... 15

Tabla 4. Estudios sobre el uso de tratamientos enzimáticos para liberar compuestos bioactivos naturales de matrices naturales.....20

Tabla 5. Estudios sobre el uso de tratamientos enzimáticos para liberar compuestos bioactivos naturales de matrices naturales. *Continuación*21

Tabla 6. Factores y niveles a usar en el diseño central compuesto con sus valores reales y codificados.46

Tabla 7. Diseño experimental con 26 corridas con los factores codificados y sus niveles de manera aleatoria para la extracción de compuestos bioactivos con enzimas usando el DDC.47

Tabla 8. Actividades enzimáticas de las dos preparaciones fibrolíticas comerciales analizadas.....50

Tabla 9. Porcentaje de humedad y porcentaje de sólidos en los subproductos evaluados...53

Tabla 10. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.55

Tabla 11. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.59

Tabla 12. Contenido de compuestos polifenólicos no extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.....62

Tabla 13. Contenido de flavonoides en el subproducto de guayaba después del tratamiento preliminar enzimático.65

Tabla 14. Contenido de flavonoides en el subproducto de guayaba después del tratamiento preliminar enzimático.66

Tabla 15. Diseño experimental con 26 corridas con los factores codificados y sus niveles de manera aleatoria para la extracción de compuestos bioactivos con enzimas usando el DDC con sus respectivas respuestas.69

Tabla 16. Resultados obtenidos para obtener las ecuaciones de regresión utilizando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1.70

Tabla 17. Análisis de varianza para compuestos fenólicos.....82

Tabla 18. Análisis de varianza para flavonoides82

Tabla 19. Análisis de varianza para medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre82

RESUMEN

Los subproductos agroindustriales debido a su composición son materiales ideales para realizar extracciones de compuestos bioactivos con enzimas degradadoras de polisacáridos. Las paredes celulares vegetales contienen polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectinas que actúan como barreras para la liberación de sustancias intracelulares. Algunas enzimas como la celulasa, la β -glucosidasa, la xilanas, la β -glucanasa y la pectinasa ayudan a degradar la estructura de la pared celular y despolimerizar los polisacáridos de la pared celular de la planta, facilitando la liberación de compuestos enlazados. Por lo tanto, estas enzimas han sido propuestas como herramientas para optimizar la extracción de compuestos a partir de la matriz vegetal.

En este estudio se evaluaron actividades de endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanas y pectinasa para dos enzimas comerciales: Promote® y Fibrozyme® con la finalidad de aplicarlas en subproductos agroindustriales. Según los resultados, Promote® obtuvo valores de $2.69 \pm 0.04 \mu\text{kat/mL}$ de muestra enzimática, $0.34 \pm 0.02 \mu\text{kat/mL}$ de muestra enzimática y $0.76 \pm 0.005 \mu\text{kat/mL}$ de muestra enzimática para las actividades de endoglucanasa, β -glucosidasa y pectinasa respectivamente, resultando ser mayores a las que obtuvo Fibrozyme®.

Después se llevó a cabo la caracterización nutracéutica de las fracciones de extractos polifenólicos extraíbles (contenido de fenoles y flavonoides) y no extraíbles (taninos condensados e hidrolizables), así como la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre y la metodología FRAP de subproductos agroindustriales de guayaba (*Psidium guajava*), coliflor (*Brassica oleracea* var. Botrytis) y huitlacoche (*Ustilago maydis*). Se encontró que en la mayoría de los ensayos el subproducto de guayaba mostró niveles mayores de fenoles solubles, flavonoides, taninos hidrolizables y condensados ($14.66 \pm 0.36 \text{ mg GAE/g bs}$, $4.95 \pm 0.23 \text{ mg eq. catequina/g bs}$, $26.84 \pm 0.18 \text{ mg GAE/g bs}$ y $230.19 \pm 4.92 \text{ mg PA/g bs}$, respectivamente), al compararlas con los subproductos de coliflor y huitlacoche. Mismo comportamiento tuvieron dichos extractos al evaluar su capacidad antioxidante por medio del uso del radical DPPH y FRAP (30.47 ± 0.39 y $24.40 \pm 0.43 \text{ mg eq. de Trolox/g bs}$, respectivamente).

Enseguida, se llevó a cabo la aplicación de las dos muestras enzimáticas fibrolíticas sobre el subproducto de guayaba. Se utilizó un tratamiento con Promote®, otro con Fibrozyme® y una combinación de ambas enzimas. Así mismo, se establecieron cuatro condiciones: pH 6, temperatura de 39 °C, concentración de enzima al 1.5 % p/p o p/v en BCF y cuatro tiempos de incubación (0.5, 1, 2 y 4 h) y se compararon con un control utilizando únicamente BCF pH 6, utilizándose como variables respuesta el contenido de fenoles y flavonoides. Se determinó estadísticamente que el tratamiento de 2 h utilizando Promote® fue el que mostró mejores resultados para flavonoides (5.67 ± 0.24 mg eq. catequina/g) y para fenoles (24.11 ± 0.38 mg eq. de ác. gálico/g).

Con base en los resultados del anterior apartado, se optó por utilizar la mezcla enzimática Promote® en el subproducto de guayaba. Para ello se utilizó la MSR con un diseño central compuesto (DDC) para desarrollar un modelo de predicción para optimizar las condiciones de pretratamiento con esta enzima comercial, a fin de obtener los mayores niveles de fitoquímicos posibles. Se evaluaron cuatro factores (concentración de enzima, pH, temperatura y tiempo de incubación) con cinco niveles codificados desde $-\alpha$, -1, 0, 1 y α , utilizando como variables de respuesta contenido de compuestos fenólicos (Y_1), contenido de flavonoides (Y_2) y medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre (Y_3). Se obtuvo que las condiciones óptimas para maximizar las tres respuestas evaluadas fueron temperatura de 40 °C, tiempo de 3 h, concentración de enzima de 2.5 % (v/v) y pH 7; con valores predichos por el modelo de contenido de compuestos fenólicos de 6.74 ± 1.24 mg eq de ác. gálico/g), contenido de flavonoides de 2.97 ± 0.22 mg eq de catequina/g y para la medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre un valor de 10.40 ± 1.55 mg eq de Trolox/g. La aplicación de la enzima comercial Promote® sobre el subproducto agroindustrial de guayaba liberó mayores niveles de compuestos fitoquímicos (fenólicos y flavonoides) con actividades funcionales (e.g. antioxidantes) importantes, en comparación con el control sin enzima.

ABSTRACT

The agro-industrial byproducts due to their composition are ideal materials for extractions of bioactive compounds with polysaccharide degrading enzymes. Plant cell wall polysaccharides such as cellulose, hemicellulose and pectins act as barriers for the release of intracellular substances. Some enzymes such as cellulase, β -glucosidase, xylanase, β -glucanase and pectinase help to degrade the cellular structure and depolymerize the polysaccharides of the plant cell walls, facilitating the release of the tightly bound compounds. Therefore, these enzymes have been proposed as tools to optimize the extraction of compounds from the plant matrix.

In this study, activities of endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, xylanase and pectinase were evaluated for two commercial enzymes: Promote® and Fibrozyme® with the purpose of applying them to agroindustrial by-products. According to the results, Promote® showed values of $2.69 \pm 0.04 \mu\text{kat} / \text{mL}$, $0.34 \pm 0.02 \mu\text{kat} / \text{mL}$ and $0.76 \pm 0.005 \mu\text{kat} / \text{mL}$ of enzymatic sample for the activities of endoglucanase, β -glucosidase and pectinase, respectively, resulting to be higher than those obtained for Fibrozyme®.

The nutraceutical characterization of fractions of extractable polyphenolic extracts (content of phenols and flavonoids) and non-extractables (condensed and hydrolysable tannins), as well as the antioxidant capacity of DPPH as a free radical and the FRAP production of agroindustrial by-products from guava (*Psidium guajava*), cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botrytis) and huitlacoche (*Ustilago maydis*), was carried out. It was found that in most of the evaluations, the guava by-product had higher levels of soluble phenols, flavonoids, hydrolysable and condensed tannins ($14.66 \pm 0.36 \text{ mg eq of gallic acid /g db}$, $4.95 \pm 0.23 \text{ catechin mg eq./g db}$, $26.84 \pm 0.18 \text{ mg eq of gallic acid /g db}$ and $230.19 \pm 4.92 \text{ mg PA/g db}$, respectively), when compared with the by-products of cauliflower and huitlacoche. A similar behavior was observed when those extracts were evaluated for their antioxidant capacity with the use of DPPH and FRAP radicals (30.47 ± 0.39 and $24.40 \pm 0.43 \text{ mg Trolox eq./g db}$, respectively).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

In view of these results, the application of the two enzymatic fibrolytic products on the guava by-product was carried out. A treatment with Promote® alone, another with Fibrozyme® alone and a combination of both enzymes, were used. Likewise, four conditions were established: pH 6, temperature of 39 °C, enzyme concentration at 1.5% w/w or w/v in BCF and four incubation times (0.5, 1, 2 and 4 h) and these were compared with a control consisting of BCF pH 6; phenols and flavonoids contents were used as response variables. It was statistically determined that the 2-hour treatment using Promote® showed better results for flavonoids (5.67 ± 0.24 mg eq catechin/g) and for phenols (24.11 ± 0.38 mg eq of gallic acid/g).

Based on the results of the previous section, the Promote® enzymatic mixture was used for its optimization in the guava by-product. For this, the RSM with a central composite design (CCD) was used to develop a prediction model to optimize the pretreatment conditions with this commercial enzyme, and in order to obtain the highest possible levels of phytochemicals. Four factors (enzyme concentration, pH, temperature and incubation time) were evaluated with five levels coded from $-\alpha$, -1, 0, 1 and α , using as response variables: content of phenolic compounds (Y_1), flavonoid content (Y_2) and measurement of antioxidant capacity using DPPH as free radical (Y_3). The optimal conditions to maximize the evaluated responses were temperature at 40 °C, reaction time during 3 h, enzyme concentration at 2.5% (v/v) and pH 7; with predicted values from the model of 6.74 ± 1.24 mg of gallic acid eq /g for phenolic compounds, 2.97 ± 0.22 mg of catechin eq/g for flavonoid content, and 10.40 ± 1.55 mg of Trolox eq/g for antioxidant capacity using DPPH as a free radical. The application of the commercial enzyme Promote® on the guava by-product released higher levels of phytochemical compounds (phenolics and flavonoids) with important functional (e.g. antioxidant) properties, in comparison with the control without enzyme.

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ACU Unidades de actividad de celulasa	GAE Equivalentes de ácido gálico
AOAC Association of Official Analytical Chemists	HD Hidrodestilación
BCF Buffer citrato-fosfato	IQF Individual quick freezing
bh base húmeda	MAE Extracción asistida por microondas
bs base seca	MSR Metodología de superficie de respuesta
BSA Albúmina sérica bovina	PEF Extracción por campo eléctrico pulsado
CMC Carboximetilcelulosa	PLE Extracción por líquido presurizado
DDC Diseño central compuesto	S.A. de C.V. Sociedad Anónima de Capital Variable
DE Desviación estándar	SFE Extracción por medio de fluidos supercríticos
DNS Ácido dinitrosalicílico	UI Unidades Internacionales
DPPH 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo	
EAE Extracción asistida por enzimas	
EAU Extracción asistida por ultrasonido	
FRAP Poder antioxidante reductor del hierro	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos fenólicos

1.1.1 Definición

Este tipo de compuestos contienen uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático. El fenol es la estructura en la que se basa todo el grupo. El anillo aromático en este caso es, por supuesto, el benceno (ver **Figura 1**). (Vermerris & Nicholson, 2006).

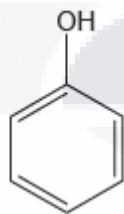


Figura 1. Estructura química del fenol (Vermerris & Nicholson, 2006).

Los fenoles son en muchos aspectos similares a los alcoholes de estructuras alifáticas donde el grupo hidroxilo está unido a una cadena de carbonos. El grupo hidroxilo fenólico, sin embargo, está influenciado por la presencia del anillo aromático. Debido al anillo aromático, el hidrógeno del hidroxilo fenólico es lábil, lo que hace que los fenoles sean ácidos débiles. Los polifenoles son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno; además, son los compuestos antioxidantes más abundantes en la dieta humana. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios característicos de las plantas y, como grupo, generalmente se encuentran como ésteres o glucósidos en lugar de compuestos libres (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Vermerris & Nicholson, 2006).

1.2 Clasificación de compuestos fenólicos

Se pueden considerar varias clases según el número de anillos de fenol y los elementos estructurales que unen estos anillos. En este contexto, se han adoptado tradicionalmente dos grupos principales de polifenoles, denominados flavonoides y no flavonoides. Como se

muestra en la **Figura 2**, el grupo flavonoides comprende los compuestos con una estructura C6-C3-C6: flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, flavan-3-oles, antocianidinas, isoflavonas y proantocianidinas (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

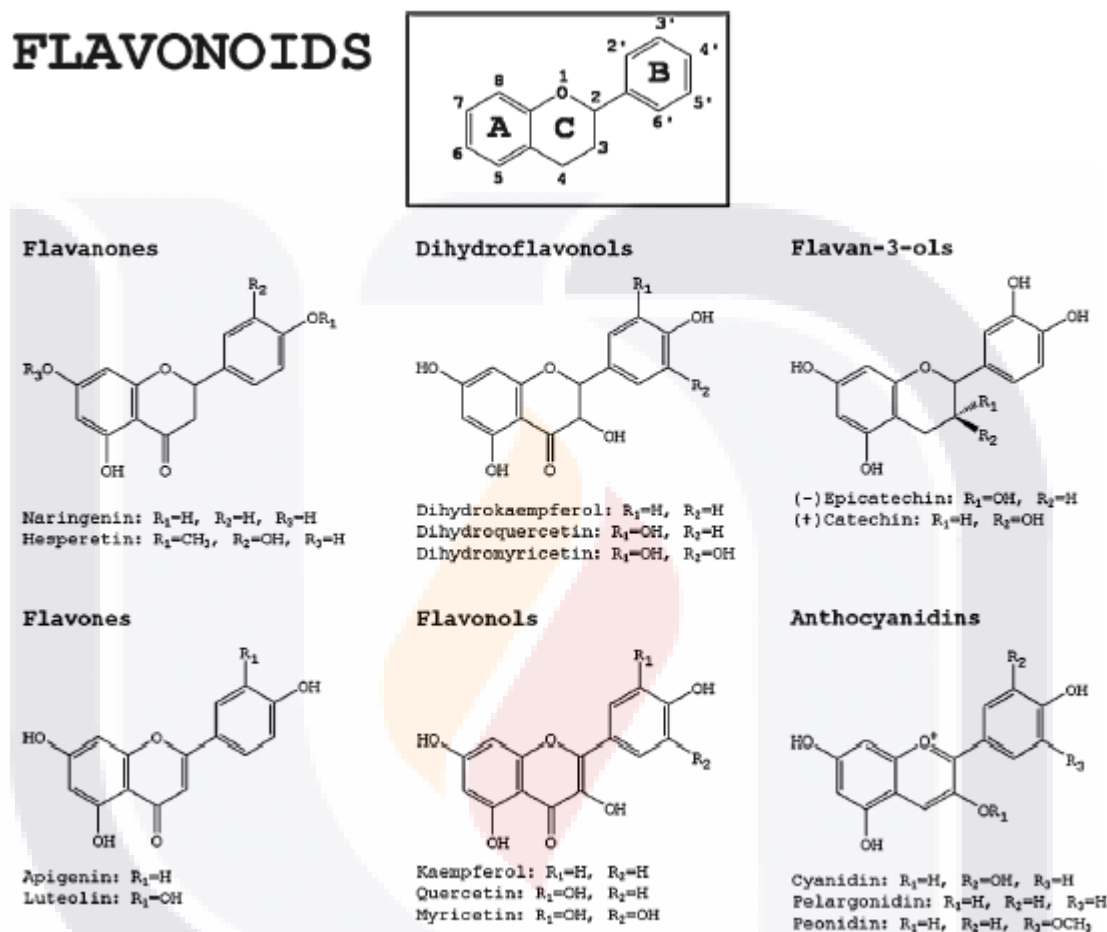
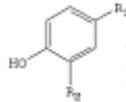


Figura 2. Estructura química de flavonoides. (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

El grupo de los no flavonoides se clasifica según el número de carbonos que tienen (**Figura 3**) y comprende los siguientes subgrupos: fenoles simples, ácidos benzoicos, taninos hidrolizables, acetofenonas y ácidos fenilacéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, chalconas, lignanos y secoiridoides (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

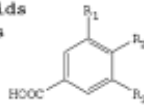
NONFLAVONOIDS

C6 Simple Phenols



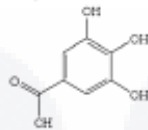
p-vinylguaiacol: $R_1=CH=CH_2$, $R_2=OCH_3$
Tyrosol: $R_1=CH_2CH_2OH$, $R_2=H$
Hydroxytyrosol: $R_1=CH_2CH_2OH$, $R_2=OH$

C6-C1 Phenolic acids and aldehyds

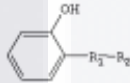


p-Hydroxybenzoic acid: $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=H$
Gallic acid: $R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=OH$
Syringic acid: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=OCH_3$
Protocatechuic acid: $R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=H$

(C6-C1)_n Hydrolyzable tannins

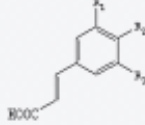


C6-C2 Acetophenones/Phenylacetic acids



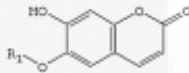
2-hydroxyacetophenone: $R_1=CO$, $R_2=CH_3$
2-hydroxyphenylacetic acid: $R_1=CH_2$, $R_2=COOH$

C6-C3 Hydroxycinnamic acids



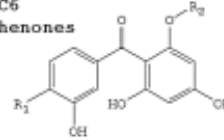
p-Coumaric: $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=H$
Caffeic acid: $R_1=OH$, $R_2=OH$, $R_3=H$
Ferulic acid: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=H$
Sinapic: $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=OCH_3$

C6-C3 Coumarins



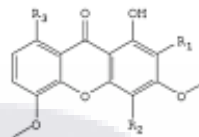
Scopoletin: $R_1=CH_3$
Escolin: $R_1=Glucoside$

C6-C1-C6 Benzophenones



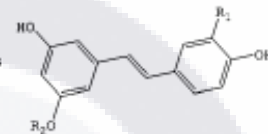
Maclurin: $R_1=OH$, $R_2=H$
2,4,6,3'-tetrahydroxybenzophenone:
 $R_1=H$, $R_2=H$
4,6,3',4'-tetrahydroxy-2-methoxybenzophenone: $R_1=CH$, $R_2=CH_3$

C6-C1-C6 Xanthenes



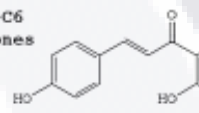
1,8-dihydroxy-3,5-dimethoxyxanthone:
 $R_1=H$, $R_2=H$, $R_3=OH$
1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone:
 $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$, $R_3=H$

C6-C2-C6 Stilbenes



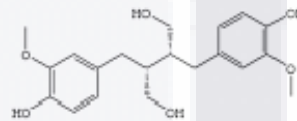
Resveratrol: $R_1=H$, $R_2=H$
Piceatannol: $R_1=OH$, $R_2=H$
Piceid: $R_1=H$, $R_2=Glucoside$

C6-C3-C6 Chalcones



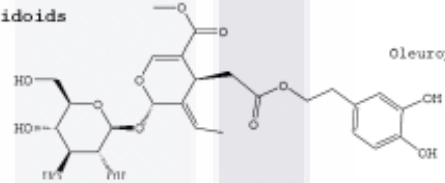
Chalconaringenin: $R_1=H$
Florizoin chalcone: $R_1=Glucoside$

(C6-C3)₂ Lignans



Secoisolaricresinol

Secoiridoids



Oleuropein

Figura 3. Estructura química de no flavonoides. (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

1.2.1 Flavonoides

Los *flavonoides* tienen un esqueleto de difenilpropanos, dos anillos de benceno (A y B) conectados por una cadena de tres carbonos que forman un anillo pirano cerrado con el anillo A de benceno. Los flavonoides en las plantas usualmente se presentan glicosilados principalmente con glucosa o ramnosa, pero también pueden unirse con galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico u otros azúcares. El número de restos glicosilo generalmente varía

de uno a tres; sin embargo, los flavonoides han sido identificados con cuatro y también cinco partes (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Los *flavonoles* y las *flavonas* tienen un doble enlace entre C2 y C3 en la estructura de los flavonoides y un átomo de oxígeno en la posición C4. Además, los flavonoles también tienen un grupo hidroxilo en la posición C3 (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Los *dihidroflavonoles* tienen la misma estructura que los flavonoles sin el doble enlace entre C2 y C3. A menudo se producen en asociación con los taninos en el duramen (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Vermerris & Nicholson, 2006).

La estructura de las *flavanonas* contiene un grupo cetona, pero no hay un enlace carbono-carbono insaturado. Los anillos A y B pueden sustituirse de manera análoga a las flavonas (Vermerris & Nicholson, 2006).

Las *isoflavonas* tienen la estructura C6-C3-C6, pero el anillo B está en una posición diferente en el heterociclo de oxígeno (Vermerris & Nicholson, 2006).

Las *antocianinas* se basan en la estructura de la sal de flavilio y son pigmentos solubles en agua en las plantas. Se encuentran en forma de glucósidos en plantas y alimentos de sus respectivas agliconas, llamadas antocianidinas. Los azúcares más comunes encontrados son la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa y fructosa, que están vinculados principalmente en la posición C3 como glucósidos y en C3, C5 como diglicósidos. También se ha observado glicosilación en las posiciones C7, C3' y C5' (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Flavan-3-oles o *flavanoles* tienen una cadena saturada de tres carbonos con un grupo hidroxilo en la posición C3. En los alimentos están presentes como monómeros o como proantocianidinas, que son flavanoles poliméricos (4 a 11 unidades) conocidos también como *taninos condensados*. En los alimentos nunca están glicosilados (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

1.2.2 No Flavonoides

Los *fenoles simples* y *ácidos fenólicos* son algunos de los fitoquímicos bioactivos más simples y consisten en un solo anillo fenólico sustituido. Los ácidos fenólicos (C6-C1) con

la misma estructura que los fenoles simples tienen un grupo carboxilo unido al benceno. Los ácidos cinámico y cafeico son representantes comunes de un amplio grupo de compuestos derivados de fenilpropano que se encuentran en el estado de oxidación más alto (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Cowan, 1999).

Los *taninos hidrolizables* se basan en ácido gálico, generalmente como ésteres múltiples con d-glucosa. Se conocen dos tipos: los galotaninos, que producen solo ácido gálico tras la hidrólisis, y los elagitaninos, que producen ácido elágico como producto de degradación común (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Cowan, 1999).

Las *acetofenonas* son cetonas aromáticas y los *ácidos fenilacéticos* tienen una cadena de ácido acético unido al benceno. Ambos tienen una estructura C6-C2 (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Los *ácidos hidroxicinámicos* se incluyen en el grupo fenilpropanoide (C6-C3). Se forman con un anillo aromático y una cadena de tres carbonos. Hay cuatro estructuras básicas: los ácidos cumáricos, ácidos caféicos, ácidos ferúlicos y ácidos sinápicos. En la naturaleza, generalmente están asociados con otros compuestos como el ácido clorogénico, que es el enlace entre el ácido cafeico y el ácido quínico (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Las *cumarinas* son sustancias fenólicas compuestas de anillos de benceno y α -pirona fusionados. Son responsables del olor característico del heno. A partir de 1996, al menos 1.300 han sido identificados (Cowan, 1999).

Las benzofenonas y las xantonas tienen la estructura C6-C1-C6. La estructura básica de la benzofenona es una difenil cetona, y la de la xantona es un 10-oxi-10H-9 oxaantraceno. Actualmente se sabe que existen más de 500 xantonas en la naturaleza, y aproximadamente 50 de ellos se encuentran en el mangostán con sustituyentes prenilo (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

Los *estilbenos* tienen una estructura C6-C2-C6. El resveratrol, el compuesto más conocido, contiene tres grupos hidroxilo en la estructura básica y se llama 3, 4', 5-trihidroxiestilbeno. En las plantas, el piceido, el glucósido del resveratrol, es el principal derivado del resveratrol. Los estilbenos están presentes en las plantas como isómeros *cis* o *trans*. Las formas *trans*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pueden ser isomerizadas a formas *cis* por radiación UV (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Vermerris & Nicholson, 2006).

Las *chalconas* tienen una cadena lineal C3 que conecta los dos anillos. La cadena C3 de chalconas contiene un doble enlace. En general, las plantas no acumulan chalconas. Después de su formación, la naringenina chalcona se isomeriza rápidamente por la enzima chalcona isomerasa para formar la flavanona, naringenina. Las chalconas más comunes que se encuentran en los alimentos son la floretina y su 2'-O-glucósido, la chalconaringenina y la arbutina (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009; Vermerris & Nicholson, 2006).

Los *lignan*os son dímeros u oligómeros que resultan del acoplamiento de monolignoles -*p*-cumaril alcohol, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, siendo el alcohol coniferílico el monolignol más común usado en la biosíntesis de lignanos. Los lignanos están presentes en helechos, gimnospermas y angiospermas. Se localizan en tallos leñosos y en semillas y desempeñan un papel como disuasor de insectos. Algunos de estos compuestos tienen propiedades medicinales (Vermerris & Nicholson, 2006).

Los *secoirido*ides son fenoles complejos producidos a partir del metabolismo secundario de terpenos como precursores de varios alcaloides indol. Se caracterizan por la presencia de ácido elenólico, en su forma glucosídica o aglicónica, en su estructura molecular. La oleuropeína, el secoiridoide más conocido, es un éster heterosídico de ácido elenólico y 3,4-dihidroxifeniletanol que contiene una molécula de glucosa, cuya hidrólisis produce ácido elenólico e hidroxitirosol (Andrés-Lacueva *et al.*, 2009).

1.3 Subproductos Agroindustriales

El término 'subproducto' significa desechos de plantas reutilizables, que tienen un buen valor de mercado (Selvamuthukumarán & Shi, 2017). Los subproductos agrícolas se consideran actualmente como una fuente de ingredientes funcionales como antioxidantes, por ejemplo. polifenoles, carotenoides, flavonoides, antocianinas, vitaminas y fibras dietéticas (citado por Galanakis, 2013 en Galanakis 2011; Patsioura *et al.*, 2011; Selvamuthukumarán & Shi, 2017). Además, poseen diversos usos como materiales bioabsorbentes, en la producción de

inoculantes rizobianos, etc. (Lai *et al.*, 2017). La unidad de procesamiento de frutas y verduras entrega varios materiales de desecho inutilizables, que comprenden principalmente semillas, cáscaras y piedras (Selvamuthukumaran & Shi, 2017). Los ingredientes funcionales se incluyen en el término general "nutracéutico", que indica un alimento (aditivo alimentario o suplemento dietético) que proporciona beneficios para la salud (citado por Galanakis, 2013 en Ramaa *et al.*, 2006; Tapas *et al.*, 2008). El renacimiento de los nutracéuticos a partir de subproductos agrícolas se realiza a partir de la existencia de metodologías, que permiten no sólo la recuperación, sino también su reutilización dentro de los alimentos. La producción se realiza principalmente en 5 etapas: pretratamiento macroscópico, separación de macro y micro-moléculas, extracción, purificación y formación de nutracéuticos (citado por Galanakis, 2013 en Galanakis, 2012).

La eliminación de estos desechos sólidos generados representa un problema grave. La modificación y extracción de fitoquímicos de los residuos agrícolas debe implementarse como una idea de "alimento para alimentos". La eliminación de los residuos agroindustriales induce un problema creciente ya que la mayoría de ellos son muy propensos al deterioro microbiano, lo que limita su explotación. La porción no comestible obtenida a partir de subproductos vegetales varía de 25 a 30%, y la incapacidad para reciclar tales productos contribuirá significativamente a una pérdida económica enorme. Por ejemplo, costos de secado, almacenamiento y envío de subproductos son factores limitantes económicos. Por lo tanto, los subproductos agroindustriales se usan a menudo como alimento o como fertilizante. El problema de la eliminación de subproductos se ve agravado aún más por las restricciones legales. Por lo tanto, la utilización eficiente, práctica y ambientalmente racional de estos materiales es cada vez más importante, especialmente porque la rentabilidad y los empleos pueden sufrir (Lai *et al.*, 2017; Selvamuthukumaran & Shi, 2017). En la **Tabla 1** se muestran algunos estudios previos sobre la cantidad de subproductos generados por la industria del procesamiento de frutas y verduras.

Tabla 1. Cantidad de subproductos generados por la industria de procesamiento de frutas y verduras (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

Fruta/Vegetal	Subproducto	Parte comestible	Referencia
Agave	40% (cáscara y médula)	60%	Iñiguez-Covarrubias <i>et al.</i> (2001)
Manzana	11% (pulpa y núcleo de semilla)	89%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> (2010)
Alcachofa	Alrededor del 60% (brácteas externas, receptáculos y tallos)	40%	Llorach <i>et al.</i> (2002)
Espárrago	Hasta 40% –50% (lanza)	50%-60%	Rodríguez <i>et al.</i> (2006)
Banana	Hasta el 30% (cáscara)	70%	Schieber <i>et al.</i> (2001)
Cladodios de pera de cactus	20% (espinas, gloquidios, y la cáscara)	80%	Bensadon <i>et al.</i> (2010)
Tuna	45% (espinas, gloquidios, cáscara y pulpa inutilizable)	65%	Bensadon <i>et al.</i> (2010)
Zanahoria	30%–40% (orujo)	60%-70%	Schieber <i>et al.</i> (2001)
<i>Cyphomandra betacea</i>	15% –35% (piel, pulpa y semillas)	65%-85%	Ordoñez <i>et al.</i> (2010)
Mandarina	16% (cáscaras)	84%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> (2010)
Mango	13.5% (semillas), 11% (cáscaras) y 17.9% (pulpa no utilizable)	58%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> (2010)
Naranja	66% (cáscara)	44%	Li <i>et al.</i> (2006)
Papaya	6.5% (semillas), 8.5% (cáscaras) y 32.1% (pulpa no utilizable)	53%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> (2010)
Fruta de la pasión	>75% (cáscara y semillas)	23%	Schieber <i>et al.</i> (2001)
Piña	9.1% (corazón), 13.5% (cáscaras), 14.9% (arriba) y 14.5% (pulpa)	48%	Ayala-Zavala <i>et al.</i> (2010)
Papa	15%–40% (cáscara)	60%-85%	Schieber <i>et al.</i> (2001)
Tomate	3%–7% (cáscara y semillas)	93%-97%	Schieber <i>et al.</i> (2001)
Nueces del tigre	Hasta el 60% (residuos sólidos y líquidos).	40%	Sanchez-Zapata <i>et al.</i> (2009)

1.4 Métodos de extracción de antioxidantes en subproductos agroindustriales

La extracción es un proceso de separación utilizado para separar solutos, es decir, constituyentes bioactivos de soluciones que utilizan solventes específicos mediante la adopción de procedimientos estándar. El propósito principal de este método de extracción es separar los solutos solubles de los subproductos de la planta a fin de realizar el proceso de extracción de manera eficiente. Los extractos crudos obtenidos usando estos métodos contienen mezclas complejas de varios metabolitos de plantas como lo son, alcaloides, glucósidos, compuestos fenólicos, terpenoides y flavonoides. Estos extractos se utilizan como agentes medicinales en forma de tinturas y extractos líquidos. Existen varios métodos disponibles para extraer eficientemente los antioxidantes de los subproductos vegetales de las industrias de procesamiento (Selvamuthukumaran & Shi, 2017). A continuación, se describen los diferentes métodos utilizados hoy en día.

1.4.1 Métodos convencionales

Las técnicas de extracción clásicas/convencionales se han utilizado comúnmente a pequeña escala para extraer componentes bioactivos de varios materiales vegetales. Estas técnicas se basan generalmente en la eficiencia de extracción de diferentes disolventes, que se utilizan para este propósito. Es un enfoque de tres procesos, que consiste en 1. Extracción Soxhlet, 2. Maceración y 3. Hidrodestilación (HD) (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

La técnica de extracción de Soxhlet se ha utilizado ampliamente para extraer varios compuestos bioactivos de diversos materiales vegetales. La muestra de material vegetal seco se mantiene en un dedal. El dedal se coloca luego en el matraz de destilación, que contiene un disolvente selectivo cuando se alcanza el nivel de rebosamiento del disolvente; la solución del dedal es aspirada por un sifón. El sifón descarga la solución de nuevo en el matraz de destilación. Esta solución transporta solutos extraídos en el líquido a granel. El soluto permanece en el matraz de destilación y el disolvente vuelve al lecho sólido de la planta. El proceso se ejecuta repetidamente hasta que se completa la extracción. Los inconvenientes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más importantes de la extracción de Soxhlet son el largo tiempo requerido para la extracción y la gran cantidad de disolvente desperdiciado, que no solo es costoso de desechar sino que también puede causar problemas ambientales adicionales (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998; Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

El proceso de maceración se usó a nivel casero para preparar tónicos desde la antigüedad. Es un método popular y también una de las formas más baratas de obtener varios aceites esenciales y compuestos bioactivos de diferentes materiales vegetales. Para una menor escala de extracción, el proceso de maceración generalmente consta de varios pasos. Primero, los materiales se muelen, es decir, su tamaño se va reduciendo para aumentar el área de superficie para una mezcla uniforme con el disolvente elegido. Como segundo paso se agrega el solvente apropiado. En tercer lugar, el líquido se retira, pero el orujo, que es el residuo sólido de este proceso de extracción, se presiona para recuperar una gran cantidad de soluciones ocluidas. La mezcla obtenida y el líquido de extracción se mezclan y se separan de las impurezas por filtración (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

La HD es uno de los métodos tradicionales utilizados para extraer compuestos bioactivos y aceites esenciales de varios materiales vegetales. En este proceso, los disolventes orgánicos no están involucrados, y pueden realizarse antes de la deshidratación de cualquier material vegetal. Hay tres tipos de HD: destilación de agua, destilación de agua y vapor, y destilación de vapor directa (Vankar, 2004). En la hidrodestilación, primero, los materiales de la planta se empaquetan en un compartimiento fijo; En segundo lugar, se agrega agua en cantidad suficiente y luego se pone a hervir. Alternativamente, también se inyecta vapor directo en la muestra de la planta. Tanto el agua caliente como el vapor pueden actuar como los principales factores influyentes para liberar compuestos bioactivos de varios tejidos vegetales. El enfriamiento indirecto por agua condensa la mezcla de vapor de agua y aceite. La mezcla condensada fluye del condensador a un separador, donde el aceite y los compuestos bioactivos se separaron automáticamente del agua (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

La tasa de extracción de cualquier método convencional depende principalmente de la elección de usar disolventes selectivos. La **Tabla 2** muestra los ejemplos de varios compuestos bioactivos que se extraen utilizando diferentes disolventes. La polaridad del

solvente es uno de los factores más importantes para el compuesto objetivo, y al seleccionar el solvente, la afinidad molecular entre el solvente y el soluto elegidos, su seguridad ambiental, toxicidad y su factibilidad económica deben considerarse en mayor medida para la extracción eficiente de antioxidantes (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

Tabla 2. Ejemplo de algunos compuestos bioactivos extraídos por diferentes disolventes. (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

Agua (1.000)*	Etanol (0.654)*	Metanol (0.762)*	Cloroformo (0.259)*	Éter (0.117)*	Acetona (0.355)*
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Taninos	Polifenoles	Saponinas	Flavonoides	Terpenoides	
Saponinas	Flavonoles	Terpenoides	Taninos		
Terpenoides	Terpenoides		Flavononas		
	Alcaloides		Polifenoles		
			Antocianinas		

*Los valores entre paréntesis indican la polaridad relativa de cada solvente.

1.4.2 Métodos no convencionales

Los principales desafíos de la extracción convencional son el tiempo de extracción más largo, el requerimiento de solvente costoso y de alta pureza, la evaporación de la gran cantidad de solvente, la baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de los compuestos termolábiles. Para superar estas limitaciones de los métodos de extracción convencionales, se introdujeron técnicas de extracción novedosas y prometedoras. Estas técnicas son referidas como técnicas de extracción no convencionales. Algunas de las técnicas más prometedoras son la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la extracción de campo eléctrico pulsado (PEF), la extracción asistida por enzima (EAE), la extracción con líquido presurizado (PLE), la extracción por medio de fluidos supercríticos (SFE), extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada y destilación molecular (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

1.4.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

El ultrasonido es un tipo especial de onda de sonido más allá de la audición humana, y su frecuencia varía de 20 kHz a 100 MHz. Al igual que otras ondas, puede pasar a través de un medio creando compresión y expansión. Por lo tanto, este proceso produce un fenómeno conocido como cavitación, que conduce aún más en la producción, el crecimiento y el colapso de las burbujas. Se puede producir una gran cantidad de energía durante la conversión de la energía cinética del movimiento y, por lo tanto, ayuda a calentar el contenido de la burbuja. Los efectos causados por las ondas ultrasónicas son los ciclos de compresión y expansión durante el paso a través del fluido. La expansión puede crear burbujas o cavidades en un líquido. Esto es así cuando la presión negativa ejercida, que excede la resistencia a la tracción local del líquido, puede variar dependiendo de su naturaleza y pureza. El proceso por el cual las burbujas de vapor se forman, crecen y sufren un colapso implosivo se conoce como cavitación. Las condiciones dentro de estas burbujas implosionantes pueden ser dramáticas, con temperaturas de 4500 °C y presiones de hasta 100 MPa, que a su vez producen ondas de energía de cizallamiento muy altas y turbulencias en la zona de cavitación. La combinación de estos factores (presión, calor y turbulencia) se utiliza para acelerar la transferencia de masa en el proceso de extracción. (Selvamuthukumaran & Shi, 2017). Se sabe que el ultrasonido tiene un efecto significativo en la tasa de diversos procesos en la industria química y alimentaria. Usando ultrasonido, las extracciones completas se pueden completar en minutos con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de solvente, simplificando la manipulación y el trabajo, dando mayor pureza al producto final, eliminando el tratamiento posterior de las aguas residuales y consumiendo solo una fracción de energía fósil que normalmente se necesita para un método de extracción convencional, como la extracción Soxhlet, la maceración o la destilación. Se han extraído, analizado y formulado eficientemente varias clases de componentes alimenticios, como aromas, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos orgánicos y minerales, a partir de una variedad de matrices (principalmente tejidos animales, microalgas, levaduras, alimentos y materiales vegetales) (Chemat *et al.*, 2017). Así mismo Herrera & Luque de Castro (2004), reportaron que parece

ser una técnica de extracción efectiva para la extracción de compuestos bioactivos de los subproductos de las industrias de procesamiento de frutas y verduras.

1.4.2.2 Extracción por campo eléctrico pulsado (PEF)

El método de extracción de PEF fue una de las técnicas más conocidas para mejorar los procesos de secado, extracción y difusión desde la última década. El principio principal de la extracción de PEF es desintegrar la estructura de la membrana celular para aumentar la tasa de extracción. El potencial eléctrico pasa a través de la membrana celular cuando está suspendido en un campo eléctrico, y este potencial eléctrico separa las moléculas de membrana en función de la naturaleza del dipolo, es decir, de acuerdo con su carga en la membrana celular. Después de exceder un valor crítico de aproximadamente 1 V de potencial transmembrana, hay una repulsión, que puede ocurrir entre las moléculas portadoras de carga que forman poros en áreas débiles de la membrana y, por lo tanto, causa un aumento drástico en la permeabilidad. Para el tratamiento con PEF de materiales vegetales, se utiliza un circuito simple con pulsos de descomposición exponencial. Los materiales vegetales se colocan en una cámara de tratamiento, que consta de dos electrodos. Basado en el diseño de la cámara de tratamiento, el proceso PEF se puede operar en modo continuo o por lotes. La efectividad del tratamiento con PEF depende de los parámetros del proceso, que incluyen la intensidad de campo, la entrada de energía específica, el número de pulsos, la temperatura del tratamiento y las propiedades de los materiales a tratar. El PEF puede aumentar la transferencia de masa durante la extracción al destruir la estructura de la membrana de los materiales vegetales para lograr una mejor extracción y, por lo tanto, disminuir el tiempo de extracción. Se ha aplicado PEF para mejorar la liberación de compuestos intracelulares del tejido vegetal con la ayuda de aumentar la permeabilidad de la membrana celular (Selvamuthukumarán & Shi, 2017).

1.4.2.3 Extracción por medio de líquidos presurizados

La PLE es una técnica que consiste en la extracción con solventes líquidos a temperatura y presión elevadas, lo que mejora el rendimiento de la extracción en comparación con las técnicas realizadas a una temperatura cercana a la temperatura ambiente y la presión atmosférica. Las ventajas de permitir el uso de disolventes a temperaturas superiores a su punto de ebullición atmosférico son las propiedades de solubilidad y transferencia de masa mejoradas (Mustafa & Turner, 2011). La PLE se ha aplicado con éxito para extraer compuestos bioactivos de diferentes materiales vegetales. En consideración al rendimiento, la reproducibilidad, el tiempo de extracción y el consumo de solvente, el PLE ha sido considerado como una alternativa a los métodos convencionales debido a un proceso más rápido y un menor uso de solvente (Selvamuthukumar & Shi, 2017).

1.4.2.4 Extracción por medio de fluidos supercríticos (SFE)

La extracción de compuestos de fuentes naturales es la aplicación más ampliamente estudiada de fluidos supercríticos. Cuando un fluido es forzado a una presión y temperatura por encima de su punto crítico, se convierte en un fluido supercrítico. En estas condiciones, se colocan diversas propiedades del fluido entre las de un gas y las de un líquido. Aunque la densidad de un fluido supercrítico es similar a un líquido y su viscosidad es similar a la de un gas, su difusividad es intermedia entre los dos estados. Por lo tanto, el estado supercrítico de un fluido se ha definido como un estado en el que el líquido y el gas son indistinguibles entre sí, o como un estado en el que el fluido es compresible (es decir, un comportamiento similar al de un gas) aunque posea una densidad similar a la de un líquido y, por lo tanto, un poder de solvatación similar. La **Tabla 3** muestra algunas propiedades de estos fluidos (Herrero *et al.*, 2006; Reverchon & De Marco, 2006).

De hecho, la extracción de fluidos supercríticos (SFE) tiene ventajas inmediatas sobre las técnicas de extracción tradicionales: es un proceso flexible debido a la posibilidad de una modulación continua de la potencia/selectividad del solvente del SCF, permite la eliminación

de solventes orgánicos contaminantes y el costoso post-procesamiento de los extractos para la eliminación de disolventes (Reverchon & De Marco, 2006).

Varios compuestos han sido examinados como disolventes SFE. Por ejemplo, hidrocarburos tales como hexano, pentano y butano, óxido nitroso, hexafluoruro de azufre e hidrocarburos fluorados. Sin embargo, el dióxido de carbono (CO₂) es el disolvente SFE más popular porque es seguro, está disponible y tiene un bajo costo. Permite operaciones supercríticas a presiones relativamente bajas y a temperaturas cercanas a la habitación. El único inconveniente grave de SFE es el mayor costo de la inversión si se compara con las técnicas tradicionales de extracción a presión atmosférica. Sin embargo, el esquema del proceso base (extracción más separación) es relativamente barato y muy sencillo de escalar a escala industrial (Reverchon & De Marco, 2006).

Tabla 3. Propiedades críticas de varios solventes utilizados en SFE (Herrero *et al.*, 2006).

Solvente	Propiedad crítica			
	Temperatura (°C)	Presión (atm)	Densidad (g/mL)	Parámetro de solubilidad δ_{SFC} (cal ^{-1/2} cm ^{-3/2})
Eteno	10.1	50.5	0.200	5.8
Agua	101.1	217.6	0.322	13.5
Metanol	-34.4	79.9	0.272	8.9
Dióxido de carbono	31.2	72.9	0.470	7.5
Etano	32.4	48.2	0.200	5.8
Óxido nitroso	36.7	71.7	0.460	7.2
Hexafluoruro de azufre	45.8	37.7	0.730	5.5
<i>n</i>-buteno	-139.9	36.0	0.221	5.2
<i>n</i>-pentano	-76.5	33.3	0.237	5.1

La extracción de compuestos bioactivos de materiales vegetales se basa en varios parámetros, recalcando que estos parámetros son ajustables. Las principales variables que influyen en la eficiencia de extracción son la temperatura, la presión, el tamaño de las partículas y el contenido de humedad del material de alimentación, el tiempo de extracción, la tasa de flujo de CO₂ y la relación de disolvente a alimentación (Selvamuthukumarán & Shi, 2017).

1.4.2.5 Extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada

La extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada, también conocida como SWE, es decir, la extracción con agua caliente a presión se ha convertido recientemente en una popular tecnología de procesamiento verde y surge como una técnica prometedora de extracción y fraccionamiento para reemplazar los métodos tradicionales de extracción. La extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada también se utiliza en la preparación de muestras para extraer contaminantes orgánicos de los alimentos para análisis de seguridad alimentaria y sólidos/sedimentos con fines de monitoreo ambiental. Es una técnica respetuosa con el medio ambiente que puede proporcionar mayores rendimientos de extracción a partir de material vegetal sólido. La extracción por medio de agua a baja polaridad presurizada se basa en el uso de agua como extractor en un modo dinámico, y bajo una presión suficientemente alta para mantener el estado líquido; además puede mantener el agua en el líquido. Una presión de 5 MPa sería lo suficientemente alta para evitar que el agua se vaporice a temperaturas de 100 a 250 °C. Una vez que la presión es lo suficientemente alta como para mantener el agua en estado líquido, no es necesaria una presión adicional, ya que tiene una influencia limitada en las características del disolvente del agua. El aumento de la temperatura del agua de 25 a 250 °C provoca cambios similares en la constante dieléctrica, la tensión superficial y la viscosidad; igualmente puede solubilizar fácilmente compuestos orgánicos como los fitoquímicos, que normalmente son insolubles en el agua ambiente (Selvamuthukumarán & Shi, 2017).

1.4.2.6 Destilación molecular

La destilación es una operación unitaria utilizada principalmente para la separación de los componentes de la mezcla por medio de evaporación parcial. Se basa en el hecho de que el vapor es relativamente más rico en el componente con la presión de vapor más alta, es decir, el componente más volátil. La destilación a vacío moderado se caracteriza por el uso de equipos de destilación convencionales. El límite de presión más bajo es del orden de 1 torr, es decir, 1 mm Hg. Cuando la distancia de transferencia es comparable con la ruta libre media de las moléculas de vapor, la destilación se conoce como destilación molecular. La trayectoria libre media se define como la distancia promedio que una molécula viajará en la fase de vapor sin chocar con otra molécula de vapor. Esto implica que, en el sistema de destilación molecular, las moléculas de vapor pueden alcanzar el condensador sin colisiones intermoleculares. Por lo tanto, no se puede establecer un equilibrio dinámico entre el vapor y la fase líquida. La destilación molecular se produce a temperaturas muy bajas y, por lo tanto, reduce el problema de la descomposición térmica. El alto vacío también elimina la oxidación que podría ocurrir en presencia de aire. En la destilación molecular, la velocidad de evaporación se controla mediante la velocidad a la que las moléculas escapan de la superficie libre del líquido y se condensan en el condensador. Para este proceso de separación, es necesario revelar el comportamiento de los componentes objetivo en el proceso de evaporación (Selvamuthukumaran & Shi, 2017).

1.4.2.7 Extracción asistida por enzimas (EAE)

Una de las principales fuentes de extracción de antioxidantes son los tejidos vegetales. Las paredes celulares vegetales contienen polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectinas que actúan como barreras para la liberación de sustancias intracelulares. Algunas enzimas como la celulasa, la β -glucosidasa, la xilanasa, la β -glucanasa y la pectinasa ayudan a degradar la estructura de la pared celular y despolimerizar los polisacáridos de la pared celular de la planta, facilitando la liberación de compuestos enlazados (Moore *et al.*, 2006). Por lo tanto, estas enzimas han sido propuestas como herramientas para optimizar la

extracción de compuestos a partir de la matriz vegetal (Kim *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Wilkins *et al.*, 2007).

La mayoría de los compuestos bioactivos naturales, como los flavonoides, están presentes en diferentes formas, interactuando con los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectina) (**Figura 4**) (Fu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005). Para la liberación de estos compuestos, estas interacciones necesitan romperse por enzimas que hidrolizan las paredes celulares. La β -glucosidasa rompe los enlaces β -1,4 glucosídicos en los glucósidos (flavonoides en conjunción con la glucosa) (Yang *et al.*, 2010).

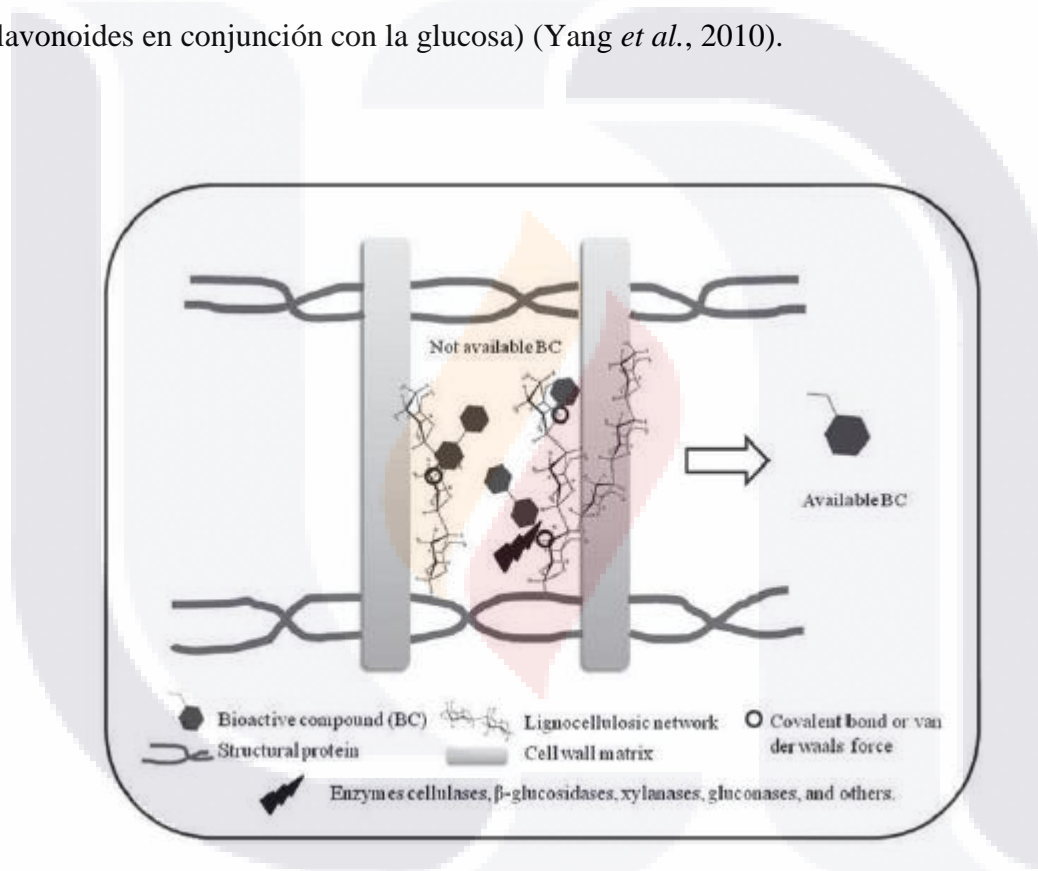


Figura 4. Compuestos bioactivos encontrados en matrices vegetales formando interacciones con redes lignocelulósicas (Gil-Chávez *et al.*, 2013)

Por otra parte, los compuestos fenólicos están a menudo ligados a los polisacáridos de la pared celular y la degradación de la pared celular es un paso clave para liberar fenoles de la pared celular. En este sentido, se ha demostrado que el uso de xilanasas, β -glucanasas y

celulasas es eficaz, ya que pueden hidrolizar los ácidos fenólicos unidos a éster (Moore *et al.*, 2006). Sin embargo, esta liberación depende de las características estructurales y de composición de los compuestos (Yang *et al.*, 2010).

Existen varios informes sobre el tratamiento enzimático de los tejidos vegetales para la extracción de compuestos bioactivos naturales (**Tabla 4**). Chandini *et al.* (2011), utilizaron las enzimas tanasa y pectinasa de forma independiente para mejorar la calidad de los extractos de té negro, y se observó el máximo nivel de extracción de polifenoles cuando se utilizó tanasa sola. Por otro lado, la luteolina y la apigenina se extrajeron de las hojas de palomilla usando pectinasa, celulasa y β -glucosidasa. En otro estudio, la extracción de flavonoides de *Ginkgo biloba* se realizó, no sólo degradando la pared celular, sino también aumentando la solubilidad de los compuestos en el extracto (Chen *et al.*, 2011). La extracción asistida por enzimas también se utilizó para mejorar la composición antioxidante del jugo de zanahoria negra y, más recientemente, para obtener aceites vegetales (Khandare *et al.*, 2011; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2010).

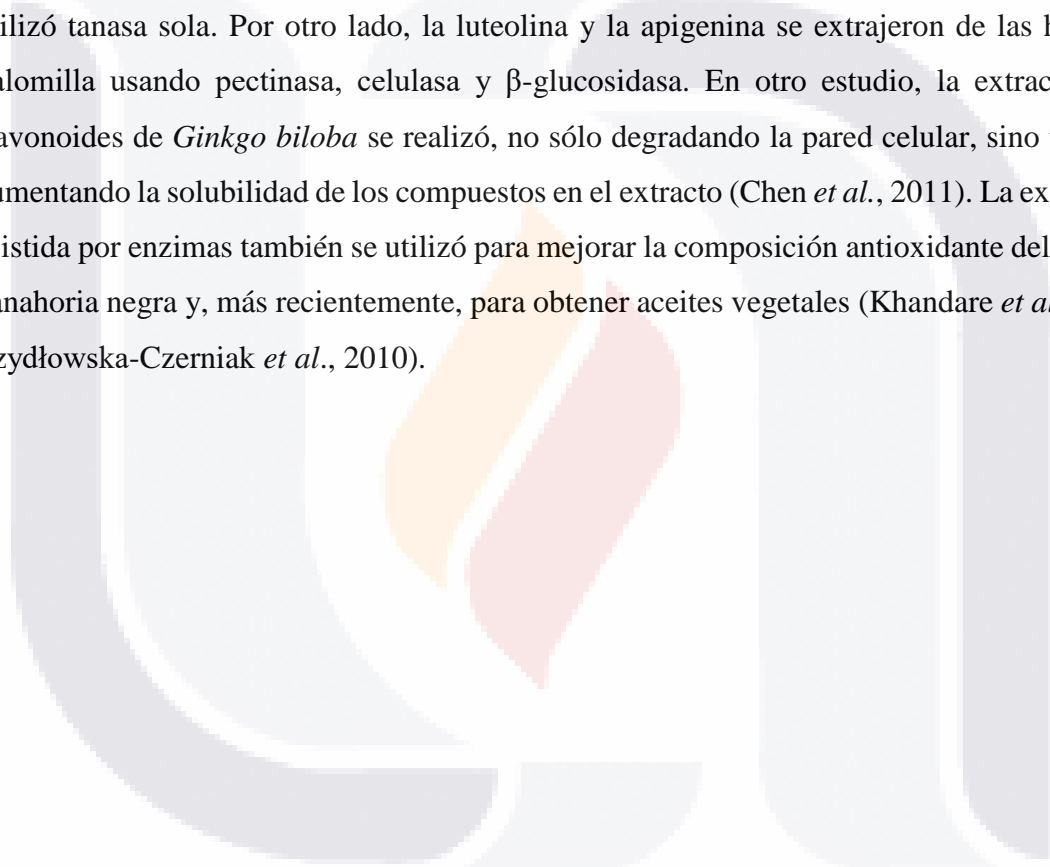


Tabla 4. Estudios sobre el uso de tratamientos enzimáticos para liberar compuestos bioactivos naturales de matrices naturales (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Enzimas utilizadas para la extracción	Condiciones del ensayo	Materiales	Compuestos bioactivos	Aplicaciones	Referencias
Pectinasa, celulosa y beta-glucosidasa	0.4 mg/mL de pectinasa, 18 h, 30–35 °C, pH 3.5–4.	Hojas de guisante	Flavonas: Luteolina y Apigenina	Actividades farmacológicas, anti-inflamatorias, antialérgicas, antiproliferativas, etc.	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
Alfa-amilasa y glucoamilasa	2% p/p de enzima, 60 min, pH 4.5.	Cúrcuma (<i>Curcuma longa L.</i>)	Oleoresina	Formulación de alimentos para la prevención del cáncer.	(Fu <i>et al.</i> , 2008)
Cellulase R® MX, Cellulase R® CL y Kleerase R® AFP	1.5% p/p de enzima, 50 °C, 3 h.	Cáscaras de cítricos: Yen Ben y limón Meyer, toronja, mandarina y naranja	Fenólicos totales	Actividades antioxidantes y de barrido de radicales libres. Implicaciones en la salud.	(Kurmudle <i>et al.</i> , 2010)
ROHALASE R® OS y ROHAPECT R® PTE (Actividad de celulasa, glucanasa y xilanasa)	0.05% y 0.1% p/p, 20 min, 70 °C y 50 °C	Colza	Fenoles, tocoferoles y fosfolípidos	Prevención y tratamiento de enfermedades crónicas: enfermedades cardíacas y neurodegenerativas, envejecimiento, cáncer y artritis reumatoide.	(Li <i>et al.</i> , 2006)
Pectinex XXL y Pectinex Ultra SPL (Enzimas pectolíticas)	20 mL/100 kg de masa, 1 h, 20 °C	Pomáceas	Polifenoles	Eficacia contra el cáncer de colon	(Muñoz <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 5. Estudios sobre el uso de tratamientos enzimáticos para liberar compuestos bioactivos naturales de matrices naturales. *Continuación.* (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

Pectinex B3-L, Vinozym EC, and Vinozym G	1% de enzima, 37–40 °C, 6 h	Piel de uva de 3 variedades: Cabernet Sauvignon, Caberménère y Ribier (residuos industriales).	Antocianinas	Aditivos alimentarios que proporcionan beneficios para la salud.	(Oszmianski <i>et al.</i> , 2011)
Celulasa de <i>Trichoderma reesei</i>, pectinasa de <i>A. niger</i> y celulosa de <i>P. decumbens</i>.	2 mg/mL de enzima, 30 h, 40 °C	Hojas de <i>Ginkgo biloba</i>	Flavonoides: Quercetina, kaempferol e isorhamnetina (predominante)	Actividades fisiológicas en terapias para enfermedades inflamatorias, cardíacas y cáncer	(Parrado, <i>et al.</i> , 2006)
Mezcla de proteasas	60 °C, pH 8, 40 min	Salvado de arroz	Extracto enzimático con potencial uso como alimento funcional como producto final.	Prevención de enfermedades incluyendo cáncer, hígado graso, hipercalciuria, cálculos renales, etc.	(Wang <i>et al.</i> , 2010)

La extracción con enzimas no sólo se ha utilizado para extraer compuestos de plantas, sino también de algas donde la complejidad estructural y la rigidez de la pared celular de algas representan un obstáculo, reduciendo la eficacia de extracción de compuestos bioactivos intracelulares (Wang *et al.*, 2010). Además, la extracción asistida por enzimas podría utilizarse para obtener compuestos valiosos a partir de desechos y subproductos agrícolas tales como ácido gálico (Curiel *et al.*, 2010) que pueden usarse para la preparación de aditivos alimentarios tales como pirogalol y galato de propilo (Yu & Li, 2008) y también para servir como un intermedio para la síntesis del fármaco antibacteriano Trimetoprim por la química farmacéutica (Curiel *et al.*, 2010). La versatilidad de las enzimas para catalizar una variedad de procesos para la producción de compuestos bioactivos naturales representa un enfoque interesante para ser más explotado en términos de su actividad, robustez y eficiencia (Gil-Chávez *et al.*, 2013).

1.4.2.7.1 Beneficios de la extracción asistida por enzimas

La aplicación de enzimas para la extracción completa de bioactivos sin el uso de disolventes es una propuesta atractiva. El pretratamiento enzimático de la materia prima normalmente da como resultado una reducción en el tiempo de extracción, minimiza el uso de disolventes y proporciona un mayor rendimiento y calidad del producto. El conocimiento previo de la composición de la pared celular de las materias primas ayuda en la selección de una enzima o enzimas útiles para el pretratamiento. La disminución del uso de solventes durante la extracción es particularmente importante por razones tanto reglamentarias como ambientales, proporcionando una opción “más verde” que la extracción no enzimática tradicional (Puri *et al.*, 2012)

La extracción asistida por enzimas de compuestos bioactivos de plantas tiene limitaciones comerciales y técnicas potenciales: (i) el coste de las enzimas es relativamente caro para procesar grandes volúmenes de materia prima; (ii) las preparaciones enzimáticas actualmente disponibles no pueden hidrolizar completamente las paredes de las células vegetales, limitando los rendimientos de extracción de los compuestos; (iii) la extracción asistida por enzimas puede ser difícil de escalar a escala industrial debido a que las enzimas se comportan de manera diferente ya que las condiciones ambientales tales como el porcentaje de oxígeno disuelto, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes varían. Sin embargo, si se pueden superar las limitaciones anteriores, entonces la extracción basada en enzimas podría proporcionar una oportunidad no sólo de aumentar los rendimientos de extracción, sino también de mejorar la calidad del producto permitiendo el uso de condiciones de procesamiento más suaves tales como temperaturas de extracción más bajas (Puri *et al.*, 2012).

1.4.2.7.2 Desarrollo del proceso para la extracción asistida por enzimas

A diferencia de otros procesos no térmicos, tales como alta presión hidrostática (HP), dióxido de carbono comprimido (cCO₂), SC-CO₂ y pulsos de campo eléctrico elevado (HELP), la

extracción con enzimas puede ser fácilmente probada a escala de laboratorio. Las enzimas pueden seleccionarse para funcionalidades específicas, así como para condiciones óptimas de proceso, tales como temperatura y concentración. A pesar de que las enzimas funcionan normalmente a una temperatura óptima, todavía pueden usarse en una gama de temperaturas, proporcionando flexibilidad tanto para el costo como para la calidad del producto. La reducción del tamaño de partícula del sustrato antes del tratamiento enzimático proporciona una mejor accesibilidad de la enzima a la célula para aumentar significativamente los rendimientos de extracción. En la extracción acuosa asistida por enzimas, las enzimas pueden romper el coloide polisacárido-proteína en la pared celular creando una emulsión que interfiere con la extracción. Por lo tanto, los sistemas no acuosos son preferibles para algunos materiales, ya que minimizar la formación de polisacárido-proteína coloidal emulsiones (Concha *et al.*, 2004). En la **Figura 5** se resume la metodología de extracción asistida por enzimas para la extracción de componentes bioactivadores de diversas fuentes vegetales. Sin embargo, los parámetros que afectan a la liberación de bioactivos asistidos por enzimas deben optimizarse para cada proceso específico. Estos parámetros incluyen pH, tiempo, temperatura y concentración enzimática (Puri *et al.*, 2012).

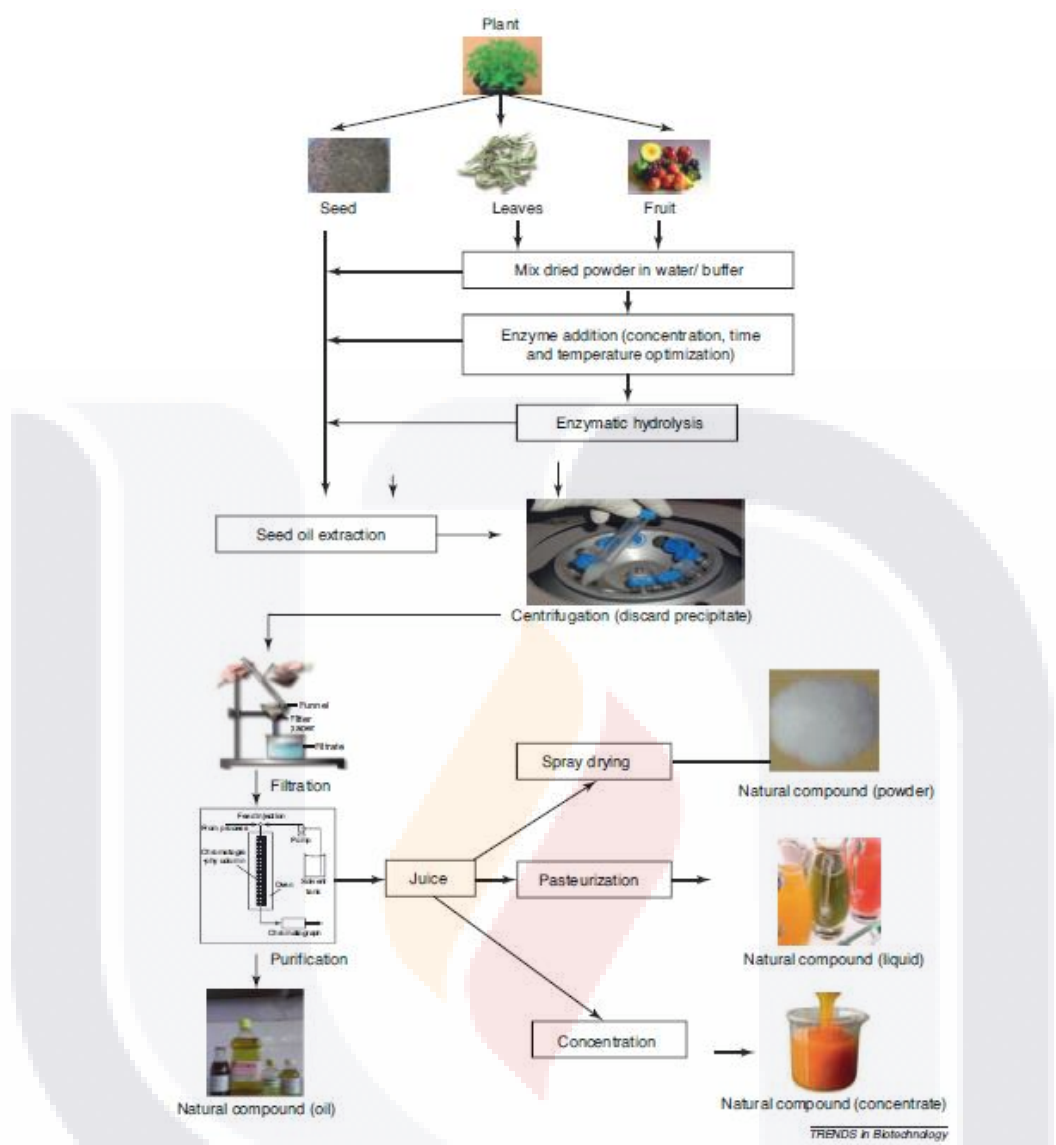


Figura 5. Extracción asistida por enzimas de compuestos bioactivos de una fuente vegetal. (<http://www.cognitivesolutions.com> y <http://www.21food.com>).

1.4.2.7.3 Preparaciones fibrolíticas comerciales

Los productos de enzimas comerciales son de origen fúngico (*Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei*) y bacteriano (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium spp.*) (Meale *et al.*, 2014).

Morgavi *et al.* (2013), coinciden en que se requiere de una gran variedad de enzimas para degradar los complejos arreglos de carbohidratos estructurales en las paredes celulares de las plantas. Comúnmente las preparaciones comerciales enzimáticas son referidas como celulasas o xilanasas, aunque actividades enzimáticas secundarias tales como amilasas, proteasas, estererasas o pectinasas están invariablemente presentes ya que estas preparaciones raramente consisten en una única enzima pura. Esta diversidad es ventajosa, ya que facilita la selección de una gama de sustratos con un solo producto, pero complica la identificación de las enzimas específicas responsables de las respuestas positivas observadas (Meale *et al.*, 2014).

1.5 GUAYABA

La especie *Psidium guajava* L., denominada comúnmente guayaba, pertenece a la familia Myrtaceae. Se trata de un arbusto de hasta 7 m de altura, escasamente ramificado; las hojas son aromáticas, de 4-8 cm de longitud, con los nervios prominentes en la cara inferior; las flores son blancas, vistosas (**Figura 6**) (Martínez *et al.*, 1997).



Figura 6. Planta de guayaba (*Psidium guajava*). (Vallarta Opina, 2018).

El fruto es una baya, que consiste en un pericarpio carnoso y una cavidad de semilla con pulpa carnosa y numerosas semillas pequeñas. La producción mundial de guayaba se estimó en alrededor de 500.000 toneladas métricas. De los países sudamericanos, Brasil, Colombia, México y Venezuela producen cantidades significativas de guayaba. La industria de la guayaba ofrece una variedad de productos procesados: bebidas, jarabe, helado, mermeladas, jaleas, queso, caramelo, jugo, vino y productos deshidratados y enlatados (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001)

1.5.1 Subproductos de la guayaba

La guayaba es una rica fuente de pectinas metoxiladas relativamente bajas (50%), que representan más del 10% del peso seco (Muroki & Saint-Hilaire, 1977). Después de extraer la pulpa para hacer bebidas, jugo, jarabe, helado y mermeladas, aproximadamente el 30-35% del peso de la fruta permanece como desecho llamado orujo, que está hecho de rejilla de guayaba y semillas. Dado que los desechos constituyen sólo el 30-35% de la fruta, el uso de la guayaba para la producción de pectina es limitado (Askar & Treptow, 1998; Wadhwa *et al.*, 2015). Las semillas, usualmente desechadas durante el procesamiento de jugo y pulpa, contienen aproximadamente 5-13% de aceite rico en ácidos grasos esenciales (Adsule & Kadam, 1995). Los resultados de investigaciones recientes indican que la cáscara y la pulpa de guayaba podrían ser utilizadas como fuente de fibra dietética antioxidante (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001).

Por otro lado, Ajila *et al.* (2012), informaron sólo el 10% como desecho o subproducto (orujo) después del procesamiento. El orujo de guayaba tiene un 61% de CF y un 12% de EE. Las semillas de guayaba contienen 9.7% de proteínas y 8.9-9.4% de aceite, que es una buena fuente de ácido linoleico. La pulpa y la cáscara tienen un alto contenido en fibra dietética (48.6-49.4%) (Wadhwa, *et al.*, 2015).

1.6 COLIFLOR

Los alimentos del género *Brassica* son muy nutritivos, proporcionando nutrientes y fitoquímicos que promueven la salud tales como vitaminas, carotenoides, fibra, azúcares solubles, minerales, glucosinolatos y compuestos fenólicos. Los vegetales de la familia Brassicaceae son las fuentes esenciales de compuestos fenólicos en la dieta humana. También contienen derivados de ácidos hidroxicinámico, cafeico, clorogénico, ferúlico y sinápico, así como flavonoles (derivados de kaempferol y derivados de quercetina) y antocianinas (col roja). Se han reportado cultivos de *Brassica* como buenas fuentes de antimutágenos. Varios estudios epidemiológicos mostraron que estaban asociados con la reducción del cáncer. Otros estudios de animales experimentales también demostraron que la alimentación de algunas de estas verduras podría inhibir el desarrollo de alguna carcinogénesis inducida químicamente y dio como resultado la inducción de enzimas desintoxicantes de fase 2 tales como glutatión S-transferasa. Se ha informado que los compuestos naturales en estas verduras eran eficaces en la protección contra la carcinogénesis química modulando el metabolismo carcinógeno (Ahmed & Ali, 2013).

La coliflor (*Brassica oleracea*) es una de las verduras crucíferas pertenecientes a la familia Brassicaceae que son ampliamente consumidas en todo el mundo y tiene una amplia variedad de usos directamente como un vegetal o como un ingrediente en ensaladas, sopas, etc. Estos productos contienen cantidades considerables de compuestos benéficos para la salud, tales como compuestos fenólicos, glucosinolatos y vitaminas (**Figura 7**). La coliflor ocupa una superficie de 8.88 millones de hectáreas, con una producción de 16.40 millones de toneladas en el mundo (Ahmed & Ali, 2013; Huynh *et al.*, 2014).



Figura 7. Coliflor (*Brassica oleracea* Var. Boytris). (https://es.heypik.com/hey-photos/cauliflower_11175928.html)

1.6.1 Subproductos de coliflor

La coliflor tiene un índice de desechos muy alto. En cuanto a la proporción de subproductos, las hojas constituyen aproximadamente el 50% del total; El resto es principalmente tallo. Estos residuos son responsables de importantes problemas ambientales en las industrias y la disminución de su impacto ambiental ha sido objeto de creciente preocupación en los últimos años (Llorach *et al.*, 2003). Es una excelente fuente de proteína (16.1%), celulosa (16%) y hemicelulosa (8%). Estas partes no comestibles se valoran ahora sólo como materias primas para fertilizantes industriales, piensos para animales y producción de fibra, o se dejan en los campos. Sin embargo, como contienen altas cantidades de compuestos bioactivos, su potencial de valorización puede ser mucho mayor (Hyunh *et al.*, 2013). Se han reportado como una rica fuente de fibra dietética y que poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Los compuestos fenólicos y la vitamina C son los principales antioxidantes de las hortalizas *Brassica*, debido a su alto contenido y alta actividad antioxidante (citado por Stojceska *et al.*, 2008 en Podsdek, 2007). Los antioxidantes liposolubles (carotenoides y

vitamina E) son responsables de hasta un 20% de la actividad antioxidante total del género *Brassica* (Stojceska *et al.*, 2008).

1.7 HUITLACOCHÉ

1.7.1 Descripción del huitlacoche

La enfermedad del tizón del maíz es causada por el fitopatógeno basidiomiceto *Ustilago maydis*. La enfermedad resulta en el retraso del crecimiento y rendimiento de la planta, conduciendo a severas pérdidas económicas. *U. maydis* es un microorganismo dimórfico, capaz de producir diferentes formas morfológicas (levaduras o micelios) en respuesta a estímulos ambientales (Sierra-Campos *et al.*, 2009).

Caracterizado por la formación de agallas o tumores principalmente en el órgano fructífero, pero también en sistemas y hojas de la planta huésped *Zea mays* (**Figura 8**). Esta enfermedad es usualmente considerada mundial; sin importar, este ha sido usado como alimento en México desde las culturas precolombinas (Martínez-Espinoza & Ruiz-Herrera, 1998). Como resultado, su nombre popular, huitlacoche o cuitlacoche, viene del vocablo Náhuatl (lenguaje de los Aztecas) “cuitlacochein” o “cuitlacuchtli” que significa “degeneración del maíz en el elote”. También el significado de la palabra “cuitlaltl” es “excremento”, y la palabra “cochi” es “negro” u “oscuro”. En los cuentos folclóricos hay otras interpretaciones de este término, incluido “suciedad de cuervo”. En el Náhuatl, esta enfermedad fue designada también como “popoyauh” o “popoyotl”, que significa “maíz quemado”. Para los mexicanos no sólo era un producto de deshecho en sentido físico, este tenía también un sentido espiritual en el cual era considerado un alimento de destilación, lo cual explica la raíz de la palabra. De hecho, “cuitlatl” viene del nombre de un emperador mexica llamado Cuitláhuac (Sahagún, 1989).

El huitlacoche es un basidiomiceto del orden de los Ustilaginales, algunas características de estos son las siguientes: infectan estructuras reproductivas de las plantas, principalmente flores; el desarrollo del micelio no es profuso; el promicelio está septado transversalmente, con basidiosporas laterales y terminales. Las especies que pertenecen al género *Ustilago*, tienen soros con apariencia de hollín y vagamente lleno con teliosporas negras o café oscuro (Valverde *et al.*, 1993).

Por sus atributos sensoriales y nutricionales los hongos son muy apreciados como parte de la dieta en muchas culturas. Las agallas producidas por el hongo *Ustilago maydis* en las mazorcas de maíz se conocen como huitlacoche o cuitlacoche y en México se consume desde la época prehispánica. Generalmente se recolecta y vende en estado fresco y envasado, y se le considera una exquisitez culinaria (Paredes & Valverde, 2006).



Figura 8. Características del huitlacoche, agallas sobre los granos de maíz inducidas por el hongo fitopatógeno *U. maydis* (Juárez-Montiel *et al.*, 2011).

El huitlacoche, como alimento típico mexicano, debe su creciente popularidad a su característico sabor, que no se parece a ningún otro alimento conocido. En este sentido podemos hablar de sabor de huitlacoche, de igual manera que nos referimos a chocolate, fresa, vainilla, etc.; como sabores clásicos. Existen ciertos compuestos que intervienen en el sabor de diferentes hongos. Sin embargo, algunos compuestos solamente están presentes en el huitlacoche y no en ningún otro hongo (Paredes-Lopez *et al.*, 2006).

La determinación de proteínas totales, aminoácidos, fibra dietética, carbohidratos y ácidos grasos saturados se han realizado a través de estudios nutricionales, la identificación del huitlacoche como un alimento funcional que produce sustancias bioactivas, estas últimas pueden ser usadas para crear productos alimenticios fortificados (Juárez-Montiel *et al.*, 2011).

1.7.2 Compuestos fenólicos del huitlacoche

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados como fenoles simples y ácidos fenólicos tales como el ácido gálico, ácido benzoico, ácido siríngico, ácido clorogénico, y otros asociados; y polifenoles, los cuales son clasificados dentro de muchos grupos tales como flavonoides, taninos, estilbenos, etc. La bioactividad de los compuestos fenólicos puede estar relacionada a su capacidad para quelar metales, inhibir lipooxigenasa, y atrapar radicales libres (Kim *et al.*, 2008).

Las melaninas son macromoléculas formadas por polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Comúnmente los pigmentos resultantes son marrones o negros en color pero muchos otros colores han también sido observados. Las melaninas son también hidrofóbicas y cargadas negativamente. En diversos hongos se han identificado varios tipos diferentes de melaninas a la fecha. Los dos más importantes tipos son la melanina DHN (llamada así por una de las rutas intermediarias, 1, 8-dihidroxi-naftaleno) y melanina DOPA (llamada así por uno de los precursores, L-3, 4-dihidroxi-fenilalanina). Ambos tipos de

melaninas han sido implicadas en la patogénesis (Langfelder *et al.*, 2003). Las melaninas se encuentran en las paredes celulares de las hifas, y en otras en las paredes celulares de las esporas o esclerocios. Las melaninas permiten la resistencia o hibernación de las estructuras de resistencia fúngicas mediante la protección contra una variedad de factores ambientales como el ataque de enzimas líticas producidas por microorganismos del suelo, o protegerlas contra la desecación y la radiación de la luz visible y ultravioleta. Los hongos melanizados son más resistentes a factores más que aquellos mutantes albinos no melanizados u otros hongos normales no melanizados (Butler *et al.*, 2005). Además, mientras no todos los hongos patogénicos producen melaninas, existe una gran clase de hongos potencialmente invasivos los cuales tienen en común la producción de melaninas (Jacobson, 2000).

Existe evidencia que las estructuras melanizadas estabilizan radicales libres en los sistemas biológicos, esto debido a su gran nivel de resonancia de electrones, lo cual sugiere que la melanina representa una trampa para electrones desapareados. Este fenómeno fue interpretado por la evidencia de tres estados de oxidación de los residuos quinónicos de la melanina: hidroquinona (estado totalmente reducido), semiquinona (radical libre estable y parcialmente oxidado), y quinona (producto de la oxidación de dos electrones). Las semiquinonas son conocida por ser radicales libres estables, y dado que la melanina polimérica contiene una amplia estructura aromática conjugada, esto sugiere que la energía del radical libre semiquinona de la melanina sería reducida por la posibilidad de resonancia. Así, la melanina podría funcionar como un lavado para electrones desapareados potencialmente dañinos (Jacobson, 2000).

En cuanto al huitlacoche existen pocos reportes conocidos del análisis del perfil de compuestos fenólicos. Los resultados encontrados sugieren un alto nivel de compuestos fenólicos solubles (nivel mayor que el del frijol y el de algunas frutas, por ejemplo). Los principales compuestos fenólicos cuantificados por HPLC fueron el ácido ferúlico (258 mg/100 g bs), ácido 4-hidroxibenzoico (174 mg/100 g bs), ácido sirínico (156 mg/100 g bs), y ácido protocatecúico (93 mg/100 g bs). Hacen falta estudios más profundos sobre estos

fenólicos solubles, así como de los fenólicos insolubles (melaninas y compuestos similares) del huitlacoche, ninguno de los cuales nunca han sido explorados en cuanto a sus posibles propiedades nutraceuticas (Beas-Fernández *et al.*, 2008; Beas-Fernández *et al.*, 2006). En congruencia con los niveles de fenólicos encontrados, los extractos metanólicos de huitlacoche han mostraron poseer actividades antirradical (antioxidantes del DPPH) del 57-74% (Guevara-Lara *et al.*, 2008; Beas-Fernández *et al.*, 2008; Carrillo-Díaz *et al.*, 2008).

El rango encontrado de antocianinas en muestras de huitlacoche va de 71-226 mg/kg bs, el cual se puede comparar con el presente en ciruelas 20-250 mg/kg bs. Sin embargo, lo encontrado en el huitlacoche es bajo en comparación con las uvas rojas pues tienen un rango de 300-7500 mg/kg bs. El contenido de taninos condensados fue bajo en huitlacoche en comparación a lo encontrado en semillas de frijol (2030-2140 mg Eq (+) Cat/100 g bs (Guevara-Lara *et al.*, 2008; Beas-Fernández *et al.*, 2008; Carrillo-Díaz *et al.*, 2008).

1.7.3 Subproductos de huitlacoche

La hoja de maíz, la mazorca de maíz y los cabellos del maíz son los principales subproductos generados a partir del procesamiento del huitlacoche. Se ha reportado que los cabellos de maíz son ricos en compuestos fenólicos, flavonoides, cetosteroides, aceites volátiles, polisacáridos, proteínas, esteroides y elementos minerales, que se sabe tienen un efecto significativo en la salud humana. Así mismo, estudios previos sugirieron que dicho subproducto proveniente del maíz pigmentado azul y rojo podría inhibir la carcinogénesis colorrectal en ratas macho ya que poseen actividades antimutagénicas y de actividades antioxidantes (Dong *et al.*, 2014).

Además, estudios farmacológicos han demostrado sus principales bioactividades entre las que incluyen actividades antibacterianas, hipoglucémicas, antidepresivas, antifatiga y agentes diuréticos eficaces. Estas propiedades podrían deberse a los grupos hidroxilo

existentes en los compuestos fenólicos que pueden proporcionar los componentes necesarios para mostrar actividades antioxidantes (Dong *et al.*, 2014).

De manera similar, el extracto de mazorca de maíz muestra propiedades antioxidantes significativas de acuerdo con Ebrahimzadeh *et al.* (2008).

Para la hoja de maíz, no se ha informado sobre algún componente bioactivo, exceptuando su uso en la industria para la obtención de bioetanol. Vale la pena señalar que los rendimientos de la mazorca y hoja de maíz son más altos que el de los cabellos en la producción agrícola; tanto la mazorca y hoja son desechados o utilizados como fertilizantes agrícolas (Dong *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Los subproductos agroalimentarios han sido por mucho tiempo considerados como desechos devaluados derivados del procesamiento de la industria de los alimentos y cuya disposición genera un problema ambiental y económico, por lo que existe una tendencia hacia su aprovechamiento. Estos residuos podrían ser una fuente alternativa para obtener compuestos de alto valor agregado como, por ejemplo, antioxidantes naturales, justificando su aislamiento de estas fuentes.

La mayoría de estos compuestos bioactivos se encuentran unidos o atrapados con los componentes de la pared celular dificultando con ello su extracción y afectando de manera negativa su biodisponibilidad. La extracción asistida por enzimas es un método que presenta ventajas tales como mayores rendimientos al descomponer la estructura compleja de las matrices vegetales y eliminación selectiva de los componentes no deseados, alta eficacia catalítica y preservación de la eficacia original de productos naturales, reducción del tiempo de extracción y del volumen de disolvente utilizado.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de enzimas comerciales sobre diferentes subproductos agroindustriales libera compuestos fitoquímicos con mayores niveles de actividades funcionales importantes.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de enzimas comerciales sobre la liberación de compuestos fitoquímicos de subproductos agroindustriales, evaluando sus propiedades funcionales.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer condiciones efectivas de tratamiento enzimático para los subproductos agroindustriales bajo estudio.
2. Cuantificar los compuestos fitoquímicos liberados como resultado de los tratamientos enzimáticos.
3. Evaluar los niveles de las propiedades funcionales resultantes de los tratamientos enzimáticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de subproductos de guayaba, coliflor y huitlacoche

El material vegetal que se evaluó en este estudio fueron subproductos provenientes del procesamiento de frutas y hortalizas. En el caso de los subproductos de coliflor, las muestras fueron donadas por la empresa mexicana Frigorizados La Huerta S.A. de C.V., ubicada en el municipio de San Francisco de los Romo, Aguascalientes; generados a partir del proceso de

congelación IQF. En lo concerniente a los subproductos de guayaba, éstos fueron donados por la empresa mexicana Valle Redondo S. A. de C. V. ubicada en el municipio de Aguascalientes, Aguascalientes; mientras que los subproductos de huitlacoche fueron generados a partir de huitlacoche adquirido del Centro Comercial Agropecuario de la ciudad de Aguascalientes, Aguascalientes. El material vegetal fresco se almacenó a -20 °C, en recipientes herméticos protegidos de la luz hasta su posterior uso.

6.2 Preparaciones enzimáticas comerciales

Se utilizarán dos preparaciones fibrolíticas comerciales:

1) Fibrozyme® (Alltech, Inc., Nicholasville, KY, USA) producida a partir del cultivo de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride*, cuya actividad principal es xilanasas y en menor escala celulasas, es decir, atacan los enlaces que existen entre los heteropolímeros de hemicelulosa (xilosas, manosas, pectinas y celulosa, entre otros). Según el fabricante, la actividad xilanásica del producto Fibrozyme® es 100 UI/g.

2) Promote® (N.E.T., Cargill Inc., Agribrands Int., St. Louis, MO, USA), la cual es una preparación enzimática de tipo líquido, con actividad celulasas y xilanasas producida por extracto de fermentación de *Trichoderma longibrachiatum*. La actividad enzimática, medida como micromoles de azúcares reductores liberados por minuto a partir de celulosa, pH 5.0, 40°C, fue de 1200 unidades de actividad celulasas (ACU por sus siglas en inglés) por gramo de preparación enzimática (Balci *et al.*, 2007).

6.3 Secado y molienda de las muestras

Las muestras se secaron a 45 °C en un horno de secado con temperatura controlada (Felisa® mod. FE-291AD) posteriormente se molieron utilizando molino (Krupps® mod. GX4100) y se tamizaron por una malla del núm. 40 con una apertura de 425 µm (Controls® Milano-

Italy) (**Figuras 9, 10 y 11**). Los subproductos en polvo se almacenaron en frascos herméticos protegidos de la luz a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.



Figura 9. Subproducto de guayaba después de someterlo a proceso de secado y molienda.

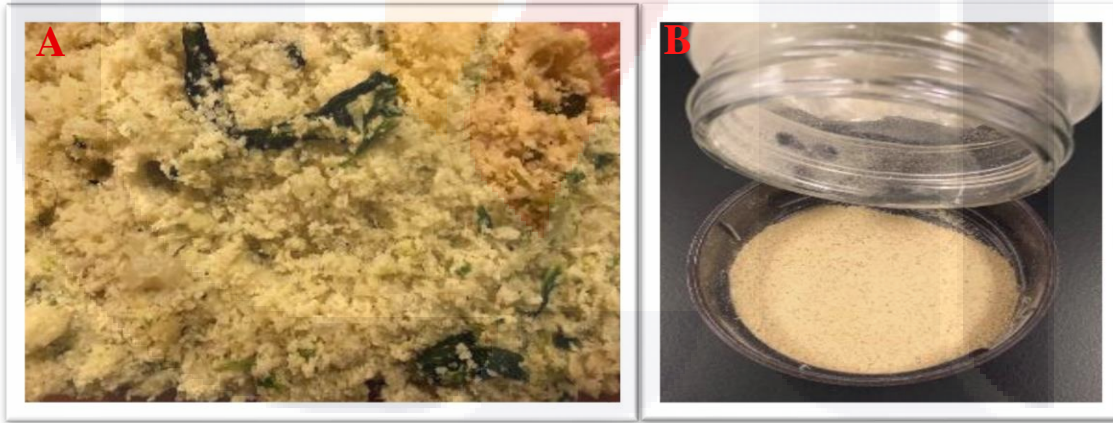


Figura 10. Subproducto de coliflor utilizado en los ensayos. Subproducto de coliflor antes (A) y después (B) de ser sometido a los procesos de secado y molienda.



Figura 11. Subproducto de huitlacoche utilizado en los ensayos. Subproducto de coliflor antes (A) y después (B) de ser sometido a los procesos de secado y molienda.

6.4 Medición de actividades enzimáticas en las preparaciones comerciales

Con la finalidad de caracterizar las preparaciones comerciales, se midieron las actividades enzimáticas para endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa y xilanasa según técnicas descritas por Colombatto & Beauchemin (2003):

- Ensayo para medir actividad de endoglucanasa (endo-(1-4)- β -D-glucanasa): Se utilizó como sustrato la carboximetilcelulosa (CMC) al 1 % (p/v). Para el ensayo, se mezclaron 0.25 mL de buffer citrato-fosfato 0.1 M (pH 6.0), CMC (0.5 mL) y agua destilada en tubos de ensayo y se incubaron durante 10 min a 39 °C en baño de agua, a fin de equilibrarlos. Luego, se agregó la preparación enzimática diluida adecuadamente en el buffer; se mezcló suavemente con vórtex hasta alcanzar un volumen de reacción final de 1.0 mL. Se realizó la incubación durante exactamente 15 minutos, y la reacción se finalizó mediante la adición de 1.5 mL de reactivo DNS. Los tubos se colocaron en ebullición durante exactamente 300 s y se enfriaron en agua. La absorbancia se leyó a 526 nm usando espectrofotómetro. La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó usando una curva estándar hecha con glucosa (rango de 0.1 a 0.3 mg de glucosa; ver anexo **Figura 22**), preparada en condiciones idénticas. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes

de glucosa/min por mililitro o por gramo de la preparación enzimática y en microkatalas por mililitro o por gramo de la preparación enzimática.

- Ensayo para medir actividad de exoglucanasa (exo-(1-4)- β -D-glucanasa o celobiohidrolasa): Se utilizó como sustrato celulosa microcristalina al 1 % (p/v). Debido a que este sustrato no es soluble en agua, la solución tuvo que estar en constante agitación mientras se tomó con la pipeta. Para el ensayo, se colocó 1 mL del sustrato, buffer citrato-fosfato (0.1 M, pH 6) y agua destilada, hasta alcanzar un volumen de reacción de 2 mL. La mezcla se incubó por 10 min a 39 °C para equilibrarlos. Posteriormente, se añadió la mezcla enzimática durante un tiempo de incubación de 120 minutos. Los tubos se colocaron en agua a ebullición por 10 minutos para terminar la reacción. En seguida, los tubos se enfriaron en agua y se centrifugaron a 1000 x g por 10 min. Se recuperó 1 mL de muestra de cada tubo, y se añadió 1 mL de agua destilada antes de mezclar con 3 mL del reactivo DNS y se llevó a cabo la técnica del DNS descrita anteriormente. La absorbancia se leyó a 540 nm usando espectrofotómetro. La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó usando una curva estándar hecha con glucosa (rango de 0.1 a 0.6 mg de glucosa; ver anexo **Figura 22**), preparada en condiciones idénticas. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes de glucosa/min por mililitro o por gramo de la preparación enzimática y en microkatalas por mililitro o por gramo de la preparación enzimática.
- Ensayo para medir actividad de xilanas (endo-(1-4)- β -D-xilano, xilanohidrolasa): Se utilizó como sustrato xilano de abedul al 1 %, preparado en agua destilada, para lo cual 1 g de xilano fue homogenizado en 60 mL de agua destilada a 60 °C y calentado hasta punto de ebullición con agitación constante. El sustrato se tapó y se le permitió enfriar con agitación continua durante una noche, al día siguiente se completó el volumen a 100 mL con agua destilada. Para la reacción, se mezcló 1 mL del sustrato, 0.9 mL de buffer de citratos (0.1 M, pH 6) y agua destilada y se incubaron

a 39 °C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió la mezcla enzimática y se completó el volumen a 2 mL. La reacción se dejó continuar por 300 s, y se finalizó por medio de la adición de 3 mL del reactivo DNS. Se llevó a cabo la técnica del DNS descrita anteriormente. La absorbancia se leyó a 540 nm usando espectrofotómetro. La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó usando una curva estándar hecha con xilosa (rango de 0.1 a 0.6 mg de xilosa; ver anexo **Figura 22**), preparada en condiciones idénticas. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes de xilosa/min por mililitro o por gramo de la preparación enzimática y en microkatalas por mililitro o por gramo de la preparación enzimática.

- Ensayo para medir actividad de β -glucosidasa: Se utilizó como sustrato el *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (1 mM), el cual se disolvió en buffer citrato-fosfato (0.1 M, pH 6). Para la reacción se mezcló un volumen apropiado de la dilución de la mezcla enzimática, 400 μ L del sustrato y buffer citrato-fosfato hasta alcanzar un volumen de reacción de 500 μ L. Posteriormente, se incubó la mezcla durante 15 minutos. La reacción se terminó por medio de la adición de 500 μ L de buffer de glicina (0.4 M, pH 10.8). Después de la adición del buffer de glicina, la absorbancia se midió a 405 nm. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se determinó usando una curva estándar (rango de 0.1 a 0.6 nmol de *p*-nitrofenol; ver anexo **Figura 22**), preparada en condiciones idénticas. Los resultados se expresaron en nanomoles de *p*-nitrofenol/min por mililitro o por gramo de la preparación enzimática y en microkatalas por mililitro o por gramo de la preparación enzimática.
- Ensayo para medir actividad de pectinasa: Se utilizó como sustrato ácido poli-galacturónico (0.24 %) disuelto en buffer de citrato-fosfato (0.1 M) a pH 6. Para la reacción se mezclaron 0.9 mL de buffer de citratos con 1 mL del sustrato, y se incubó durante 10 min a 39 °C. Posteriormente se añadió la mezcla enzimática y se incubó durante 10 min. La reacción se terminó al añadir 3 mL del reactivo DNS, después se realiza esta técnica realizando una curva estándar con ácido D-galacturónico (rango

de 0.1 a 1 mg de ácido D-galacturónico; ver anexo **Figura 22**). Las unidades se expresaron como micromoles de ácido galacturónico/min por mililitro o por gramo de mezcla enzimática.

Con la finalidad de corregir las absorbancias, en los diferentes ensayos se incluyeron como controles un tubo con el respectivo sustrato sin la mezcla enzimática, y un tubo con la mezcla enzimática sin sustrato.

6.5 Determinación de proteína en las muestras enzimáticas

Debido a la necesidad de comparar los resultados para la medición de actividades enzimáticas de las dos preparaciones fibrolíticas comerciales se procedió a determinar su contenido de proteínas. Para ello se empleó el kit comercial DC Protein Assay de BIO RAD®.

El ensayo se basa en la reacción de la proteína con una solución alcalina de tartrato de cobre y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Al igual que con el ensayo de Lowry, hay dos pasos que conducen al desarrollo del color: la reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino, y la posterior reducción del reactivo de Folin por la proteína tratada con cobre, produciendo así una o más de varias especies reducidas posibles y desarrollando un color azul característico con absorbancia máxima a 750 nm y absorbancia mínima a 405 nm. (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951; Peterson, 1979).

Para el ensayo se tomaron 500 μ L del reactivo A (solución de tartrato de cobre alcalino) en tubo Eppendorf, se mezclaron con la enzima disuelta en BCF pH 6 y se mezclaron con vórtex. Luego se agregó 4 mL del reactivo B (reactivo de Folin diluido) y se mezcló nuevamente con la ayuda de un vórtex, para alcanzar un volumen final de reacción de 4.6 mL. Los tubos se protegieron de la luz y después de 15 minutos de reacción éstos se leyeron a 750 nm. Los resultados se compararon con la ayuda de una curva estándar de BSA (rango 0.4-1.5 mg de BSA; ver anexo **Figura 23**)

6.6 Determinación de humedad

Con el fin de expresar los resultados en g de peso seco de muestra, fue determinado el contenido de humedad según la técnica de la AOAC (1990). Para ello se pesaron aproximadamente 3 g de las diferentes muestras y se llevaron a peso constante en estufa (Felisa® mod. FE-291AD) a 105 °C.

6.7 Extracción de compuestos fenólicos

Para la obtención del extracto que se utilizó para estas determinaciones se pesó 1 g del subproducto en polvo y se agregaron 40 mL de metanol:agua (50:50) a pH 2, se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se centrifugó la muestra a 6000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante (Extracto A). Al residuo se le agregó nuevamente una mezcla de 40 mL de acetona:agua (70:30), para posteriormente agitarla a temperatura ambiente por 1 h. Una vez terminado este lapso, nuevamente se centrifugó a 6000 rpm por 10 min, recuperándose el sobrenadante (Extracto B). Los extractos A y B se mezclaron para llevar a cabo la determinación de fenoles solubles y flavonoides, correspondientes a la fracción de fenoles extraíbles. El residuo correspondiente a la fracción de fenoles no extraíbles se le determinarán los ensayos de taninos condensados y taninos hidrolizables (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015a).

6.8 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles total se determinará utilizando el método de Folin-Ciocalteu, basado en el método utilizado descrito por Singleton *et al.* (1998). Esta técnica cuantifica la concentración total de grupos hidroxilos fenólicos presentes en la muestra que se está analizando y se basa en una reacción de óxido-reducción obteniendo una coloración azul (Gutiérrez-Ruiz, 2017). Al extracto A+B se le añadió el reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, agua destilada y carbonato de sodio al 7% hasta alcanzar un volumen final de reacción de 3

mL. Los tubos se incubaron en oscuridad durante 90 min y se midió la absorbancia a 757 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg GAE / g) basado en una ecuación lineal para una curva patrón preparada con ácido gálico como estándar (10 – 80 µg; ver anexo **Figura 24**).

6.9 Flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó siguiendo el método colorimétrico diseñado por (Marinova *et al.*, (2005). El contenido de flavonoides totales se basa en la capacidad del $AlCl_3$ para formar quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados (Gutiérrez-Ruiz, 2017). 0.25 mL de la muestra se mezclaron con 75 µL de $NaNO_2$ al 5% (p/v), 150 µL de $AlCl_3$ 10 % (p/v), y 500 µL de NaOH 1M. Se ajustó con agua destilada hasta un volumen final de 2.5 mL, para posteriormente realizar la lectura espectrofotométrica a 510 nm, comparando con una curva patrón utilizando como estándar (+)-catequina (rango 3.33 – 83.33 µg de catequina; ver anexo **Figura 26**). Los resultados se expresarán como mg de Catequina Equivalente /g de peso seco (Zapata *et al.*, 2013).

6.10 Taninos condensados

La cuantificación de proantocianidinas no extraíbles se realizó mediante la hidrólisis ácida con n-butanol del residuo de la extracción descrita anteriormente para fenoles extraíbles. Esta técnica se fundamenta en la liberación a partir de calor y un alcohol de las antocianidinas estables al calor a partir de los taninos condensados del subproducto, estas antocianidinas son pigmentos que generan un compuesto coloreado que se puede medir a una longitud de onda de 550 nm. Las proantocianidinas presentes en el residuo se hidrolizaron de acuerdo al método descrito por (Porter *et al.* (1986). Brevemente, en un tubo con tapa de 10 mL se agregó 5 mL de n-butanol/HCl (95:5), después se añadió 0.1 g del residuo y 0.2 mL del reactivo metálico (2 % p/v sulfato de amonio férrico en una concentración 2 mol/L HCl), y

el contenido se mezcló en el vórtex. Se colocó en baño maría a temperatura de ebullición durante 1 h. Posteriormente, se dejó enfriar el tubo y la solución se transfirió a un matraz aforado ajustando el volumen a 25 mL, con el reactivo n-butanol/HCl antes preparado. Las absorbancias se leen a una longitud de onda de 450 y 555 nm. Los resultados se expresaron como miligramos de proantocianidinas (PA) por gramo de muestra seca comparando con una curva de PA (rango 0-1 mg/L; ver anexo **Figura 27**) (Zurita *et al.*, 2012).

6.11 Taninos hidrolizables

El fundamento de esta técnica consiste en liberar por medio de una hidrólisis acida y temperatura a los taninos hidrolizables. En esta técnica de igual forma se usó el residuo de la técnica de fenoles extraíbles descrita anteriormente. El procedimiento es el siguiente, se pesaron 20 mg de la muestra y se le agregaron 2 mL de metanol/H₂SO₄ (90:10), se dejó incubar a 85 °C durante 20 h con agitación moderada. Después de este tiempo se centrifugaron los tubos a 3000 g y al sobrenadante se le ajustó el volumen a 10 mL con agua destilada en un matraz aforado. Por último, se determinó el contenido de fenoles totales por el método descrito por Singleton *et al.* (1998). (Hartzfeld *et al.*, 2002).

6.12 Evaluación del poder reductor por el método de FRAP

Este método evalúa el poder reductor de una muestra en base a su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe³⁺) acomplejado con 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa (Fe²⁺), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm, según lo diseñó Benzie & Strain (1996). A la muestra se le adiciona una solución de FRAP (Buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3.4), TPTZ, FeCl₃, en relación 10:1:1), luego de 30 minutos de reacción se determina la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm; este valor se compara con una curva de referencia construida con Trolox (rango 16.66-100 nmol; ver anexo **Figura 28**) como patrón primario, y los resultados se expresan como miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra seca (Zapata *et al.*, 2013).

6.13 Evaluación de la Capacidad Antioxidante por el método del DPPH

Se empleará el método de Brand-Williams *et al.* (1995). El método se basa en la disminución de la absorbancia medida a 517 nm debido a la reducción del radical DPPH• por la acción de los antioxidantes (Gutiérrez-Ruiz, 2017). A la muestra se le añadirá solución metanólica de DPPH, y se evaluará la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 90 min de reacción (protegiéndose de la luz) a una longitud de onda de 515 nm, comparando el valor con una curva de referencia construida con Trolox como patrón primario (rango 0-35 nmol de Trolox; ver anexo **Figura 26**), los resultados serán expresados como Trolox mg equivalente /g peso seco (Zapata *et al.*, 2013).

6.14 Establecimiento de las condiciones enzimáticas

Se utilizó la preparación enzimática comercial denominada Promote® (NET Cargill). La extracción de compuestos bioactivos a partir de los subproductos usando enzimas degradadoras de polisacáridos se optimizó usando la MSR con un Diseño Central Compuesto (DCC), empleando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1. Se evaluaron 4 factores (X1, X2, X3, X4) cada uno con 5 niveles ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$), con el objetivo de obtener el rendimiento óptimo de compuestos fenólicos y flavonoides con el máximo potencial antioxidante retenido por medio de la inhibición del radical DPPH. En la **Tabla 6** se describen la codificación de los factores (X) y sus niveles (Gutiérrez-Ruiz, 2017).

Tabla 6. Factores y niveles a usar en el diseño central compuesto con sus valores reales y codificados.

Factor/nivel		$-\alpha$	-1	0	1	α
X1	Concentración de enzima (%)	1	1.5	2	2.5	3
X2	pH	4	5	6	7	8
X3	Temperatura (°C)	30	40	45	50	60
X4	Tiempo de incubación (h)	1	3	4	5	7

El diseño experimental se presenta en la **Tabla 7**; se realizaron 26 corridas experimentales de manera aleatoria usando un diseño central compuesto con 24 corridas en los puntos axiales y factoriales y 2 corridas replicadas en los puntos centrales donde se aumentan para estimar los efectos significativos y el error puro por medio del análisis estadístico (Gutiérrez-Ruiz, 2017).

Siguiendo las condiciones de las corridas en el orden aleatorio, se tomó el subproducto y se colocó en matraz Erlenmeyer, protegiéndolo de la luz con papel aluminio. Posteriormente se le agregó BCF previamente ajustado al pH correspondiente y se mezcló con la concentración de enzima de acuerdo al diseño experimental. Posteriormente, se incubó la mezcla a la temperatura correspondiente con agitación continua y una vez terminada la incubación se pasó a un tubo Falcón de 50 mL para proceder a congelarlo a una temperatura de -80 °C en un ultracongelador tipo REVCO. Una vez congelado, el contenido del tubo se liofilizó y se llevaron a cabo las determinaciones posteriores (Gutiérrez-Ruiz, 2017).

Tabla 7. Diseño experimental con 26 corridas con los factores codificados y sus niveles de manera aleatoria para la extracción de compuestos bioactivos con enzimas usando el DDC.

Corrida	Concentración de enzima (X1)	pH (X2)	Temperatura (X3)	Tiempo (X4)
1	-2	0	0	0
2	-1	-1	-1	-1
3	-1	-1	-1	1
4	-1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	1
6	-1	1	-1	-1
7	-1	1	-1	1
8	-1	1	1	-1
9	1	1	1	1
10	0	- α	0	0
11	0	0	- α	0
12	0	0	0	- α
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	α
16	0	0	α	0
17	0	α	0	0
18	1	-1	-1	-1
19	1	-1	-1	1
20	1	-1	1	-1
21	1	-1	1	1
22	1	1	-1	-1
23	1	1	-1	1
24	1	1	1	-1
25	1	1	1	1
26	α	0	0	0

Se tuvieron como variables de respuestas a cuantificar contenido de fenoles solubles totales, contenido de flavonoides y en los extractos los diferentes ensayos descritos anteriormente. Para cada uno se ajustaron a un modelo de regresión cuadrático con una ecuación polinomial de segundo grado como el siguiente:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i>1}^k \sum_j^k b_{ij} X_i X_j$$

Donde Y= respuesta a ser optimizada; $\sum_{i=1}^k b_i X_i$ es el efecto lineal de las variables; $\sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2$ es el efecto cuadrático y $\sum_{i>1}^k \sum_j^k b_{ij} X_i X_j$ es la interacción entre los diferentes parámetros. La significancia estadística de los parámetros estimados, el ajuste del modelo aplicado y la proporción de varianza fueron determinados por un ANOVA (análisis de varianza), también se realizó la prueba de falta de ajuste y la determinación de coeficiente múltiple (R^2), esto con la finalidad de determinar si el modelo es adecuado y que se pueda utilizar para predecir la variable de respuesta (Gutiérrez-Ruiz, 2017).

Una vez ajustado el modelo se graficaron ambos modelos cuadráticos y sus curvas de nivel. Debido a que se tienen tres variables de respuesta para determinar un óptimo común se utilizara el Método de superposición de curvas de nivel, en donde se utilizan las curvas de nivel de cada modelo superponiéndolas en una gráfica y aplicando la función de deseabilidad, en donde se indica que se quieren maximizar las respuestas. Este método nos dará la solución óptima global para las tres variables de respuesta (citado por Gutiérrez-Ruiz, 2017 en Castaño-Tostado & Domínguez-Domínguez, 2010; Bezerra *et al.*, 2008).

6.15 Análisis Estadístico

Para los diferentes estudios se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño completamente al azar, para determinar las diferencias entre los tratamientos, y una comparación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) empleando el software estadístico MiniTab® 17 (Steel & Torrie, 1981).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Actividades enzimáticas de las preparaciones fibrolíticas evaluadas.

Al revisar en la literatura se ha encontrado que los productos de enzimas comerciales son de origen fúngico y bacteriano. Por lo general, estas mezclas consisten en combinaciones de varias enzimas, pero complica la identificación de las enzimas específicas responsables de las respuestas positivas observadas (Meale *et al.*, 2014; Morgavi *et al.*, 2013). Es por eso que en la presente se evaluaron diferentes actividades enzimáticas de dos preparaciones fibrolíticas comerciales; Promote® y Fibrozyme®; con la finalidad de caracterizarlas. Los resultados se resumen en la **Tabla 8** y en la **Figura 12**.

Tabla 8. Actividades enzimáticas de las dos preparaciones fibrolíticas comerciales analizadas.

ENSAYO	UNIDADES	MUESTRA ENZIMÁTICA	
		Fibrozyme® (g-1)	Promote® (mL ⁻¹)
*Endoglucanasa	μmol glucosa min ⁻¹	52.96 ± 3.86 ^b	179.62 ± 2.43 ^a
	μkat	0.79 ± 0.06 ^b	2.69 ± 0.04 ^a
	μkat/mg de proteína	0.0331 ± 0.002 ^a	0.017 ± 0.0002 ^b
*β-Glucosidasa	μmol pNF min ⁻¹	11.42 ± 0.44 ^b	20.47 ± 1.13 ^a
	μkat	0.19 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.02 ^a
	μkat/mg de proteína	0.0079 ± 0.0003 ^a	0.002 ± 0.0001 ^b
*Exoglucanasa	μmol glucosa min ⁻¹	0.70 ± 0.04 ^a	0.028 ± 0.004 ^b
	μkat	0.01 ± 0.001 ^a	0.0004 ± 0.00 ^b
	μkat/mg de proteína	0.0004 ± 0.00003 ^a	0.000003 ± 0.000004 ^b
*Xilanasa	μmol xilosa min ⁻¹	1703.74 ± 14.91 ^a	259.48 ± 5.17 ^b
	μkat	29.99 ± 0.22 ^a	3.81 ± 0.08 ^b
	μkat/mg de proteína	1.04 ± 0.009 ^a	0.024 ± 0.0005 ^b
*Pectinasa	μmol xilosa min ⁻¹	Sin actividad	50.62 ± 0.32 ^a
	μkat		0.76 ± 0.005 ^a
	μkat/mg de proteína		0.005 ± 0.00003 ^a

*Los datos se representan como la media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa (p<0.05) bajo la prueba de Tukey (n= 3).

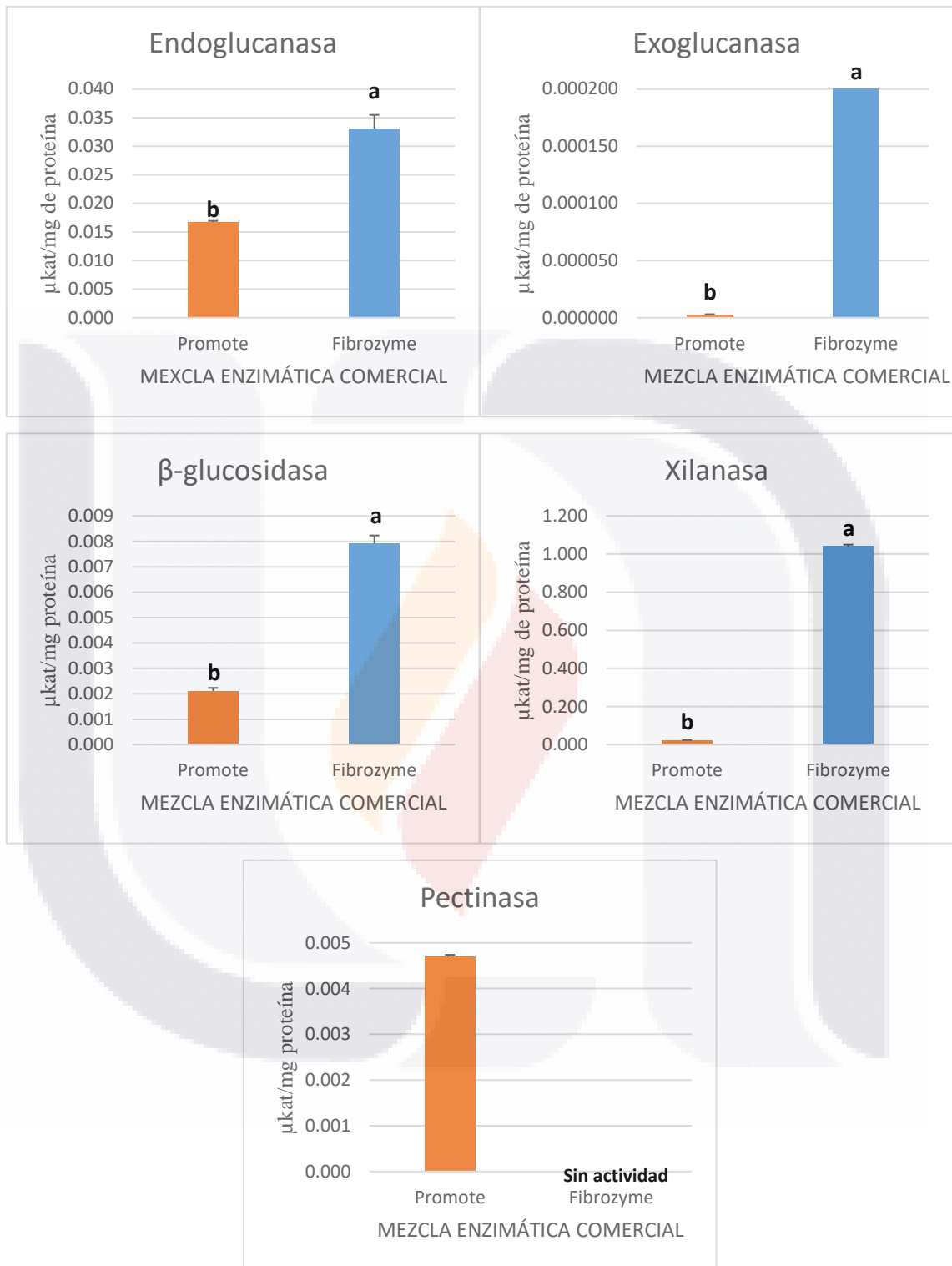


Figura 12. Comparación de medias de las diferentes actividades enzimáticas evaluadas en las dos preparaciones fibrolíticas comerciales. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{kat/mg}$ de proteína.

Al observar la **Tabla 8** y la **Figura 12**, en general Fibrozyme® obtuvo mejores resultados para los ensayos de actividades de endoglucanasa ($0.0331 \pm 0.002 \mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteína), β -glucosidasa ($0.0079 \pm 0.0003 \mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteína) y xilanasa (1.04 ± 0.009), al compararla contra Promote® ($0.017 \pm 0.0002 \mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteína; $0.002 \pm 0.0001 \mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteína y $0.024 \pm 0.0005 \mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteína) respectivamente. Sin embargo, Promote® mostró actividad de pectinasa (0.005 ± 0.00003), en contraste con Fibrozyme®. Fibrozyme® es un producto comercial (Alltech Inc., Nicholasville, KY, USA) a base de celulasas, hemicelulasas y proteasas y su actividad xilanásica es 100 UI g^{-1} (Tricarico *et al.*, 1998). Al evaluar su actividad de endoglucanasa se obtuvo un resultado de $52.96 \mu\text{mol glucosa min}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo cual es muy parecida a la reportada (56.87 UI g^{-1}) por Ramírez *et al.* (2005), a pH 6.5; y mayor a la reportada por Meraz-Romero *et al.* (2012), cuya actividad fue de $36 \pm 0.007 \text{ UI g}^{-1}$.

En cuanto a la actividad xilanásica, se obtuvo un valor experimental de $1703.74 \pm 14.91 \mu\text{mol xilosa min}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Ranilla *et al.* (2008) obtuvieron un valor de $583 \mu\text{mol xilosa min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ a partir de xilano de cascarilla de avena y $163 \mu\text{mol}$ de glucosa por minuto a partir de carboximetilcelulosa a pH 6.5 y $39 \text{ }^\circ\text{C}$. Igualmente se ha encontrado una gran variación de actividad de xilanasas (148 UI g^{-1}) y celulasas (791 UI g^{-1}) (Giraldo *et al.*, 2008; Hristov *et al.*, 2008). Frumholtz & Beauchemin (1999) también reportan trazas de actividad de β -glucosidasa, lo cual es consistente con los resultados obtenidos ($11.44 \mu\text{mol pNF min}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

Promote® (N.E.T., Cargill Inc., Agribrands Int., St. Louis, MO, USA) es una preparación enzimática de tipo líquido, con actividad celulasa y xilanasa. La actividad enzimática, medida como micromoles de azúcares reductores liberados por minuto a partir de celulosa, pH 5.0, 40°C , fue de 1200 unidades de actividad celulasa por gramo de preparación enzimática (Balci *et al.*, 2007). Dean *et al.* (1993) midieron la actividad xilanásica (5190 UI mL^{-1}) a pH 5.5 a $39 \text{ }^\circ\text{C}$, que al compararla con el valor experimental (179.62 ± 2.43) resulta una diferencia marcada. No obstante, Colombatto *et al.* (2003) midieron a las mismas condiciones ($39 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH 6.0) encontrando actividades de endoglucanasa (225 UI mL^{-1}), β -glucosidasa (102 UI mL^{-1}), xilanasa (2252 UI mL^{-1}) y exoglucanasa (24 UI mL^{-1}), que al compararlas contra las obtenidas en este estudio (179.62 , 20.47 , 259 y 0.028 UI mL^{-1} , respectivamente) resultan en diferencias notables; aunque para determinar la cantidad de azúcares reductores, ellos

utilizaron la técnica del reactivo de Somogyi-Nelson, realizando la lectura espectrofotométrica a 630 nm, a diferencia de la técnica del DNS utilizada en el presente trabajo.

Meraz-Romero *et al.* (2012) mencionan que la mayoría de variaciones para medir actividades enzimáticas son debido a que las condiciones y métodos usados en diversos estudios varían, como por ejemplo, diferencias de temperatura y pH estándares para medir la actividad; lo que dificulta una comparación de los productos o la predicción de su eficacia.

7.2 Contenido de humedad

Debido a la necesidad de expresar los resultados en g de base seca, se realizó la determinación del porcentaje de humedad en los diferentes subproductos evaluados y cuyos resultados se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Porcentaje de humedad y porcentaje de sólidos en los subproductos evaluados.

Subproducto	% Humedad	% Sólidos
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	6.562 ± 0.081	93.435 ± 0.081
Coliflor (<i>Psidium guajava</i>)	6.958 ± 0.032	93.042 ± 0.032
Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>)	10.616 ± 0.057	89.384 ± 0.057

7.3 Compuestos polifenólicos extraíbles en las muestras de subproductos agroindustriales y medición de su capacidad antioxidante.

Los compuestos polifenólicos son componentes muy importantes debido a sus actividades antioxidantes, su quelación de iones metálicos activos redox, la inactivación de las cadenas de lípidos libres de radicales y la prevención de la conversión de hidroperóxido en oxirradicales reactivos. El contenido fenólico se puede utilizar como un indicador importante

de la capacidad antioxidante y se puede utilizar como una pantalla preliminar para cualquier producto cuando se pretende usar como fuente natural de antioxidantes en alimentos funcionales (Wijngaard *et al.*, 2009).

Se ha reportado que los ácidos fenólicos y flavonoides son los principales fitoquímicos responsables de la actividad antioxidante de frutas y verduras (Martínez *et al.*, 2012). Para medir la capacidad antioxidante de los alimentos en las últimas décadas se han desarrollado diversos métodos, con la finalidad de evaluar los diferentes mecanismos de acción de los compuestos presentes para inhibir los procesos de oxidación. Debido a que el resultado global es consecuencia de múltiples factores como el tipo de especies activas y características de la reacción, no existe un método universal simple o sencillo por el cual se pueda medir la capacidad antioxidante cuantitativamente de forma precisa (Niki, 2010).

Para medir la capacidad antioxidante se utilizó la técnica del DPPH evaluando la fracción correspondiente a la de polifenoles extraíbles y en la cual, las muestras de subproductos de guayaba mostraron mayor capacidad antioxidante, en contraste con el extracto de polifenoles extraíbles de coliflor y de huitlacoche.

La **Tabla 10** y la **Figura 13** muestran los resultados obtenidos para dicha fracción, así como los resultados de la capacidad antioxidante usando DPPH como radical libre y el método FRAP.

Tabla 10. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.

SUBPRODUCTO	POLIFENOLES EXTRAÍBLES			
			Actividad antioxidante*	
	Fenoles solubles (mg eq. de ácido gálico/g bs)*	Flavonoides (mg eq. de catequina/g bs)*	FRAP (mg eq. de Trolox/g bs)*	DPPH (mg eq. de Trolox/g bs)*
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	14.66 ± 0.36 ^a	4.95 ± 0.23 ^a	24.40 ± 0.43 ^a	30.47 ± 0.39 ^a
Coliflor (<i>Brassica oleracea var. Botrytis</i>)	2.32 ± 0.10 ^c	2.49 ± 0.04 ^b	2.77 ± 0.95 ^c	2.28 ± 0.09 ^c
Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>)	10.07 ± 0.28 ^b	3.75 ± 0.06 ^b	9.07 ± 0.57 ^b	5.22 ± 0.46 ^b

*Los datos se representan como la media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) bajo la prueba de Tukey (n= 3).

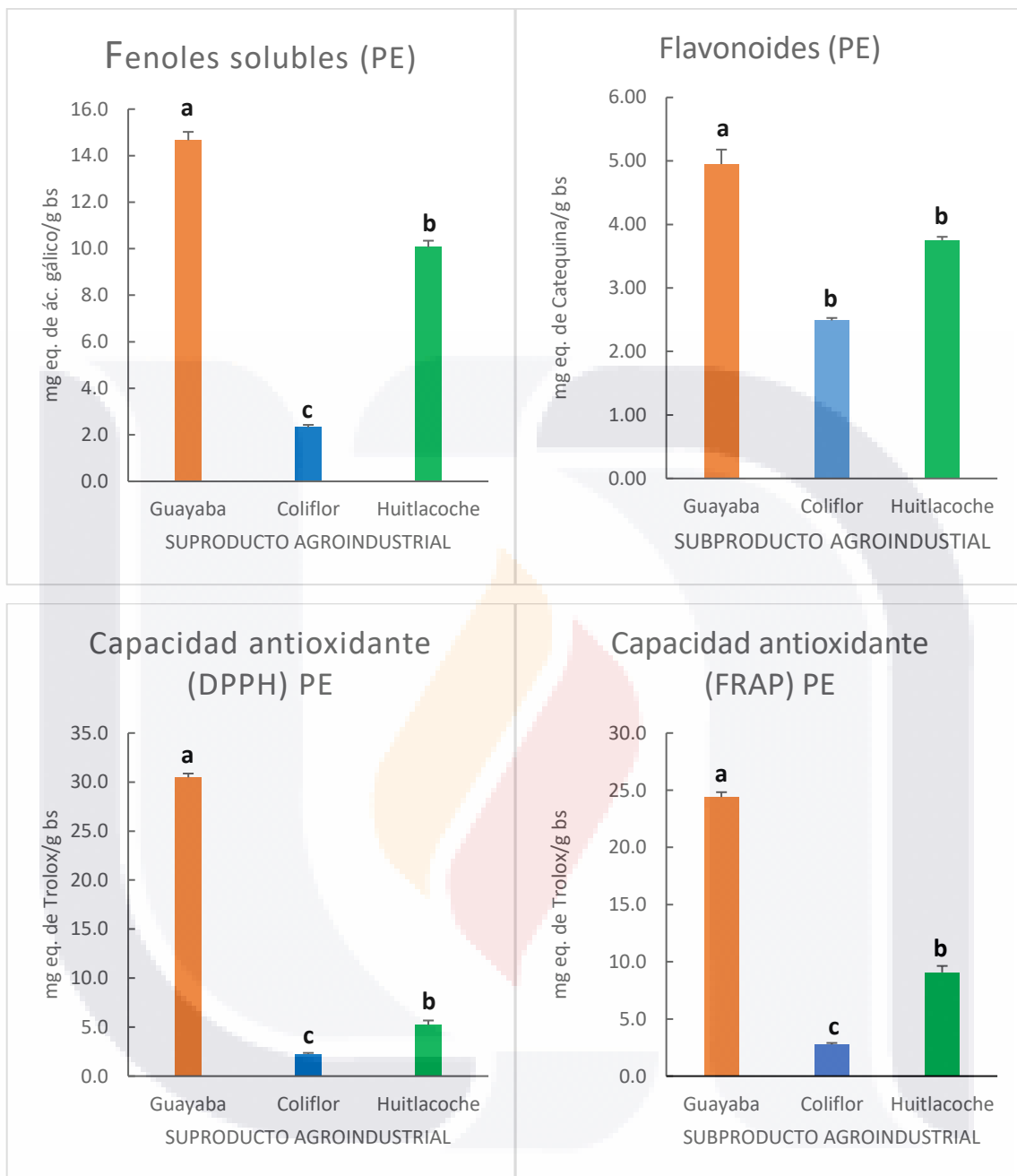


Figura 13. Contenido de fenoles totales solubles de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando DPPH como radical libre y método FRAP. Los resultados fueron expresados en GAE mg/g bs; mg eq. catequina/g bs y mg eq. Trolox/g bs para DPPH y FRAP. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) bajo la prueba de Tukey ($n = 3$).

Según los resultados obtenidos, la fracción correspondiente a los polifenoles extraíbles de subproducto de guayaba presenta diferencia significativa con respecto a los subproductos de coliflor y huitlacoche para todos los ensayos.

Amaya-Cruz *et al.* (2015) reportan niveles para fenoles solubles en subproducto de guayaba de 7.5 ± 0.3 GAE mg/g bs y para flavonoides de 2.3 ± 0.1 mg eq. catequina/g bs, que al comparar con los resultados obtenidos (14.66 ± 0.36 y 4.95 ± 0.23 respectivamente), son dos veces menores. Así mismo, Martínez *et al.* (2012) encontraron valores para fenoles solubles de 250 GAE mg/g bs, mientras que para DPPH Y FRAP fueron de 3.85 y 2.78 mg eq. Trolox/g bs para subproducto de guayaba. Jiménez-Escrig *et al.* (2001) utilizando el mismo método de extracción reportan valores de 0.0587 GAE mg/g bs para piel de guayaba y de 0.0263 GAE mg/g bs para pulpa; así mismo reportan 115.63 y de 59.57 mg eq. Trolox/g bs para piel y pulpa respectivamente. No obstante, Araújo *et al.* (2014), encontraron valores de fenoles solubles de 1.88 ± 0.12 GAE mg/g bs en subproductos de guayaba. (Larrosa *et al.* (2002) reportan el contenido de fenoles solubles totales del subproducto de coliflor de 0.036 ± 0.002 mg eq. de Trolox/ g de peso húmedo, mientras que el obtenido fue de 2.17 ± 0.096 mg eq. de Trolox/ g de peso húmedo, lo que resulta en un valor mayor. Esto podría deberse a diversos factores como el tipo de extracto utilizado, ya que para esta determinación se utilizó una extracción secuencial doble con mezclas de solventes acidificados metanol:acetona:agua para un mejor rendimiento de extracción (Hassan *et al.*, 2011).

Para el caso del subproducto de coliflor, Wijngaard *et al.* (2009) obtuvieron 4.02 ± 0.11 GAE mg/g bs, para FRAP de 5.35 ± 0.12 mg eq. Trolox/g bs y en el caso de DPPH de 2 ± 0.14 mg eq. Trolox/g bs, valor muy parecido al obtenido (2.77 ± 0.95 mg eq. Trolox/g bs), mientras que Babbar *et al.* (2014) reportan 9.2 ± 0.60 GAE mg/g bs para el caso de fenoles solubles en subproducto de coliflor.

Para el caso del subproducto de huitlacoche no ha sido reportado en la literatura algún antecedente sobre la evaluación del contenido de compuestos fenólicos y determinación de la capacidad antioxidante, sin embargo, Dong *et al.* (2014) estudiaron la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos en subproducto de maíz, el cuál es muy parecido al subproducto de huitlacoche. Dichos autores reportaron 2.98 ± 0.12 mg GAE/g bs para hoja, 2.83 ± 0.13 mg GAE/g bs para olote, y 3.99 ± 0.19 mg GAE/g bs para cabello, y que sumados

resultan en un valor muy parecido al que se obtuvo (10.07 ± 0.28 mg GAE/g bs).

Floegel *et al.* (2011), analizan la composición y la capacidad antioxidante de 50 vegetales y frutas y bebidas, concluyendo que las frutas y bebidas poseen mayor actividad antioxidante que los vegetales, en el caso de polifenoles extraíbles.

Martínez *et al.* (2012) y Araújo *et al.* (2014), mencionan que la concentración y el tipo de sustancias fenólicas dependen de varios factores como lo son las diferencias entre variedades, estación, factores ambientales como el tipo de suelo y clima, factores genéticos y métodos de procesamiento y extracción.

7.4 Compuestos polifenólicos no extraíbles (taninos condensados e hidrolizables) en las muestras de subproductos agroindustriales y medición de su capacidad antioxidante.

Los polifenoles no extraíbles son una fracción emergente e ignorada de antioxidantes dietéticos que presentan características estructurales y fisiológicas diferenciales en comparación con los bien conocidos polifenoles extraíbles. Estos compuestos se dividen principalmente en dos fracciones: polifenoles hidrolizables (taninos hidrolizables), que son compuestos fenólicos de bajo peso molecular fuertemente asociados con polisacáridos o proteínas; y proantocianidinas no extraíbles (taninos condensados), que son estructuras de alto peso molecular (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015a).

Las **Tablas 11** y **12** resumen los resultados obtenidos para estas fracciones, así como su capacidad antioxidante empleando DPPH como radical libre y el método FRAP.

Tabla 11. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.

SUBPRODUCTO	POLIFENOLES NO EXTRAÍBLES	
		Actividad antioxidante*
	Taninos Condensados (mg eq. de PA/g bs)*	FRAP (mg eq. de Trolox/g bs)*
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	230.19 ± 4.92 ^a	31.51 ± 1.11 ^b
Coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>)	24.44 ± 0.87 ^b	2.34 ± 0.13 ^c
Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>)	31.08 ± 1.22 ^b	89.12 ± 1.26 ^a

*Los datos se representan como la media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) bajo la prueba de Tukey (n= 3).

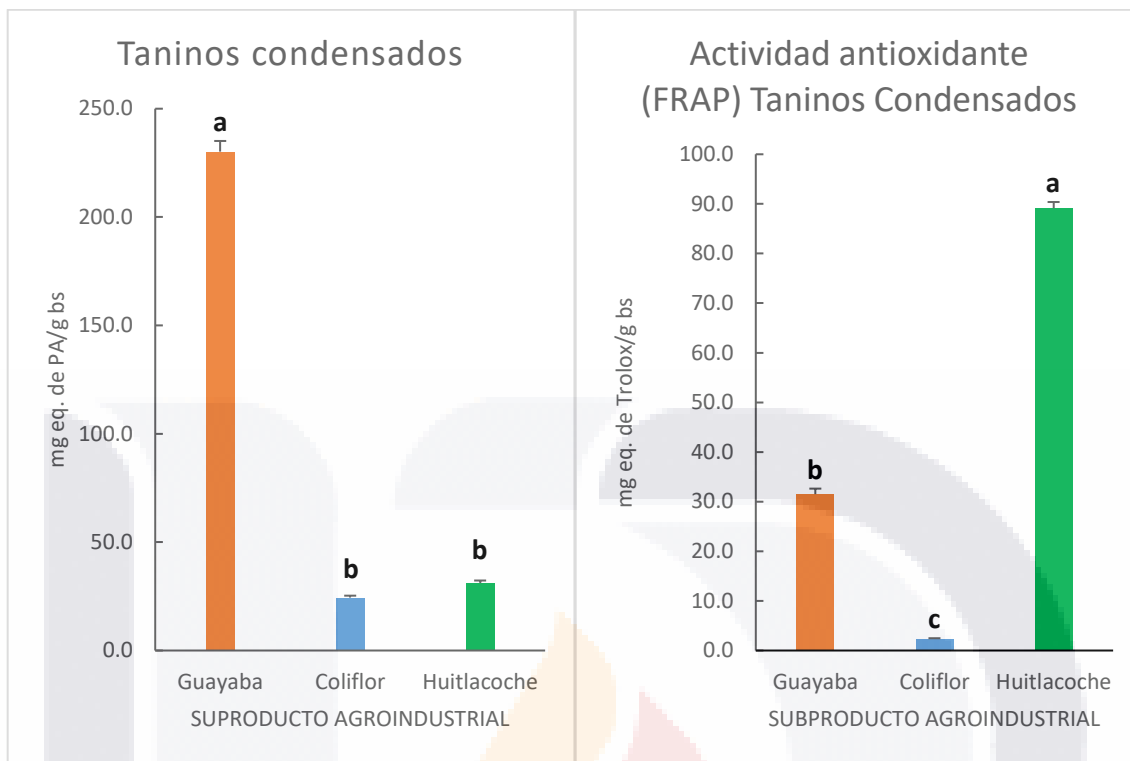


Figura 14. Contenido de taninos condensados de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando la técnica de FRAP. Los resultados fueron expresados en PA mg/g bs en el caso de taninos condensados y mg eq. Trolox/g bs para DPPH. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) bajo la prueba de Tukey ($n = 3$).

De acuerdo a los resultados presentados en la **Tabla 11** y en la **Figura 14**, se puede observar que el subproducto de guayaba obtuvo un valor mayor para el caso de taninos condensados (230.19 ± 4.92 mg eq. PA/g bs) en comparación con el subproducto de coliflor y de huitlacoche (24.44 ± 0.87 y 31.08 ± 1.22 mg eq. PA/g bs, respectivamente). Amaya-Cruz *et al.* (2015), reportan valores de 13.2 ± 1.7 mg eq. PA/g bs para subproducto de guayaba. En cuanto a la medición de la capacidad antioxidante de los extractos de taninos condensados empleando el método FRAP, éstos mostraron poseer actividades superiores a los extractos de polifenoles extraíbles. Para el caso de subproducto de guayaba fue de 1.3 veces mayor, mientras que para el subproducto de huitlacoche fue 23.7 veces. En contraste, el subproducto de coliflor obtuvo un valor similar en ambos extractos.

Resulta interesante que el subproducto de huitlacoche a pesar de poseer un nivel inferior de taninos condensados con respecto al de guayaba obtuviera mayor capacidad antioxidante, por lo que esta tendencia pudiera deberse a alguna clase de compuestos fenólicos que, para conocerlos específicamente, tendría que emplearse el uso de herramientas tales como HPLC. Al respecto, Dong *et al.* (2014) han identificado por medio de HPLC en cabello, hoja y olote de maíz compuestos fenólicos tales como ácido gálico, ácido caféico, ácido ferúlico y resveratrol.

La **Tabla 12** y la **Figura 15** muestran los resultados para el caso de extractos de taninos hidrolizables y en los cuales se encontró que el subproducto de guayaba siguió la misma tendencia en el caso de taninos condensados, ya que es el que posee mayores niveles (26.84 ± 0.18 mg eq. ác. gálico/g bs) al compararlos con huitlacoche y coliflor (22.96 ± 0.14 y $8.75 \pm$ mg eq. ác. gálico/g bs, respectivamente). Amaya-Cruz *et al.* (2015), reportan niveles de 0.69 ± 0.0 mg eq. ác. gálico/g bs para el caso de subproducto de guayaba, lo cual es menor a lo obtenido. Para el caso de subproducto de coliflor, Gonzales *et al.* (2014) reportaron un valor de 7.3 ± 0.17 mg eq. ác. gálico/g bs utilizando un proceso de sonicación y extracción mediante el uso de un álcali, resultando en un valor comparable con el obtenido experimentalmente utilizando una extracción con metanol/H₂SO₄.

Tabla 12. Contenido de compuestos polifenólicos no extraíbles y actividad antioxidante en los diferentes extractos de los subproductos evaluados.

POLIFENOLES NO EXTRAÍBLES		
SUBPRODUCTO		Actividad antioxidante*
	Taninos Hidrolizables (mg eq. de ác. gálico/g bs)*	DPPH (mg eq. de Trolox/g bs)*
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	26.84 ± 0.18 ^a	56.82 ± 0.35 ^a
Coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>)	8.75 ± 0.50 ^c	39.55 ± 2.02 ^b
Huitlacoche (<i>Ustilago maydis</i>)	22.96 ± 0.14 ^b	41.52 ± 0.45 ^b

*Los datos se representan como la media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) bajo la prueba de Tukey (n= 3).

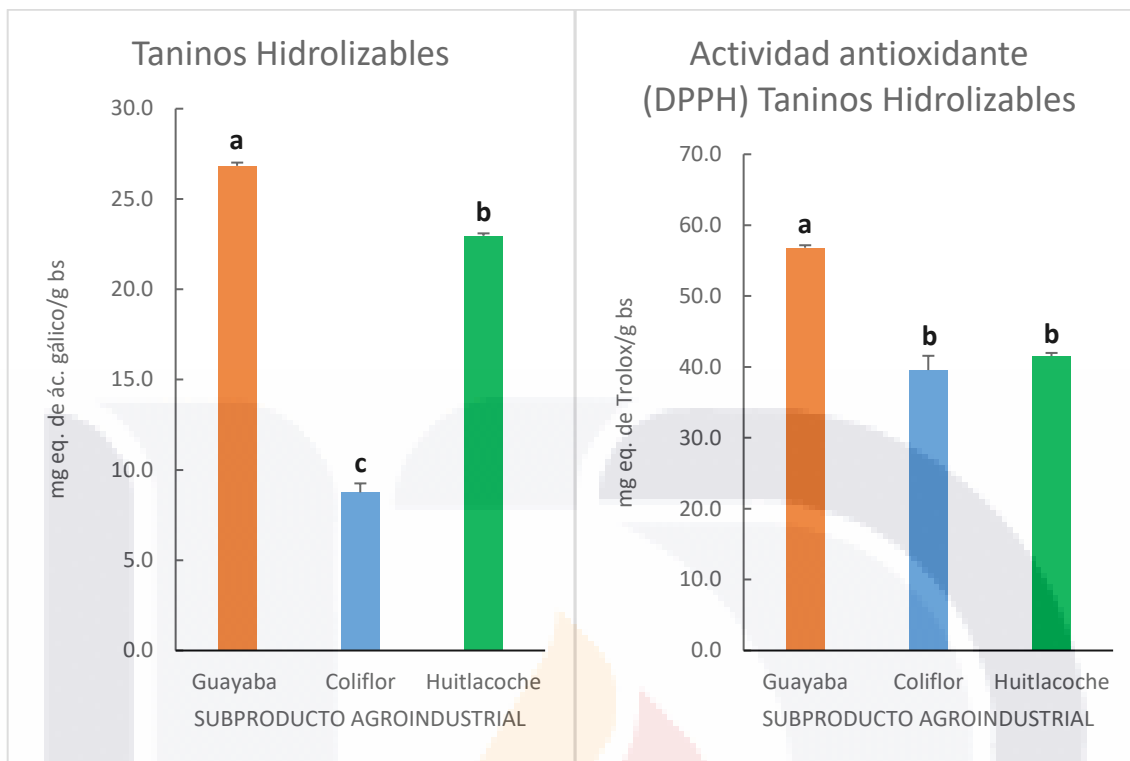


Figura 15. Contenido de taninos hidrolizables de subproductos agroindustriales, contenido de flavonoides y capacidad antioxidante empleando DPPH como radical libre. Los resultados fueron expresados en GAE mg/g bs para el caso de taninos hidrolizables y mg eq. Trolox/g bs para DPPH. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) bajo la prueba de Tukey ($n = 3$).

No se encontraron datos reportados en la literatura de capacidades antioxidantes en la fracción PNE de los subproductos agroindustriales evaluados, por lo que no es posible comparar. Sin embargo, para el caso de la medición de la capacidad antioxidante empleando DPPH, el subproducto de guayaba obtuvo un valor de 56.82 ± 0.35 mg eq. Trolox/g bs; mientras que para el caso de los de coliflor y huitlacoche fueron de 39.55 ± 2.02 y 41.52 ± 0.45 mg eq. ác. gálico/g bs, respectivamente. De igual manera, al comparar estos valores con la fracción de polifenoles extraíbles, se observó que fueron superiores. Para el caso del subproducto de guayaba fue de 1.86 veces, mientras que para el caso de los subproductos de coliflor y huitlacoche fueron 17.3 y 7.9 veces superiores. Arranz *et al.* (2009), llegaron a una

conclusión similar, ya que reportaron una gran cantidad de actividad antioxidante en los extractos de polifenoles no extraíbles. De igual manera, Pérez-Jiménez & Saura-Calixto (2015a) mencionan que la fracción de polifenoles no extraíbles posee una significativa actividad antioxidante.

Tow *et al.* (2011) hacen mención sobre factores que podrían afectar el contenido de polifenoles no extraíbles y entre las cuales se encuentran: diferencias de madurez, estación de crecimiento, prácticas agrícolas, condiciones de almacenamiento, genotipo, las condiciones experimentales, las diferencias en los métodos analíticos así como factores tecnológicos.

7.5 Experimento previo en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales

Una vez finalizada la caracterización nutracéutica de los tres subproductos descritos con anterioridad, se optó por llevar a cabo la optimización utilizando enzimas fibrolíticas comerciales en el subproducto de guayaba, ya que, de acuerdo a los resultados, fue en el que se obtuvieron, en general, mayores cantidades de fitoquímicos y capacidad antioxidante.

Con la finalidad de decidir qué preparación fibrolítica sería la más adecuada de aplicar en dicho subproducto, se optó por realizar un experimento previo, en el cual se utilizó un tratamiento con Promote®, otro con Fibrozyme® y una combinación de ambas enzimas. Así mismo, se establecieron cuatro condiciones: pH 6, temperatura de 39 °C, concentración de enzima al 1.5 % p/p o p/v en BCF y cuatro tiempos de incubación (0.5, 1, 2 y 4 h) y se compararon con un control utilizando únicamente BCF pH 6.

Realizado los tratamientos enzimáticos, se procedió a liofilizar las muestras, para después cuantificar el contenido de flavonoides. Las **Tablas 13 y 14**, así como las **Figuras 16 y 17** resumen los resultados obtenidos.

Tabla 13. Contenido de flavonoides en el subproducto de guayaba después del tratamiento preliminar enzimático.

PREPARACIÓN FIBROLÍTICA COMERCIAL	CONTENIDO DE FENOLES (mg. eq. ác. gálico/g)			
	Tiempo de incubación (h)			
	0.5	1	2	4
Control	9.26 ± 0.13	9.10 ± 0.11	8.35 ± 0.06	7.80 ± 0.06
Fibrozyme®	8.74 ± 0.11	8.39 ± 0.32	6.68 ± 0.21	5.93 ± 0.10
Promote® + Fibrozyme®	8.40 ± 0.11	7.36 ± 0.29	7.17 ± 0.25	6.83 ± 0.21
Promote®	13.82 ± 0.25	17.60 ± 2.22	24.11 ± 0.38	20.37 ± 0.20

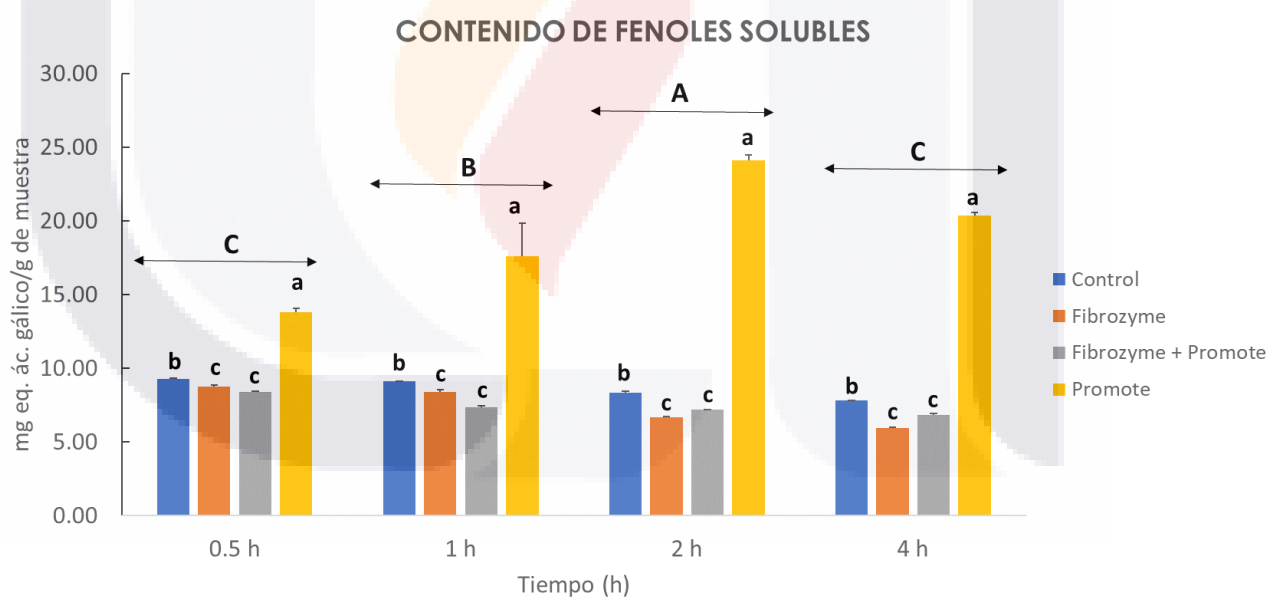


Figura 16. Contenido de fenoles en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales. Los resultados fueron expresados en mg eq. ác. gálico/g bs. Los datos se representan como la media ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) bajo la prueba de Tukey ($n = 4$).

Tabla 14. Contenido de flavonoides en el subproducto de guayaba después del tratamiento preliminar enzimático.

PREPARACIÓN FIBROLÍTICA COMERCIAL	CONTENIDO DE FLAVONOIDES (mg. eq. catequina/g)			
	Tiempo de incubación (h)			
	0.5	1	2	4
Control	3.07 ± 0.04	2.98 ± 0.03	2.90 ± 0.12	2.70 ± 0.03
Fibrozyme®	3.16 ± 0.12	3.13 ± 0.15	2.87 ± 0.06	2.70 ± 0.04
Promote® + Fibrozyme®	3.22 ± 0.05	3.08 ± 0.08	2.92 ± 0.03	2.75 ± 0.08
Promote®	3.19 ± 0.10	4.49 ± 0.12	5.67 ± 0.24	4.58 ± 0.29

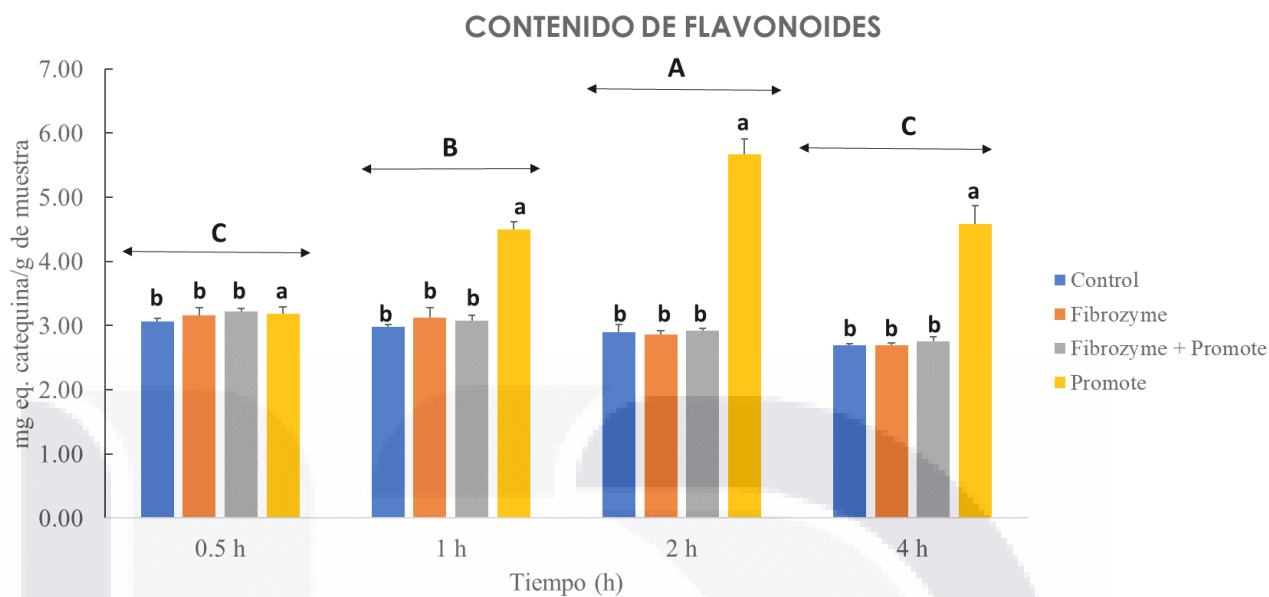


Figura 17. Contenido de flavonoides en subproducto de guayaba tratado con las preparaciones fibrolíticas comerciales. Los resultados fueron expresados en mg eq. catequina/g bs. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) bajo la prueba de Tukey ($n = 4$).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de incubación ($p < 0.05$), donde el tratamiento de 2 h fue el que mayores niveles de flavonoides y fenoles obtuvo.

Al comparar la combinación de Fibrozyme® + Promote®, Fibrozyme® y Promote® contra el control, también existieron diferencias significativas, siendo ésta última la que ayudó a extraer mayor cantidad de estos compuestos fenólicos extraíbles, por lo que se puede concluir que se debería utilizar tiempos de entre 1-4 h a fin de obtener un mayor rendimiento.

7.6 Aplicación de MSR con un diseño central compuesto (DDC) sobre subproducto de guayaba

Con base en los resultados del anterior apartado, se optó por utilizar la mezcla enzimática Promote® en el subproducto de guayaba. Para ello se utilizó la MSR con un diseño central compuesto (DDC) para desarrollar un modelo de predicción para optimizar las condiciones de pretratamiento con esta enzima comercial, a fin de obtener los mayores de niveles de fitoquímicos posibles. Las condiciones experimentales y los valores de respuesta correspondientes del diseño experimental se presentan en la **Tabla 15**.

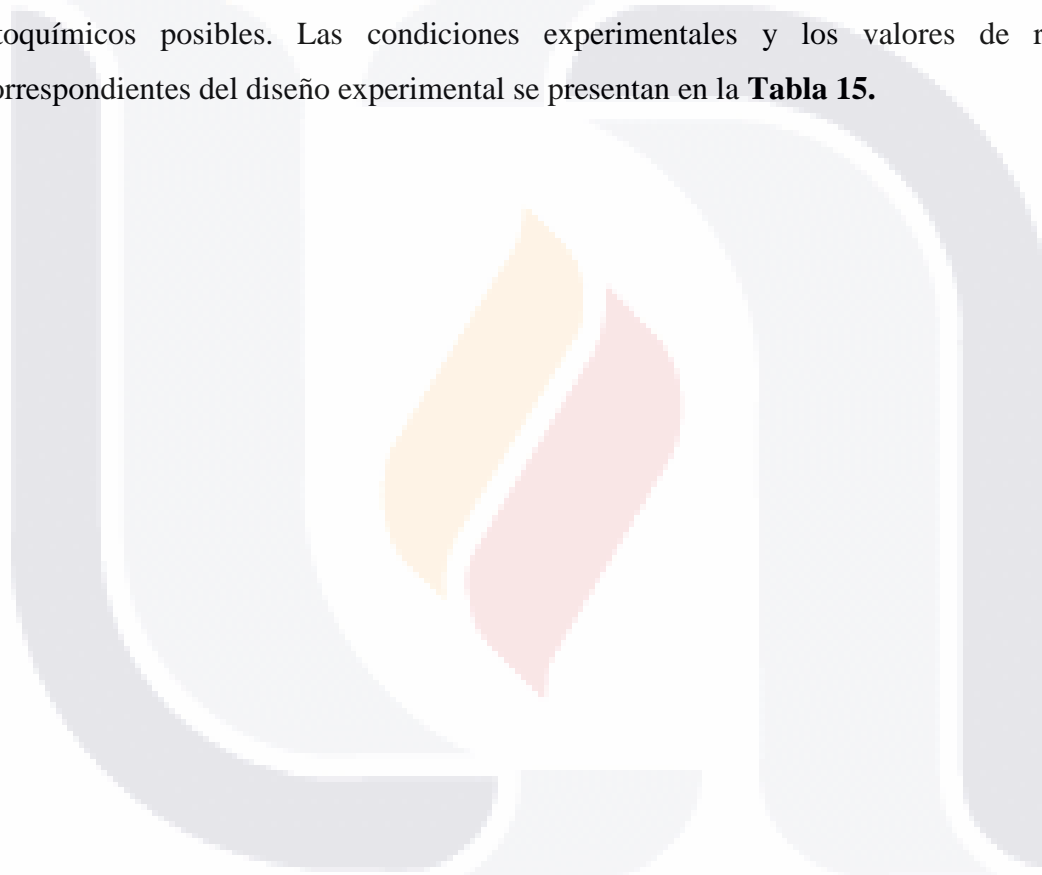


Tabla 15. Diseño experimental con 26 corridas con los factores codificados y sus niveles de manera aleatoria para la extracción de compuestos bioactivos con enzimas usando el DDC con sus respectivas respuestas.

Corrida	Concentración de enzima (X1)	pH (X2)	Temperatura (X3)	Tiempo (X4)	*Respuesta ^a (Y ₁)	*Respuesta ^b (Y ₂)	*Respuesta ^c (Y ₃)
1	-2	0	0	0	6.06	2.72	9.47
2	-1	-1	-1	-1	7.55	3.02	9.38
3	-1	-1	-1	1	7.69	2.70	9.90
4	-1	-1	1	-1	7.32	2.40	8.66
5	-1	-1	1	1	5.63	2.58	9.33
6	-1	1	-1	-1	6.37	2.93	10.34
7	-1	1	-1	1	5.04	2.58	7.00
8	-1	1	1	-1	7.11	2.56	6.80
9	1	1	1	1	3.74	2.50	6.32
10	0	- α	0	0	8.30	2.84	11.66
11	0	0	- α	0	8.41	3.18	12.14
12	0	0	0	- α	7.28	2.93	10.19
13	0	0	0	0	6.79	2.90	9.35
14	0	0	0	0	6.82	2.91	9.28
15	0	0	0	α	6.34	2.60	8.31
16	0	0	α	0	5.94	2.51	8.62
17	0	α	0	0	4.96	2.92	7.08
18	1	-1	-1	-1	8.13	2.91	10.74
19	1	-1	-1	1	7.47	2.72	9.74
20	1	-1	1	-1	7.09	2.68	9.28
21	1	-1	1	1	7.61	2.85	9.33
22	1	1	-1	-1	6.86	2.86	9.66
23	1	1	-1	1	6.23	2.91	8.65
24	1	1	1	-1	4.79	2.58	7.52
25	1	1	1	1	4.75	2.56	8.15
26	α	0	0	0	8.19	2.68	10.42

^a Respuesta para fenoles (mg eq. ácido gálico/g bs).

^b Respuesta para flavonoides (mg eq. catequina/g bs).

^c Respuesta para actividad antioxidante por medio de la inhibición del radical DPPH (mg eq. Trolox/g bs).

*Los resultados expresan la media con n=2.

Las variables independientes y dependientes se analizaron para obtener una ecuación cuadrática de regresión que podría predecir la respuesta dentro del rango dado. Los valores de los coeficientes en la ecuación se presentan en la **Tabla 16**, así como los valores del coeficiente de regresión de Pearson (R^2) y la prueba de carencia de ajuste.

Tabla 16. Resultados obtenidos para obtener las ecuaciones de regresión utilizando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1.

Variable de respuesta	Modelo cuadrático	R^2	R^2 Ajustada	Valor p	Prueba carencia de ajuste
Fenoles (Y₁)	$Y_1 = 9.315 + 0.3016667X_1 - 0.878333X_2 - 0.71088333X_3 - 0.321667X_4 + 0.10625X_1X_2 + 0.0625X_1X_3 + 0.08125X_1X_4 - 0.23125X_2X_3 - 0.2775X_2X_4 + 0.35625X_3X_4 - 0.0014583X_1^2 - 0.142292X_2^2 + 0.1102083X_3^2 - 0.172292X_4^2$	0.84	0.65	0.0103	0.0213
Flavonoides (Y₂)	$Y_2 = 2.905 + 0.03X_1 - 0.009167X_2 - 0.135833X_3 - 0.05X_4 - 0.0075X_1X_2 + 0.02875X_1X_3 + 0.035X_1X_4 - 0.015X_2X_3 - 0.01375X_2X_4 + 0.0575X_3X_4 - 0.066042X_1^2 - 0.021042X_2^2 - 0.029792X_3^2 - 0.049792X_4^2$	0.79	0.53	0.0354	0.0400
Capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH (Y₃)	$Y_3 = 9.315 + 0.3016667X_1 - 0.878333X_2 - 0.710833X_3 - 0.321667X_4 + 0.10625X_1X_2 + 0.0625X_1X_3 + 0.08125X_1X_4 - 0.23125X_2X_3 - 0.2775X_2X_4 + 0.35625X_3X_4 - 0.0014583X_1^2 - 0.142292X_2^2 + 0.1102083X_3^2 - 0.172292X_4^2$	0.82	0.58	0.0222	0.0397

Los valores experimentales de fenoles (Y₁), flavonoides (Y₂) y capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH (Y₃) frente a los calculados a partir de la ecuación indicó una carencia de ajuste, como se presenta en la **Tabla 15**, esto debido a que hay diferencia significativa en la prueba de carencia de ajuste con un nivel de significancia de 0.05. Según

Guan & Yao (2008), el coeficiente de correlación de Pearson (R^2) es una medida del grado de ajuste. Dicho coeficiente fue de 0.84, 0.79 y 0.82, respectivamente. Sin embargo, una vez que el modelo fue ajustado, el coeficiente de determinación fue de 0.65, 0.53 y 0.58, respectivamente. Esto implica que el modelo ajustado puede explicar el 65%, 53% y 58% de las variaciones. El valor de probabilidad (P) de la significancia del modelo de regresión fue mayor a 0.001.

Sin embargo, el modelo estadístico también revela los diferentes factores que resultaron ser significativos para el caso de las tres diferentes variables de respuesta a evaluar y cuyos resultados son presentados en la **Figura 18**.

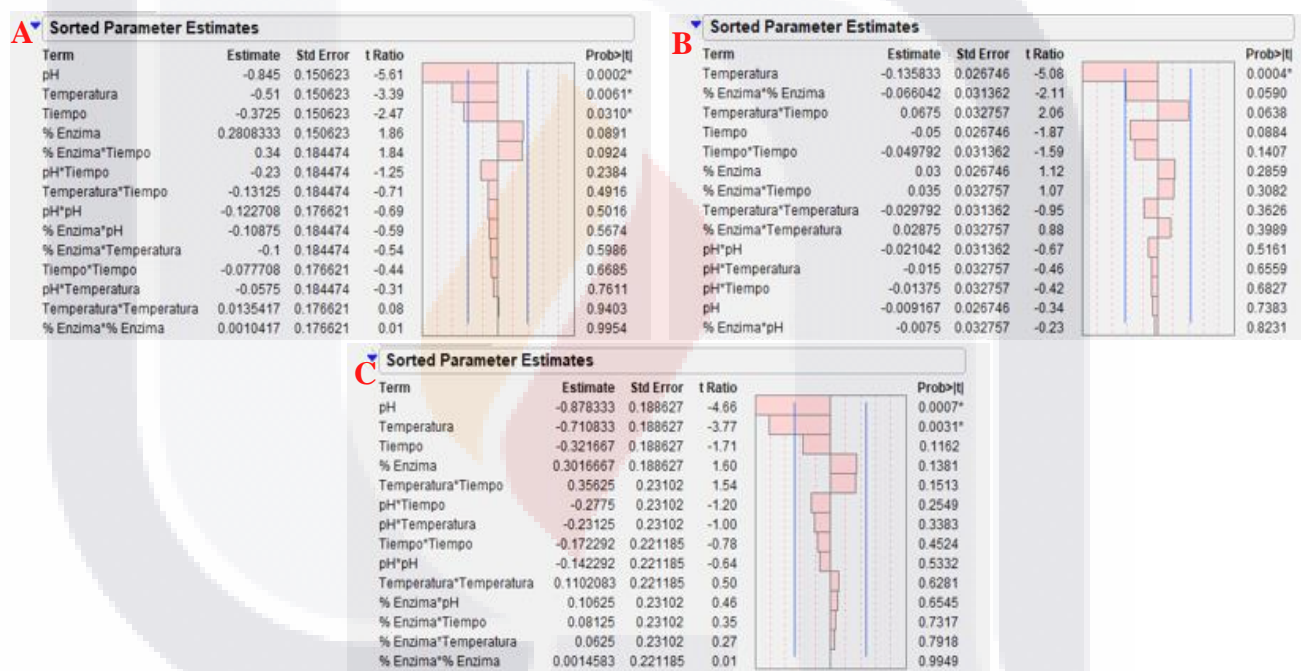


Figura 18. Parámetros estimados ordenados para las diferentes respuestas evaluadas. (A) Respuesta para compuestos fenólicos, (B) respuesta para flavonoides y (C) respuesta para evaluación de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre.

En el caso de la variable de respuesta de compuestos fenólicos (Y_1), el software estadístico arroja como resultado que los factores lineales, ordenados de mayor a menor, pH ($p= 0.0002^*$), temperatura ($p= 0.0061^*$) y tiempo ($p= 0.0310^*$) son aquellos que son

significativos, mientras que para la variable de respuesta flavonoides (Y_2), únicamente el factor lineal con efecto significativo fue la temperatura ($p= 0.0004^*$). No obstante, para la respuesta de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre (Y_3), tanto la temperatura ($p= 0.0007^*$) como el tiempo ($p= 0.0031^*$), fueron los factores lineales que ejercieron efectos significativos, comparándolos con un valor de significancia menor al 0.001.

Para facilitar la visualización, las superficies de respuesta y las gráficas de contorno de las condiciones enzimáticas de pretratamiento se muestran en las **Figuras 19, 20 y 21**.

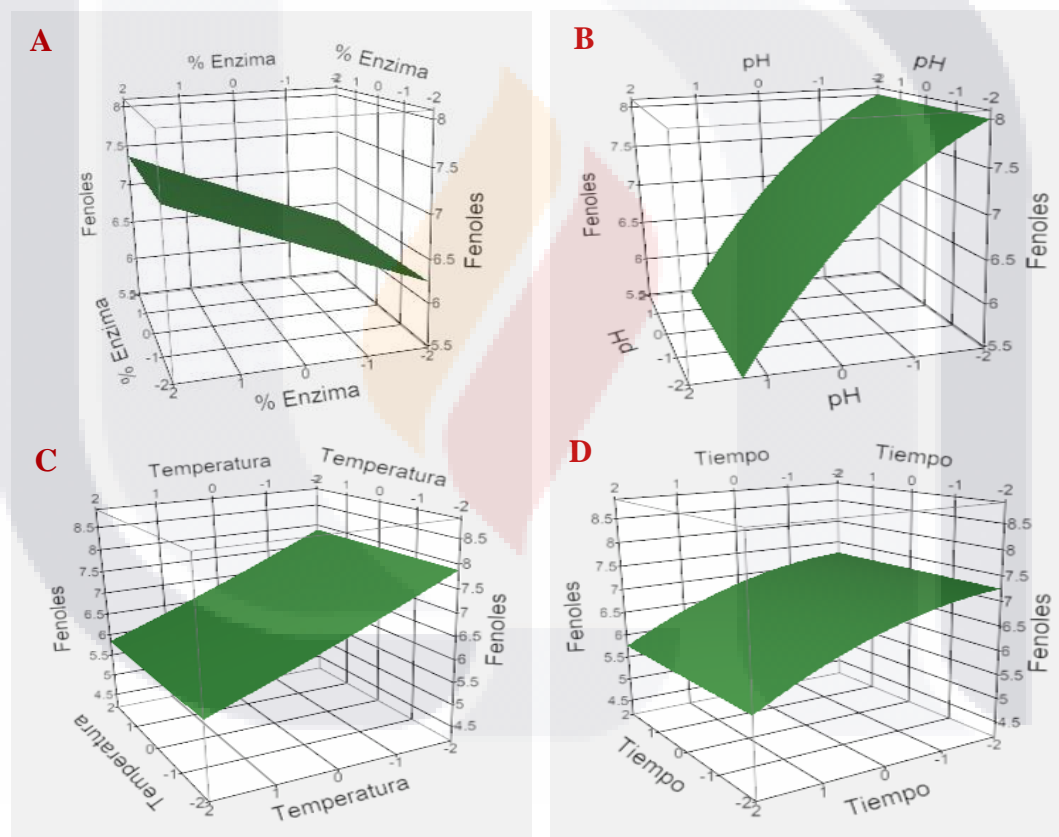
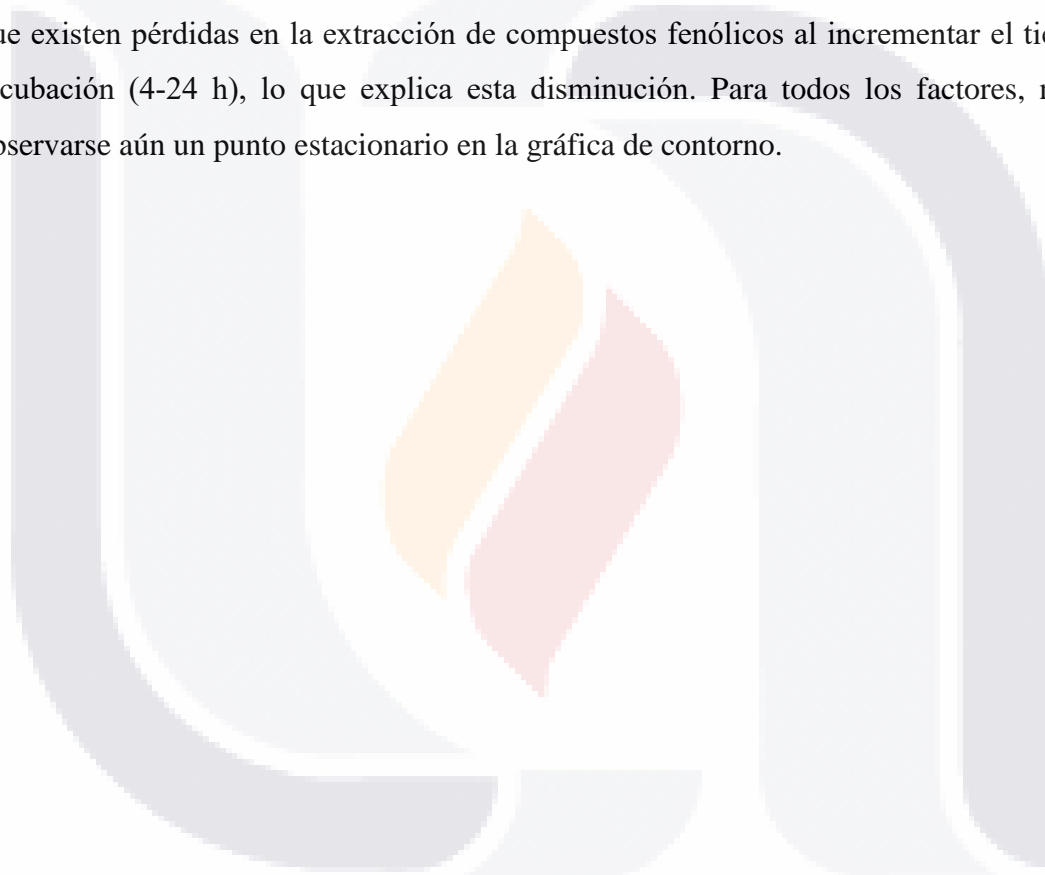


Figura 19. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de compuestos fenólicos de subproducto de guayaba. (Fenoles expresados como mg eq. de ácido gálico/g; los factores en el gráfico se encuentran codificados.)

En la **Figura 19** se aprecia que, para el caso de la extracción de compuestos fenólicos, conforme fue aumentando la concentración de enzima (A), se extrajo una mayor cantidad de estos fitoquímicos. Así mismo, a medida que el pH (B) fue disminuyendo, la enzima fue aumentando su capacidad para ayudar a liberar mayor cantidad de compuestos fenólicos. Al disminuir la temperatura (C) se aumentó la cantidad de fenólicos.

Al evaluar el factor tiempo (D), fue evidente que la cantidad de compuestos fenólicos extraídos decreció al ir aumentando el tiempo de incubación. Tomaz *et al.* (2016), mencionan que existen pérdidas en la extracción de compuestos fenólicos al incrementar el tiempo de incubación (4-24 h), lo que explica esta disminución. Para todos los factores, no logró observarse aún un punto estacionario en la gráfica de contorno.



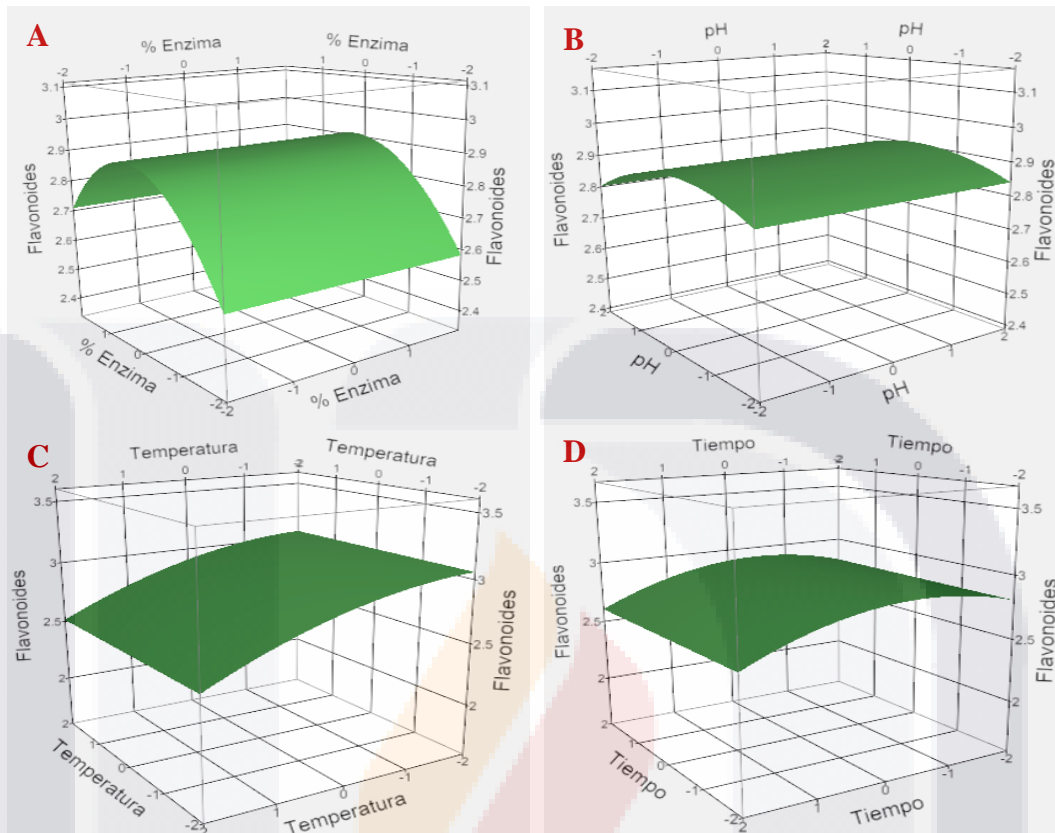


Figura 20. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de flavonoides en subproducto de guayaba. (Flavonoides expresados como mg eq. de catequina/g; los factores en el gráfico se encuentran codificados.)

Como se puede observar en la **Figura 20**, valores altos de temperatura (C) y tiempo (D) (60 °C, 7 h) afectan negativamente al contenido de flavonoides en el subproducto de guayaba, mientras que con un tiempo de 1 h a una temperatura de 45 °C se tiene la mayor extracción de flavonoides. Por otro lado, para el caso de los factores de concentración de enzima (A), pH (B), y tiempo (D), se alcanza a apreciar un punto estacionario donde la respuesta no mejora, justo en el punto central para los tres factores (2% v/v, 6 y 4 h, respectivamente), no siendo el caso para la temperatura, donde dicho punto no es claro aún.

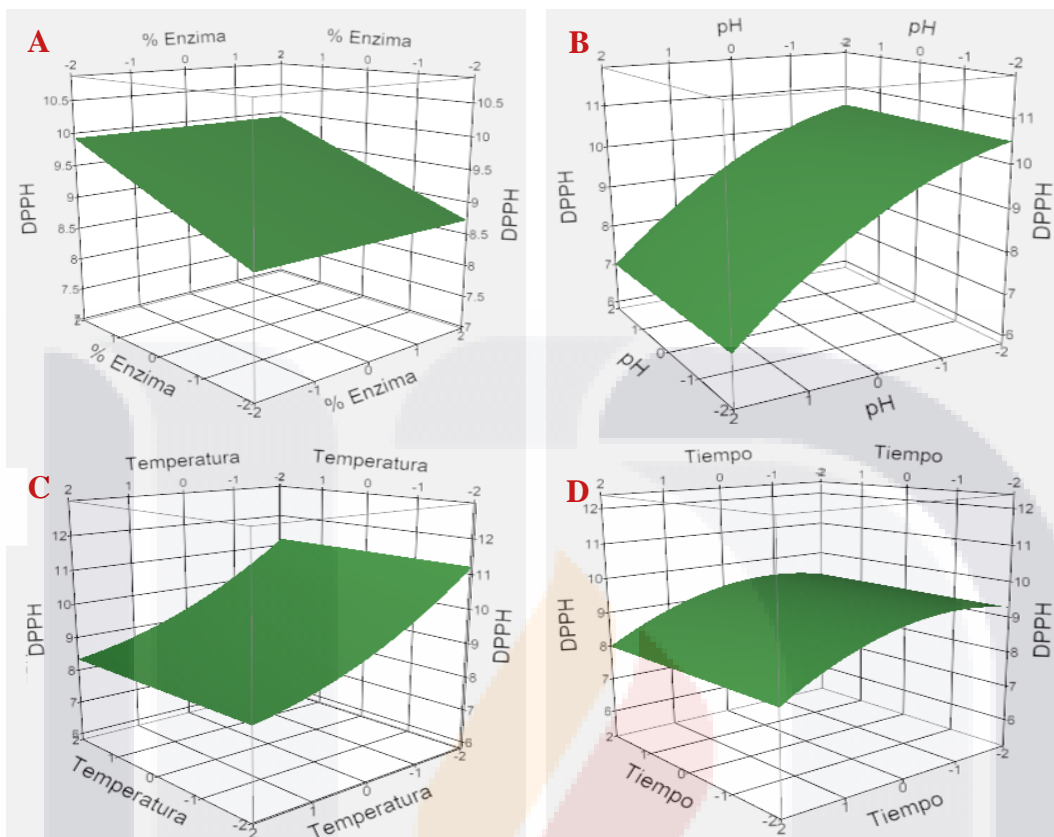


Figura 21. Gráficos de contorno de superficie de respuesta para los efectos de (A) concentración de enzima, (B) pH, (C) temperatura y (D) tiempo, en la extracción de compuestos fenólicos de subproducto de guayaba. (DPPH expresados como mg eq. de Trolox/g; los factores en el gráfico se encuentran codificados.)

Las gráficas de contorno de superficie de respuesta para el caso de la medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre, muestran que para el caso de los factores concentración de enzima, pH y temperatura no se observa un punto estacionario, caso contrario para el factor tiempo, donde se percibe dicho punto cercano al valor central (4 h), es decir, ya no existe mejora en la respuesta.

También se aprecia que conforme se aumenta la concentración de enzima (A), la respuesta mejora notablemente; en cambio, al disminuir el pH y la temperatura, la capacidad antioxidante aumenta.

Por último, para finalizar con el proceso de optimización se aplicó la función de deseabilidad para maximizar de manera simultánea las cuatro variables de respuesta con el programa estadístico; en el anexo **Figura 29** se presentan los valores máximos de cada una de las variables de respuesta con la siguiente solución global óptima:

- Temperatura= 40 °C
- Tiempo= 3 h
- Concentración de enzima = 2.5 % v/v
- pH= 7

Así mismo se obtuvieron los valores óptimos predichos por el modelo para maximizar todas las respuestas con los siguientes valores; contenido de compuestos fenólicos (6.745 ± 1.24 mg eq de ác. gálico/g), contenido de flavonoides (2.97 ± 0.22 mg eq de catequina/g) y para la medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre (10.40 ± 1.55 mg eq de Trolox/g).

8. CONCLUSIONES

- La preparación fibrolítica Fibrozyme® presentó mayor actividad como celulasa, mientras que Promote® posee actividad como pectinasa, en contraste con Fibrozyme®. Estas preparaciones comerciales podrán ser utilizadas para la liberación de compuestos bioactivos de subproductos agroindustriales.
- Al realizar la caracterización nutracéutica de los tres subproductos evaluados, el de guayaba mostró mayores niveles de fenoles solubles, flavonoides, taninos condensados e hidrolizables.
- Los subproductos provenientes de guayaba son buena fuente de compuestos fenólicos y exhibieron actividades de inhibición del radical DPPH y FRAP mayores que las de coliflor y huitlacoche.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Se obtuvo que las condiciones óptimas para maximizar las tres respuestas evaluadas fueron temperatura de 40 °C, tiempo de 3 h, concentración de enzima al 2.5 % (v/v) y pH 7; con valores predichos por el modelo de contenido de compuestos fenólicos de 6.74 ± 1.24 mg eq de ác. gálico/g, contenido de flavonoides de 2.97 ± 0.22 mg eq de catequina/g y para la medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre un valor de 10.40 ± 1.55 mg eq de Trolox/g.
 - La aplicación de la enzima comercial Promote® sobre el subproducto agroindustrial de guayaba liberó mayores niveles de compuestos fitoquímicos (fenólicos y flavonoides) con actividades funcionales (e.g. antioxidantes) importantes, en comparación con el control sin enzima.

9. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de mejorar la carencia de ajuste del modelo estadístico utilizando la MSR con un DCC, se propone que la zona experimental incluya una región más amplia, utilizando mayores concentraciones de enzima (>3% v/v), temperaturas por debajo de 30°C, así como pH más bajo de 4, con el propósito de encontrar el punto estacionario y obtener una mayor extracción de los compuestos fitoquímicos de interés.

10. ANEXOS

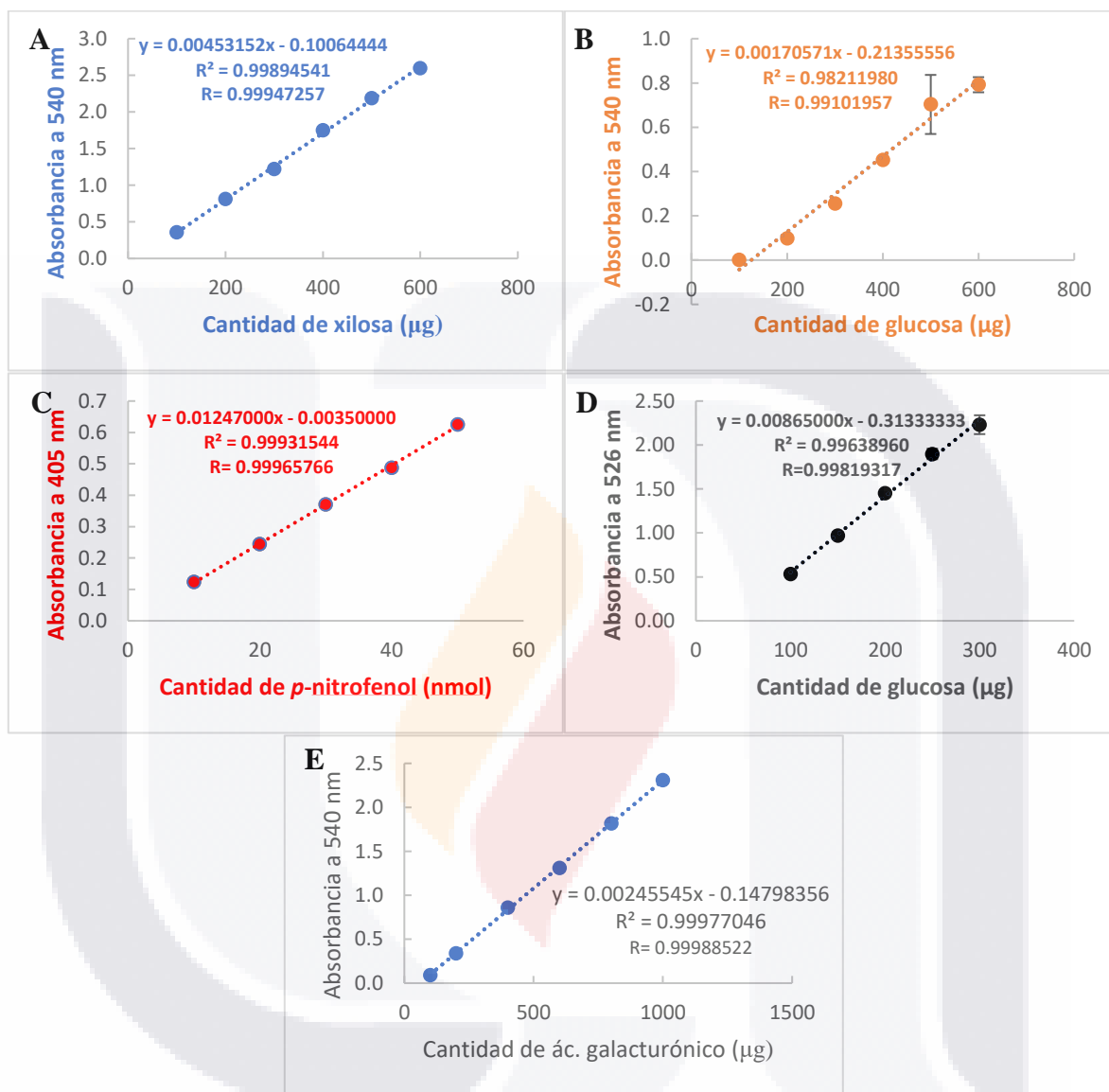


Figura 22.Curvas de calibración para los ensayos de A) xilanasas, B) exoglucanasas, C) β – glucosidasas, D) endoglucanasas y E) pectinasas. (media \pm desviación estándar, n= 3).

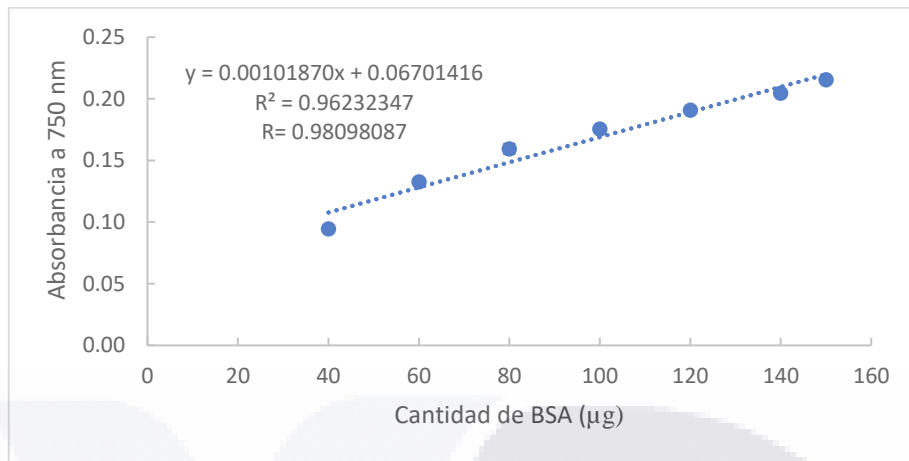


Figura 23. Curva de calibración de BSA (media \pm desviación estándar; $n= 3$).

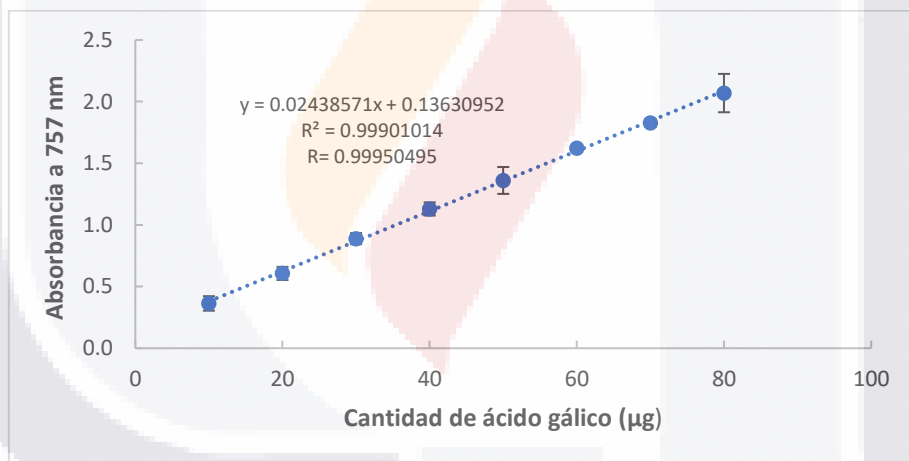


Figura 24. Curva de calibración de fenoles solubles totales (macro-método; media \pm desviación estándar; $n= 3$).

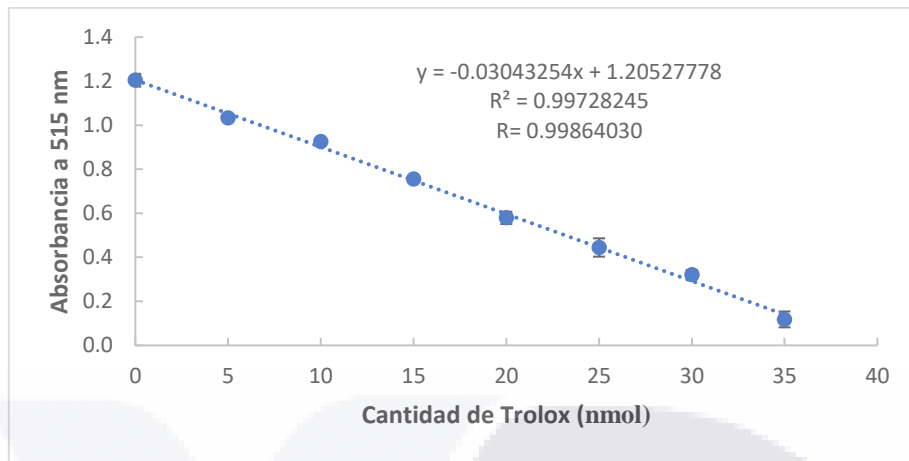


Figura 25. Curva de Calibración de Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) Usando DPPH Como Radical Libre (media ± desviación estándar; n= 3).

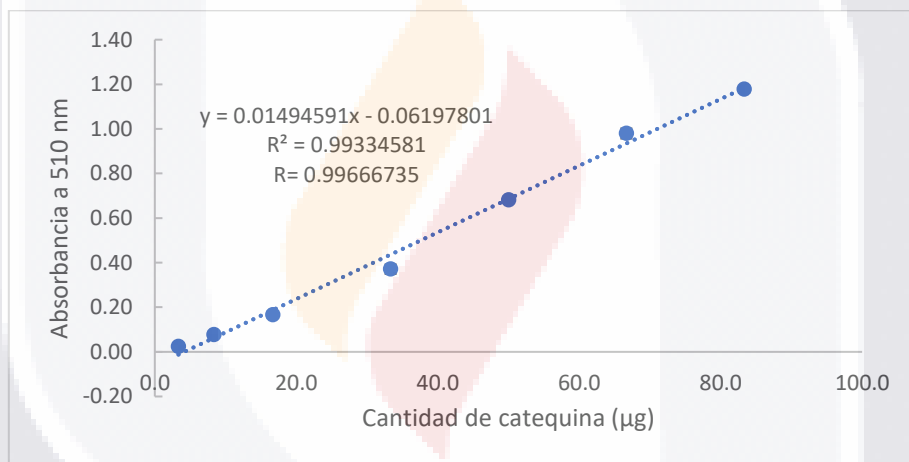


Figura 26. Curva estándar de Catequina ensayo Flavonoides (media ± desviación estándar; n=3).

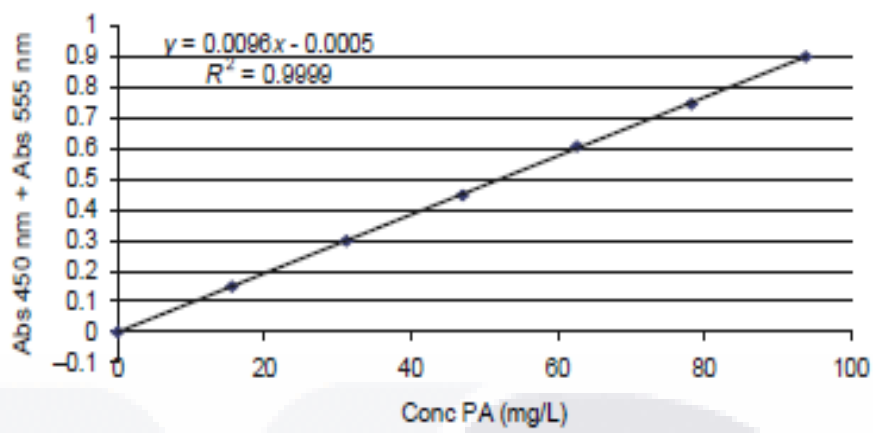


Figura 27. Curva estándar de proantocianidina ensayo taninos condensados (media \pm desviación estándar; n=3).

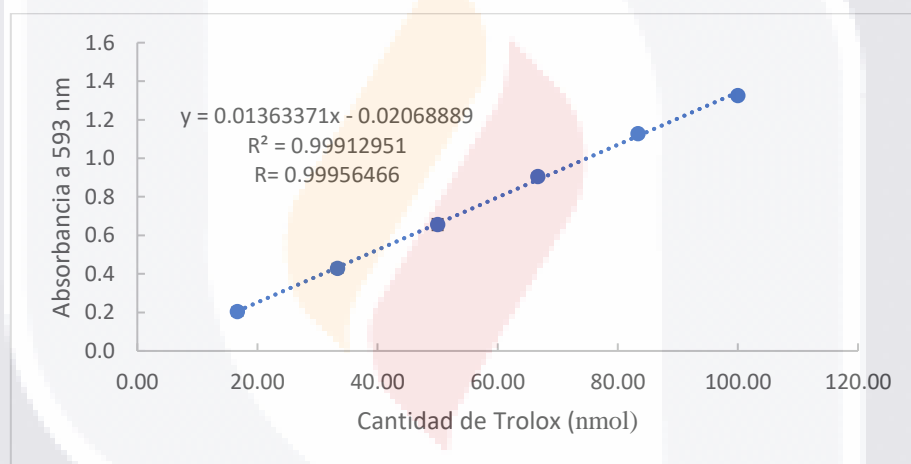


Figura 28. Curva estándar de Trolox ensayo FRAP (media \pm desviación estándar; n=3).

Tabla 17. Análisis de varianza para compuestos fenólicos. Nivel de significancia de 0.001.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Proporción F
Modelo	14	32.444172	2.31744	4.2561
Error	11	5.989417	0.54449	Prob>F
C. Total	25	38.433588		0.0103*

*Resultados obtenidos utilizando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1.

Tabla 18. Análisis de varianza para flavonoides. Nivel de significancia de 0.001.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Proporción F
Modelo	14	0.73021538	0.052158	3.0381
Error	11	0.18885000	0.017168	Prob>F
C. Total	25	0.91906538		0.0354*

*Resultados obtenidos utilizando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1.

Tabla 19. Análisis de varianza para medición de la capacidad antioxidante utilizando DPPH como radical libre. Nivel de significancia de 0.001.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Proporción F
Modelo	14	41.509670	2.96498	3.4722
Error	11	9.393192	0.85393	Prob>F
C. Total	25	50.902862		0.0222*

*Resultados obtenidos utilizando el software estadístico JMP® SAS 8.0.1.

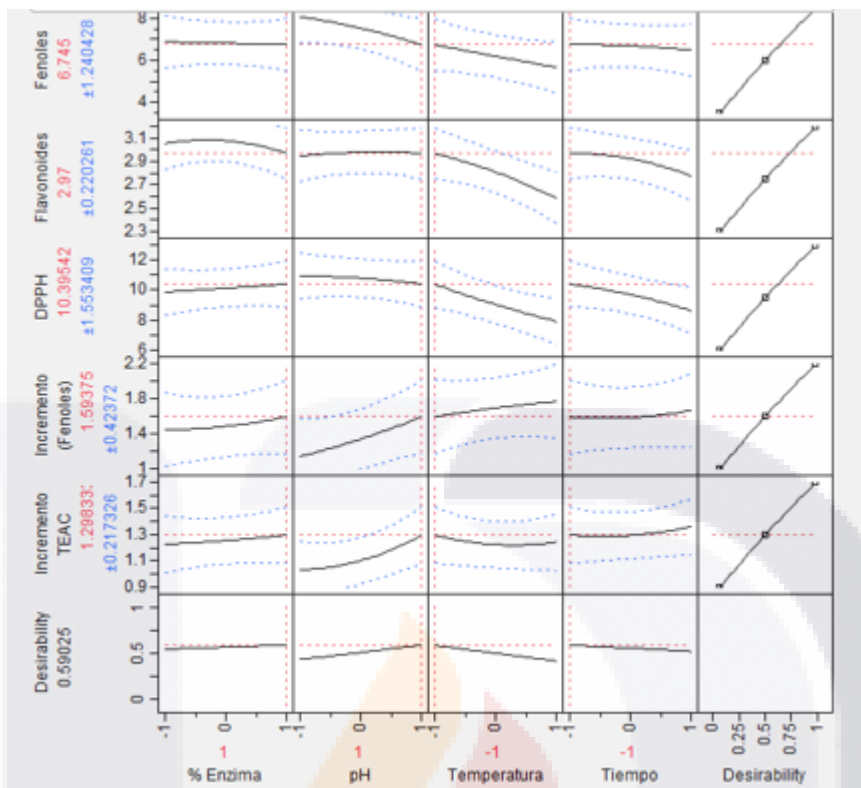


Figura 29. Perfil de predicción para los modelos ajustados aplicando la función de deseabilidad y maximizando las tres variables de respuesta simultáneamente.

11. REFERENCIAS

- Adsule, R. N., & Kadam, S. S. (1995). *Guava*. In D. K. Salunkhe, & S. S. Kadam (Eds.), *Handbook of Fruit Science and Technology* (pp. 419–433). New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker.
- Ahmed, F. A., & Ali, R. F. M. (2013). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh and processed white cauliflower. *BioMed Research International*, 2013, 367819. <https://doi.org/10.1155/2013/367819>
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2012). Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.659172>
- Amaya-Cruz, D. M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M. A., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods*, 17, 93–102. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.04.051>
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Lamuela-Raventós, R. M. (2009). Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. En *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability* (pp. 53–88). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch2>
- Araújo, K., Magnani, M., Nascimento, J., Souza, A., Epaminondas, P., Souza, A., ... Souza, A. (2014). Antioxidant Activity of Co-Products from Guava, Mango and Barbados Cherry Produced in the Brazilian Northeast. *Molecules*, 19(3), 3110–3119. <https://doi.org/10.3390/molecules19033110>
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High Contents of Nonextractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298–7303. <https://doi.org/10.1021/jf9016652>

- Askar A. & Treptow H. (1998). Nebenprodukte bei der Verarbeitung tropischer Früchte. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung*. 83 7-13
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., & Bhargav, V. K. (2014). Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2568–2575. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0754-4>
- Balci, F., Dikmen, S., Gencoglu, H., Orman, A., Turkmen, I. I., & Biricik, H. (2007). the Effect of Fibrolytic Exogenous Enzyme on Fattening Performance of Steers. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 10(2), 113–118. Recuperado a partir de http://www.academia.edu/13199870/The_effect_of_fibrolytic_exogenous_enzyme_on_fattening_performance_of_steers
- Beas-Fernández, R., Guzmán-Maldonado, S. H.; Loarca-Piña, M. G. F.; Chávez-Ortiz, L. I.; González-Díaz, M. C.; Guevara-Lara, F. (2008). Chemical and functional characterization of huitlacoche (Ustilago maydis-Zea mays). *Cartel y resumen en memoria en línea (096-12); 2008 IFT Annual Meeting & Food Expo, New Orleans, Louisiana, USA*. 28 de Junio a 1 de Julio de 2008.
- Beas-Fernández, R.; Guzmán-Maldonado, S. H.; Herrera-Hernández, G.; Pérez-Molphe-Balch, E.; Gámez-Roldán, Y.; Guevara-Lara, F. (2006). Análisis de compuestos fenólicos presentes en huitlacoche (Ustilago maydis-Zea mays). *Presentación oral y resumen presentados en el Segundo Congreso Estatal “La Investigación en el Posgrado”*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, 21-24 de Noviembre del 2006.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Butler, M. J., Gardiner, R. B., & Day, A. W. (2005, febrero). Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: Are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biological Control*.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.008>

Carrillo-Díaz, M. I., Tirado-Estrada, G., Guevara-Lara, F., Silos-Espino, H., Martín del Campo Valle, S., Moreno Hernández Duque, J.L., Acero-Godínez, M. G., Rubio-Franchini, M. C., Martínez-Villalobos, R., Beas-Fernández, R. (2008). Caracterización de fibra dietaria y capacidad antioxidante del hongo del huitlacoche (*Ustilago maydis*). Cartel presentado en el Noveno Seminario de Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. Ags. 20-22 de Mayo de 2008.

Chandini, S. K., Rao, L. J., Gowthaman, M. K., Haware, D. J., & Subramanian, R. (2011). Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chemistry*, 127(3), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.078>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
<https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.035>

Chen, S., Xing, X. H., Huang, J. J., & Xu, M. S. (2011). Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.017>

Colombatto and K. A. Beauchemin, D. (2003). A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 559–568. <https://doi.org/10.4141/A03-016>

Colombatto, D., Morgavi, D. P., Furtado, A. F., & Beauchemin, K. A. (2003). Screening of

exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *Journal of Animal Science*, 81(10), 2628. <https://doi.org/10.2527/2003.81102628x>

Concha, J., Soto, C., Chamy, R., & Zúñiga, M. E. (2004). Enzymatic pretreatment on rose-hip oil extraction: Hydrolysis and pressing conditions. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(6), 549–552. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-0939-y>

Cowan, M. M. (1999, octubre 1). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology Journals. [https://doi.org/0893-8512/99/\\$04.00+0](https://doi.org/0893-8512/99/$04.00+0)

Curiel, J. A., Betancor, L., De Las Rivas, B., Muñoz, R., Guisan, J. M., & Fernández-Lorente, G. (2010). Hydrolysis of tannic acid catalyzed by immobilized-stabilized derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6403–6409. <https://doi.org/10.1021/jf9044167>

Dong, J., Cai, L., Zhu, X., Huang, X., Yin, T., Fang, H., & Ding, Z. (2014). Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Cornhusk, Corncob and Stigma *Maydis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(11), 1956–1964. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140177>

Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk J Biol*, 32, 43–49. Recuperado a partir de <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-08-32-1/biy-32-1-7-0708-8.pdf>

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>

Fu, Y. J., Liu, W., Zu, Y. G., Tong, M. H., Li, S. M., Yan, M. M., ... Luo, H. (2008). Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, 111(2), 508–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.003>

- Galanakis, C. M. (2013, octubre 1). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.004>
- Gil-Chávez, G. J., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013, enero 1). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Giraldo, L. A., Tejido, M. L., Ranilla, M. J., Ramos, S., & Carro, M. D. (2008). Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *Journal of Animal Science*, 86(7), 1617–1623. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0343>
- Gonzales, G. B., Smagghe, G., Raes, K., & Van Camp, J. (2014). Combined Alkaline Hydrolysis and Ultrasound-Assisted Extraction for the Release of Nonextractable Phenolics from Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(15), 3371–3376. <https://doi.org/10.1021/jf500835q>
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.041>
- Gutiérrez-Ruiz, I. M. (2017). Caracterización de subproductos agroindustriales y evaluación de su efecto en un modelo animal de diabetes tipo 2 (Tesis de Doctorado). *Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Aguascalientes, Aguascalientes.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785–1790. <https://doi.org/10.1021/jf0111155>

- Hassan, F. A., Ismail, A., Abdulhamid, A., & Azlan, A. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds in bambangan (*mangifera pajang* kort.) Peels and their free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(17), 9102–9111. <https://doi.org/10.1021/jf201270n>
- Herrera, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *379*(7–8), 1106–12. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2684-0>
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006, enero 1). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Hristov, A. N., Basel, C. E., Melgar, A., Foley, A. E., Ropp, J. K., Hunt, C. W., & Tricarico, J. M. (2008). Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, *145*(1–4), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.051>
- Huynh, N. T., Smaghe, G., Gonzales, G. B., Van Camp, J., & Raes, K. (2014). Enzyme-assisted extraction enhancing the phenolic release from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) outer leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(30), 7468–7476. <https://doi.org/10.1021/jf502543c>
- Jacobson, E. S. (2000, octubre). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.708-717.2000>
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5489–5493. <https://doi.org/10.1021/jf010147p>
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011, abril). El huitlacoche (tizón del maíz), causado por el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*, como alimento funcional. *Revista Iberoamericana de Micología*. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>

- Khandare, V., Walia, S., Singh, M., & Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.07.007>
- Kim, D. O., Young, J. K., Ock, K. C., Shin, D. H., Jung, H., Chang, Y. L., & Wilson, D. B. (2005). Phenolic extraction from apple peel by cellulases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9560–9565. <https://doi.org/10.1021/jf052052j>
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., ... Chung, I. M. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7265–7270. <https://doi.org/10.1021/jf8008553>
- Lai, W. T., Khong, N. M. H., Lim, S. S., Hee, Y. Y., Sim, B. I., Lau, K. Y., & Lai, O. M. (2017, enero 1). A review: Modified agricultural by-products for the development and fortification of food products and nutraceuticals. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.014>
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003, marzo). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00526-1)
- Larrosa, M., Llorach, R., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 35(6), 532–542. <https://doi.org/10.1006/fstl.2002.0907>
- Llorach, R., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2003). Valorization of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) by-products as a source of antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2181–2187. <https://doi.org/10.1021/jf021056a>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological*

Chemistry , 193(1), 265–275. Recuperado a partir de <http://www.jbc.org/content/193/1/265.short>

Luque de Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998, agosto 10). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)

Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255–260.

Martínez-Espinoza, A. D., & Ruiz-Herrera, J. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(2), 149–58. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943353>

Martínez, M. J., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 12–14. Recuperado a partir de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961997000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.057>

Meale, S. J., Beauchemin, K. A., Hristov, A. N., Chaves, A. V., & McAllister, T. A. (2014). Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant production. *Journal of Animal Science*, 92(2), 427–442. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6869>

Meraz-Romero, E., Loera-Corral, O., Mendoza-Martínez, G., Meneses-Mayo, M., Cobos-Peralta, M. A., Hernández-Sánchez, D., ... Pinos-Rodríguez, J. M. (2012). Efecto del pH y del líquido ruminal clarificado en la estabilidad de un producto enzimático

fibrolítico. *Agrociencia*, 46, 347–358. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000400003&nrm=iso

Moore, J., Cheng, Z., Su, L., & Yu, L. (2006). Effects of solid-state enzymatic treatments on the antioxidant properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9032–9045. <https://doi.org/10.1021/jf0616715>

Morgavi, D. P., Kelly, W. J., Janssen, P. H., & Attwood, G. T. (2013). Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *animal*, 7(s1), 184–201. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000419>

Muroki, N. & Saint-Hilaire, P. (1977). Pectin from guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 10, 314–315

Mustafa, A., & Turner, C. (2011, octubre 3). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>

Niki, E. (2010, agosto 15). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>

Paredes-Lopez, O., Guevara Lara, F., & Bello Pérez, L. A. (2006). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. Secretaría de Educación Pública.

Paredes L. O., Valverde M. E. (2006). Los recursos nutracéuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *Cinvestav*; 65-73.

Patsioura, A., Galanakis, C. M., & Gekas, V. (2011). Ultrafiltration optimization for the recovery of β -glucan from oat mill waste. *Journal of Membrane Science*, 373(1–2), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.02.032>

Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2015a). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007>

Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2015b). Macromolecular antioxidants or non-

extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007>

Peterson, G. L. (1979, diciembre). Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90222-7)

Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>

Ramírez Cancino, L., Aranda Ibáñez, E., David, G., Martínez, M., Landois Palencia, L., Alberto, L., ... Galván, C. (2005). Characterization of commercial fibrolytic products for ruminant diets. *Vet. Méx*, 36(1). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/423/42336101.pdf>

Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Giraldo, L. A., Tricárico, J. M., & Carro, M. D. (2008). Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on in vitro ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Animal Feed Science and Technology*. [New York, NY]: Elsevier Science.

Reverchon, E., & De Marco, I. (2006, septiembre 1). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>

Sahagún B. (1989). Historia general de las cosas de la Nueva España. 2nd ed. In: López Austin A, García Quintana J, editors. México: *Consejo Nacional para la Cultura y las Artes-Alianza Editorial Mexicana*; 1989.

Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61–81. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1093/fqs/fyx004>

- Shao, Q., Chundawat, S. P., Krishnan, C., Bals, B., Sousa, L., Thelen, K. D., ... Balan, V. (2010). Enzymatic digestibility and ethanol fermentability of AFEX-treated starch-rich lignocellulosics such as corn silage and whole corn plant. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-12>
- Sierra-Campos, E., Valdez-Solana, M. A., Matuz-Mares, D., Velázquez, I., & Pardo, J. P. (2009). Induction of morphological changes in *Ustilago maydis* cells by octyl gallate. *Microbiology*, 155(2), 604–611. <https://doi.org/10.1099/mic.0.020800-0>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Stojceska, V., Ainsworth, P., Plunkett, A., Ibanoglu, E., & Ibanoglu, S. (2008). Cauliflower by-products as a new source of dietary fibre, antioxidants and proteins in cereal based ready-to-eat expanded snacks. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.01.009>
- Szydłowska-Czerniak, A., Karlovits, G., Hellner, G., & Szlyk, E. (2010). Effect of enzymatic and hydrothermal treatments of rapeseeds on quality of the pressed rapeseed oils: part II. Oil yield and oxidative stability. *Process Biochemistry*, 45(2), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.014>
- Tricarico, J. M., K. A. Dawson, and K. E. Newman. 1998. Effects of a microbial enzyme preparation (Fibrozyme) on ruminal digestion of fescue hay. *J. Anim. Sci.* 76(Suppl. 1):289 (Abstr.)
- Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., & Kontić, J. K. (2016). Recovery of flavonoids from grape skins by enzyme-assisted extraction. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 51(2), 255–268. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1085881>
- Tow, W. W., Premier, R., Jing, H., & Ajlouni, S. (2011). Antioxidant and Antiproliferation Effects of Extractable and Nonextractable Polyphenols Isolated from Apple Waste

Using Different Extraction Methods. *Journal of Food Science*, 76(7), T163–T172.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02314.x>

Vallarta Opina. (2018). Nayarit, con potencial para producir guayaba - Vallarta Opina. Recuperado el 16 de noviembre de 2018, a partir de <http://vallartaopina.net/2018/08/26/nayarit/nayarit-con-potencial-para-producir-guayaba/>

Valverde, M., Fallah Moghaddam, P., Zavala-Gallardo, M. S., Pataky, J. K., Paredes-Lopez, O., & Pedersen, W. L. (1993). Yield and Quality of Huitlacoche on Sweet Corn Inoculated with *Ustilago maydis*. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 28.

Vankar, P. S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 9(4), 30–41. <https://doi.org/10.1007/BF02834854>

Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry. Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7>

Wadhwa, M., Bakshi, M. P. S., & Makkar, H. P. S. (2015). Waste to worth: fruit wastes and by-products as animal feed. *CAB Reviews*, 10(031), 1–26. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510031>

Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hreggvidsson, G. O., Jónsson, J. Ó., Thorkelsson, G., & Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1387–1393. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.010>

Wijngaard, H. H., Rößle, C., & Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 116(1), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.033>

Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K., & Cameron, R. G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*,

98(8), 1596–1601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.022>

Yang, Y. C., Li, J., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Luo, M., Wu, N., & Liu, X. L. (2010). Optimisation of microwave-assisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from *Geranium sibiricum* Linne and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, *122*(1), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.061>

Yu, X. W., & Li, Y. Q. (2008). Expression of *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris* and its application in the synthesis of propyl gallate in organic solvent. *Food Technology and Biotechnology*, *46*(1), 80–85. Recuperado a partir de <https://www.semanticscholar.org/paper/Expression-of-Aspergillus-oryzae-Tannase-in-Pichia-Yu-Li/63772fda0191a9896c35d6195da52929218ca994>

Zapata, K., Cortes, F. B., & Rojano, B. A. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Informacion Tecnologica*, *24*(5), 103–112. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500012>

Zurita, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2012). Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(8), 936–939. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.681634>