



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN
SOLVENTE-TEMPERATURA EN EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS *J. spicigera*, SU PROTECCIÓN
COLOIDAL CON GOMA DE MEZQUITE NATIVA Y PURIFICADA”

TESIS:

Que para obtener el grado
de Doctor en Biotecnología

PRESENTA:

García Márquez Eristeo

Matricula: 209180095

DIRECTOR:

Dr. Jaime Vernon Carter

JURADO

Dr. Francisco Cruz Sosa

Dra. Angélica Román Guerrero

Dra María Eva Rodríguez Huevo

Dr Rubén Jiménez Alvarado

MAYO DE 2013

Dedicatoria

Es preciso suponer que en todo lo que se combina hay muchas cosas de todas clases, y semillas de todas las cosas, que tienen formas diversas y colores y sabores diferentes.

A N A X Á G O R A S

A mi querida amiga e inseparable compañera

El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo.

AGRADECIMIENTOS

México, D. F., a 5 de Julio de 2013

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad Iztapalapa aprobó la tesis

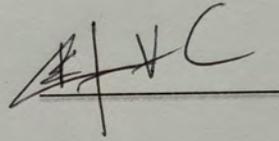
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DISOLVENTE-TEMPERATURA EN EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *Justicia spicigera*, SU PROTECCIÓN COLOIDAL CON GOMA DE MEZQUITE NATIVA Y PURIFICADA

Que presentó:

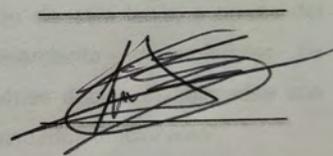
Eristeo García Márquez

Comité Tutorial

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana

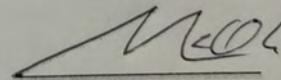


Asesores: Dr. Hugo Espinosa Andrews
Centro de Investigación y asistencia en
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Universidad Autónoma Metropolitana



Comité de evaluación:

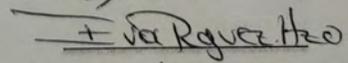
Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa



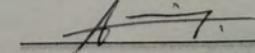
Secretario: Dra. Angélica Román Guerrero



Vocal: Dra. María Eva Rodríguez Huezo



Vocal: Dr. Rubén Jiménez Alvarado



Agradecimientos

Agradezco al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter, por todas sus disertaciones durante este proyecto, sus consejos, comentarios y correctivos que fueron de gran ayuda para la realización del mismo. Su apoyo y confianza en mi trabajo, por su gran capacidad intelectual que, ha sido un aporte invaluable. Por sus ideas que siempre fueron rigurosas. Agradezco también la facilidad de otorgar todos los medios necesarios y suficientes durante el desarrollo del mismo.

Al comité tutorial y miembros del jurado, por su valiosa colaboración, su esfuerzo en la revisión del escrito y consejos para la terminación del mismo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado y para la conclusión de esta tesis, a través del proyecto U-81157-Z, intitulado “Acomplejamiento-desacomplejamiento intermolecular de compuestos fenólicos lipo e hidrofílicos incorporados en emulsiones dobles estabilizadas con biopolímeros para minimizar su degradación y maximizar sus propiedades funcionales”.

Índice de figuras

2.1. El muicle y extractos, cuyos colores fueron dependientes del tipo de solvente utilizado	5
2.2. Clasificación de compuestos fenólicos en función de sus estructura molecular	8
2.3. Reacciones de auto-oxidación	10
5.1. Marco general desarrollado durante el trabajo experimental	19
5.2. Hojas frescas de muicle y deshidratadas	21
5.3. Diagrama de condiciones de extracción y estabilidad de TPC y AA de extractos bajo condiciones de temperatura y disolventes	22
5.4. Tensiómetro CSC y dispositivo adaptado para controlar temperatura	30
6.1. La polaridad del disolvente, la concentración de TPC, temperatura de extracción pueden estar relacionados con la intensidad de color y un indicativo de las diferentes moléculas en cada extracto	34
6.2. Efecto de las condiciones de extracción-disolvente, y descomposición del contenido de fenoles totales en los extractos de muicle, ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 25°C durante 20 días	43
6.3. Cinética de primer orden, obtenida por descomposición en el contenido de fenoles totales en el extracto PG ₅ 25 a pH 3.5: (■) Datos experimentales; (...) datos ajustados debido a mayor pérdida (k_1); and (— — —), datos ajustados con la información relativamente ralentizada k_2	44
6.4. Remoción de color en a, b comparado con (c), en dispersiones al 15 % p/p	49
6.5. Espectros de —GMN, —GMP y —GA, purificados y liofilizados	51
6.6. Decremento de tensión interfacial en función del tiempo utilizando diferentes concentraciones de goma y aceite mineral NF-85	52

6.7. Neutralización de los grupos ionizables totales en —GMN, —GMP, y —GA. Las curvas sigmoideas corresponden a la neutralización de los grupos ionizables totales y las curvas en forma de pico son las respectivas derivadas correspondientes a cada biopolímero 54

6.8. Efecto de GMN y GMP en la protección de los compuestos fenólicos obtenidos del muicle, E50_r-GMN₁ (■ ■), E50_r-GMN_{1,25} (□ □), E50_r-GMP₁ (▲ ▲) y E50_r-GMP_{1,25} (▽ ▽) 56

6.9. Efecto de GMN y GMP en la protección de los compuestos fenólicos obtenidos del muicle, E50_r-GMN₁ (■ ■), E50_r-GMN_{1,25} (□ □), E50_r-GMP₁ (▲ ▲) y E50_r-GMP_{1,25} (▽ ▽) 57

Índice de tablas

5.1. Diseño factorial usado para estimar la remoción de color en GMN	26
6.1. TPC en extractos de muicle en función solventes y temperatura	36
6.2. Actividad antioxidante inicial en extractos de muicle	40
6.3. TPC cuantificado de extractos de muicle a diferentes condiciones de acidez	42
6.4. Constantes de velocidad para (k_1) y lento (k_2) y tasa de degradación de TPC de extractos de muicle. Ajustados a modelo cinético de primer orden, y valores de $t_{1/2}$ del mayor gradiente encontrado	45
6.5. Pérdida de actividad antioxidante en extractos de muicle por cambio de pH, después de 20 días de almacenamiento.	47
6.6. Unidades de color utilizando Lw5 y F-66	49

Resumen

Los compuestos fenólicos son de suma importancia debido sus diversas propiedades asociadas a ellos, incluyendo actividad antioxidante, antimicrobiana, imparten color y sabor en alimentos, su contribución y mantenimiento al bienestar humano, es debido a la reducción de enfermedades degenerativas. En México, existe una gran diversidad de plantas endémicas que contienen un alto contenido de compuestos fenólicos con actividad terapéutica, entre ellas *Justicia spicigera* (muicle), que la hace potencialmente atractiva para la explotación industrial. A pesar de dichos efectos benéficos para la salud, este tipo de compuestos son altamente lábiles a la degradación por diversos factores ambientales (luz, oxígeno, temperatura, entre otros). La efectividad de dichos compuestos se encuentra restringida por sus concentraciones relativamente bajas, eficiencia de extracción con disolventes y condiciones de operación. Lo anterior, hace necesario establecer dichas condiciones (tipo de disolvente, temperatura y efecto de pH) para obtener el mayor contenido de compuestos fenólicos. Además de preservar dichas propiedades y funcionalidades durante el almacenamiento.

Por tal motivo, en esta propuesta se evaluó el efecto de la temperatura de extracción (25°C y 60°C), disolventes utilizados; agua (W), etanol (E), etanol 50% (E₅₀), glicerol 5% (G₅) y propilenglicol 5% (PG₅). Evaluando el contenido inicial de compuestos fenólicos totales (TPC) y actividad antioxidante (AA). Se encontró que el extracto E₅₀25 mostró el mejor rendimiento de extracción de TPC, equivalente a $1,018 \pm 24.2$ mgGAE/kg.

Por otra parte, el efecto del pH sobre el TPC durante el almacenamiento tuvo una fuerte influencia sobre la estabilidad del TPC y AA. Independientemente de los tres pHs de almacenamiento (3.5, 5.5 y 7.4), se encontró que todos los extractos presentaron pérdida significativa del TPC y AA. La degradación tuvo una cinética de primer orden en dos etapas, la primera con una constante relativamente rápida (k_1) a tiempos de almacenamiento relativamente cortos, seguido por una constante relativamente lenta (k_2) a tiempos de almacenamiento relativamente largos, siendo el extracto E₁₀₀60 (pH's 3.5 y 7.4) el que presentó la menor pérdida de TPC y, la mayor pérdida de AA con

una reducción del 10.0% y 87.0%, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que el mayor tiempo de vida media para los extractos de E₁₀₀60 (pH 7.4 y 3.5) y PG₅60 (pH 5.5), fueron 64, 106 y 186 días respectivamente.

Debido a lo anterior, surgió la necesidad de prolongar la estabilidad y funcionalidad de los extractos del muicle, por lo que se propuso incorporarlos en una matriz biopolimérica formada por goma de mezquite nativa (GMN) y goma de mezquite purificada (GMP). La purificación fue realizada por cromatografía de intercambio iónico (remoción de metales para eliminar el oscurecimiento que presentan las soluciones acuosas. La eficiencia de remoción de color fue mayor del 80%, el cual, se ha mencionado que se encuentra asociado al contenido de “taninos” (1000-2500 ppm). Las soluciones oscuras de GMN, restringe el uso como aditivo apto para su consumo humano. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA), ha reglamentado que la concentración de taninos debe ser cero ppm. El proceso de purificación de la GMN fue evaluado por medio de la señal de bandas de vibración de los grupos funcionales mediante de espectroscopia de infrarrojo, por la cuantificación de grupos ionizables totales y por tensión interfacial. La reducción de color potenció las bandas de absorción de los grupos funcionales, al igual que la cuantificación de grupos ionizables totales. Los datos de tensión interfacial no mostraron diferencia importante entre los resultados de la GMN y GMP.

La estabilización del extracto E₅₀25 concentrado de muicle en las soluciones de GMN y GMP, respectivamente, mejoró la estabilidad de éstos. La estabilidad fue cercana al 90% del TPC en un periodo de 30 días de almacenamiento, comparado con el extracto libre, el cual redujo su concentración en 50% después de 16 días.

La estabilidad de los compuestos fenólicos puede estar relacionada a las propiedades funcionales de la GMN. Una de las propiedades funcionales en sistemas hidrosolubles es la protección coloidal. Todos los compuestos hidrosolubles y liposolubles interaccionan por medio de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Las moléculas polares interaccionan por medio de puentes de hidrógeno, mientras que las no polares interaccionan con los segmentos hidrófobos de las cadenas de biopolímero. La macromolécula reorganiza su estructura orientando los residuos de polisacárido hidrosoluble hacia el medio continuo, formando una película protectora. La reorganización entre compuestos fenólicos y la GMN o con la GMP, permite que los compuestos fenólicos queden atrapados o rodeadas por la macromolécula limitando los procesos degradativos.

ABSTRACT

Phenolic compounds are of utmost importance due to their various properties associated with them,

including antioxidant and antimicrobial activity, color change, and impart flavor to food, their contribution and of maintenance to human well-being, is due to the reduction of degenerative diseases. In Mexico there is a great diversity of endemic plants that contain a high content of phenolic compounds with therapeutic activity, among them *Justicia spicigera* (muicle), which makes it potentially attractive for industrial exploitation

Despite these beneficial health effects, these types of compounds are highly labile to degradation by various environmental factors (light, oxygen, temperature, etc.). The effectiveness of these compounds is restricted by their relatively low concentrations, due to the efficiency of the extraction solvents and the operating conditions. This makes it necessary to establish said conditions (type of solvent, temperature, etc.) to obtain the highest

For this reason, in this proposal the effect of the extraction temperature (25°C and 60°C) and the solvents used were evaluated; [water (W), ethanol (E), 50 % ethanol (E₅₀), 5 % glycerol (G₅) and 5 % propylene glycol (PG₅)]. Evaluating the initial content of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA). It was found that the E₅₀25 extract showed the best TPC extraction performance, equivalent to $1,018 \pm 24.2$ mgGAE / kg

On the other hand, the effect of pH on TPC during storage had a strong influence on the stability of TPC and AA. Regardless of the three storage pHs (3.5, 5.5 and 7.4), it was found that all the extracts presented a significant loss of TPC and AA. The degradation had a first order kinetics in two stages, the first with a relatively fast constant (k_1) at relatively short storage times, followed by a relatively slow constant (k_2) at relatively long storage times, the extract being E₁₀₀60 (pH's 3.5 and 7.4) which presented the lowest loss of TPC and the highest loss of AA with a reduction of 10.0 % and 87.0 %, respectively. According to the results obtained, it was found that the longest half-life time for the extracts of E₁₀₀60 (pH 7.4 and 3.5) and PG₅60 (pH 5.5) were 64, 106 and 186 days respectively.

Due to the above, the need arose to prolong the stability and functionality of the muicle extracts, for which it was proposed to incorporate them into a biopolymeric matrix formed by native mesquite gum (GMN) and purified mesquite gum (GMP). The purification was carried out by ion exchange chromatography (removal of metals and adsorption to eliminate the darkening that aqueous solutions present. The efficiency of color removal was greater than 80 %, which, it has been mentioned, is associated with the content of "Tannins" (1000-2500 ppm). Dark solutions of GMN, restricts the use as an additive suitable for human consumption. The Food and Drug Administration (FDA), has regulated that the concentration of tannins must be zero ppm.

The purification process of the GMN was evaluated by means of the signal of vibration bands of the functional groups by means of infrared spectroscopy, by the quantification of total ionizable groups and by interfacial tension. The color reduction, enhanced the absorption bands of the functional groups, as did the quantification of total ionizable groups. The interfacial tension data did not show a significant difference between the GMN and GMP.

The stabilization of the concentrated E₅₀25 muicle extract in the GMN and GMP solutions, respectively, improved their stability. The stability was close to 90 % of the TPC in a period of 30 days of storage, compared with the free extract, which loses 50 % after 16 days. The stability of phenolic compounds may be related to the functional properties of GMN. One of the functional of properties in water-soluble systems are colloidal protection. All water-soluble and fat-soluble compounds interact through hydrogen bonds and Van der Waals forces. Polar molecules interact through hydrogen bonds, while nonpolar molecules interact with the hydrophobic segments of the polymer chains.

The macromolecule reorganizes its structure by directing the water-soluble polysaccharide residues towards the continuous medium, forming a protective film. The reorganization between phenolic compounds and GMN or with GMP, allows the phenolic compounds to be trapped or surrounded by the macromolecule, limiting the degradative processes.

Índice general

Lista de figuras	V
Lista de tablas	VI
Resumen	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.0.1. <i>Justicia spicigera</i> Schlechtendal (Muicle)	4
2.0.2. Compuestos fenólicos	7
2.0.3. Actividad antioxidante	9
2.0.4. Desventajas	11
2.0.5. Protección contra la degradación	11
2.1. Goma de mezquite	11
2.1.1. Reacciones de ionización	13
2.1.2. Restricciones de la goma de mezquite	13
2.1.3. Purificación de la goma de mezquite	13
2.2. Estabilidad del contenido de fenoles totales	14
3. Justificación	15
4. Objetivos	17
4.0.1. Objetivo general	17
4.0.2. Objetivos particulares	17
5. Materiales y métodos	18
5.0.1. Materiales	18
5.0.2. Reactivos analíticos utilizados	19

5.0.3.	Recolección de hojas de muicle	20
5.1.	Obtención de polímeros	20
5.1.1.	Resinas intercambio iónico	20
5.2.	Metodología	20
5.2.1.	Deshidratación de hojas de muicle	20
5.2.2.	Obtención de extractos de muicle	21
5.3.	Caracterización de extractos de muicle	23
5.3.1.	Contenido de fenoles totales (TPC)	23
5.3.2.	Inhibición de radical libre ABTS	23
5.3.3.	Inhibición de radical libre (DPPH ^{*+})	24
5.3.4.	Degradación de extractos del muicle	25
5.3.5.	Protección de extracto de muicle (E ₅₀₂₅)	25
5.4.	Purificación de goma de mezquite	26
5.4.1.	Preparación de soluciones de biopolímero	26
5.4.2.	Remoción de color en goma de mezquite	26
5.4.3.	Cuantificación de color residual en GMP	27
5.4.4.	Espectrogramas de infrarrojo (FT-IR)	28
5.5.	Cuantificación de grupos ionizables totales	28
5.6.	Tensión interfacial	29
5.6.1.	Determinación de tensión interfacial	29
5.7.	Formación de complejos coloidales	30
5.7.1.	Estabilidad de compuestos fenólicos	31
5.7.2.	Contenido de fenoles totales en TPC estabilizado	31
5.7.3.	Actividad antioxidante en complejos coloidales	31
5.8.	Análisis estadístico	32
6.	Resultados	33
6.1.	Caracterización de extractos de muicle	33
6.1.1.	Efecto disolvente-extracción sobre el contenido de fenoles totales	33
6.1.2.	Efecto de temperatura-extracción sobre el TPC	35
6.2.	Efecto de disolvente e inhibición del radical libre ABTS ^{*+}	37
6.2.1.	Efecto de disolvente e inhibición del radical libre DPPH ^{*+}	38

6.2.2. Efecto de temperatura en actividad antioxidante	39
6.2.3. Efecto de pH sobre TPC durante el almacenamiento	41
6.2.4. Efecto de disolvente en actividad antioxidante inicial	46
6.3. Purificación de goma de mezquite	48
6.3.1. Purificación de GMN	48
6.4. Espectrogramas de FT-IR obtenidos de GMP y GMN	50
6.4.1. FT-IR	50
6.5. Tensión interfacial	51
6.5.1. Decremento de la tensión interfacial en GMN y GMP	51
6.6. Cuantificación de grupos ionizables totales	53
6.6.1. Grupos ionizables en polielectrolitos	53
6.7. Estabilización de E ₅₀ 25 utilizando GMN y GMP	53
6.7.1. Protección del extracto E ₅₀ 25	53
6.7.2. Compuestos fenólicos estabilizados con GMN y GMP	54
6.7.3. Actividad antioxidante en muestras estabilizadas con GMN y GMP	55
7. Conclusión	58
8. Prospectivas	60
Anexo 1	62
Bibliografía	63

Capítulo 1

Introducción

En los últimos años se ha observado gran interés en el consumo de compuestos bioactivos benéficos para la salud. Los compuestos que han sido de gran importancia, son aquellos que presentan actividades antioxidantes, dichos compuestos se encuentran contenidos en una gran variedad de alimentos y plantas consideradas “medicinales”, cuyas propiedades se han relacionado con el contenido de compuestos fenólicos. Los beneficios derivados del consumo de este tipo de compuestos, radica en su capacidad para neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS están involucradas en los procesos de envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, autoinmunes, inflamatorias, cardiovasculares, y cancerígenas (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011; Soto et al., 2011; Day et al., 2009; Williams et al., 2004).

Dentro de esta diversidad vegetal se encuentra *Justicia spicigera* (Muicle, Schltldl.), una planta nativa de México, que se ha extendido hacia el norte de nuestro país y hacia América del sur. Se distribuye principalmente en los estados de Hidalgo, Veracruz, Yucatán, Chiapas, Nayarit, Puebla, Tlaxcala, Morelos y San Luis Potosí (Martínez, 1992). Es un arbusto de hoja perenne y flores tubulares de color naranja (Euler y Alam, 1982; Martínez, 1992 y 2004). Diversas investigaciones han confirmado que las estructuras de compuestos fenólicos son los responsables de las propiedades y, protegen la planta de depredadores. Además de contribuir en el sabor, color y astringencia de los alimentos incluidas las frutas, verduras y por supuesto, todos los preparados provenientes de dichas plantas medicinales (Soto et al., 2011; Pérez-Jiménez y Torres, 2011; Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011, Vermerris y Nicholson, 2006).

No obstante, debido a su alto grado de reactividad oxidativa, debido a factores ambientales, incluidos la temperatura, luz, oxígeno, pH, iones metálicos, entre otros (Craft et al., 2012; Pavón-García et

al., 2011; Day et al., 2009), ha obligado a explorar nuevos sistemas que coadyuven en la protección y su estabilidad para evitar la pérdida de sus propiedades antioxidantes (Day et al., 2009). Una alternativa para contrarrestar dicha degradación, es mediante su incorporación en matrices selectivas. Matrices capaces de proporcionar una barrera protectora a la difusión de agentes pro oxidantes, además de prolongar su estabilidad por mayor tiempo. Dichos compuestos fenólicos pueden ser estabilizados por medio de protección coloidal. Dichos compuestos estabilizados pueden incorporarse en sistemas alimenticios y conservar sus propiedades antioxidantes.

Entre las metodologías más utilizadas se puede mencionarse a la microencapsulación, las emulsiones (simples o múltiples) y la protección coloidal. Entre los biopolímeros utilizados para la protección de moléculas lábiles a los procesos oxidativos pueden mencionarse las gomas; guar, xantana, los almidones modificados y goma arábica. La goma guar y xantana, tienen la limitante de formar soluciones altamente viscosas, por lo que, deben utilizarse en bajas concentraciones. Los almidones modificados forman productos estables aunque, durante tiempos de vida de anaquel los productos que lo contienen disminuyen su calidad. La goma arábica, ha sido uno de los aditivos más utilizados para estabilizar una amplia variedad de productos alimenticios y no alimenticios. Sin embargo, su variación en cantidad, calidad y precios ha propiciado la búsqueda de nuevos biopolímeros con propiedades semejantes; emulsionante, encapsulante, estabilizante, protector coloidal, entre otros (Glicksman, 1982). El biopolímero con mayor similitud es la GMN. Esta última, es el producto exudado en los troncos y tallos del árbol del mezquite, cuyo biopolímero natural se ha reportado que tiene propiedades funcionales superiores a las obtenidas con la GA (Pedroza-Islas et al., 2002; Goycoolea et al., 1997). La GMN también actúa como un protector coloidal, evitando los procesos degradativos de las moléculas susceptibles a los procesos de degradación y los factores degradantes (Pavón-García et al., 2011; Beristain et al., 1999).

Sin embargo, a pesar de las excelentes propiedades funcionales que dicho biopolímero posee, su alto nivel de oscurecimiento de las soluciones acuosas, ha limitado su uso para su aplicación en la industria alimenticia, debido a que puede impartir color no deseado en los productos alimenticios, en comparación con la GA que ha sido ampliamente utilizada en alimentos. A pesar de la semejanza composicional entre GA y GMN, se ha reportado que la GMN contiene concentraciones no estandarizadas de taninos, los cuales pueden representar ciertos efectos tóxicos indeseables (Anderson y Weiping, 1989; Goycoolea et al., 1998).

La presencia e impartición de color en productos alimenticios o farmacéuticos se considera una impureza que demerita la calidad de los mismos. La presente propuesta se basó en reducir la cantidad

de color en la GMN, sin que ésta pierda sus propiedades funcionales.

En las industrias alimenticias, las resinas de intercambio iónico y adsorción han reemplazado a los métodos de purificación tradicionales como el carbón activado. Las resinas altamente selectivas han demostrado mayor efectividad y selectividad, comparada con los métodos fisicoquímicos. La cromatografía iónica y de adsorción permite la separación de los compuestos a partir de soluciones relativamente diluidas, dependientes de su polaridad entre la fase estacionaria y la fase móvil. Esta metodología es atractiva por su relativa simplicidad de diseño, fácil operación y escalamiento. Además de la alta capacidad de regeneración, recuperación de disolventes y mínima la degradación de los componentes activos (Soto et al., 2011). Por lo cual, ambas tecnologías de purificación fueron utilizadas para la remoción selectiva de aquellos compuestos que le imparten color en la GMN.

Una manera de determinar que el proceso de purificación no modificó las propiedades funcionales de GMP, fue incorporar en ésta compuestos altamente sensibles a la degradación, para determinar sus propiedades coloidales. Los compuestos fenólicos cumplen con esa propiedad.

La alta solvatación de los biopolímeros (GMN y GMP) y su propiedad de protección coloidal, permitió estabilizar a los compuestos fenólicos. Los mecanismos de protección coloidal se llevan a cabo por la interacción de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Mecanismo por el cual los compuestos liposolubles e hidrosolubles han sido protegidos. Estas interacciones rodean a las moléculas de menor tamaño (compuestos fenólicos) y la macromolécula (GMN o GMP) reorganiza su estructura formando una película protectora. La nueva reorganización entre compuestos fenólicos y la GMN o GMP, restringe el paso de sustancias oxidantes como el oxígeno (Glicksman, 1982).

Lo anteriormente expuesto, muestra un panorama general que permitió proporcionar información acerca de la estabilidad de los extractos obtenidos del muicle y prolongar su estabilidad utilizando GMN y GMP (purificada por medio de cromatografía de adsorción).

Capítulo 2

Antecedentes

2.0.1. *Justicia spicigera* Schlechtendal (Muicle)

La gran abundancia vegetal en nuestro país, ha permitido el uso de múltiples especies en la vida cotidiana de la población para tratar diversas afecciones a la salud. En México cerca de 4,000 especies tienen atributos medicinales, pero, se estima que su validación farmacológica, solamente ha sido en un 5% de esas especies (FAO, 2001). El uso de plantas con propiedades curativas, ha sido una forma de mitigar diversas dolencias. Las preparaciones comunes han sido infusiones, proceso en el que se obtienen sustancias hidrosolubles, básicamente mediante la inmersión de partes de la planta en agua, cuya temperatura es cercana al punto de ebullición. Proceso popular que se ha convertido en un método para preparar extractos acuosos, con efectos benéficos a la salud, entre estas plantas se encuentra el muicle.

El muicle, es una acantácea, un arbusto de 1 a 1.5 m de altura, sus hojas son de un color verde oscuro de 6 a 7 cm de largo y de 1 cm de ancho en promedio. Las soluciones hidrosolubles del muicle presentan un color violeta-azul visto a contra luz, y de un color rojo oscuro por reflexión (Figura 2.1). Las infusiones obtenidas de las hojas del muicle, han sido empleadas para aliviar múltiples dolencias; depurativo de la sangre, en el tratamiento de erisipela, sífilis y para regular la presión arterial (Domínguez et al., 1990; Martínez, 1992, 2004).

En la medicina tradicional mexicana, la infusión de las hojas de muicle en agua hirviendo ha sido utilizada como antipirético, anti-inflamatorio, inmuno estimulante, antihipertensivo, antiepiléptico, en el tratamiento de desordenes digestivos: dolor de estómago, diarrea, disentería, así como constipación (Ortiz-Andrade et al., 2012; Alonso-Castro et al., 2012) y cáncer cervical (Márquez et al., 1999), mientras en otras ciudades, las partes aéreas y la planta entera son utilizadas en el tratamiento de

la diabetes (Mahabir y Gulliford, 1997) y la amenorrea (Wong, 1976).

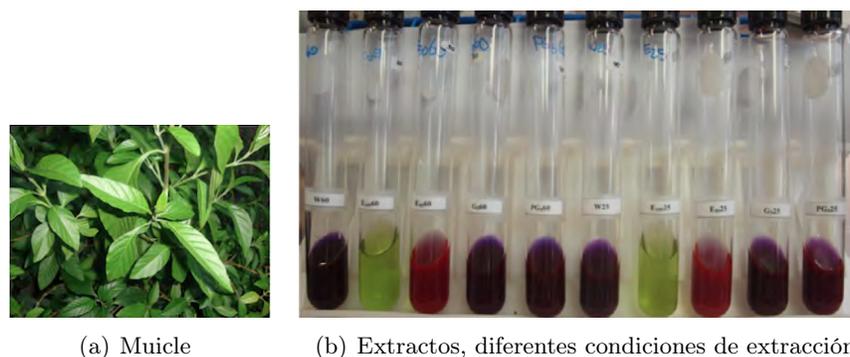


Figura 2.1: El muicle y extractos, cuyos colores fueron dependientes del tipo de solvente utilizado

Informes previos han indicado, que los extractos etanólicos de las hojas del muicle mostraron efectos contra *Gardia duodenalis*. Protozoo patógeno común en México, asociado con la diarrea, dolor abdominal y anorexia (Ponce-Macotela et al., 2002), mientras que, los extractos acuosos mostraron actividad citotóxica contra células leucémicas humanas (Cáceres-Cortés et al., 2001).

Diferentes compuestos han sido encontrados en el muicle, entre los mencionados se encuentran kaempferitrina (Kaempferol-3,7-bisramnosido), O-sitosterol (fitoesterol) y sus glucósidos, alantoína (derivado de las purinas) y criptoxantina (carotenoide) (Euler y Alam, 1982; Domínguez et al., 1990). Estos compuestos de diferente naturaleza molecular, pueden ser los responsables que alivian de ciertas dolencias físicas y enfermedades.

El kaempferol y sus glicósidos forman parte de una clase de compuestos ubicuos en las plantas, principalmente en frutas, vegetales y té. Diversos autores (Zhang et al., 2008; Sentjurc et al., 2003; Myhrstad et al., 2002; Wang et al., 2006) sugieren que el kaempferol es una molécula altamente antioxidante, a concentraciones de $0.5 \mu\text{M}$, ensayada con la molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El índice de inhibición reportado fue de $(\text{IC}_{50}) = 25.70 \pm 1.02 \mu\text{M}$, una capacidad antioxidante similar a la obtenida con el alfa-tocoferol, ensayada a la misma concentración. También se ha sugerido que tiene efectos estrogénicos. El kaempferol podría estar involucrado como receptor estrogénico y prevenir el estrés oxidativo, inducido por los oxiesteroles (oxidación de fitoesteroles), además de reducir la muerte celular por apoptosis (Heim et al., 2002; Wattel et al., 2003; Ruiz et al., 2005).

El sitosterol es otra clase importante de fitoquímico que exhibe actividad anti-inflamatoria, anti-neoplásica, antipirética, modula la actividad inmunológica, reduce la concentración del colesterol en el plasma sanguíneo y bloquea su absorción en el intestino. Inhibe e induce la apoptosis de las células

cancerosas de las glándulas mamarias en la mujer (Tapiero et al., 2003; Bouic y Lamprecht, 1999). La eficacia de los esteroides vegetales en la reducción de los niveles de colesterol, ha llevado a sugerir dietas con ésteres de esteroles como aditivos alimenticios, como una forma de reducir el colesterol en sangre (Ling y Jones, 1995). A pesar de sus propiedades y su inocuidad en soluciones acuosas, pueden actuar sobre los componentes solubles en grasa. Por ejemplo, reducir las concentraciones de carotenoides y tocoferoles que son transportados por las lipoproteínas, junto con el colesterol (Plat et al., 2000). Aunque, no existe evidencia que haya disminución de las concentraciones plasmáticas de retinol, vitamina D y K inducidas por las dietas de esteroides vegetales y sus ésteres.

La alantoína es de uso tópico, frecuentemente (FDA, 2010), es un astringente, queratolítico y antioxidante, actúa como cicatrizante en heridas leves, reduce la inflamación de las úlceras en humanos y remueve rápidamente las ROS. Su principal función fisiológica es de regulador en el almacenamiento y translocación del nitrógeno en las plantas superiores. Su consumo acelera el restablecimiento de los tejidos en el estómago e intestinos (Haghi et al., 2008; Yi-Chung et al., 2006). Se ha reportado que la alantoína regula algunos procesos biológicos, y regula la proliferación celular en el desarrollo fetal (Shestopalov et al., 2005).

Aún así, los estudios de actividad antioxidante de otras especies de este género y del muicle son escasos. Sepúlveda-Jiménez et al., (2009) describieron que el muicle mostró actividad antioxidante, donde los compuestos fenólicos y flavonoides contribuían a esa actividad. La anterior evidencia ha sugerido que el muicle puede ser una fuente potencial de antioxidantes, misma que podría apoyar su uso en el tratamiento de diversas enfermedades, sobre todo en aquellas, donde los radicales libres están relacionados con dichos trastornos o ser incorporados en concentraciones estandarizadas en productos alimenticios.

El interés en los compuestos fenólicos se ha relacionado principalmente por su actividad antioxidante, por mostrar actividad biológica in vivo y por los efectos que éstos puedan tener contra las enfermedades relacionadas con la formación excesiva de ROS, donde se excede la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo humano (Morelló et al., 2004).

Sin embargo, estos antioxidantes naturales han mostrado inestabilidad durante su obtención, procesamiento, transporte y almacenamiento. Por ejemplo, el oscurecimiento oxidativo de los compuestos fenólicos, son la mayor causa de la degradación de frutas y derivados vegetales alimenticios (Mathew y Parpia, 1971).

Diferentes sistemas de disolventes han sido utilizados para obtener extractos antioxidantes de diferentes materiales como frutas, vegetales y plantas con propiedades medicinales. Mezclas acuosas de

acetona, metanol y etanol, han sido comúnmente usados para extraer compuestos fenólicos, debido a que proporcionan un alto rendimiento de tales componentes en el extracto total, a pesar de que no son selectivos para obtenerlos, se ha revelado que sistemas disolventes mono componentes son más eficientes en la extracción de éstos compuestos (Pinelo et al., 2005; Santos-Soriano et al., 2007). La cantidad de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante varía de acuerdo con la fuente utilizada, disolvente y el tipo de extracción (Xu y Chang, 2007; Turkmen et al., 2006; Lapornik et al., 2005). Por lo tanto, es importante entender los factores que influyen en el rendimiento y estabilidad de los compuestos fenólicos durante su almacenamiento, antes de proceder a su incorporación en productos alimenticios.

El efecto benéfico de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante, pueden disminuir como resultado de la acción del procesamiento. Así como, las condiciones de almacenamiento y la presentación del producto que contiene éstos componentes al ser ingeridos. Cuando los componentes fenólicos no son protegidos adecuadamente, pueden interactuar con los jugos gástricos y sales biliares, disminuyendo sus efectos benéficos en el consumidor. Lo anterior, ha motivado su estabilización por medio de protección coloidal, utilizando el biopolímero de la GMN y GMP.

2.0.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos ampliamente distribuidos en la naturaleza vegetal, y por lo tanto, nuevos métodos de extracción, análisis y aplicaciones han sido extensivamente estudiados. Una aplicación de particular importancia, ha sido la actividad antioxidante (ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, cumarinas, estilbenos, benzoquinonas, antraquinonas, lignanos, flavonoides, etc.) en productos alimenticios para prolongar la vida de anaquel y mantener la calidad de los mismos. Esto ha llevado a correlacionar los datos de capacidad antioxidante obtenidos por ensayos in vitro, con la capacidad esperada y prolongada en los sistemas alimenticios. A pesar de estos esfuerzos, la capacidad antioxidante relativa de compuestos antioxidantes en los sistemas alimenticios depende de otros factores, como su interacción y las condiciones generales de medio ambiente en los alimentos. Para que un antioxidante pueda promover el efecto esperado, debería analizarse todo el sistema en su conjunto y así obtener productos altamente benéficos para la salud (Craft, et al., 2012; Soto et al., 2011; Tsao y Deng, 2004) (Figura 2.2). La amplia variedad de compuestos fenólicos y su diferente naturaleza química pueden mostrar una gran versatilidad. Dicha versatilidad puede utilizarse en los diferentes productos alimenticios. Productos alimenticios con principios activos capaces de mantener su actividad antioxidante.

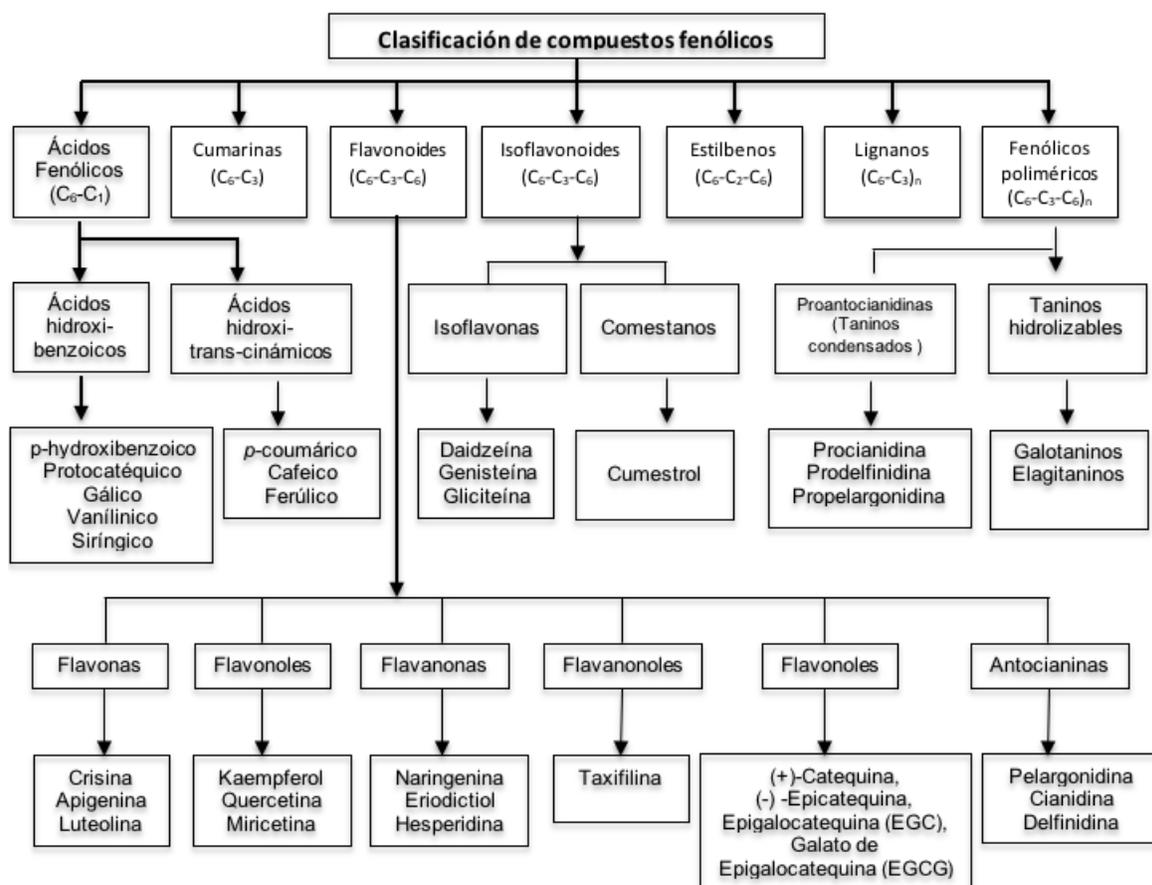


Figura 2.2: Clasificación de compuestos fenólicos en función de sus estructura molecular

2.0.3. Actividad antioxidante

Las reacciones de oxidación de triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados comúnmente en los alimentos, son los responsables de las alteraciones organolépticas y nutricionales en los alimentos. Una forma de retardar el proceso de oxidación, es la adición de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. La actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir o impedir el proceso de oxidación. Una forma de determinar la efectividad de un antioxidante contra la oxidación, es a través de su cinética de reacción (Becker et al., 2004). La gran diversidad de componentes naturales antioxidantes en los alimentos, por ejemplo, el alfa-tocoferol, contenido en grasas y aceites, y fenoles solubles en medio acuoso, como el ácido gálico en frutas, son los responsables de retardar el proceso de oxidación. Aunque la actividad antioxidante que detiene o prolonga la estabilidad de muchos productos naturales, está asociada a su elevada reactividad contra los radicales libres activos, y se considera el mecanismo principal (Roginsky y Lissi, 2005).

La capacidad antioxidante proporciona información sobre la duración de la acción antioxidante, mientras que la reactividad, caracteriza el nivel de intensidad inicial de antioxidante a una cierta concentración del antioxidante o mezcla de éstos (Roginsky y Lissi, 2005). Análogamente, la actividad antioxidante difiere de la actividad antirradical (Figura 2.2). La actividad antirradical es un valor definido por la reactividad de un antioxidante contra los radicales libres activos, determinados por la tasa de reacción. No obstante, la actividad antioxidante es la capacidad de retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad antirradical no significa una alta actividad antioxidante (Craft, et al., 2012; Roginsky y Lissi, 2005).

La actividad antioxidante depende de factores como la concentración, temperatura, tipo de sustrato, luz y medio en que se encuentre el sistema (polaridad), concentración de metales pro-oxidantes, mismos que deben controlarse para retardar los procesos oxidativos.

Existen dos formas para determinar la actividad antioxidante en la degradación de compuestos susceptibles a oxidarse, indirecta y directa. En la forma indirecta, la capacidad antioxidante para eliminar radicales libres no está asociada con la degradación real oxidativa. En ésta técnica se utilizan los radicales libres como el ABTS y DPPH. Estas moléculas son hasta cierto punto estables, y ampliamente utilizadas por su intensa absorción en la región visible espectrofotométrica. La determinación antioxidante global (rompimiento de la molécula) es estimada por la actividad donante de H^+ de los compuestos fenólicos.

Los métodos directos están basados en la cinética oxidativa de la peroxidación lipídica. Roginsky

y Lissi, (2005) mencionan que el proceso de cuantificación oxidativa puede realizarse por auto-oxidación. El proceso se lleva a cabo de forma espontánea con auto-aceleración debida a la acumulación de hidroperóxido. Los mecanismos de reacción en cadena de radicales libres de auto-oxidación se pueden describir como iniciación (donde el número de radicales libres se incrementa), propagación (el número total de radicales libres es constante, aunque el número de especies puede ser variable) y terminación (el número de radicales libres decrece). Estos mecanismos de reacción producen sustancias volátiles que causan detrimento en la calidad de los alimentos. Los principales mecanismos de auto-oxidación de los lípidos en sus tres etapas son las siguientes, (Ecuaciones 2.3).

La oxidación puede ser retardada en ROO^\cdot por medio de la adición de compuestos neutralizantes, como los TPC, que pueden donar un átomo de hidrógeno. La característica esencial de los TPC, es que la sustitución del grupo OH, produce un radical fenoxi que se convierte en una semiquinona debido a su rápida desprotonación, en medio acuoso y a pH neutro. La etapa final, produce compuestos como ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos pueden impactar en la calidad de los alimentos.

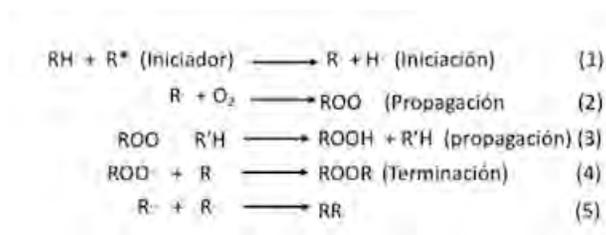


Figura 2.3: Reacciones de auto-oxidación

Una ventaja del método directo, se basa en el modelo de reacción controlada y generalmente tiene mayor sensibilidad (Roginsky y Lissi, 2005). Pero, la metodología requiere mayor tiempo y experiencia en cinética química para utilizarlo de manera adecuada. Por lo que, el método no puede aplicarse rápidamente en pruebas de rutina. La utilidad de los métodos indirectos como el ABTS y DPPH, son métodos fáciles y tienen capacidad informativa. Proveen información rápida sobre la capacidad de los productos naturales que pueden eliminar a los radicales libres estables. La aplicación de los métodos indirectos, requieren exactitud para obtener reproducibilidad. Esa deficiencia puede controlarse con el tiempo de incubación, concentración de reactivos y estandarización del protocolo de prueba. Aunque ambas metodologías deben correlacionarse para obtener datos fiables y precisos.

2.0.4. Desventajas

Entre las desventajas del uso de los radicales libres, es la falta de uniformidad en los métodos utilizados para la calibración, las modificaciones de la metodología empleada y la forma en la que se reportan los resultados, los datos pierden consistencia y dificultan la comparación de resultados reportados en la literatura. Las modificaciones empleadas en las metodologías para determinar la medición de antioxidantes, puede deberse a la flexibilidad a los ensayos utilizados, como ocurre en las metodologías de ABTS y DPPH (Roginsky y Lissi, 2005; Craft et al., 2011), sin embargo los resultados no siempre concuerdan. La estructura química en cada grupo de los compuestos antioxidantes, la estequiometría entre éstos, y los radicales libres, la compatibilidad y el ensayo empleado pueden mostrar efecto importante sobre los resultados obtenidos. Lo anterior, sugiere la necesidad de realizar evaluaciones de los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante de las diversas fuentes, teniendo en cuenta la composición química y factores como la polaridad, pH y temperatura, con respecto a los ensayos. Los métodos de DPPH y ABTS no realizan estimaciones de las especies reactivas de oxígeno, son metodologías fundamentadas en el uso de radicales nitro (Craft et al., 2011).

2.0.5. Protección contra la degradación

Debido a la alta reactividad que presentan los compuestos fenólicos, no pueden conservarse por sí solos por tiempos prolongados. Su protección contra su degradación es de suma importancia, de tal forma que para aplicar dichos compuestos es necesario estabilizarlos, la estabilización debe ofrecer las mismas propiedades funcionales que el producto obtenido inicialmente, aun cuando éste haya sido almacenado por cierto período de tiempo. Por este motivo, la protección de los compuestos fenólicos contra la oxidación es necesaria para mantener no sólo la actividad fenólica, además de su actividad antioxidante. Existen diversos métodos de estabilización de compuestos fenólicos, entre éstos, aquellos que involucran su encapsulación y su asociación por medio de protección coloidal, la protección coloidal es una metodología asequible y fácil de realizar utilizando GMN y GMP.

2.1. Goma de mezquite

La goma de mezquite nativa (GMN) es el producto exudado en forma de lágrima de tamaño irregular translúcida, por los troncos y tallos del árbol *Prosopis laevigata* (mezquite), árbol que crece en las áreas semidesérticas de México. El color de la goma varía entre un amarillo claro a café oscuro. Al

igual que la goma arábica es un polielectrolito altamente soluble en agua. Las soluciones obtenidas son ligeramente ácidas (pH 4.3 a 4.8). Esta goma es altamente soluble en agua, comparada con otras, como la goma de xantana, guar, que es limitada. La goma de mezquite ha sido propuesta, como un sustituto de la GA, debido a sus propiedades funcionales; como protector coloidal, emulsionante y estabilizante de colorantes naturales y agente encapsulante de aceites cítricos, espesante, reductor de la cristalinidad, obteniéndose mayores efectos protectores en comparación con la GA (Rodríguez-Huezo et al., 2004; Beristain et al., 2002). Las aplicaciones dependen de las propiedades que proporciona ésta macromolécula en combinación con otras, y de sus diversos estados de hidratación (Khanna et al., 1977). Los mecanismos de estabilización, por ejemplo en emulsiones preparadas con GMN, se ha propuesto que son promovidos a través de una película interfacial entre las micro-gotas del material oleoso y el medio acuoso continuo. La película previene los mecanismos de coalescencia. También se sugiere que su alta solubilidad (ionización de sus grupos ácidos) y la actividad superficial de GMN promueven una carga eléctrica negativa repulsiva que puede contribuir a la estabilización de los sistemas dispersos.

Químicamente, GMN, es un heteropolisacárido ligeramente ácido, con función aniónica, altamente ramificada; es considerado un arabinogalactano-proteico un AGP, un polisacárido unido covalentemente a una proteína. El polisacárido está constituido por dos monosacáridos, L-arabinosa y galactosa, además de D-glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico derivados de la oxidación de la glucosa. La estructura, se ha descrito como una cadena central de unidades de D-galactosa, unidas por enlaces (1→3) y beta (1→6) a la cual se unen cadenas laterales en O (6) residuos de D-galactosa (White, 1946, 1947a, b, 1948; Cuneen y Smith, 1948a, b). Además de la estructura altamente compleja, constituida por monosacáridos, la GMN tiene una fracción proteica que oscila entre 2% y 4.8% (Gooycoolea et al., 1998; Orozco-Villafuerte et al., 2003; López-Franco et al., 2004). La alta solubilidad de la GMN y su relativa baja viscosidad comparada con otros biopolímeros facilitan su aplicación como un emulsionante y protector coloidal efectivo. Sin embargo, como aditivo comercial no ha sido aprobada, porque ésta contiene altas concentraciones de taninos (Anderson et al., 1989; Gooycoolea et al., 1998). Por lo que, en este trabajo se propuso obtener un biopolímero con concentraciones de color estandarizadas para poder aprovechar sus propiedades funcionales antes explicadas.

2.1.1. Reacciones de ionización

La alta solubilidad de las gomas como la GMN y GA producen soluciones ligeramente ácidas y cualquier cambio de pH ambiente, pueden modificar sus propiedades, entre éstas, su nivel de ionización, cuando se adiciona una concentración mínima de ácido o base. Ello significa, que puede cuantificarse la concentración total de grupos funcionales. El nivel de ionización de los grupos funcionales permite cuantificar el número de equivalentes químicos en la GMN y compararse con la GA. El número de equivalentes químicos puede fundamentarse en que los polielectrolitos como la GMN tiene una gran cantidad de grupos ionizables, que en solución, la GMN se disocia en sus macro iones polivalentes (poli-iones) y un gran número de iones pequeños de carga opuesta (contra iones).

2.1.2. Restricciones de la goma de mezquite

La alta similitud en las propiedades químicas y funcionales entre GMN y la GA, ha permitido proponer que esta última, puede ser reemplazada en productos alimenticios, debido a su variación en calidad, precio y suministro. No obstante, se ha establecido que la GA es un aditivo seguro y aprobado por el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y GMN no ha sido estudiada rigurosamente por ninguno de estos organismos internacionales. Lo anterior, ha limitado su aplicación en productos alimenticios. Los argumentos expuestos son los altos niveles de taninos y minerales como el manganeso, además de las pruebas rigurosas de toxicología. Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular contenidos en las plantas superiores, incluidas las utilizadas como alimentos. Los taninos ingeridos a través de la dieta, se ha sugerido que pueden reducir el valor nutritivo de las proteínas debido a la formación de complejos insolubles, la inhibición del hierro, por su acomplejamiento y la reducción de los sistemas antioxidantes biológicos que participan en las reacciones redox (Hartzfeld et al., 2002).

2.1.3. Purificación de la goma de mezquite

En todos los procesos de purificación, uno de los requisitos indispensables para separar las impurezas indeseadas del componente principal, es tener máxima disolución. Una de las propiedades de la GMN es su alta hidrosolubilidad y produce una alta carga eléctrica aniónica que mantiene unida a toda la macromolécula (Pasika, 1977). La alta solubilidad y su carga aniónica produce alta sensibilidad a los cambios de viscosidad por adición de grupos altamente ionizados como ácidos, bases fuertes y electrolitos (Glicksman, 1982), la disminución de viscosidad, permite obtener soluciones

concentradas de GMN, útiles para lograr su purificación.

Previas investigaciones han propuesto que es posible obtener un biopolímero con las mismas propiedades funcionales y con niveles estandarizados de impurezas. Anderson y Weiping (1989) propusieron que la tecnología de microfiltración tangencial y ultrafiltración puede producir soluciones clarificadas de GMN. La tecnología de ultrafiltración logró remover 62% de taninos contenidos en una solución al 4.5% (p/p) de GMN. El mismo proceso permitió obtener una solución concentrada de GMN con 12.6% p/p de sólidos totales. Las pruebas emulsionantes demostraron que la tecnología de ultrafiltración disminuyó la concentración proteica de GMN. Se observó que hubo disminución de sus propiedades emulsionantes en GMN por la tecnología de ultrafiltración. Goycoolea et al., (1998), propusieron que una selección cuidadosa de GMN puede contener concentraciones de taninos similares e incluso menores, que los obtenidos de muestras de GA. En base a los resultados previos, en este trabajo se propuso remover la mayor concentración posible de color por medio de cromatografía de intercambio iónico y de adsorción. La cromatografía acoplada y la modificación de pH en las soluciones de GMN, fueron utilizados para remover impurezas (sustancias que producen color en la GMN).

2.2. Estabilidad del contenido de fenoles totales

El interés en los compuestos fenólicos ha sido relacionado con su actividad antioxidante, su actividad biológica in vivo y por sus efectos contra enfermedades relacionadas con la formación excesiva de ROS (Morelló et al., 2004). No obstante, los antioxidantes naturales han mostrado inestabilidad durante su obtención, procesamiento, transporte y almacenamiento (Mathew y Parpia, 1971). La inestabilidad de estos antioxidantes es debido a la facilidad de interaccionar con los demás componentes propios del sistema. Los compuestos fenólicos son donadores de electrones o átomos de hidrógeno para neutralizar su deficiencia electrónica. El intercambio de electrones o átomos de hidrógeno es signo de alta inestabilidad y degradación de estos compuestos antioxidantes (Xu y Chang, 2007; Turkmen et al., 2006; Lapornik et al., 2005). Por lo tanto, la estructura molecular y factores ambientales, como el pH, temperatura de extracción, almacenamiento y transporte, luz, oxígeno, iones metálicos y la interacción con otras moléculas son factores que puede afectar su estabilidad. La estabilización por medio de protección coloidal de los compuestos fenólicos fue uno de los principales objetivos, debido a sus múltiples aplicaciones y sus efectos benéficos a la salud. La estabilización puede garantizar el consumo de compuestos fenólicos en concentraciones estandarizadas.

Capítulo 3

Justificación

Los compuestos fenólicos son moléculas altamente sensibles debido a su alta reactividad y a su degradación por factores ambientales degradativos. Entre estos factores se encuentran; la luz, la presencia de oxígeno, temperatura, pH, y la interacción con otras moléculas propias del medio donde éstas se encuentren. La reactividad y inestabilidad de las moléculas fenólicas se debe a su habilidad para reaccionar con especies reactivas y con iones metálicos pro-oxidantes. Una forma de reducir la inestabilidad de los compuestos fenólicos, es utilizando una matriz selectiva capaz de disminuir los procesos oxidativos. Entre las matrices de elección se encuentran los biopolímeros coloidales como la GMN. La cual ha mostrado propiedades funcionales superiores a los impartidos por la GA, a pesar de las altas concentraciones de color que ésta imparte. La utilización de un biopolímero accesible, representa una forma de sustituir un producto como la GA, altamente variable en calidad y disponibilidad. Análogamente, se ha reportado que procesos de purificación como la ultrafiltración, permiten obtener un biopolímero con propiedades semejantes que aquella sin purificar, quedando a discusión si es posible implementar nuevos tipos de procesos, donde se puedan mantener las propiedades funcionales y disminuir la concentración de moléculas que imparten color en la GMN e incluso mejorar estas propiedades. Una forma de verificar los efectos protectores coloidales del biopolímero, y al mismo tiempo disminuir, los efectos oxidativos de los compuestos fenólicos obtenidos del muicle. Puede ser utilizando el biopolímero sin modificar y purificado por medio de cromatografía de intercambio iónico y de adsorción. La formación de complejos coloidales puede ser una alternativa viable para estabilizar compuestos fenólicos susceptibles de oxidación, obtenidos a partir del muicle, en forma de un extracto concentrado. Por lo que, ésta contribución trata de solucionar el problema de alta inestabilidad de los compuestos fenólicos sin modificar sus propiedades, incluyendo

éstas moléculas altamente reactivas en la GMN y GMP con propiedades funcionales superiores que de la GA. Los complejos coloidales altamente solubles podrían ser aplicados a cualquier producto alimenticio, para proporcionar una concentración estandarizada de antioxidantes estables.

Capítulo 4

Objetivos

4.0.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de las condiciones de extracción disolvente-temperatura en el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en los extractos frescos del muicle, su degradación durante su almacenamiento y protección con GMN y GMP.

4.0.2. Objetivos particulares

1. Extraer la máxima cantidad de compuestos fenólicos utilizando diferentes disolventes, controlando temperatura.
2. Caracterizar los extractos obtenidos a diferentes valores de pH, determinando la concentración de fenoles totales y actividad antioxidante en función del tiempo.
3. Determinar el orden de degradación de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante.
4. Purificar la GMN a través de resinas de intercambio iónico y de adsorción.
5. Cuantificar el color residual en GMP y determinar la eficiencia de remoción en ésta.
6. Caracterización de la GMP utilizando FT-IR, cuantificación de grupos ionizables totales y tensión interfacial en comparación con la GMN.
7. Estabilización de compuestos fenólicos por medio de protección coloidal utilizando ambas gomas.
8. Cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en los sistemas estabilizados; extractos acuosos concentrados-GMN y extractos acuosos concentrados-GMP.

Capítulo 5

Materiales y métodos

El desarrollo experimental seguido durante éste trabajo, se dividió en tres partes: la primera, estuvo enfocada al análisis de los extractos acuosos del muicle, determinando el efecto de disolventes, temperatura y pH. Se determinó el efecto de disolventes, en el rendimiento de fenoles totales, actividad antioxidante y su degradación en función de pH. La segunda, estuvo orientada al proceso de purificación de la goma de mezquite utilizando una resina iónica y de adsorción: Lewatit S5428 (LanXess, Alemania) y Amberlite FPX66 (Dow Chemical, México). La purificación fue monitoreada cuantificando el color residual en GMP. El color, fue determinado usando la metodología descrita en la norma oficial mexicana NMX-F-526-1992, y la tercera, al estudio de los compuestos fenólicos protegidos coloidalmente con GMP, contrastando con la GMN. El desarrollo experimental se muestra en la (Figura 5.0.1).

5.0.1. Materiales

Todos los materiales y reactivos utilizados durante la extracción para obtener los compuestos fenólicos, actividad antioxidante, proceso de purificación de biopolímero y estabilización de los compuestos fenólicos se enuncian a continuación:

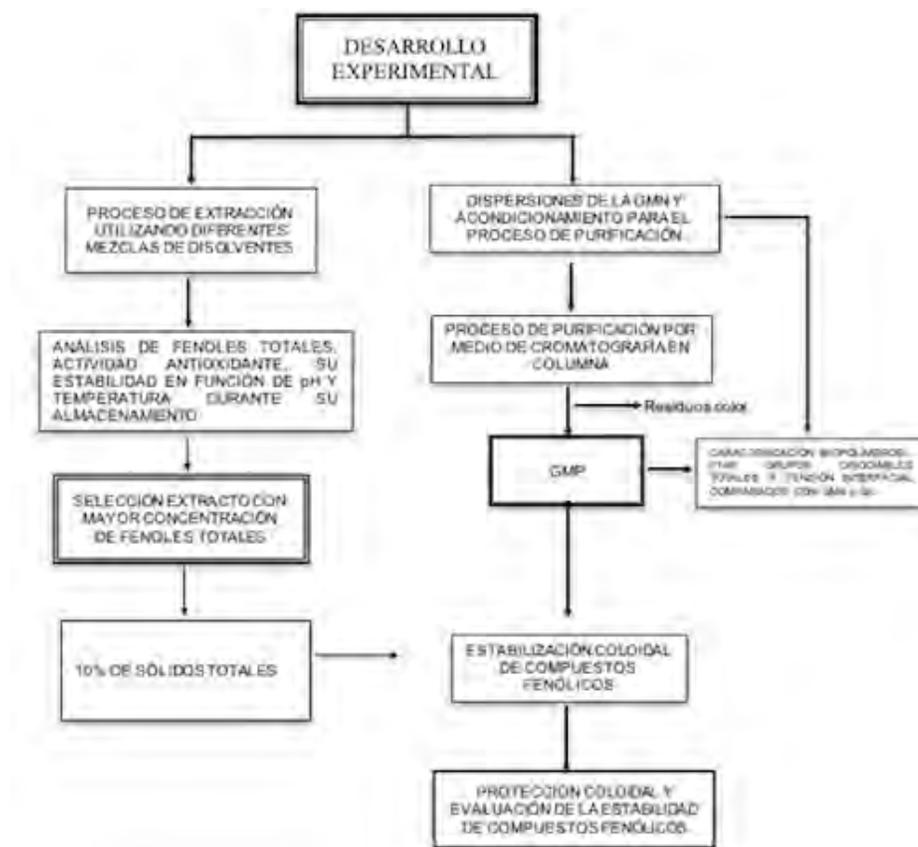


Figura 5.1: Marco general desarrollado durante el trabajo experimental

5.0.2. Reactivos analíticos utilizados

Los reactivos analíticos y estándares usados para la determinación de contenido de fenoles totales (TPC) y actividad antioxidante (AA) fueron: el reactivo de Folin-Ciocalteau (FCR) y azida de sodio (SA), fueron adquiridos de Hycel de México, S. A. de C. V., (México, D. F, México), el ácido 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX), estándar de ácido gálico (GAS), persulfato de potasio (PPS) y glicerol (G, 99% de pureza) fueron obtenidos de Química Sigma Aldrich S. A. de C. V. (Toluca, Estado de México, México). El acetato de sodio anhidro (ASA), ácido acético glacial (GAA), ácido hidrociorhídrico (HCl), metanol (MeOH) e hidróxido de sodio (NaOH) fueron adquiridos de J. T. Baker, S. A. de C. V. (Xalostoc, Estado de México, México). El carbonato de sodio (SC) fue obtenido de Tecsiquim S. A. de C. V., y el propilenglicol (PG) grado alimenticio fue adquirido de la compañía Polioles, S. A. de C. V, ambas compañías establecidas en Toluca (Toluca, Estado de México, México). En todo el desarrollo de los experimentos se utilizó agua desionizada

(W).

5.0.3. Recolección de hojas de muicle

Se emplearon hojas de muicle para la preparación de los extractos. 8 kg de material vegetal fue colectado de arbustos adultos en el mes de junio de 2012 en Oacalco, Tepoztlán, Morelos (Latitud 18°91'67", Longitud -99°01'67", a 1600 msnm).

5.1. Obtención de polímeros

La GMN en lágrima *Prosopis laevigata* fue colectada de localidades cercanas a Río Verde, San Luis Potosí, México, (21°55'22" latitud norte y 99°59'38" Latitud Oeste, a 998 msnm) durante los meses de abril-mayo de 2010. EL producto obtenido en lágrima fue conservado a -20°C. Muestras de 100 g en forma de lagrima fueron finamente molidas. Utilizando las muestras en polvo se prepararon soluciones al 15 % de GMN. Las soluciones obtenidas se mantuvieron a 4°C por 12 h para asegurar su hidratación, luego fueron purificadas. La GA en lágrima fue adquirida de Biological Engineering Co., Ltd (Guangzhou, China), fue conservada bajo las mismas condiciones que GMN.

5.1.1. Resinas intercambio iónico

Los soportes utilizados fueron: Lewatit S5428, resina de intercambio iónico, fuertemente básica, tipo I, macroporosa, fabricada con poliacrilato reticulado, Los grupos funcionales de la resina fueron, amina cuaternaria. La resina iónica es estable entre 0 a 12 unidades de pH, grado alimenticio (Lw5, LanXess, Naucalpan, Estado de México). FPX-66 (F-66, Dow Chemical Company, Toluca, México); es una resina adsorbente fabricada con un polímero aromático macroreticular. Las especificaciones de área superficial y porosidad proporcionadas por el proveedor fueron de 700 m²/g y 1.4 cm³/g de resina. El fabricante menciona que la resina no modifica su eficiencia debido a los cambios drásticos de pH, su intervalo de trabajo especificado fue 0 a 14.

5.2. Metodología

5.2.1. Deshidratación de hojas de muicle

Las hojas frescas de muicle fueron colocadas en charolas de acero inoxidable (60 cm x 50 cm), formando una capa homogénea de material vegetal (Figura 5.2 a). Las charolas fueron colocadas en

una estufa de convección forzada (SW-17TA, Blue-M, New Columbia, PA, U.S.A.) y secadas a 30°C por 72 h (Figura 5.2 b). Las hojas secas, fueron empacadas en bolsas de aluminio selladas al vacío y almacenadas a -10°C hasta su uso. El material vegetal seco conservado a -10°C, fue finamente molido hasta pasar por malla 35, inmediato al proceso de preparación de los extractos.

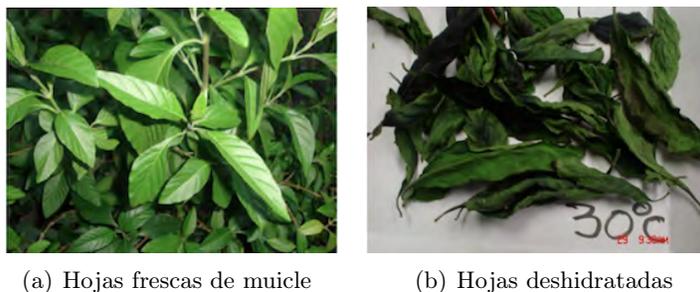


Figura 5.2: Hojas frescas de muicle y deshidratadas

5.2.2. Obtención de extractos de muicle

Los extractos fueron preparados por maceración de 2.5 g de material vegetal con 100 g de diferentes mezclas de disolventes (dos mono solventes y tres sistemas binarios) a 25°C y 60°C (las temperaturas fueron decididas de experimentos preliminares). Los productos de maceración fueron separados después de 12 h de extracción. Las dos temperaturas estudiadas fueron decididas debido a la alta concentración de los compuestos fenólicos y por la mínima degradación observada durante los procesos térmicos. La codificación de las condiciones de extracción fue realizada en base a la combinación de los disolventes y temperatura utilizados; agua (W₂₅, W₆₀), etanol absoluto (E₁₀₀25, E₁₀₀60), etanol 500 g/kg (E₅₀25, E₅₀60), glicerol 50 g/kg (G₅25, G₅60) y propilenglicol 50 g/kg (PG₅25, PG₅60). Los extractos obtenidos con los disolventes mencionados fueron filtrados utilizando papel Whatman número 4. Los extractos obtenidos exhibieron un pH inicial de 7.4, independientemente de las condiciones iniciales de extracción. La metodología para determinar la estabilidad de TPC y AA, la tasa de degradación bajo diferentes ambientes de pH y almacenados durante 20 días, puede observarse en la figura 5.2.2.

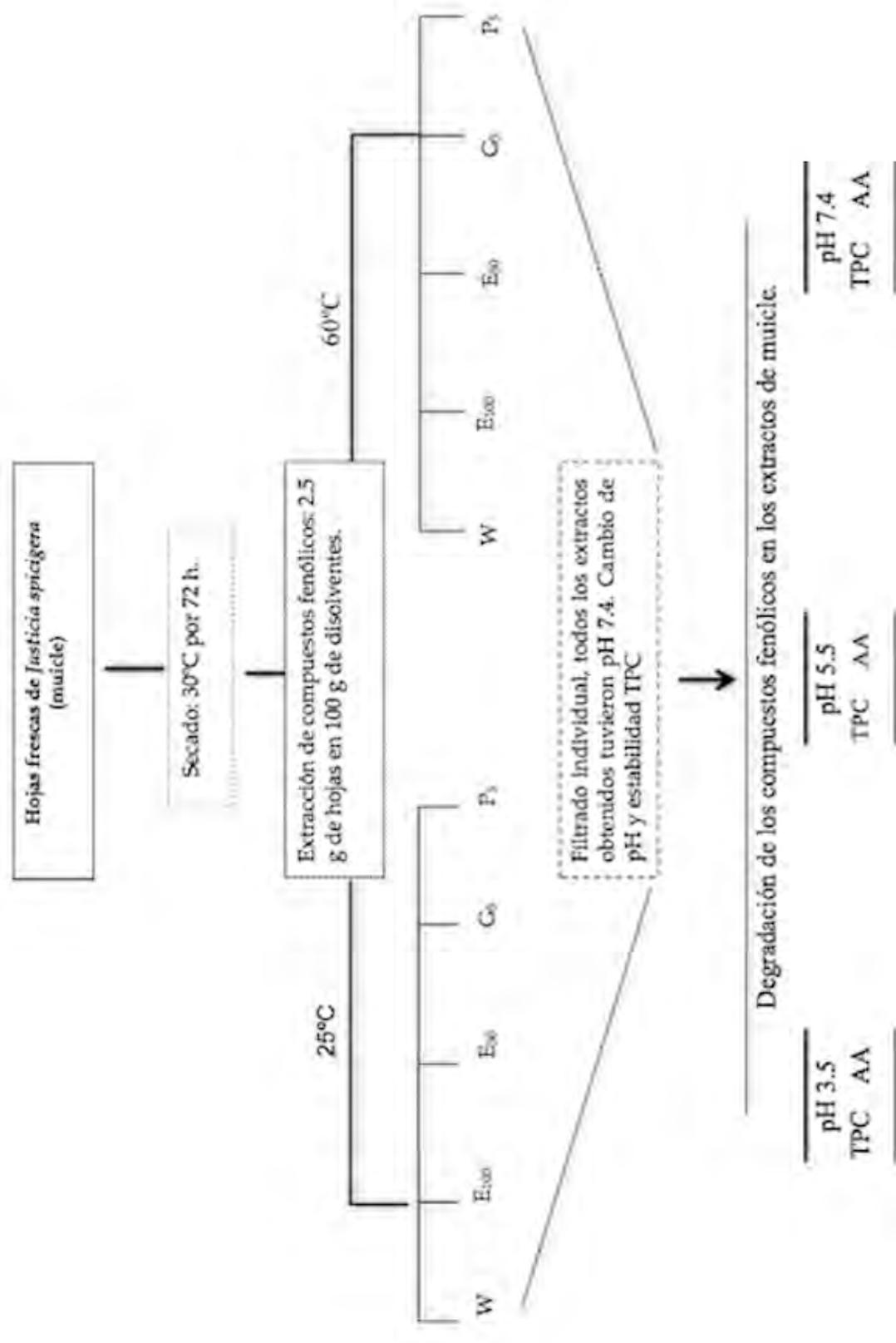


Figura 5.3: Diagrama de condiciones de extracción y estabilidad de TPC y AA de extractos bajo condiciones de temperatura y disolventes

5.3. Caracterización de extractos de muicle

Los extractos obtenidos, fueron diluidos con los disolventes utilizados en la extracción correspondiente en una relación 1:1, v/v. El pH de las diluciones con cada uno de los solventes se mantuvo a 7.4. Para ajustar el pH en el intervalo de 3.5 a 5.5 fue adicionada la cantidad mínima necesaria de 1.0 N de HCl. Todos los extractos ajustados en el intervalo de pH, fueron almacenados durante veinte días a 25°C a tres valores de pH (3.5, 5.5 y 7.4) previamente elegidos. Los valores de pH fueron escogidos porque en ese intervalo cubre el intervalo de pHs mayormente utilizados en los procesos industriales, tanto en formulaciones alimenticias como farmacéuticas. La concentración de fenoles totales y actividad antioxidante fue determinada durante 20 días.

5.3.1. Contenido de fenoles totales (TPC)

Los TPC fueron determinados usando el método de Yim et al., 2012, con mínimas modificaciones. La metodología, se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir los ácidos fosfomolibdico y fosfotungstico (reactivo de Folin-Ciocalteu), que en solución alcalina, los ácidos reducidos presentan una coloración azul marino, proporcional a la concentración de compuestos fenólicos. Brevemente, 20 μL del extracto obtenido (muicle) fue mezclado con 100 μL de FRC (500 g/kg). Después de 8 min de reacción a 25°C, fueron adicionados 300 μL de SC (200 g/kg), seguidamente, se adicionó agua desionizada para ajustar el volumen a 2000 μL . La mezcla fue protegida de la luz e incubada a 40°C durante 30 min. Después de reducirse el reactivo FRC, proporcionalmente al contenido de fenoles totales (mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno), se midió la absorbancia a 765 nm en cada una de las muestras. Los valores obtenidos fueron restados del valor obtenido de una muestra blanco. La absorbancia fue determinada utilizando un espectrofotómetro Genesys 2 UV (Spectronic Unicam, Rochester, N.Y. E.U.A.). Los valores de TPC reportados fueron interpolados en una curva de calibración. La curva de calibración fue determinada con un estándar de referencia GAS. La concentración de GAS, utilizada para la curva de calibración durante este trabajo fue entre 80 a 1000 mg/kg ($R^2= 0.999$). Los resultados fueron el promedio de tres mediciones. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por kg (mgGAE/kg).

5.3.2. Inhibición de radical libre ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante contenida en los extractos, fueron cuantificados por la neutralización los iones catiónicos de ABTS^{*+}. La inhibición se basó en la metodología descrita

por Gong et al., 2012 y Ozgen et al., 2012, con mínimas modificaciones. El catión ABTS^{•+} fue preparado mezclando partes iguales de una solución 7 mM de ABTS con PPS 4.9 mM (solución estándar). La concentración final de PPS, después de mezclar la solución de ABTS y PPS fue 2.45 mM, en la mezcla. Para asegurar la formación del radical libre, la mezcla anterior se mantuvo entre 12 y 16 h a 25°C en la oscuridad para permitir la reacción y obtener el catión libre ABTS^{•+}. La solución utilizada de ABTS^{•+} en el análisis, fue obtenida por dilución de la solución estándar con solución amortiguadora de acetato de sodio 20 mM (pH 4.5). La dilución se mantuvo en 0.7 ± 0.01 unidades de absorbancia a 734 nm. La cuantificación de AA se obtuvo mezclando 20 μL de la muestra, diluida apropiadamente con 3000 μL de ABTS^{•+} (absorbancia 0.700), mezclando minuciosamente. La mezcla de reacción se mantuvo a 38°C durante 30 min. Después del proceso de incubación las muestras se enfriaron rápidamente a 25°C y se determinó la absorbancia a 734 nm. La AA en las muestras fue determinada durante un periodo de almacenamiento de 20 días. La corrección de AA fue obtenida determinando la absorbancia de una muestra control, mezclando 20 μL de solución amortiguadora –solución de acetatos- con 3000 μL de ABTS^{•+}. Los resultados reportados, son el promedio de tres ensayos. Los datos fueron reportados como equivalentes de TROLOX (ET, mM). ET fue calculada a partir de la curva de calibración, obtenida en el intervalo de 0.5 a 10 mM de ET respectivamente.

5.3.3. Inhibición de radical libre (DPPH^{•+})

La actividad neutralizante de los extractos de muicle, fueron evaluados usando DPPH^{•+}, como ha sido reportado por Yim et al., 2012. Una solución estándar preparada recientemente de DPPH (0.075 mM) en metanol fue utilizada para determinar la AA. La solución para determinar la AA se obtuvo por dilución de la solución estándar (1+9, v/v) con metanol. La absorbancia de la solución diluida fue 0.8 ± 0.01 . 20 μL de extracto de muicle fueron mezclados con 3800 μL de solución diluida de DPPH^{•+}. La solución anterior fue mezclada vigorosamente e inmediatamente después se mantuvo a 25°C en oscuridad por 30 min. Después, se determinó la absorbancia de las muestras contra una muestra control a 517 nm. El ensayo fue determinado por triplicado. La capacidad neutralizante de los extractos estudiados vs radicales libres de DPPH^{•+} fue determinada mediante el cálculo de la concentración de AA utilizando la curva de calibración de ET, mencionada en la sección 5.3.2.

5.3.4. Degradación de extractos del muicle

Los extractos de muicle, obtenidos con diferentes disolventes y ajustado a diferentes valores de pH: 3.5, 5.5 y 7.4, fueron analizados determinando el TPC durante su almacenamiento a 25°C. La degradación de TPC fue determinada utilizando un modelo cinético de primer orden, ecuación 5.1;

$$\ln[TPC] = \ln[TPC]_n - kt \quad (5.1)$$

Donde: $[TPC]_t$ es el contenido de TPC (mgGAE/kg) a tiempo t (h), $[TPC]_0$ es el contenido inicial TPC en los extractos de muicle y k es la tasa de descomposición (h^{-1}).

El cambio de TPC en el tiempo, proporcionó una descripción de la tasa de cambio con respecto al contenido inicial de TPC. Sin embargo, en muchas situaciones, es deseable, obtener una medida sencilla de la velocidad de reacción. Una medida sencilla es la vida media ($t_{1/2}$), obtenida a partir de los parámetros del modelo de primer orden (Walstra, 2002) como se muestra en la ecuación 5.2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (5.2)$$

$t_{1/2}$ es el tiempo que tarda en disminuir a la mitad, la cantidad de material original debido a reacción (asumiendo que el compuesto en cuestión es el reactante limitante) expresado en días. Intuitivamente, entre más rápida sea la reacción, el tiempo de degradación será mucho menor.

5.3.5. Protección de extracto de muicle (E₅₀25)

El contenido de TPC en los extractos obtenidos mostraron alta concentración inicial. Sin embargo, en los diferentes extractos obtenidos, el TPC no fue estable durante el periodo de estudio. La concentración inicial disminuyó en un 20% en 190 horas. Una manera de retardar dicho proceso de degradación es formando complejos coloidales con GMN y GMP.

La utilización de ambas tuvo dos finalidades; 1) Prolongar la estabilidad de TPC evitando los procesos de degradación y 2) Determinar que la GMP no modifico sus propiedades coloidales, después de eliminar el color. Una forma de probar dicha propiedad, es protegiendo el TPC.

Para la formación de complejos coloidales se utilizó el extracto E₅₀25, debido al mayor rendimiento obtenido en los extractos. Además de la relativa facilidad de eliminar el etanol utilizado en la extracción. Para prolongar la estabilidad del TPC y la formación de complejos coloidales se procedió a purificar la GMN.

5.4. Purificación de goma de mezquite

5.4.1. Preparación de soluciones de biopolímero

Se prepararon soluciones al 15 % p/p, de GMN y GA, en agua desionizada con agitación constante (120 rpm). Las soluciones obtenidas fueron hidratadas durante 12 horas. Después, las soluciones obtenidas fueron filtradas a través de tierra diatomea (0.5 % p/p) y papel filtro Whatman No 1. La concentración en las soluciones (15 % p/p) fueron corregidas utilizando un refractómetro Abbé (Abbé-L, Bausch and Lomb, Rochester, E.U.A.). La GMN fue purificada utilizando las resinas Lw5 y F-66, contenidas en columnas individuales, en un arreglo en serie, utilizando un diseño factorial 3X2. Los parámetros de estudio fueron: pH y temperatura. los niveles mínimos fueron 2.4 y 25°C, niveles medios 4.6 y 42°C y niveles máximos 6.8 y 60°C, respectivamente. Los pH extremos fueron ajustados adicionando la cantidad necesaria de 1.0 N de NaOH o HCl. El diseño factorial se muestra en la tabla 5.1. Todas las soluciones 100 g de muestra con 15 % sólidos totales (p/p) de GMN y GA fueron liofilizadas para determinar los espectrogramas de infrarrojo (FT-IR).

Tabla 5.1: Diseño factorial usado para estimar la remoción de color en GMN

T °C (x ₁)	pH (100 g GMN/100 g solución(x ₂))
25	2.4
42.5	2.4
60	2.4
25	4.6
42.5	4.6
60	4.6
25	6.8
42.5	6.8
60	6.8

5.4.2. Remoción de color en goma de mezquite

La remoción de color fue realizada utilizando la metodología de Reddy et al., 2007 y Seeram et al., 2004. La metodología fue modificada por la utilización de dos columnas empacadas, con dimensiones de 5.2 X 40 cm. Brevemente, 500 g de resina Lw5 y F-66 fueron lavadas por separado con agua desionizada. Después, la resina Lw5 fue pre lavada con 0.5 N de HCl, mientras que F-66 con 0.025 M de HCl en metanol (HCl-Met), durante 2 h, repitiendo el proceso de lavado 3 veces. Finalmente, ambas columnas (dimensiones; 5.2 cm x 40.0 cm, volumen 850 mL; el volumen de trabajo en ambas columnas fue de 630 mL) fueron empacadas con la resina correspondiente e instaladas en serie.

Ambas columnas se estabilizaron con agua desionizada a un flujo de 1 mL/min, durante 12 horas a 25°C. Pevio al proceso de purificación, la temperatura de la columna fue estabilizada utilizando solución refrigerante (10 % de propilenglicol p/p) que recirculó por las chaquetas de éstas de forma continua. La temperatura se controló utilizando un recirculador (Inmersion circulator modelo 730, Cole-Parmer, E.U.A.). Después, una solución al 15 % p/p de GMN (300 mL \pm 5 mL) ajustada a pH correspondiente, fue adicionada en la columna (a temperatura controlada) a flujo de 1 mL/min por medio de una bomba peristáltica (Modelo 7553-70, Cole-Parmer, instrument, E.U.A.). Iniciando con la cromatografía de intercambio iónico con Lw5 y luego por adsorción con F-66. El color fue adsorbido en las resinas, a medida que la solución de goma circula por ambas columnas. Los primeros 50 mL de eluente (solución de GMN diluida) fueron eliminados en cada ensayo. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por medio de refractometría a intervalos de 10 min. Después de agotada la solución de goma en la columna se adicionó agua de forma continua. Las fracciones de goma fueron analizadas por refractometría, la concentración obtenida fue (14.0 a 14.8 °Brix) utilizando una curva de calibración (concentración de GA 0 % a 30 % p/p). Finalmente, las fracciones fueron mezcladas. Las soluciones de GMP obtenidas, fueron utilizadas para determinar la concentración residual de color. La elución de biopolímero en las columnas se realizó con agua (3.5 L). Una solución de ácido clorhídrico 0.1 M HCl-Met (2 x 150 mL) fue utilizada para la reactivación de las columnas. El ácido en exceso fue removido con agua destilada. La solución de GMP obtenida fue utilizada para determinar sus propiedades funcionales, en comparación con GMN y GA. 100 g de GMP con 14.8 % de sólidos totales fue liofilizada para determinar el espectrograma de infrarrojo y determinar los posibles cambios. Por medio de FT-IR, monitoreando los grupos funcionales; amino, hidroxilo y carbonilo.

5.4.3. Cuantificación de color residual en GMP

El color residual en la GMP fue cuantificado por medio de absorbancia utilizando un espectrofotómetro (Genesys II, Illinois, E.U.A.). La metodología se describe en NMX-F-526-1992. Brevemente, la GMP fue diluida con agua desionizada (1.5+3), ajustando la concentración al 5 %, por medio de refractometría, finalmente, se determinó la absorbancia a 420 nm. Se utilizó como referencia soluciones al 5 % de GMN y GA sin tratamiento. El color residual fue determinado utilizando la ecuación 5.3.

$$Color_{residual} = \frac{Abs_{GMN} - Abs_{GMP}}{bc} * 100 \quad (5.3)$$

Donde:

Abs_{GMN} = color en la GMN

Abs_{GMP} = color en la GMP

b = longitud de la celda en cm

c = concentración de sólidos totales en g/cm^3 . Todos los resultados se trataron estadísticamente para determinar la remoción máxima de color.

5.4.4. Espectrogramas de infrarrojo (FT-IR)

En todos los procesos de purificación es de primordial importancia, eliminar por cualquier medio aquellas impurezas o color para estandarizar cualquier aditivo alimenticio. Una forma de verificar que ciertas características de la molécula o grupos de átomos no disminuyeron su intensidad a una frecuencia específica, independientemente de la complejidad estructural, es haciendo uso de la espectroscopia de infrarrojo. En previos trabajos esta técnica ha sido utilizada para determinar la intensidad de diferentes tipos de enlace; C-H, O-H, y N-H (3800 a 2700 cm^{-1}), C=O, C=C, (1900 a 1500 cm^{-1}) y C-C, C-O, C-N (1300 a 800 cm^{-1}), para identificar los posibles cambios en los biopolímeros estudiados (Espinosa-Andrews et al., 2010). En base a lo anterior, se obtuvieron espectrogramas de infrarrojo utilizando muestras liofilizadas de GMP, GMN y GA. La humedad residual fue estandarizada en estufa de vacío (JSVO-60T) a 40°C por 8 horas, hasta peso constante. Los espectrogramas de las muestras fueron obtenidos usando un espectrofotómetro FT-IR GX System (Perkin-Elmer, Shelton, CT, U.S.A.), acoplado a un ATR (DuraSample II accessory). Todos los espectros fueron el promedio de 30 barridos en el intervalo de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos obtenidos se reportan en unidades de absorbancia.

5.5. Cuantificación de grupos ionizables totales

La cuantificación total de grupos disociables se obtuvo de las soluciones de GMP, GMN y GA. La cuantificación de grupos disociables se obtuvo de 50 g de solución al 10% p/p. La neutralización en cada caso fue determinada por el punto de inflexión obtenido de las curvas de titulación potenciométrica. El punto de inflexión se obtuvo por medio de derivación numérica. La cuantificación de grupos disociables totales se obtuvo por mezclado constante de las soluciones individuales, y por adición de 0.1 N de hidróxido de sodio en cada una de las dispersiones de biopolímero. Alícuotas de 0.2 mL de 0.1N NaOH, fueron adicionadas en las soluciones, un retardo de 60 segundos entre

las dosis consecutivas permitió asegurar los valores de pH obtenidos, permitiendo obtener el punto de inflexión preciso. Los resultados fueron obtenidos utilizando un potenciómetro Orión (150 AE, Beverly, E.U.A.).

5.6. Tensión interfacial

5.6.1. Determinación de tensión interfacial

La tensión interfacial fue determinada por el método del anillo Du Nouy con un tensiómetro (Modelo 7053500, CSC Scientific Company, Inc, E.U.A.). Todo el material de vidrio fue lavado con detergente neutro, 15 % de ácido clorhídrico y luego con 15 % de acetona en etanol. El residuo de solventes fue removido con agua desionizada y secado con corriente de aire. La GMP, GMN y GA (liofilizados) fueron dispersados en agua desionizada (2.5 %, 5.0 %, 10.0 %, 15.0 %, 20.0 % y 25 % p/p) e hidratados por 12 horas. Las soluciones acuosas de goma, se filtraron a través de 1 % de tierra diatomea No 549. La precapa fue formada dispersando 1 g de tierra diatomea en agua destilada, vertida en un embudo Buchner, conteniendo el papel filtro Whatman No 1, la solución fue filtrada con ayuda de vacío utilizando una bomba VacuuBrand (ME 2 NT, Wertheim, Alemania). Después de filtrar las soluciones de goma, las concentraciones fueron corregidas por medio de refractometría. La tensión interfacial fue determinada colocando el anillo de Du Nouy (6 mm de diámetro) 5 mm por debajo de la superficie de las dispersiones acuosas de goma (15 mL), contenidas en un recipiente (40 mm de diámetro por 35 mm de altura, el recipiente fue provisto de un dispositivo para controlar la temperatura de las soluciones de goma) después fueron adicionados lentamente 15 mL de aceite mineral. Todas las mediciones fueron realizadas a 25°C y controlada con un recirculador (Modelo DC30-K20, Germany, Thermo Electron), en condiciones de presión atmosférica, como puede observarse en la Figura 5.4. Las mediciones de tensión interfacial fueron corregidas utilizando un factor de 1.002. El valor utilizado fue determinado en base al diámetro del anillo. Además, de las indicaciones establecidas en el manual de referencia del equipo. Cada observación es el promedio de 3 réplicas. El equipo fue calibrado determinando la tensión superficial utilizando agua y etanol a 25°C y 35°C. Los resultados fueron comparados con los valores reportados en el manual de referencia del equipo.

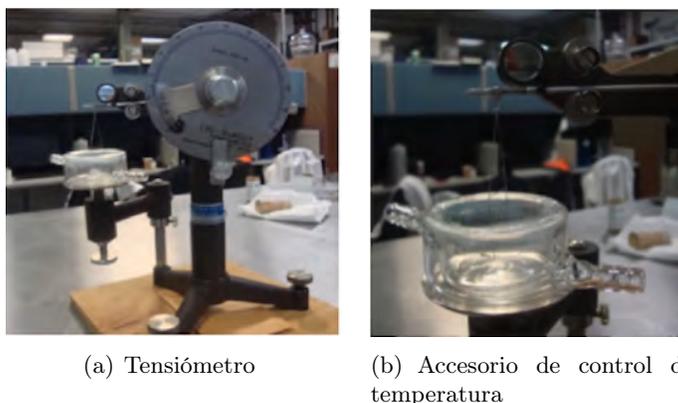


Figura 5.4: Tensiómetro CSC y dispositivo adaptado para controlar temperatura

5.7. Formación de complejos coloidales

En base al mayor contenido de TPC, extraído por los diferentes disolventes, se utilizó el extracto E5025, para la formación de complejos coloidales. El extracto fue concentrado 9 veces para aumentar la concentración de TPC. La reducción de volumen fue realizada por destilación a presión reducida utilizando un rotavapor Büchi (R114, New Castle, E.U.A), obteniendo 10.1 % de sólidos totales. La codificaciones de las muestras fueron establecidas en relación peso/peso, en base a la abreviación de E_{50r} (concentrado con 10.1 % sólidos) y los biopolímeros (GMN y GMP); E_{50r}-GMN₁, 1:1; E_{50r}-GMN_{1,25} 1:1.25, E_{50r}-GMP₁ 1:1; y E_{50r}-GMP_{1,25} 1:1.25. A 50 gramos de E_{50r} se adicionó lentamente la relación establecida de biopolímero (GMN o GMP) en peso, mezclando a 200 rpm (IKA C-mag HS 10, Ika Woks, E.U. A.). Obtenida la mezcla se adicionó la cantidad mínima necesaria de citrato de sodio (500 g/L) ajustando el pH a 6.8. La adición de citrato permitió aumentar la ionización de las gomas. Se continuó mezclando cada una de las muestras a 20°C durante 12 h. Durante el proceso de mezclado todas las muestras fueron protegidas de la luz. Luego, se adicionó una solución de 550 g/L de ácido cítrico para ajustar el pH a 4.8, obteniéndose conjugados moleculares con porcentaje de fenoles totales entre 38 % y 43 % p/p. Los conjugados obtenidos se mantuvieron a 4°C durante 12 horas y finalmente las muestras fueron liofilizadas.

Doce muestras de 10 g de cada una (E_{50r}-GMN₁, 1:1; E_{50r}-GMN_{1,25} 1:1.25; E_{50r}-GMP₁ 1:1; y E_{50r}-GMP_{1,25} 1:1.25) fueron conservados en recipientes de vidrio transparente expuestos a la luz solar indirecta a 25°C. Los fenoles totales fueron analizados como se indica en la sección 5.3.1 durante un periodo de 120 días.

5.7.1. Estabilidad de compuestos fenólicos

En un tubo de ensayo fueron adicionados 5 mL de etanol al 70 % (solución extractora) y 0.6 gramos de muestra (E_{50r} -GMN1, 1:1; E_{50r} -GMN_{1,25} 1:1.25 y E_{50r} -GMP₁ 1:1; E_{50r} -GMP_{1,25} 1:1.25), el contenido en el tubo de ensayo fue mezclado durante 30 s, después la muestra fue centrifugada 0.2 G por 3 min (Hermle 323 K, Edgard High Vacuum International, Inglaterra). Finalmente, las fases fueron separadas por decantación, utilizando papel whatman No.3. La fase etanólica fue utilizada para determinar el TPCL (Concentración de fenoles totales libres). Los sólidos, fueron lavados con solución extractora y finalmente, los lavados fueron descartados, debido a la baja concentración de fenoles totales. Ambas fases, orgánica y sólidos fueron utilizados para determinar el TPC y la AA.

5.7.2. Contenido de fenoles totales en TPC estabilizado

Los sólidos (0.58 g) obtenidos en la sección anterior fueron dispersados en solución amortiguadora 0.05 M de fosfatos pH 7.2. El TPC en los sólidos y en la fase etanólica fueron determinados como se describe en la sección 5.3.1 y calculados con la siguiente ecuación 5.4.

$$TPC_{libre} = Abs_t - Abs_0 \quad (5.4)$$

Donde: Abs_t = absorbancia de la muestra (en los sólidos o en la solución extractora).

Abs_0 = absorbancia de un blanco. Obtenido el valor de absorbancia, se determinó el TPC interpolando el valor de absorbancia en la curva de calibración, previamente establecida (sección 5.3.1).

Los resultados fueron reportados en mg_{GAE}/g muestra. El porcentaje de protección fue determinado como el cociente entre TPC libre y TPC protegido coloidalmente, según la ecuación 5.5.

$$eficiencia = \frac{TPC}{TPC - TPC_{libre}} * 100 \quad (5.5)$$

5.7.3. Actividad antioxidante en complejos coloidales

Los sólidos (0.58 g) fueron dispersados en solución amortiguadora 0.05 M de fosfatos pH 7.2. La AA en los sólidos y en la fase etanólica fueron determinados como se describe en la sección 5.3.2.

5.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias utilizando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. El software SPSS (IBM Co., EUA, 2001) fue utilizado para determinar el nivel de significancia.

Capítulo 6

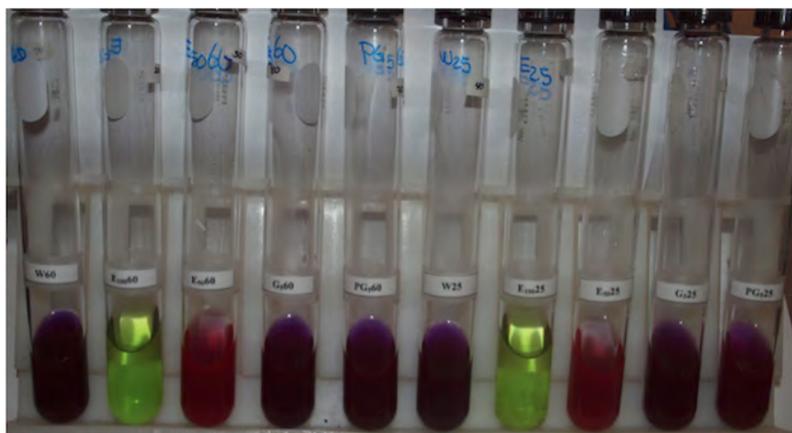
Resultados

6.1. Caracterización de extractos de muicle

Los compuestos fenólicos obtenidos de plantas y frutos son conocidos por actuar como neutralizantes de los radicales libres. Se ha considerado que la actividad antioxidante es función de la presencia de los compuestos fenólicos contenidos en éstas. Muchos antioxidantes, diferentes a la vitamina C, vitamina E, y carotenoides, también se encuentran en la dieta. Donde la actividad antioxidante depende del proceso y el tiempo de almacenamiento. Reduciendo su actividad, debido a reacciones con otros componentes de los alimentos.

6.1.1. Efecto disolvente-extracción sobre el contenido de fenoles totales

A partir de las maceraciones de las hojas de muicle (finamente trituradas) con los diferentes disolventes, se obtuvieron cinco extractos frescos. El análisis de fenoles totales, mostró diferencias en la concentración de TPC en los diferentes extractos. La concentración fue función del tipo de disolvente utilizado, como puede observarse en la figura 6.1.1. Se obtuvieron distintas concentraciones de TPC en función de los disolventes utilizados. La identificación de extractos fue codificada en base al disolvente, porcentaje y temperatura utilizada, las relaciones utilizadas fueron en peso; agua (W25), etanol absoluto (E₁₀₀25), etanol 50 % (E₅₀25), glicerol 5 % (G₅25) y propilenglicol 5 % (PG₅25). La concentración de sólidos totales en los extractos obtenidos varió entre 15.0 y 16.0 g/kg, independientemente del tipo de disolvente utilizado, excepto en el extracto obtenido con etanol al 100 %.



(a) Extractos obtenidos con W25, E₁₀₀25, E₅₀25, G₅25 y PG₅25.

Figura 6.1: La polaridad del disolvente, la concentración de TPC, temperatura de extracción pueden estar relacionados con la intensidad de color y un indicativo de las diferentes moléculas en cada extracto

En base a los resultados obtenidos, mediante la determinación de TPC en cada uno de los extractos de *J. spicigera* frescos (TPC₀), se encontró que el sistema de disolventes usados, tuvo diferente concentración de compuestos fenólicos. La concentración fue superior a 700 mg_{GAE}/kg para todos los disolventes empleados, excepto para E₁₀₀25, el cual, mostró un rendimiento de extracción (TPC) significativamente menor (20 % del valor obtenido con respecto del resto de los extractos), por lo cual fue descartado para ser usado en pruebas posteriores. Los extractos E₅₀25, G₅25 y PG₅25 no presentaron diferencias significativas en TPC₀ ($p < 0.05$), las concentraciones obtenidas fueron $1,018.80 \pm 24.17$ mg_{GAE}/kg, 989.93 ± 18.02 mg_{GAE}/kg y 959.05 ± 18.47 mg_{GAE}/kg, respectivamente. El extracto W25, a pesar de haber mostrado un valor de TPC₀ significativamente menor, que resto de los extractos (917.09 ± 26.46 mg_{GAE}/kg), fue significativamente mayor que el obtenido con E₁₀₀25. Dichas variaciones en TPC₀ pueden deberse a las diferencias de polaridad (δ) en cada uno de los disolventes ensayados: W [$\delta = 82$], por ejemplo, E₅₀ [$\delta = 52.5$], PG₅ [$\delta = 77.6$], G₅ [$\delta = 78.3$] y E₁₀₀ [$\delta = 25$] respectivamente. Siendo E₅₀, PG₅ y G₅, los sistemas con δ intermedia, en los cuales se obtuvo mejor rendimiento de extracción de TPC, comparado con W y E₁₀₀ que se encuentran en los extremos de polaridad ensayada.

La extracción por disolventes, ha sido frecuentemente utilizada para obtener alto rendimiento de antioxidantes, y actividad antioxidante en los extractos. El rendimiento es dependiente de la polaridad del disolvente utilizado. El potencial antioxidante parece estar correlacionado con la polaridad de los disolventes utilizados. La polaridad representa la suma de las fuerzas de interacción entre las moléculas de disolvente y soluto, con cierta capacidad general de solvatación (o poder de solvata-

ción) de los disolventes. Dependiente de la interacción intermolecular, entre los iones o moléculas de soluto y las moléculas de disolvente. Puede decirse, que a mayor solvatación, mayor solubilidad, y que a menor interacción molecular, la solubilidad se reduce. La polaridad es responsable de todas las interacciones intermoleculares entre el disolvente y las moléculas de soluto. La solubilidad mutua entre ambas especies define no sólo la concentración de solutos extraídos, sino además la composición, concentración y propiedades funcionales de los solutos (Reichardt, 1994, Lin y Giusti, 2005). Lo anterior, demuestra que la polaridad es altamente importante en los sistemas de extracción, para la obtención de extractos con altas concentraciones de compuestos fenólicos. Diversos trabajos han demostrado la importancia de utilizar disolventes puros. Basados en su polaridad, para mejorar no sólo el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos, sino, para poder obtener extractos con compuestos de distinta naturaleza, por ejemplo: moléculas glicosiladas (Li, 1994; Ding, 1999; Lin y Giusti, 2005; Uma et al., 2010). Los principales disolventes utilizados incluyen; agua, alcoholes primarios como etanol, metanol y sus mezclas, acetona o acetonitrilo; acetato de etilo. incluyendo soluciones acuosas de éstos, las cuales han demostrado mejorar la eficiencia de extracción comparado con los disolventes puros (Spigno y De Faveri, 2007). Cabe mencionar que, a pesar de los altos rendimientos de extracción, que dichos disolventes pueden suministrar, su uso para consumo humano está restringido, debido a la posible toxicidad asociada con los residuos de éstos. Mientras que el agua, debido a su inocuidad, ha sido ampliamente utilizada como un disolvente para obtener algunos flavonoides glucosilados relativamente puros. Sin embargo, su alta polaridad, hace que sea un disolvente poco efectivo para flavonoides con menor polaridad. Lo anterior, motivó el uso de disolventes que no sólo fueran excelentes medios para la extracción de compuestos fenólicos con alto contenido de TPC de *J. spicigera*, sino también se aumentar la concentración de TPC. La importancia del valor de la polaridad intermedia de disolventes no tóxicos, y seguros para aplicarse en alimentos de consumo humano, fue uno de los objetivos importantes.

6.1.2. Efecto de temperatura-extracción sobre el TPC

Al realizar la extracción de compuestos fenólicos de *J. Spicigera* a 25°C y 60°C, se encontró que los extractos frescos con W, E₅₀ y PG₅ no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). En la tabla 6.1, pueden observarse los valores de TPC, respecto al incremento de la temperatura de extracción a pH de 7.4. El contenido de TPC en los extractos obtenidos con E₁₀₀, el efecto de la temperatura de extracción tuvo un efecto significativo, mejorando el rendimiento de extracción en E₁₀₀60, 3.3 veces el rendimiento obtenido en E₁₀₀25. Este comportamiento es común, en los sistemas de extracción

de compuestos activos. El incremento en la temperatura del disolvente de extracción promueve la solubilidad, y difusión de los compuestos activos, contenidos en el interior de las células vegetales hacia el seno del líquido extractor (Al-Farsi y Lee, 2008), ocurriendo una rápida liberación de dichos compuestos, debido al rompimiento o lixiviación celular (Wang et al., 2007). No obstante, el incremento excesivo en la temperatura puede ser un parámetro poco adecuado para algunos tipos de compuestos activos termosensibles (Moure et al., 2001; Too et al., 2010), ya que podría provocar su degradación y/o interacción con productos como las proteínas constituyentes de los mismos materiales vegetales (Moure et al., 2001; Spigno y De Faveri, 2007).

Tabla 6.1: TPC en extractos de muicle en función solventes y temperatura

Códigos extractos muicle	TPC pH 7.4 (mg GAE/kg)	TPC pH 5.5 (mg GAE/kg)	TPC pH 3.5 (mg GAE)/kg
W	25	917.09 ± 26.46 c,d	849.61 ± 19.54 c
	60	872.77 ± 8.80 c	899.97 ± 21.32 c
E ₁₀₀	25	190.98 ± 6.60 a	193.00 ± 6.98 a
	60	624.02 ± 6.85 b	729.43 ± 25.64 b
E ₅₀	25	1,018.80 ± 24.17 g	976.50 ± 28.63 e,f
	60	977.51 ± 32.88 e,f,g	988.59 ± 18.71 e,f
PG ₅	25	959.05 ± 18.47 d,e,f	1,018.13 ± 26.29 f
	60	963.08 ± 26.76 d,e,f,g	849.61 ± 25.60 c,d
G ₅	25	989.93 ± 18.02 f,g	1,006.72 ± 16.76 e,f
	60	926.15 ± 14.52 c,d,e	952.33 ± 20.12 d,e

Las letras minúsculas en la misma columna representan datos significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Este comportamiento pudo haberse presentado en el extracto obtenido con G560, donde el incremento en la temperatura provocó la disminución significativa en el rendimiento de TPC, comparado con el extracto obtenido a 25°C (Tabla 6.1). El incremento en la temperatura no siempre fue adecuada para todo tipo de compuestos polifenólicos. Cuando los compuestos polifenólicos son térmicamente estables, se puede inferir que la tasa de extracción es mucho mayor que la tasa de descomposición, en determinado intervalo de temperatura (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). La estabilidad de TPC en extractos acuosos, debido al efecto de temperatura también puede estar influenciado por la hidrólisis de las moléculas antioxidantes en solución. Van der Sluis et al., (2005) han sugerido que la estabilidad por efecto de la temperatura en los antioxidantes como la quercitina y sus glicósidos, pueden ser dependientes de la complejidad molecular de los monosacáridos unidos covalentemente a ésta. Por ejemplo, la estabilidad de los siguientes glicósidos decreció en el siguiente orden, quercitina-galactosa \approx quercitina-ramnosa > quercitina-glucosa/rutinosa > quercitina-arabinosa. El

efecto de temperatura hidrolizó los complejos glicosídicos de quercitina, observándose un incremento de la aglicona. Lo anterior, puede ser uno de los fenómenos que se presentaron en los TPC extraídos con W y G₅. La diferente naturaleza del disolvente, puede extraer altas concentraciones de TPC. Sin embargo, aumenta su inestabilidad, y en consecuencia puede observarse una disminución respecto de la concentración inicial. Otra limitante posible, puede ser el método de cuantificación de TPC. Se ha reportado que el método de Folin-Ciocalteu tiene respuesta idéntica cuando se comparan los resultados entre una muestra problema y un estándar. Sin embargo, los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, se oxidan también en presencia de moléculas como las proteínas y taninos (Puede haber cantidades mínimas de estos compuestos). Aunque la extracción se compuestos polifenólicos sea selectiva en productos naturales, donde el tiempo de análisis es crucial (Wrolstad et al., 2003). Sin embargo, es el método más utilizado en comparación con otros, como el de tartrato ferroso. Tiene la desventaja de usar una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.5, pH que no permite el desarrollo de color rápidamente, el tiempo prolongado en el desarrollo de color, puede ser un inconveniente, y obtener resultados poco adecuados, mismos que no mostraron resultados congruentes (los resultados no se muestran).

Se ha demostrado que el tipo de disolvente empleado durante la extracción de compuestos fenólicos, influye en las pruebas de capacidad antioxidante, y están estrechamente correlacionados. Cuando se comparan los resultados de TPC y AA. Los resultados de actividad antioxidante fue la actividad total de los compuestos fenólicos, contenidos en los extractos, fue la suma de todos los componentes contenidos en el extracto. Determinados por la decoloración del radical libre, a través de la reducción del radical catión. A continuación, se describe el efecto de las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos sobre la actividad antioxidante de los extractos.

6.2. Efecto de disolvente e inhibición del radical libre ABTS*+

Existe suficiente evidencia, donde se menciona que los disolventes utilizados en la extracción de compuestos fenólicos, influye en los ensayos de actividad antioxidante, aunque no todos de la misma manera, porque depende de sus propiedad hidrofílica e hidrofóbica. Los ensayos mayormente utilizados para determinar la actividad antioxidante en los compuestos fenólicos han sido ABTS y DPPH, ambos en su forma radical. Los ensayos realizados con ABTS en disolvente polar, ha mostrado mayor valor de actividad antioxidante (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006), mientras que en el caso de DPPH, el uso de disolventes con alta polaridad, parecen reportar resultados más

bajos (Molyneux, 2004). Los resultados de actividad antioxidante, determinada con ABTS fueron mayores que los determinados con DPPH. La actividad antioxidante determinada con ABTS fue mayor en un 41.3 % (Tabla 6.2), con respecto al valor obtenido con DPPH. La disposición del radical libre y su habilidad para reaccionar con los compuestos antioxidantes, disponibles en medio acuoso, parecen depender de la metodología y el nivel de solvatación de los componentes antioxidantes.

La actividad antioxidante inicial fue expresada como equivalentes mM de Trolox (AAET), un término más significativo y descriptivo, en que los ensayos pueden expresar la actividad antioxidante, que aquellos que se han reportado como un porcentaje de la disminución de absorbancia. Los disolventes utilizados durante la extracción de polifenoles tuvieron efecto significativo en la actividad antioxidante, cuantificados con ABTS, donde el color azul-verde es un indicativo de los radicales libres formados de ABTS ($ABTS^{*+}$), sensibles en presencia de antioxidantes contenidos en los extractos. La decoloración de la solución de prueba, después de la adición de muestra indicó que los radicales libres fueron inactivados o reducidos por la presencia de antioxidantes. La actividad antioxidante determinada por $ABTS^{*+}$, y ordenada de mayor a menor valor, contenida en los extractos frescos a pH de 7.4 fue: $W60 \geq PG_525, G_560, PG_560, G_525, E_{50}25 \geq W25 \geq E_{50}60 > E_{100}60$ (Tabla 6.2). La actividad antioxidante contenida en los extractos obtenidos con PG_5, G_5, E_{50} , no tuvieron diferencia significativa.

6.2.1. Efecto de disolvente e inhibición del radical libre $DPPH^{*+}$

El método de DPPH, reportado como un método fácil y rápido, permitió determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Midiendo la disminución de la absorbancia del radical libre en solución metanólica a 515 nm, que desaparece tras la reducción del compuesto radical. El decremento de la absorbancia significó la neutralización del radical $DPPH^{*+}$. El resultado fue un cambio de color púrpura a amarillo, el DPPH fue estabilizado por la aceptación de un átomo de hidrógeno donado por el antioxidante, formando una molécula estable (Juntachote y Berghofer, 2005; Turkmen et al., 2006). La actividad antioxidante contenida en los extractos frescos del muicle de mayor a menor fue el siguiente: $G_560 \geq W60 \geq PG_525, E_{50}25, E_{50}60 > PG_560, G_525, W25 > E_{100}60$ (Tabla 6.2). Las diferencias en AA, mostrados por los ensayos obtenidos con $DPPH^{*+}$ puede ser debido a la naturaleza y tipo de los disolventes utilizados. Los radicales presentes y la polaridad, que pueden afectar la transferencia de electrones, y al mismo átomo de hidrógeno, que son los que determinan las mediciones de AA. Así como la presencia de compuestos no antioxidantes en los extractos, que modificaron el resultado (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006). En términos

prácticos, los resultados mostrados indicaron que los extractos acuosos del muicle contienen diversos compuestos fenólicos, y están directamente relacionados con la compatibilidad del sistema disolvente utilizado. Donde la actividad antioxidante es la suma resultante de los componentes individuales en la reacción. El sustrato y la molécula de radical libre utilizada para el ensayo, ya sea ABTS*⁺ o DPPH*⁺. Finalmente, la actividad antioxidante fue dependiente del tipo de compuestos fenólicos extraídos por los disolventes utilizados, y de la naturaleza de la molécula de prueba (Molyneux, 2004; Pellegrini et al., 1999; Asghar et al., 2008).

Lo anterior, permite inferir que los extractos obtenidos mediante diferentes disolventes con polaridad intermedia, permitieron obtener compuestos antioxidantes considerablemente más eficaces contra los radicales libres, que aquellos con menor polaridad. Lo que puede indicar que el muicle contiene diversos componentes activos. Donde la polaridad de los disolventes utilizados, podrían perturbar la capacidad de solvatación de las moléculas antioxidantes e intervenir en la estimación de la AA.

6.2.2. Efecto de temperatura en actividad antioxidante

La temperatura de extracción tuvo efecto significativo sobre la AA, en los extractos obtenidos con W y E50, determinado por ABTS*⁺ y DPPH*⁺. El cambio de temperatura en el disolvente W, modificó el contenido de AA. Un efecto contrario, ocurrió con E₅₀. El cambio en la temperatura puntual, con los demás disolventes utilizados, no exhibió un efecto significativo en la cuantificación de AA, con excepción de G₅₂₅, que exhibió un aumento en AA (determinado por DPPH*⁺ acorde con el aumento de temperatura (Tabla 6.2).

Tabla 6.2: Actividad antioxidante inicial en extractos de muicle

Código extractos muicle	ABTS pH7.4 (mM AAET)	ABTS pH5.5 (mM AAET)	ABTS pH3.5 (mM AAET)	DPPH pH7.4 (mM AAET)	DPPH pH5.5 (mM AAET)	DPPH pH3.5 (mM AAET)
W	6.29 ± 0.12 c 6.74 ± 0.10 d	5.80 ± 0.13 c 6.34 ± 0.16 e	5.76 ± 0.28 b,c 6.28 ± 0.17 c,d	4.45 ± 0.06 b 5.85 ± 0.18 c,d	5.72 ± 0.05 d,e 5.48 ± 0.05 c,d	4.82 ± 0.13 c,d 4.24 ± 0.04 b
E ₁₀₀	ND 4.33 ± 0.04 a	ND 3.01 ± 0.15 a	ND 2.77 ± 0.19 a	ND 3.52 ± 0.30 a	ND 2.90 ± 0.07 a	ND 3.53 ± 0.11 a
E ₅₀	6.42 ± 0.06 c,d 5.95 ± 0.13 b	4.83 ± 0.10 b 6.10 ± 0.11 c,d,e	5.32 ± 0.64 b 6.19 ± 0.15 b,c,d	5.63 ± 0.15 c 5.52 ± 0.08 c	3.23 ± 0.09 b 5.88 ± 0.07 e	5.03 ± 0.08 d,e 5.46 ± 0.10 g
PG ₅	6.61 ± 0.18 c,d 6.54 ± 0.12 c,d	7.35 ± 0.19 f 6.34 ± 0.18 d,e	5.74 ± 0.16 b,c 7.13 ± 0.13 e	5.74 ± 0.29 c 5.56 ± 0.22 c	6.35 ± 0.13 f 5.43 ± 0.25 c	5.20 ± 0.16 e,f 4.34 ± 0.03 b
G ₅	6.46 ± 0.15 c,d 6.55 ± 0.11 c,d	5.88 ± 0.12 c,d 6.24 ± 0.16 d,e	6.52 ± 0.13 c,d 6.26 ± 0.49 c,d	4.93 ± 0.10 b 6.24 ± 0.22 d	6.62 ± 0.05 g 6.71 ± 0.11 g	5.51 ± 0.05 g 4.58 ± 0.03 c

Las diferentes letras minúsculas en la misma columna representan datos significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) ND = no determinado

Estos cambios podrían deberse al principio de equilibrio, en el que las temperaturas más altas, aumenta la tasa de extracción de compuestos fenólicos, obteniendo una máxima recuperación de éstos, y por lo tanto, mayor contenido de compuestos antioxidantes. No obstante, las temperaturas elevadas pueden no ser adecuadas para todos los tipos de compuestos fenólicos. Liyana-Pathirana y Shahidi (2005) y Spigno y De Faveri (2007), han reportado que muestras, con una mayor proporción de polifenoles térmicamente estables, pueden extraerse bajo temperaturas elevadas. La optimización de temperatura y tiempo, pueden ser parámetros que pueden favorecer la extracción. Coadyuvar en la solubilidad del soluto y la difusión de los mismos. Por lo tanto, a partir de los resultados reportados, se puede deducir que los compuestos fenólicos extraídos de *J. spicigera*, son termoestables, aunque hasta cierto punto, limitado a un intervalo de temperatura estrecho (25°C a 60°C), y que a temperaturas más allá de cierto valor, los compuestos fenólicos pueden reducir su concentración y cuantificación.

6.2.3. Efecto de pH sobre TPC durante el almacenamiento

Los extractos de muicle fueron ajustados a diferentes valores de pH, los cuales causaron mínimas variaciones en el contenido inicial del TPC (Tabla 6.3). Los extractos a diferentes valores de pH (3.5, 5.5 y 7.4) se almacenaron a 25°C. El contenido de TPC en las muestras fue determinado durante 20 días de almacenamiento. La finalidad, fue establecer una base comparativa de la degradación de TPC, relativa de los extractos. Los valores de TPC fueron normalizados graficando la relación del TPC en el tiempo= t y $t = 0$ en función del tiempo de almacenamiento. Por ejemplo, la figura 6.2, muestra el perfil de degradación de los extractos de muicle, obtenidos a 60°C en función del tiempo de almacenamiento y diferentes valores de pH. Un comportamiento similar fue observado para los extractos obtenidos a 25°C (datos no mostrados). Las condiciones de extracción y el pH afectaron la degradación de TPC. La degradación de TPC de menor a mayor, fue a pH 3.5: $E_{10060} < E_{5060} < E_{5025} < W_{25} < W_{60} < PG_{560} < PG_{525} < G_{525} < G_{560}$; a pH 5.5: $E_{5025} < W_{60} < PG_{560} < W_{25} < G_{560} < E_{5060} < PG_{525} < E_{10060}$; y a pH 7.4: $E_{10060} < E_{5025} < W_{60} < E_{5060} < G_{560} < W_{25} < PG_{525} < PG_{560} < G_{525}$ respectivamente.

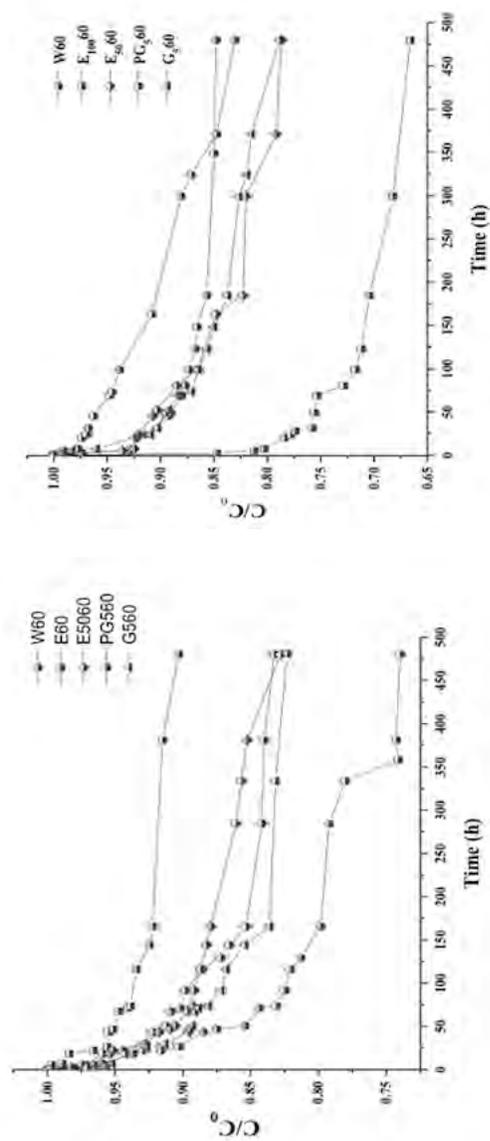
La tasa, a la cual el TPC-tiempo experimental, decrecieron fueron ajustados a varios modelos (datos no mostrados), no obstante, los datos mostrados tuvieron un mejor ajuste (R^2 entre 0.95 y 0.99) en todos los casos a un modelo de primer orden (ecuación 1). El ajuste de los datos experimentales fue realizado en dos procesos individuales, consecutivos con diferentes tipos de cinéticas: (1) Una etapa inicial, caracterizada por un gradiente mayor, inducida por la alta pérdida inicial de TPC, probablemente promovido por las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como el oxígeno disuelto en el disolvente utilizado en la extracción y luz, que reaccionaron con los compuestos fenólicos en un intervalo de tiempo de almacenamiento relativamente corto (de $t = 0$ hasta $t = t_1$, con t_1 variando entre 31.3 a 80.4 h) y (2) una segunda etapa, donde la tasa de degradación es menos pronunciada, es decir, el tiempo de estabilidad de los compuestos fenólicos se mantuvo constante, y evidentemente, la pérdida de los mismos fue menos drástica. Este fenómeno ocurrió (a partir de $t = t_1$ a $t = 480$ h), donde el gradiente de TPC-tiempo fue drásticamente reducido, probablemente, debido a que la mayor parte de los compuestos fenólicos en los extractos interaccionaron con ROS, lo que resulta en una desaceleración de la tasa de pérdida. Un gráfico representativo que muestra ambos comportamientos. Por ejemplo, los gradientes, el relativamente rápido y el lento, puede verse para PG_{525} a pH 3.5, en la figura 6.3, las constantes de velocidad correspondientes al gradiente rápido (k_1) y el relativamente plano (k_2) de TPC-tiempo de degradación se muestran en la Tabla

6.4. La variabilidad numérica observada en las constantes k_1 y k_2 , obtenidas de la observación de los extractos acuosos de muicle, bajo diferentes condiciones de extracción y pH. No permitió establecer un comportamiento generalizado del patrón de degradación en el TPC durante el tiempo de almacenamiento, diferente de la pérdida de TPC que fue importante. No obstante, se calculó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) utilizando los valores de k_1 , porque en este primer gradiente se encontró la mayor degradación del TPC.

Tabla 6.3: TPC cuantificado de extractos de muicle a diferentes condiciones de acidez

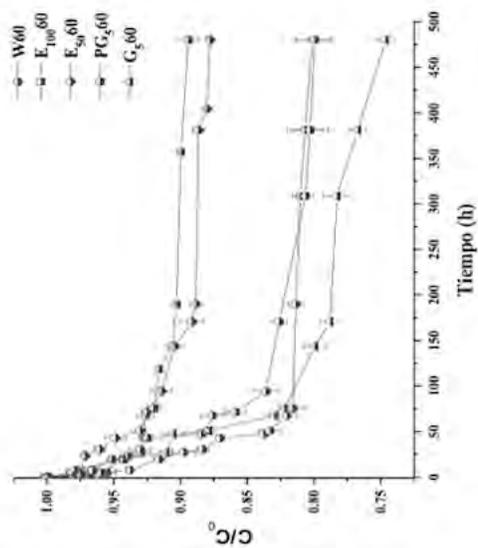
Código extractos muicle		TPC pH 7.4 (mgGAE/kg)	TPC pH 5.5 (mgGAE/kg)	TPC pH 3.5 (mgGAE/kg)
W	25	917.09 ± 26.46 c,d	849.61 ± 19.54 c	865.73 ± 13.81 c
	60	872.77 ± 8.80 c	899.97 ± 21.32 c	885.87 ± 9.58c,d
E ₁₀₀	25	190.98 ± 6.60 a	193.00 ± 6.98 a	196.36 ± 8.35 a
	60	624.02 ± 6.85 b	729.43 ± 25.64 b	608.59 ± 4.54 b
E ₅₀	25	1,018.80 ± 24.17 g	976.50 ± 28.63 e,f	970.46 ± 6.87 f
	60	977.51 ± 32.88 e,f,g	988.59 ± 18.71 e,f	969.79 ± 8.17 f
PG ₅	25	959.05 ± 18.47 d,e,f	1,018.13 ± 26.29 f	914.06 ± 15.98 d,e
	60	963.08 ± 26.76 d,e,f,g	849.61 ± 25.60 c,d	883.85 ± 14.23 c,d
G ₅	25	989.93 ± 18.02 f,g	1,006.72 ± 16.76 e,f	936.22 ± 16.87 e,f
	60	926.15 ± 14.52 c,d,e	952.33 ± 20.12 d,e	968.45 ± 13.81 f

Diferentes letras minúsculas en la misma columna representan datos significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).



(a) pH 7.4

(b) pH 5.5



(c) pH 3.5

Figura 6.2: Efecto de las condiciones de extracción-disolvente, y descomposición del contenido de fenoles totales en los extractos de muile, ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 25°C durante 20 días

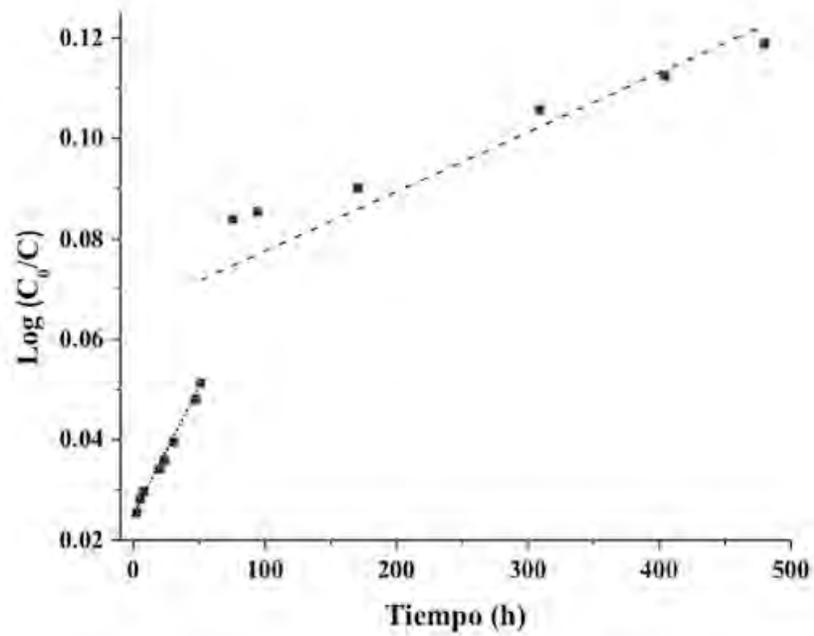


Figura 6.3: Cinética de primer orden, obtenida por descomposición en el contenido de fenoles totales en el extracto PG₅25 a pH 3.5: (■) Datos experimentales; (....) datos ajustados debido a mayor pérdida (k_1); and (---), datos ajustados con la información relativamente ralentizada k_2

Tabla 6.4: Constantes de velocidad para (k_1) y lento (k_2) y tasa de degradación de TPC de extractos de muicle. Ajustados a modelo cinético de primer orden, y valores de $t_{1/2}$ del mayor gradiente encontrado

pH	3.5 k_1 (h ⁻¹)	$t_{(1/2)}$ (días)	5.5 k_1 (h ⁻¹)	$t_{(1/2)}$ (días)	7.4 k_1 (h ⁻¹)	$t_{(1/2)}$ (días)
W25	7.23E-04	39.94	1.20E-03	24.07	5.48E-04	52.70
W60	1.29E-03	22.39	2.16E-03	13.37	4.71E-04	61.32
E ₁₀₀ 60	2.71E-04	106.57	3.66E-03	7.89	4.49E-04	64.32
E ₅₀ 25	7.48E-04	38.61	4.77E-03	6.05	5.04E-04	57.30
E ₅₀ 60	3.78E-04	76.41	1.67E-03	17.29	7.08E-04	40.79
PG ₅ 25	4.98E-04	57.99	4.29E-03	6.73	5.06E-04	57.08
PG ₅ 60	8.77E-04	32.93	1.55E-04	186.33	9.44E-04	30.59
G ₅ 25	1.12E-03	25.79	7.38E-04	39.13	6.56E-04	44.03
G ₅ 60	1.04E-03	27.77	8.46E-04	34.14	6.98E-04	41.38

pH	3.5 k_2 (h ⁻¹)	R ²	5.5 k_2 (h ⁻¹)	R ²	7.4 k_2 (h ⁻¹)	R ²
W25	6.20E-05	0.96	4.88E-04	0.97	1.10E-04	0.99
W60	2.10E-05	0.98	2.07E-04	0.97	1.02E-04	0.99
E ₁₀₀ 60	2.90E-05	0.96	4.77E-04	0.97	4.10E-05	0.97
E ₅₀ 25	7.20E-05	0.97	1.96E-04	0.98	7.40E-06	0.96
E ₅₀ 60	4.70E-05	0.97	5.57E-04	0.96	6.50E-05	0.98
PG ₅ 25	8.90E-05	0.99	3.09E-04	0.98	7.04E-05	0.95
PG ₅ 60	6.60E-05	0.96	1.55E-04	0.99	1.18E-04	0.97
G ₅ 25	6.50E-05	0.94	8.80E-05	0.98	1.72E-04	0.98
G ₅ 60	1.03E-04	0.98	1.01E-04	0.98	9.20E-05	0.94

Las letras minúsculas en la columna representan datos significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

En la tabla 6.4 puede observarse el $t_{1/2}$ de los extractos a diferentes valores de pH. El $t_{1/2}$, es una función del valor inicial de TPC. El TPC en algún $t_{1/2}$ puede ser mayor para un extracto dado, a pesar de tener un valor menor de $t_{1/2}$. Este efecto puede distinguirse claramente a partir de los datos experimentales. Mientras que a mayor tiempo de vida media (186.33 días), mostrado por PG560 a pH 5.5, seguido por E₁₀₀60 (106.57 días) y E₅₀60 (76.41 días), los dos últimos a pH de 3.5, las concentraciones determinadas (TPC) en los instantes $t_{1/2}$ fueron 424.81, 304.30 y 484.90 mgEAG/kg, respectivamente, mientras que los tiempos de vida media más bajos se presentaron por E₂₅ (6.05 días), PG₅25 (6.73 días) y E₁₀₀60 (7.89 días), todos a pH 5.5, y sus concentraciones (TPC) a $t_{1/2}$ fueron de 488.25, 509.07 y 364.72 mgEAG/kg, respectivamente.

6.2.4. Efecto de disolvente en actividad antioxidante inicial

El cambio de pH (7.4 a 3.5 y 5.5) en los extractos frescos de muicle afectaron de diferentemente manera la AA inicial, dependientes del sistema disolvente, y el ensayo usado para determinar la AA (6.2). Debido al bajo rendimiento del TPC, representado por E₁₀₀25, este extracto no fue considerado en los ensayos de AA. Con ABTS, la menor AA inicial ocurrió con E₁₀₀60, independientemente del pH del extracto, mientras que a pH 5.5 se obtuvo la mayor AA inicial, que correspondió a PG₅25, y a pH de 3.5 se obtuvo con el extracto PG₅60, respectivamente. Con el ensayo de DPPH, también se observó que E₁₀₀60 mostró la AA más baja, independientemente del pH del extracto. A pH 5.5, la AA inicial más alta, correspondió a G₅60, mientras que a un pH de 3.5, fue para los extractos obtenidos con G₅25 y E₅₀60, respectivamente. Los resultados obtenidos pueden ser atribuidos a los diferentes grados de hidrolisis adoptadas por los diferentes compuestos fenólicos, como consecuencia del diferente grado de disociación de los grupos OH, inducidos por los cambios de pH en los extractos. Afectando al conjunto de grupos ionizables, que participan en la reacción con las moléculas de radicales libres de ABTS^{*+} y DPPH^{*+}, ocasionando cambios en AA (Akrem et al., 2007; Juntachote y Berghofer, 2005). La tabla 6.5, muestra la degradación de AA determinada en los extractos de muicle, cuantificados durante los 20 días de almacenamiento. La actividad antioxidante cuantificada con ABTS, exhibió la mayor pérdida de actividad antioxidante en E₁₀₀60 a todos los pHs ensayados. No menos significativa, fue la pérdida de AA a pH de 7.4 en los extractos obtenidos con W25 y G₅60. A pH 5.5 ocurrió con W25, G₅60 y E₅₀60, y finalmente, a pH de 3.5 por E₅₀25, E₅₀60, PG₅25 y G₅60. La menor pérdida de AA, determinada con DPPH, ocurrió en los extractos (E100 y E50), mientras que la mayor pérdida fue exhibida en los extractos W60, seguido por W25. Todos estos resultados mostraron disminución de actividad antioxidante, independientemente del valor de pH. Las diferencias en los resultados obtenidos, utilizando los ensayos de ABTS y DPPH, pueden ser debidas a la compatibilidad entre los extractos con los radicales libres, que son de diferente naturaleza química. Ambos métodos son complementarios, y permiten una comprensión global de los factores que afectan la estabilidad y funcionalidad de los extractos del muicle.

Tabla 6.5: Pérdida de actividad antioxidante en extractos de muicle por cambio de pH, después de 20 días de almacenamiento.

Código extractos muicle	ABTS _{pH7,4} (%)	ABTS _{pH5,5} (%)	ABTS _{pH3,5} (%)	DPPH _{pH7,4} (%)	DPPH _{pH5,5} (%)	DPPH _{pH3,5} (%)
W	25 42.75 ± 1.90 a	42.88 ± 2.06 a,b	57.22 ± 4.18 b,c	68.31 ± 2.56 e	66.97 ± 1.60 e	69.60 ± 2.89 e
	60 50.44 ± 1.79 c	59.99 ± 2.66 c	60.65 ± 1.55 c,d	93.16 ± 0.35 f	80.24 ± 0.34 f	82.69 ± 0.51 f
E ₁₀₀	25 ND	ND	ND	ND	ND	ND
	60 87.53 ± 1.20 e	87.69 ± 3.22 d	93.48 ± 3.17 e	23.49 ± 8.22 a	16.68 ± 3.14 a	23.75 ± 2.07 a
E ₅₀	25 54.51 ± 1.40 d	44.41 ± 1.55 b	51.98 ± 6.03 a,b	33.87 ± 9.61 c,d	21.35 ± 3.68 b	28.02 ± 2.29 b,c
	60 49.73 ± 1.86 c	41.81 ± 3.22 a,b	50.22 ± 1.86 a	21.45 ± 5.10 a	16.49 ± 0.91 a	22.14 ± 1.56 a
PG ₅	25 46.42 ± 2.45 b	58.50 ± 2.92 c	51.37 ± 2.03 a	32.29 ± 3.64 b,c,d	22.34 ± 1.85 b	28.34 ± 3.02 c
	60 48.92 ± 1.90 b,c	61.34 ± 1.76 c	64.64 ± 3.42 d	39.31 ± 5.76 d	31.21 ± 2.96 c	33.42 ± 2.12 d
G ₅	25 46.88 ± 1.42 b	59.57 ± 1.32 c	65.58 ± 1.03 d	29.05 ± 2.05 a,b,c	36.62 ± 1.89 d	37.02 ± 0.74 d
	60 42.61 ± 2.21 a	40.16 ± 2.83 a	48.26 ± 6.07 a	24.16 ± 7.19 a,b	24.22 ± 0.72 b	24.11 ± 5.17 a,b

Las letras minúsculas en la columna representan datos significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

6.3. Purificación de goma de mezquite

6.3.1. Purificación de GMN

El método de remoción de color utilizando resina (amberlita), ha reemplazado los métodos tradicionales, como el tratamiento con carbón activado, debido a mayor eficiencia. Absorben fácilmente los contaminantes que imparten color, en muchos productos de interés industrial, y la goma de mezquite, no es la excepción. El proceso de purificación, permitió remover entre 69.7% y 81.1% de color en la GMN en un tiempo promedio de 2 horas, a un flujo de 1.5 mL/min, con respecto al color inicial. La cantidad de color inicial fue cuantificada en unidades ICUMSA. Las unidades de color en goma de mezquite sin tratamiento fue $52,426.8 \pm 276.0$, y el valor obtenido para la GA fue 198.3 ± 2.6 unidades. Los resultados obtenidos después del tratamiento cromatográfico se exponen en la Tabla 6.6 y Figura 6.4. La temperatura no tuvo efecto significativo en la remoción de color entre 25°C y 42°C a pH de 4.6 (pH natural de la goma), un efecto contrario se observó cuando la temperatura fue 60°C, se removió 12.1% más de color, con respecto a las anteriores temperaturas. El efecto de temperatura puede ser explicado en función de los siguientes los factores; (1) la complejidad molecular, no permitió eliminar en su totalidad el color de GMN, observándose soluciones ligeramente coloridas después del proceso de purificación, (2) no fue posible exponer todas de las moléculas que imparten color en GMN y, en consecuencia no pudieron ser adsorbidas por las resinas utilizadas; (3) la remoción de color por efecto de temperatura, puede deberse a la disminución de viscosidad. La disminución de viscosidad, permitió mayor difusión entre la solución y resinas de intercambio. Aumentando la tasa de remoción de color, y (4) aumento de la tasa de adsorción dentro de las cavidades de las resinas utilizadas. A mayor temperatura, menor viscosidad aparente en la dispersión de GMN, y mayor adsorción de color. La viscosidad es una función de la temperatura (Marcotte et al., 2001). No obstante, temperaturas extremas pueden reducir el tiempo de vida útil de las resinas Lw5 y F-66 en los procesos de purificación (Soto et al., 2011; Qiu et al., 2007; Scordino et al., 2003; Kammerer et al., 2005). Además de modificar las propiedades funcionales de la goma de mezquite. El efecto de remoción de color debido a la modificación de pH puede explicarse en tres etapas: Donde el biopolímero nativo fue sometido a condiciones ácidas (pH 2.4), pH nativo (4.6) y pH ligeramente ácidos (pH 6.8). En condiciones ácidas, la cantidad de color residual en goma de mezquite fue mayor que en condiciones ligeramente ácidas. La cantidad de color residual, fue menor cuando el biopolímero se mantuvo en condiciones cercanas a la neutralidad. En términos prácticos, la cantidad de color removido por amberlita, es menor cuando el biopolímero se encuentra disper-

sado en condiciones ácidas, mientras que, a condiciones casi neutras la cantidad de color adsorbido es mayor. La misma tendencia puede observarse en los dos bloques de resultados, es decir, cuando se mantiene el intervalo de pH, y se modifica la temperatura. Observándose que la mayor adsorción de color en forma decreciente fue a $\text{pH}_{6,8}60^{\circ}\text{C} > \text{pH}_{6,8}25^{\circ}\text{C} \geq \text{pH}_{4,6}60^{\circ}\text{C}$. Las diferencias en la concentración residual de color en goma de mezquite, puede ser explicado en términos de la neutralización de los grupos reactivos, principalmente, grupos $-\text{COO}^{*-}$. La ionización de los grupos reactivos en la goma de mezquite, exhiben entre sus muchas propiedades, alta disociación en medio acuoso (Pasika, 1977), además de su reducción de viscosidad. La alta solvatación y ionización, pueden ser dos propiedades químicas que permitieron la separación de color en la goma de mezquite. Previa investigación, han demostrado la factibilidad de eliminar concentraciones entre 38% a 30% de “taninos” respecto de la concentración inicial, utilizando procesos de ultrafiltración-diafiltración. Sin embargo, el proceso de separación, no fue eficiente (Goycoolea, et al., 1998).

Tabla 6.6: Unidades de color utilizando Lw5 y F-66

T °C	pH	Unidades ICUMSA
25	2.4	15,888.83 ± 184.42 e
	4.6	12,371.24 ± 234.06 c
	6.8	10,735.80 ± 203.21 b
42	2.4	13,294.41 ± 310.10 d
	4.6	12,892.51 ± 240.34 c,d
	6.8	12,534.39 ± 309.32 c
60	2.4	12,685.60 ± 308.09 c
	4.6	11,101.89 ± 120.17 b
	6.8	9,892.22 ± 184.48 a

Las letras minúsculas en la columna representan datos significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

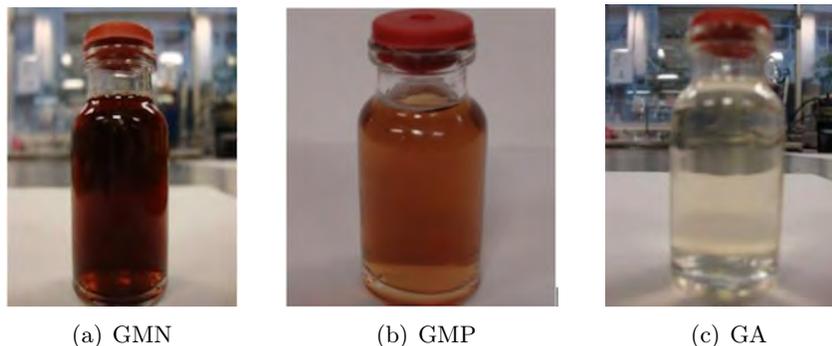


Figura 6.4: Remoción de color en a, b comparado con (c), en dispersiones al 15% p/p

6.4. Espectrogramas de FT-IR obtenidos de GMP y GMN

6.4.1. FT-IR

Existe suficiente evidencia que la GMN es una macromolécula extremadamente compleja (Anderson y Weiping, 1989; Anderson et al., 1985; Cuneen y Smith, 1948a; Cuneen y Smith, 1948b), y por lo tanto, obtener una respuesta del nivel de modificación durante el proceso de purificación, debido a la remoción de color, resulta altamente complejo. Sin embargo, utilizando la ventaja de tal complejidad, La técnica de FT-IR es una herramienta útil para comparar el efecto de purificación con respecto a una muestra sin purificar. La comparación de pico a pico o banda a banda, permitió y evidenciar las modificaciones posibles. En base a lo anterior, fueron determinados los espectrogramas de FT-IR para evidenciar los cambios posibles en GMN, GMP y GA.

Los espectros de FT-IR obtenidos de las muestras de GMN, GMP y GA fueron analizadas en fase sólida con el fin de eliminar la absorción del agua, especialmente donde los grupos $-\text{COO}^-$ ($1,500-1,800\text{ cm}^{-1}$), y $-\text{OH}^-$ ($2,800-3,800\text{ cm}^{-1}$) tienen fuerte absorción (Cui et al., 2007), además de la región $1,000$ a $2,000\text{ cm}^{-1}$, donde las bandas de absorción pueden ser utilizadas para identificar ácido glucurónico (Monsoor et al., 2001). Las muestras estudiadas mostraron espectros de absorción idénticos, como puede observarse en la Figura 6.5. No se observó diferencia significativa entre GMN y GMP, y tampoco con GA, como muestra control. El espectro de absorción de GMN mostró una banda de absorción amplia entre $3,000-3,307\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a $-\text{O}-\text{H}$, coincidente en los tres biopolímeros estudiados, si bien, ambos picos son idénticos, los valores de área bajo la curva decrecen en el siguiente orden, $\text{GMN} \approx \text{GMP} > \text{GA}$. Esta banda es extendida debido a superposición con los grupos $-\text{NH}$, con mayor valor de absorbancia para GMN y GMP, que para GA. Puede observarse una banda de menor intensidad a 2904 cm^{-1} correspondiente a enlace de vibración de $-\text{C}-\text{H}$, con menor magnitud para GA y comparativamente del doble para GMN y GMP. Las muestras de mezquite, mostraron bandas de absorción a 1601 cm^{-1} y 1417 cm^{-1} , debido a vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de la sal del ácido carboxílico. Además de las señales de energía vibratoria a 1252 cm^{-1} y 1014 cm^{-1} (enlace $-\text{C}-\text{O}-$) comparables con GA. Resultados, que concuerdan con los estimados por Espinosa-Andrews y Cui. Puede inferirse, que en el proceso de purificación de GMN, no modificó la estructura fundamental de GM, y por tanto, podría conservar sus propiedades funcionales.

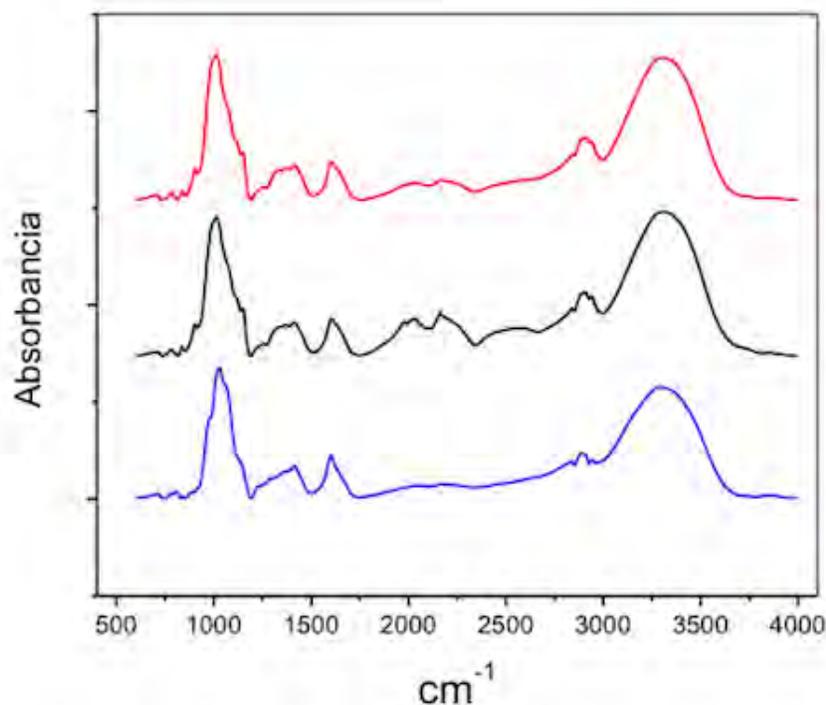


Figura 6.5: Espectros de —GMN, —GMP y —GA, purificados y liofilizados

6.5. Tensión interfacial

Un líquido existe como tal, debido a las fuerzas intermoleculares (fuerzas de van der Waals) atractivas o cohesivas que mantienen entre si las moléculas. Las fuerzas intermoleculares permiten a los líquidos a mantenerse unidos. Por lo tanto, una manera de disminuir esa energía y lograr la dispersión de fases inmiscibles, es por medio de la adición de sustancias que permitan la disminución de la tensión interfacial. Una propiedad de la GMN y GA. Pueden adsorberse en la interfase y disminuir la tensión interfacial

6.5.1. Decremento de la tensión interfacial en GMN y GMP

Entre las propiedades físico-químicas de la GA y la GMN, es que son emulsionantes, propiedad utilizada para estabilizar las emulsiones. Estas modifican el comportamiento hidrófobo de las fases aceite/agua, reduciendo la tensión interfacial de las gotitas de aceite en el medio acuoso. Esta propiedad, es de interés para las aplicaciones tecnológicas, en la formulación y en estabilidad de productos alimenticios, logrando mantener la calidad y valor nutricional de los mismos (McClements y Rao, 2011).

El cambio de tensión interfacial, entre el aceite mineral NF-85 y el biopolímero GMN fue dependiente del tiempo y del incremento de concentración de GMN. La mayor disminución de tensión interfacial se observó en el intervalo de concentración de 2.5 % a 15 % de GMN. Mientras a concentraciones entre 15 % y 25 % de GMN, las mediciones de tensión interfacial, no mostraron cambios significativos. A pesar de aumentar drásticamente la concentración de GMN. Las mediciones de tensión interfacial mostraron cambios rápidos en las primeras 10 h, después de ese tiempo, los cambios fueron menos pronunciados. Manteniéndose constantes en el intervalo de tiempo de 10 a 65 horas de prueba. En la Figura 6.6a pueden observarse los decrementos de tensión interfacial en función del tiempo, hasta aproximarse a un valor de equilibrio. En la fase inicial, la tensión interfacial se redujo rápidamente, probablemente, debido a las interacciones instantáneas entre los componentes del aceite mineral, y los componentes que constituyen la molécula de GMN en la interfase. La disminución de la tensión interfacial, puede estar relacionada con las interacciones hidrofóbicas entre ambos sistemas. Donde las moléculas hidrofóbicas, de aceite mineral son rodeadas por un fragmento o cadena de la GMN, formando una película interfacial, dependiente de la concentración de goma utilizada. La tensión interfacial alcanza un equilibrio, donde la velocidad de adsorción de las moléculas hidrofóbicas en la interfase, es igual a la desorción de las mismas. El equilibrio alcanzado, puede ser un valor indicativo en el cual, la concentración de goma GMN, sea la cantidad mínima necesaria para establecer un equilibrio entre las fases estudiadas. De forma idéntica, disminuye la tensión interfacial en el sistema aceite mineral NF-85 y GMP (Figura 6.6b). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados utilizando este tipo de polielectrolitos (Rana et al., 2002; Castellani et al., 2010; Dickinson et al., 1989; Dickinson et al., 1988).

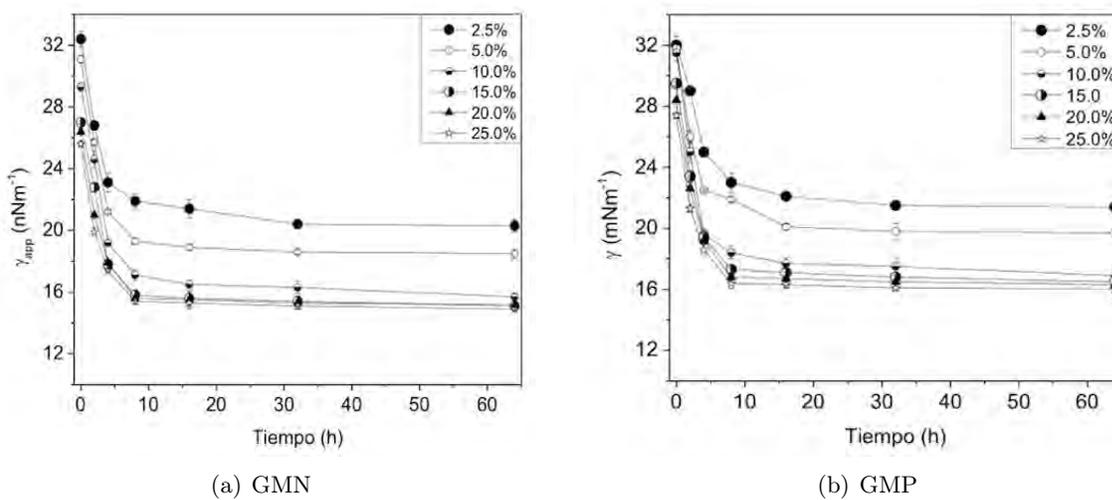


Figura 6.6: Decremento de tensión interfacial en función del tiempo utilizando diferentes concentraciones de goma y aceite mineral NF-85

6.6. Cuantificación de grupos ionizables totales

6.6.1. Grupos ionizables en polielectrolitos

La cuantificación de grupos ionizables totales, permitió comparar los resultados obtenidos entre GMN, GMP y GA. Los posibles cambios por efecto de purificación, fue determinado por punto de neutralización de los grupos funcionales totales en GMN, GMP y GA en solución. El punto de neutralidad, fue determinado en el punto de inflexión de las curvas de titulación de GMN, GMP y GA (Figura 6.7). La adición de concentraciones estándar de NaOH, produce cationes de sodio (Na^{+1}) y aniones (OH^{-1}) que en solución reaccionan con los macro-iones y iones disociados de GMN, GMP y GA. Posiblemente, los grupos R-COO^{-} y NH_3 . La adición consecutiva y continua de NaOH, permitió la neutralización de los grupos ionizables contenidos en GMN, GMP y GA. Soluciones (5 g/ 50 g solución), mostraron diferentes puntos de equivalencia. En función de la concentración de solución estándar de 0.1 N de NaOH adicionada. Los puntos de equivalencia obtenidos en orden descendente fueron; GMP (0.49)>GMN (0.33)>GA (0.28). GMP tuvo mayor concentración de grupos ionizables totales en comparación con GMN. La menor cuantificación de grupos ionizables totales se obtuvo con GA. La alta solubilidad de GMN y GMP, se convierten en macromoléculas sensibles a cualquier alteración de pH. Esta disociación, permitió la cuantificación de los grupos ionizables totales (ácidos, básicos, y/o anfipróticos) que componen la estructura de los polielectrolitos. Cuantificables por adición de soluciones ácidas o alcalinas estándar. Una forma de determinar el punto de equivalencia de una concentración finita de polielectrolitos en solución, es por medio de su punto de inflexión a través de las curvas de titulación (Oosawa, 1971; Pasika, 1977, Espinosa-Andrews et al., 2010).

6.7. Estabilización de E₅₀25 utilizando GMN y GMP

6.7.1. Protección del extracto E₅₀25

La concentración relativa de TPC, y actividad antioxidante fue afectada por las condiciones de extracción, pH y temperatura. El decremento de TPC durante el almacenamiento disminuyó drásticamente. Lo anterior demuestra que la concentración relativa de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante no pueden mantenerse por si solos, y menos aún, durante tiempos prolongados de almacenamiento.

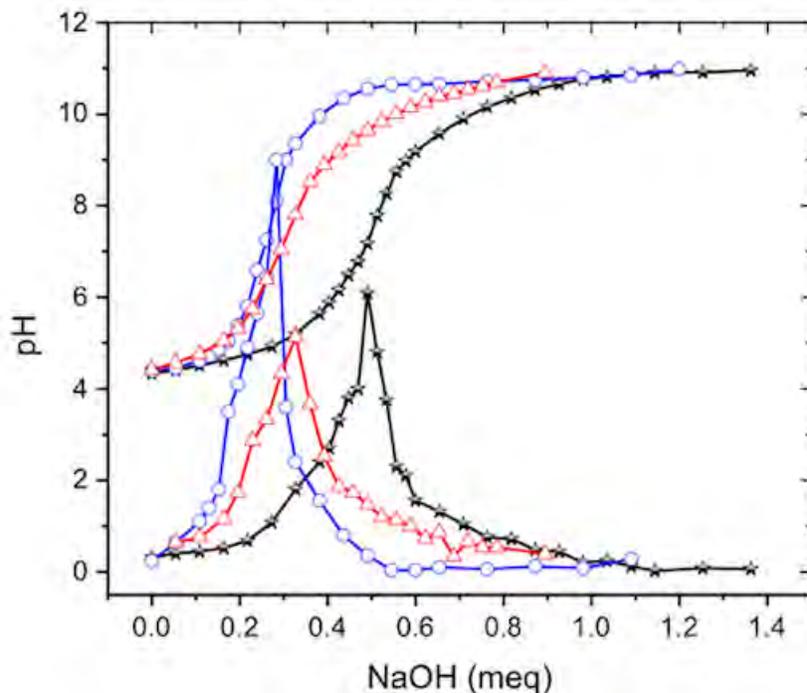


Figura 6.7: Neutralización de los grupos ionizables totales en —GMN, —GMP, y —GA. Las curvas sigmoideas corresponden a la neutralización de los grupos ionizables totales y las curvas en forma de pico son las respectivas derivadas correspondientes a cada biopolímero

De ahí que, la prolongación de estabilidad de estos compuestos, requiera de la adición de sistemas protectores coloidales, mediante una técnica. Entre los procesos utilizados para la estabilización de compuestos bioactivos, pueden mencionarse; la extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, liposomas, y conjugación macromolecular (protección coloidal). Esta última es una técnica sencilla y útil, para obtener productos en polvo altamente solubles, utilizando GMN y GMP.

6.7.2. Compuestos fenólicos estabilizados con GMN y GMP

El contenido de fenoles totales en el extracto concentrado fue determinado como se describe en la sección de materiales y métodos. El contenido de TPC fue 1,816.50 mgGAE/g de muestra seca. Después de formar los complejos coloidales, el contenido de fenoles totales iniciales (TPC_i) en orden descendente en mgGAE/g polvo seco fueron; $E50_r\text{-GMP}_{1,25}$ (968.2) > $E50_r\text{-GMN}_{1,25}$ (967.0) > $E50_r\text{-GMP}_1$ (964.5) > $E50_r\text{-GMN}_1$ (964.0), figura 6.8. La concentración de fenoles totales libres (TPC_L) en gEAG/100 g polvo fueron; 29.05, 38.7, 67.5, y 77.1 mgGAE/g polvo seco, respectivamente. Debido a la baja concentración de TPC_L en el sobrenadante analizado, se descartaron durante la prueba de estabilidad. No se observó diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de TPC, durante el

ensayo de 30 días para E50_r-GMP(1:1.25) y E50_r-GMN (1:1.25), el decaimiento de fenoles totales fue $2.5 \times 10^{-4} \text{ días}^{-1}$ y $1.9 \times 10^{-4} \text{ días}^{-1}$, respectivamente. Un comportamiento similar, fue observado en el complejo coloidal estabilizado con E50_r-GMP(1:1) y E50_r-GMN (1:1), la disminución en el contenido de TPC fue del mismo orden ($5 \times 10^{-4} \text{ días}^{-1}$) (Fig 6.8). En todas las muestras evaluadas, la degradación de compuestos fenólicos, estabilizados con GMN y GMP, parecen seguir el modelo cinético de primer orden. Modelo que se aplicó para determinar las constantes de degradación de TPC. La muestra estabilizada con una relación E50_r-GMP (1:1.25), exhibió menor tasa de degradación, que aquella estabilizada con E50_r-GMP (1:1). Mientras que, la relación de compuestos fenólicos-material protector (1:1) como en E50_r-GMP₁, y E50_r-GMN₁, dicha estabilidad se redujo prácticamente, en un orden de magnitud. La estabilidad de TPC puede ser explicada en base a sales, oxígeno, temperatura y luz. Se ha reportado que las sales tienen efectos negativos en la estabilidad de los compuestos fenólicos como en las antocianinas (de Rosso et al., 2007). A pesar de que GM actúa como protector coloidal (Glicksman, 1982, Vernon-Carter et al., 1998; Alfrén et al., 2012, Román-Guerrero et al., 2009). Estos mismos efectos han sido reportados para la GA, que tiene la habilidad de formar matrices capaces de reducir el intercambio de oxígeno ambiental, hacia el núcleo donde se encuentran los compuestos lábiles (Thevenet, 1988; Cilek et al., 2012). Debido a que no se realizó ninguna prueba del efecto de temperatura, no puede concluirse al respecto. Sin embargo, se ha reportado que la luz tiene un efecto importante de degradación sobre este tipo de compuestos fenólicos (de Rosso et al., 2007; Cisse et al., 2009). La goma de mezquite, puede ser una manera de proteger los compuestos fenólicos, obtenidos del muicle. La concentración de fenoles totales, utilizando relaciones de 1:1.25 (E50_r-GMP_{1,25}, y E50_r-GMN_{1,25}) fue de 97.1 % y 96.2 % respectivamente. Mientras que la eficiencia de protección coloidal con las relaciones de 1:1 (E50_r-GMP₁, y E50_r-GMN₁) fue de 93.5 % y 92.6 % en cada caso.

6.7.3. Actividad antioxidante en muestras estabilizadas con GMN y GMP

La actividad antioxidante inicial en los complejos preparados fue 6.1 mM equivalente a Trolox. Los complejos fueron preparados con GMP y GMN (E50_r-GMP_{1,25}, E50_r-GMN_{1,25}, E50_r-GMP₁, y E50_r-GMN₁).

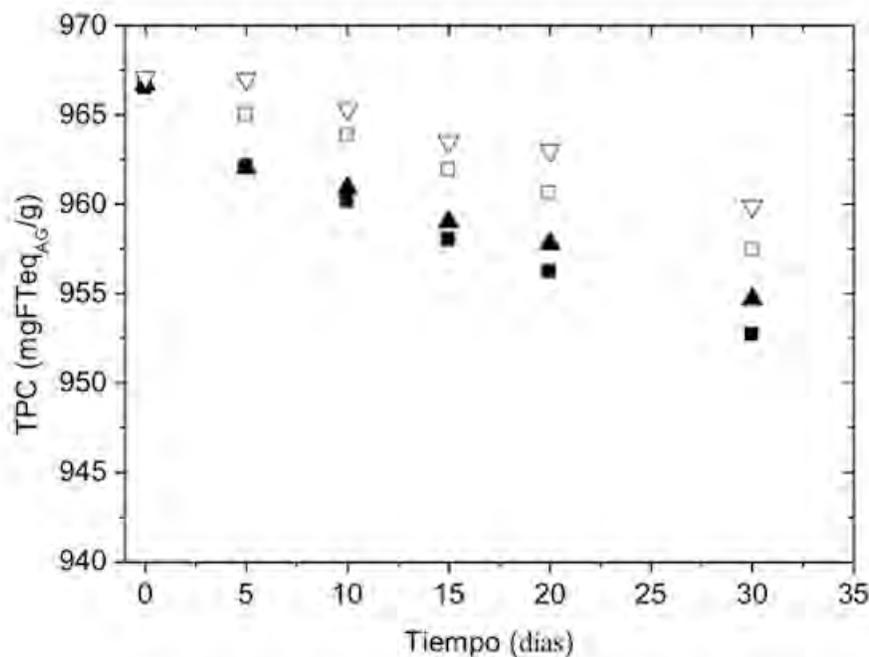


Figura 6.8: Efecto de GMN y GMP en la protección de los compuestos fenólicos obtenidos del muicle, E50_r-GMN₁ (■ ■), E50_r-GMN_{1,25} (□ □), E50_r-GMP₁ (▲ ▲) y E50_r-GMP_{1,25} (▽ ▽)

La actividad antioxidante fue monitoreada durante 30 días (Figura 6.9), a 25°C, colocados en recipientes de vidrio transparentes. La cuantificación de actividad antioxidante, monitoreada en las relaciones de E50_r-GMN_{1,25}, y E50_r-GMP_{1,25}, no mostraron diferencia significativa durante los primeros 15 días de almacenamiento. La tasa de degradación global determinada fue 4.6X10⁻³ y 2X10⁻⁴ días⁻¹, respectivamente. Relaciones de extracto concentrado-goma de mezquite, relación 1:1 (E50_r-GMN_{1,25} y E50_r-GMP₁), exhibieron tasas de degradación 1.2X10⁻² y 1.5X10⁻² días⁻¹, respectivamente. La actividad antioxidante en forma descendente fue: E50_r-GMP_{1,25} > E50_r-GMN_{1,25} > E50_r-GMP₁ > E50_r-GMN₁. Se ha reportado que la degradación de compuestos fenólicos, entre ellos, las antocianinas, son afectados por la luz, sales y pH ocasionando la pérdida de actividad antioxidante (Der Sluis et al., 2005; de Rosso et al., 2007; Cisse et al., 2009). El control de las condiciones del medio ambiente como temperatura, actividad de agua, pH y particularmente, la efectividad del material protector, juegan un papel determinante en la prolongación del tiempo de vida media (Bakowska-Barczak y Kolodziejczyk, 2011; Pavón-García et al., 2011; García-Márquez et al., 2012) de los compuestos fenólicos. Una proporción adecuada de material protector coloidal, puede disminuir los efectos oxidantes, y en consecuencia, prolongar los efectos antioxidantes en los complejos estabilizados. Menor concentración de material protector ocasionará mayor sensibilidad

de los compuestos bioactivos a degradarse.

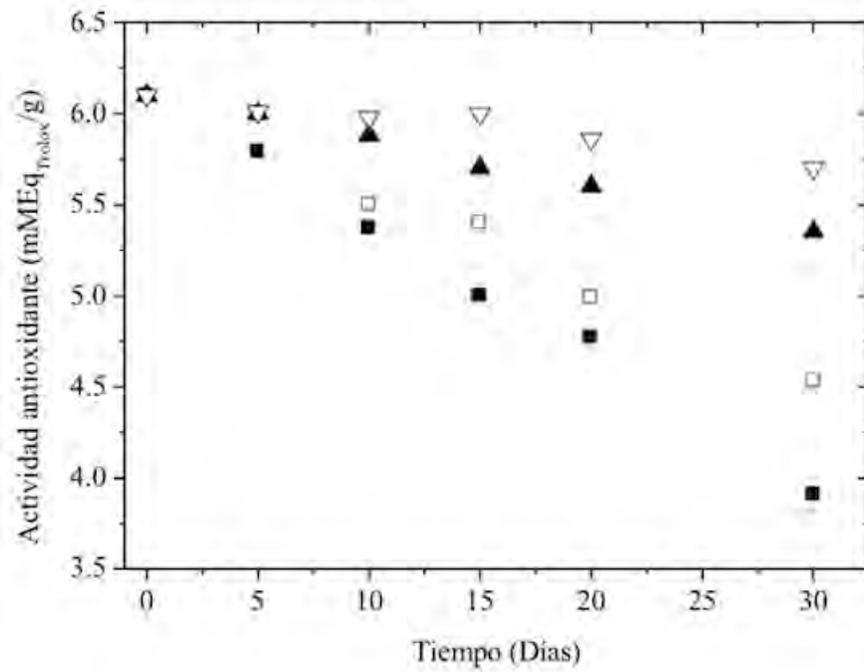


Figura 6.9: Efecto de GMN y GMP en la protección de los compuestos fenólicos obtenidos del muicle, E50_r-GMN₁ (■ ■), E50_r-GMN_{1,25} (□ □), E50_r-GMP₁ (▲ ▲) y E50_r-GMP_{1,25} (▽ ▽)

Capítulo 7

Conclusión

Los resultados indican que la extracción selectiva por medio de disolventes apropiados, afecta significativamente el contenido inicial de fenoles totales, y la actividad antioxidante de los extractos de muicle. Los factores como la temperatura, pH y polaridad, también afectan el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos con el tiempo de almacenamiento. Los extractos obtenidos por medio de disolventes con alta polaridad, tuvieron mayor actividad antioxidante, que aquellos obtenidos con disolventes de menor polaridad. Estos resultados indican que la extracción selectiva de compuestos antioxidantes de fuentes botánicas, por disolventes apropiados, y métodos adecuados, son importantes para obtener alta cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Puede establecerse que, la importancia de emplear disolventes adecuados y temperatura son condiciones de extracción. Para obtener extractos de *Justicia spicigera* con alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, y para minimizar su degradación con el tiempo de almacenamiento a pH's específicos. Esta información puede contribuir en la obtención de mayor rendimiento en el extracto con aplicaciones practicas.

El proceso de purificación implementado, utilizando resinas permitió separar de forma selectiva sustancias que imparten color. El efecto de la temperatura, en el intervalo de 25°C a 42°C, no tuvo un efecto importante a pH de 4.6 unidades. El pH afectó significativamente la eliminación de color. El proceso de eliminación de color propuesto, puede ser una tecnología útil como un medio para eliminar los compuestos que imparten color en las soluciones de la goma de mezquite. El análisis de color por medio espectrofotométrico, indicó que el 82 % del total de color de la cantidad total originalmente presentes fueron eliminados. El uso de cromatografía en columna utilizando resinas mostraron alta eficiencia en la eliminación de color. El sistema es complejo y complicado para una

descripción cuantitativa acerca de los componentes que imparten color en las soluciones de goma de mezquite. Sin embargo, la comparación de la absorbancia de las soluciones acuosas iniciales y las absorbancias de las soluciones obtenidas, mostraron que las resinas son capaces de retener a las sustancias que imparten color. El complejo de especies que imparten color y absorbidas en el seno de la resina, fue posible desorber con soluciones con baja polaridad. Los ensayos de FT-IR, mostraron que el proceso de purificación no modificó la estructura de la goma de mezquite nativa. Los ensayos de tensión interfacial, no mostraron diferencia significativa entre la GMN y GMP. La cuantificación de grupos ionizables totales, mostró que el proceso de purificación permitió aumentar en 48 % la concentración de grupos ionizables, en comparación con la goma de mezquite nativa. Los ensayos de FT-IR, tensión interfacial, y cuantificación total de grupos ionizables totales, fueron un indicativo importante que corroboró que el proceso de purificación no modificó la estructura de GMN. La concentración de fenoles totales y actividad antioxidante, inicialmente estabilizados por medio de protección coloidal no mostró degradación de los principios activos durante el tiempo de almacenamiento. El extracto concentrado (10.1 % de sólidos totales) estabilizado con GMN y GMP en una relación de 1:1.25 mostró la menor variación de los componentes fenólicos estabilizados. Los datos obtenidos, permitieron demostrar que el proceso de purificación no modificó la propiedad funcional de la GMP como protector coloidal.

Capítulo 8

Prospectivas

A partir de las observaciones obtenidas durante este trabajo, han surgido varias preguntas que no pudieron ser abordadas por falta de tiempo y, por lo tanto, quedan a modo de planes para solucionarse en el futuro.

1. Hasta la fecha se han realizado diversos estudios respecto de los procesos de extracción, con diferentes solventes, pero existe cierta controversia al respecto, puesto que la metodología para obtener compuestos fenólicos no puede ser única. Los procesos de extracción con disolventes han demostrado que el incremento de compuestos fenólicos estuvo ligado a la polaridad de los disolventes utilizados. Por lo tanto, es necesario optimizar los procesos de extracción modificando la combinación polaridad-disolvente para maximizar la extracción de compuestos fenólicos.
2. Los estudios previos acerca de los compuestos fenólicos contenidos en el muicle, han sido insuficientes, y probablemente debido a la complejidad e inestabilidad de los mismos. No obstante, la alta actividad fenólica y antioxidante de los extractos obtenidos, hace intuir que el muicle contiene otros compuestos, quizá fenólicos que hasta ahora no han sido determinados. Las nuevas tecnologías de extracción podrían mostrar nuevos resultados, sobre todo, acerca de los componentes con actividad anticonvulsiva.
3. La alta sensibilidad y reactividad de los compuestos fenólicos pudo ser estabilizada por medio de protección coloidal, demostrando, además que fue factible reducir los procesos de degradación, pero el producto obtenido no ha sido adicionado a sistemas alimenticios, por lo tanto, se desconoce el grado de interacción y estabilidad.
4. El proceso de purificación implementado con resinas de intercambio iónico y, de adsorción demostró que es factible obtener un biopolímero estandarizado con niveles de coloración reducidas en un 815. Las observaciones obtenidas durante este trabajo demostraron que, la GMP, no se observaron cambios en la cantidad relativa de grupos funcionales,

al contrario, aumentó. Sin embargo, es necesario investigar aún más, y asegurar que las fracciones removidas no modifican sus propiedades emulsionantes, reológicas y la estructura nativa presente en la GMN.

Anexo 1

Publicación

García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 1-10.

Abstract

The effect of solvent and extraction temperature on the initial antioxidant activity (AA) and total phenolic content (TPC) of Muitle (*Justicia spicigera*) extracts and their decay upon storage at different pH values was studied. Extraction with aqueous solvents, at either 25 or 60°C, produced fresh extracts (pH 7.4) with higher initial TPC and AA. Extracts were adjusted to different pH's displayed different TPC and AAA decay rates upon storage. TPC had first order decay kinetics, characterized by a relatively quick constant (k_1) at relatively short storage times followed by a relatively slow constant (k_2) at relatively large storage times. ABTS and DPPH assays estimated different AA in the extracts, attributed to compatibility differences between the bioactive species and the free radicals.

Bibliografía

Akrem, H.E., Abedrabba, M., Bouix, M., y Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.

Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M. del C., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., y García-Carrancá, A. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 888– 894

Al-Farsi, M.A., y Lee, C.Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, 108, 977-985.

Alfrén, J., Peña-Arrieta, J.M., Bergenstahl, B., y Nilsson, L. (2012). Comparison of molecular and emulsifying properties of gum arabic and mesquite gum using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloid*, 26, 54–62.

Anderson, D.M.W., y Weiping, W. (1989). The characterization of proteinaceous *Prosopis* mesquite gums are not permitted food additives. *Food Hydrocolloids*, 3, 235-242.

Anderson, D.M.W., Howlett, J.F., y McNab, C.G.A. (1985). The amino acid composition of gum exudates from *Prosopis* species. *Phytochemistry*, 24(11), 2718-2720.

Asghar, M.N., Khan, I.U., Zia, I., Ahmad, M., y Qureshi, F.A. (2008). Modified 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzo Thiazoline)-6-Sulphonic Acid Radical Cation Decolorization Assay for Antioxidant Activity of Human Plasma and Extracts of Traditional Medicinal Plants . *Acta Chemica Slovenica*, 55, 408-418.

Bakowska-Barczak, A.M., y Kolodziejczyk, P.P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34,

1301– 1309.

Becker, E.M., Nissen, L.R., y Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects, 219(6), 561-571

Beristain, C.I., García, H.S., y Vernon-Carter, E.J. (1999). Note. Mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and maltodextrin blends as wall materials for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Food Science and Technology International*, 5(4), 353-356.

Beristain, I.C., Azuara, E., y Vernon-Carter, E.J. (2002). Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as Wall material. *Journal of food Science*, 67(1), 206-211.

Bouic, P. J. y Lamprech, J. H. (1999). Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. *Alternative Medicine Review*, 4, 170-177.

Cáceres-Cortés, J.R., Cantú-Garza, F.A., Mendoza-Mata, M.T., Chávez-González, M.A., Ramos-Mandujano, G., y Zambrano-Ramírez, I.R., (2001). Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 Proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research*, 15, 691-697.

Castellani, O., Al-Assaf, S., Axelos, M., Phillips, G.O., y Anton, M. (2010). Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2 -Adsorption properties at the n-hexadecane–Water interface. *Food Hydrocolloids*, 24, 121–130.

Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., y Sumne, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235, 587–596.

Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R. y Pegg, R.B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148-173.

Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C. y Dornier, M. (2009). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14): 6285-6291.

Cui, S.W., Phillips, G.O., Blackwell, B., y Nikiforuk, J. (2007). Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (*Acacia* (sen) SUPERGUM™): Part 4. Spectroscopic characterisation of *Acacia senegal* var.

- senegal and Acacia (sen) SUPERGUM™ Arabic. *Food Hydrocolloids*, 21, 347–352
- Cuneen, J.I. y Smith, F. (1948a). The constitution of mesquite gum. Part I. Isolation of 6- and 4- glucuronosidogalactose. *Journal of the Chemical Society*, 227, 1141-1146.
- Cuneen, J.I. y Smith, F. (1948b) The constitution of mesquite gum. Part II. Methylated mesquite gum. *Journal of the Chemical Society*, 228, 1146-1157.
- Day, L., Seymour, R.B., Pitts, K.F., Konczak, I., y Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 388-395.
- de Rosso, V.V. y Mercadante, A.Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3): 347-352.
- Dickinson, E., Elverson, D.J., y Murray, B.S. (1989). On the filmforming and emulsion stabilizing properties of gum arabic: dilution and flocculation aspects. *Food Hydrocolloids*, 3, 101–114.
- Dickinson, E., Murray, B.S., Stainsby, G., y Anderson, D.M. (1988). Surface activity and emulsifying behaviour of some Acacia gums. *Carbohydrate Polymers*, 2, 477–490.
- Ding, Z. (1999). Studies on extraction and isolation flavonoids from Ginkgo leaves. *Journal of Food Quality*, 22, 693-700.
- Domínguez, X.A., Achenbach, H., González, C., y Ferré-D'Amare, A. R. (1990). Estudio químico del muile (*Justicia spicigera*). *Revista Latinoamericana de Química*, 21, 142-143.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E.J., y Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79, 541–546.
- Euler, K.L., y Alam, M. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45, 220-222.
- FAO. Disponible en línea en: <http://www.fao.org/docrep/006/j2215s/j2215s06.htm>
- FDA. Disponible en línea en:
www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart=310&showFR=1
- García-Márquez, E., Román-Guerrero. A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., y Vernon-Carter, E.J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction

conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 1-10.

Glicksman, M. (1982). *Food hydrocolloids*. Vol I, CRC Press, Inc. pp.6-8.

Glicksman, M. (1982). *Food hydrocolloids*. Vol II, CRC Press, Inc. pp.15-22.

Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., y Liu, G. (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 9-16.

Goycoolea, F.M., Calderon de la Barca, A.M., Balderrama, J.R., Valenzuela J.R., y Hernández, G. (1998). Processing and functional behaviour of low-tannin mesquite gum: en Williams P. A., Phillips G. O (Eds.). *Gums and stabilizers for the food industry* 9. Royal Society of Chemistry. Cambridge, RU. pp- 305-313.

Goycoolea, F.M., Calderoón de la Barca, A.M., Balderrama, J.R., y Valenzuela, J.R. (1997). Immunological and functional properties of the exudate gum from northwestern Mexican mesquite (*Prosopis* spp.) in comparison with gum arabic. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 29–36.

Haghi, G., Arshi, R. y Safaei, A. (2008). Improved High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method for Qualitative and Quantitative Analysis of Allantoin in *Zea mays*. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 56, 1205–1209.

Hartzfeld, P.W., Forkner, R., Hunter, M.D. y Hagerman, A.E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1785-1790

Khanna, M., Dwivedi, A.K., Shingh, S., y Soni, P.L. (1997). Mesquite gum (*Prosopis juliflora*): Potential binder in Tablet dosage formas. *Journal of Scientific and Industrial Research* 56(6), 366-368.

Heim, K.E., Tagliaferro, R.A., y Bobilya, J.D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Juntachote, T., y Berghofer, E. (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry*, 92, 193-202.

Kammerer, D., Kljusuric, J.G., Carle, R., y Schieber, A. (2005). Recovery of anthoc-

yanins from grape pomace extracts (*Vitis Vinifera* L. cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research and Technology*, 220, 431–437

Lapornik, B., Prošek, M., y Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.

Li, Z.L. (1994). Using resins and enzymes to extract flavonoids from Ginkgo leaves. *Patent in Traditional Chinese Medicine*, 16, 52-53.

Lin, F. y Giusti, M.M. (2005). Effects of solvent polarity and acidity on the extraction efficiency of isoflavones from soybeans (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3795-3800.

Ling, W.H. y Jones, P.J. (1995). Mini-review of dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*, 57,195–206.

Liyana-Pathirana, C., y Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, 47-56.

López-Franco, Y.L., Valdez, M.A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A.M., Rinaudo, M. y Goycoolea F.M. (2004) Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of Sonora mesquite gum. *Macromolecular Bioscience*, 4, 865-874.

Mahabir, D., y Gulliford M.C. (1997). Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. *American Journal of Public Health*, 1, 174-179.

Marcotte, M., Hoshahili, A.R.T., y Ramaswamy, H.S. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Research International*, 34, 695–703.

Márquez, C., Lara, F., Rodríguez, B.E., y Mata, R. (1999). *Plantas medicinales de México: Composición, Usos y Actividad Biológica*. UNAM, México.

Martínez, M. (1992). *Las plantas medicinales de México*, Editorial Ed. Botas, Sexta edición.

Martínez, M. (2004). *Las plantas medicinales de México*, Vol. I, Editorial Ed. Botas.

Mathew, A.G., y Parpia, H.A.B. (1971). Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research*, 19(1), 75–145.

McClements, D.J., y Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 285–330.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., José Núñez, M.A. y Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72, 145-171.
- Monsoor, M.A., Kalapathy, U., y Proctor, A. (2001). Improved Method for Determination of Pectin Degree of Esterification by Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2756-2760.
- Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., y Romero, M.P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85, 357-364.
- Myhrstad, M.C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R. y Moskaug, J.J.O. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of genoma-Glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 386-393.
- Oosawa, F. (1971). *Polyelectrolytes*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp 9-20.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E. y Vernon-Carter, E.J. (2003). Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers*, 54, 327-333.
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R. Salazar-Olivo, L.A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., y García-Carranca, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 455-462.
- Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio JR, A. Z., Scheerens, J.C., y Miller, A.R. (2006). Modified 2,2 - Azino -bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, 54, 1151 - 1157
- Pasika, W.M. (1977). Polysaccharide polyelectrolytes en Extracellular microbial polysaccharides, Eds: Sandford, A. P., Laskin, A., vol 45, capítulo 10, pp 128-143.

- Pavón-García, L.M.A., Pérez-Alonso, C., Orozco-Villafuerte, J., Pimentel-González, D.J., Rodríguez-Huezo, M.E., y Vernon-Carter E.J. (2011). Storage stability of the natural colourant from *Justicia spicigera* microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1428–1437.
- Pedroza-Islas, R., Macías-Bravo, S., y Vernon-Carter, E.J. (2002). Oil thermooxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1, 37–44.
- Pellegrini, R.R.N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10) 1231-1237.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M.J. y Nicoli, M.C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92, 109-117.
- Pérez-Jiménez, J. y Torres, J.L. (2011). Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 59, 12713–12724.
- Pérez-Jiménez, J., y Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39, 791-800.
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González Y., de la Mora-de la Mora, J.I., González-Maciél, A., Reynoso-Robles, R.R., y Martínez-Gordillo, M.N. (2001). Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 44, 151-152.
- Plat, J., Kerckhoffs, D.A., y Mensink, R. P. (200). Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 571–6.
- Rana, D., Neale, G.H., y Hornof. (2002). Surface tensión of mixed surfactant systems: lignosulfonate and sodium dodecyl sulfate. *Colloid and Polymer science*, 280, 775 – 778.
- Reddy, M.K., Gupta, S.K., Jacob, M.R., Khan, S.I., y Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73(5), 461-467.
- Reichardt, Ch.(1994). Solvatochromic Dyes as solvent polarity indicators. *Chemical*

reviews. 94(8), 2319-2358.

Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I., y Vernon-Carter, E.J. (2004) Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal Food Science*, 69, E351-E359.

Roginsky, V., y Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235–254.

Román-Guerrero, A., Orozco-Villafuerte, J., Pérez-Orozco, J.P., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., y Vernon-Carter, E.J. (2009). Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 708-713.

Ruiz, E., Padilla, E., Redondo, S., Gordillo-Moscoso, A., y Tejerina, T. (2005). Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *European Journal of Pharmacology*, 529, 79–83.

Santos-Soriano, J., Franco-Zavaleta, M.E., Pelayo-Zaldívar, C., Armella-Villalpando, M.A., Yáñez-López, M.L., y Guerrero-Legarreta, I. (2007). A partial characterization of the red pigment from the mexican fruit cactus “Jiotilla” (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6, 19-25

Seeram, N., Lee, R., Hardy, M. y Heber, D. (2005) Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, 41, 49–55.

Scordino, M., Di Mauro, A., Passerini, A., y Maccarone, E. (2003). Adsorption of flavonoids on resins: hesperidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6998–7004.

Sentjurc, M., Nemec, M., Connor, D.H., y Abram, V. (2003). Antioxidant Activity of *Sempervivum tectorum* and Its Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2766 -2771.

Sepúlveda-Jiménez, G., Reyna-Aquino, C., Chaires-Martínez, L., Bermúdez-Torres, K., y Rodríguez-Monroy, M. (2009). Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences*, 9, 629-632.

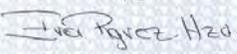
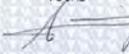
Shestopalov, A.V., Shkurat, T.P., Mikashinovich, Z.I., Kryzhanovskaya, I.O., Bogacheva, M.A., Lomteva, S.V., Prokof'ev, V.N., y Gus'kov, E.P. (2005). Biological Functions of Allantoin. *Biology Bulletin*, 33(5), 437-440

- Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., y Parajó, J.C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105, 1–27.
- Spigno, G., y De Faveri, D.M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78, 793-801.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., y Tew, K.D. (2003). Review: Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57, 321–325.
- Thevenet, F. (1988) Acacia gums: stabilisers for flavour encapsulation. En: Risch S. J, Reineccius GA (eds) *Flavour encapsulation*. ACS symposium series, 370. American Chemical Society, Washington, DC, pp 37–44.
- Too, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W., y Tan, C.P. (2010). Effects of binary extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity of mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120, 290-295.
- Tsao, R., y Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85–99.
- Turkmen, N., Sari, F., y Velioglu, Y.S. (2006). Effects on extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 835-841.
- Uma, D.B., Ho, C.W., y Wan, A.W.M. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39, 119-128.
- Van Der Sluis, A.A., Dekker, M., y Van Boekel, M.A.J.S. (2005). Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1073-1080
- Vermerris, W.Y Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Cap 1. pp 1-32.
- Vernon-Carter, E.J., Pedrosa-Islas, R., y Beristain, C.I. (1998). Stability of capsicum annum oleoresin-in-water emulsions containing prosopis and acacia gums. *Journal of Texture Studies*, 29, 53-567.
- Walstra, P. (2002). Reaction kinetics. In: *Physical Chemistry of Foods*. (Walstra, P. ed.), pp. 52- 58. Marcel Dekker Inc., New York.

- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., y Li, X. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804 - 810.
- Wattel, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, J.P., Fardelonne, P. y Brazier, M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65, 35-42.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., y Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants Or Signalling Molecules?. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(7), 838-849.
- Wong, W. (1976). Some folk medicinal plants from Trinidad. *Economic Botanic*, 30, 103-142.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, Ch.F., Smith, D.M., y Sporns, P. (2003). *Current Protocols in food analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. pp- I1.1.1-I1.1.3.
- Xu, B.J., y Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, S159-S166.
- Yi-Chung, F., Lin-Huei, A.F., y Pau-Yau, H. (2006). Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bulbil of the *Dioscorea* species. *Food Chemistry*, 94, 541-549.
- Yim, H.S., Chye, F.Y., Koo, S.M., Matanjun, P., How, S.E., y Ho, C.W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 235-242.
- White, E.V. (1946). The constitution of mesquite gum. I. The methanolysis products of methylated mesquite gum. *Journal of the American Chemical Society*, 68, 272-275.
- White, E.V. (1947a). The constitution of mesquite gum. II. Partial hydrolysis of mesquite gum. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 622-623.
- White, E.V. (1947b). The constitution of mesquite gum. III.
- Hexamethyl-3-glucuronosidomethylgalactoside methyl ester. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 2264-2266.
- White, E. V. (1948). The constitution of mesquite gum. IV. 4-Methoxy-D-glucuronic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 70, 367-369.

Zhang, Y., Seeram, P.N., Lee, R., Feng, L., y Heber, D. (2008). Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 56, 670–675.

Acta examen

 <p>Casa abierta al tiempo UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA</p>	ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA	
<p>EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCION SOLVENTE-TEMPERATURA EN EL CONTENIDO DE FENÓLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE <i>Justicia spicigera</i>, Y SU PROTECCION COLOIDAL CON GOMA DE MEZQUITE NATIVA Y PURIFICADA</p>	<p>No. 00122 Matrícula 201180766</p> <p>En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 5 del mes de julio del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:</p> <p>DR. FRANCISCO CRUZ SOSA DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO DR. RUBEN JIMENEZ ALVARADO DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO</p> <p>Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaría la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:</p> <p>DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA DE: ERISTEO GARCIA MARQUEZ</p> <p>y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:</p> <p style="text-align: center;"><u>Aprobar</u></p> <p>Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.</p>	
 <p>ERISTEO GARCIA MARQUEZ ALUMNO</p>		
<p>REVISOR</p>  <p>LIC. JULIO CESAR DE LAMA ISASSI DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES</p>		
<p>DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS</p>  <p>DR. RUBEN ROMAN RAMOS</p>	<p>PRESIDENTE</p>  <p>DR. FRANCISCO CRUZ SOSA</p>	
<p>VOCAL</p>  <p>DRA. MARIA EVA RODRIGUEZ HUEZO</p>	<p>VOCAL</p>  <p>DR. RUBEN JIMENEZ ALVARADO</p>	<p>SECRETARIA</p>  <p>DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO</p>