



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**Facultad de Química  
Departamento de Investigación y Posgrado en  
Alimentos  
Doctorado en Ciencia de los Alimentos**

**“Diseño y evaluación de un suplemento alimenticio, a base de subproductos agroindustriales, para la prevención de factores de riesgo cardiovascular”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Doctorado en Ciencia de los Alimentos**

**Presenta:**

M. en C. Diana María Amaya Cruz

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Santiago de Querétaro, Querétaro, octubre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

"Diseño y evaluación de un suplemento alimenticio, a base de subproductos agroindustriales, para la prevención de factores de riesgo cardiovascular"

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

M.C. Diana María Amaya Cruz

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

**Co-dirigido por:**

Dra. Jara Pérez Jiménez

**SINODALES**

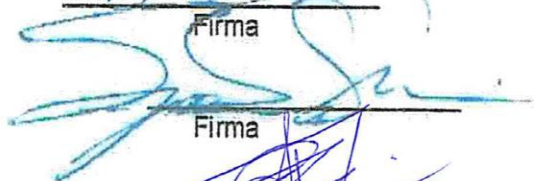
Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Jara Pérez Jiménez  
Co-director

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Sergio Román Othón Serna Saldívar  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Firma


Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Director de la Facultad

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2018

## RESUMEN

En este trabajo se planteó el desarrollo de suplementos alimenticios a base de subproductos de cálices de Jamaica, uva, mango, durazno, tuna y granada, y su evaluación en la prevención de factores de riesgo cardiovascular. Primero se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica, funcional y fitoquímica; y se seleccionaron los subproductos de Jamaica, mango, uva y granada. Debido a que no hay reportes de efecto del consumo del subproducto de Jamaica, se realizó un estudio *in vivo* con animales alimentados una dieta alta en grasa y fructosa (AGF), y suplementada (8%) con cálices de Jamaica y su subproducto. El subproducto de Jamaica, respecto al grupo control (AGF) redujo la ganancia de peso corporal (9%), triglicéridos en suero (18%), acumulación de triglicéridos en hígado (29%), y resistencia a la insulina (48%). Posteriormente se desarrollaron 3 formulaciones a partir de los subproductos antes indicados, ricas en diferentes clases de compuestos bioactivos: formulación 1 (F1, antioxidantes macromoleculares, 10.6%), formulación 2 (F2, FDT 67.4%), y formulación 3 (F3, polifenoles extraíbles 6.2%). Sobre estas tres formulaciones se llevó a cabo un estudio de vida de anaquel con una duración de 150 días con tres temperaturas (25, 35 y 45 °C); como indicador crítico se seleccionó el contenido de polifenoles extraíbles (límite de aceptabilidad < 2%). Al final del almacenamiento los antioxidantes macromoleculares resultaron ser relativamente estables, caso contrario a los polifenoles extraíbles y las antocianinas que disminuyeron con el tiempo de almacenamiento y en mayor proporción a 45 °C. Finalmente, las tres formulaciones se evaluaron en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, fructosa y colesterol (dieta AGFC). La F1 mostró los mayores efectos en los niveles séricos de triglicéridos (↓47%), colesterol total (↓43%), glucosa (↓28%) y los índices HOMA (↓40%) y TyG (↓12%). La F2 mostró mayor efecto en los valores de colesterol HDL (↑52%) y triglicéridos en hígado (↓19%); y la F3 efectos benéficos en el peso corporal (↓6%), colesterol LDL (↓26%), colesterol en hígado (↓26%), insulina (↓28%) e índice HOMA (↓40%). Por lo tanto, la suplementación presentó efectos diferenciales sobre los factores de riesgo evaluados, así que los tres productos desarrollados podrían ser empleados para la prevención de algunos de estos.

**(Palabras clave:** subproductos, fibra dietaria, polifenoles extraíbles, polifenoles no extraíbles, factores de riesgo)

## ABSTRACT

Juice byproducts are a good source of bioactive compounds, so it is necessary to establish alternatives to use. In this work the development of food supplements based on by-products of roselle, grape, mango, peach, prickly pear and pomegranate was proposed, and the evaluation of their consumption in the prevention of cardiovascular risk factors (*in vivo* model). The physicochemical, functional and phytochemical characterization was carried out, the byproducts of mango, grape, pomegranate and roselle were selected. Until now there are no reports of roselle byproduct consumption, so it was evaluated. The consumption of roselle byproduct reduced body weight gain (9%), serum triglycerides (18%), triglyceride accumulation in the liver (29%) and insulin resistance (48%) respect to HFF diet group. Then, with the by-products of grape, mango, pomegranate and roselle three formulations were developed rich in different class of bioactive compounds; formulation 1 (F1) had a higher content of non-extractable polyphenols (10.6%), formulation 2 (F2) had a higher content of dietary fiber (67.4%) and formulation 3 (F3) of extractable polyphenols (6.2%). A shelf life study was realized for these formulations, they were packed in aluminum foil-laminated pouches and stored at 25, 35 and 45 °C for 150 days. As a critical indicator, the content of extractable polyphenols was selected (acceptability limit <2%). At the end of storage, the non-extractable polyphenols were relatively stable, and the water solubility index increased. In contrast to the extractable polyphenols and anthocyanins that decreased with storage time and in a greater proportion at 45°C. Finally, the three formulations were evaluated in rats fed with a high fat, fructose and cholesterol (HFFC) diet. Formulation 1 showed the highest effects on serum levels of triglycerides (↓47%), total cholesterol (↓43%), glucose (↓28%) and the HOMA (↓40%) and TyG (↓12%) indices. Formulation 2 showed a greater effect on HDL cholesterol (↑ 52%) and triglycerides in the liver (↓19%). Formulation 3 stood out because it had beneficial effects on body weight (↓6%), LDL cholesterol (↓26%), liver cholesterol (↓26%), insulin (↓28%) and HOMA index (↓40%). Therefore, the supplementation had differential effects on the risk factors evaluated, so the three products developed could be used for the specific prevention of some of these.

**(Key words:** by-products, dietary fiber, extractable polyphenols, non-extractable polyphenols, cardiovascular, risk factors)

## DEDICATORIA

*A Dios, que no ha parado de sorprenderme, de mostrarme su fidelidad, sus planes y sus propósitos para mi vida.*

*A Andrés, porque ha estado ahí 24/7 para animarme, apoyarme, amarme (¡muchas muchas gracias!) y ahora que nos embarcamos en esta nueva aventura de ser papás, y ahora a mi bebé.*

*A mis papás, Oscar y Jacqueline, por su amor, apoyo incondicional, porque siempre nos han dado lo mejor; a mis hermanos Antonio y Marce, los amo inmensamente.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho, por su apoyo y dirección.

A mis sinodales: a la Dra. Jara Pérez Jiménez, el Dr. Sergio Serna, la Dra. Silvia Amaya y el Dr. Eduardo Castaño por todas sus observaciones y propuestas para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que sin duda hicieron muy ameno mi tiempo en el laboratorio, los llevo en el corazón; y estudiantes de servicio.

A Carmelita, al personal administrativo, a la Dra Estella por su invaluable ayuda.

## TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Factores de riesgo cardiovascular.....	19
2.1.1 Factores de riesgo cardiovascular modificables .....	19
2.1.1.1. Sobrepeso y obesidad .....	19
2.1.1.2 Diabetes y resistencia a la insulina.....	20
2.1.1.3 Dislipidemia .....	20
2.1.2 Alternativas de prevención y tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular .....	21
2.2 Fibra dietaria antioxidante.....	21
2.2.1 Fibra dietaria y factores de riesgo cardiovascular.....	23
2.3 Compuestos antioxidantes .....	25
2.3.1 Compuestos antioxidantes y factores de riesgo cardiovascular.....	26
2.4 Fuente de fibra antioxidante.....	27
2.4.1 Cáliz de Jamaica.....	27
2.4.2 Uva.....	29
2.4.3 Mango .....	31
2.4.4 Granada.....	32
2.5 Suplementos alimenticios .....	36
III. JUSTIFICACIÓN.....	40
IV. HIPÓTESIS.....	42
V. OBJETIVOS.....	43
5.1 Objetivo general .....	43
5.2 Objetivos específicos.....	43

VI. METODOLOGÍA.....	44
6.1 Material químico.....	44
6.2 Material biológico .....	44
6.2.1 Manejo de los materiales a utilizar .....	44
6.2.2 Preparación de las muestras .....	45
6.3 Caracterización de los subproductos.....	45
6.3.1 Caracterización de compuestos bioactivos.....	45
6.3.1.1 Fibra dietaria total, soluble e insoluble .....	45
6.3.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos extraíbles.....	46
6.3.1.3 Determinación de fenoles totales.....	46
6.3.1.4 Determinación de flavonoides totales .....	47
6.3.1.5 Determinación de antocianinas .....	47
6.3.1.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH* .....	48
6.3.1.7 Antioxidantes macromoleculares .....	48
6.3.1.7.1 Cuantificación de taninos condensados (NEPA) .....	48
6.3.1.7.2 Cuantificación de polifenoles hidrolizables .....	49
6.3.1.8 Identificación y cuantificación de compuestos antioxidantes y mono- di sacáridos por HPLC-DAD, HPLC-DAD-MSD .....	49
6.3.2 Caracterización fisicoquímica y funcional de los subproductos .....	52
6.3.2.1 Densidad aparente.....	52
6.3.2.2 Capacidad de hinchamiento .....	52
6.3.2.3 Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	52
6.3.2.4 Capacidad de Retención de Aceite (CRAC) .....	52
6.3.2.5 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA) .....	53



6.4 Evaluación del efecto del consumo de cálices y subproducto de Jamaica sobre los factores de riesgo cardiovascular .....	53
6.4.1 Aclimatación de los animales de experimentación.....	53
6.4.2 Grupos experimentales .....	53
6.4.3 Evaluación del cáliz y el subproducto de Jamaica como tratamiento preventivo para factores de riesgo cardiovascular.....	54
6.4.3.1 Resistencia a insulina .....	55
6.4.3.2 Perfil lipídico .....	55
6.4.3.3 Análisis histológico.....	55
6.4.3.4 Cuantificación de triglicéridos en hígado y heces .....	55
6.5 Formulación del suplemento .....	56
6.6 Identificación de polifenoles extraíbles e hidrolizables y ácidos orgánicos por UPLC-ESI-QTOF MS <sup>E</sup> en las formulaciones desarrolladas. ....	57
6.7 Caracterización fisicoquímica y funcional de las formulaciones.....	58
6.7.1 Color.....	58
6.7.2 pH .....	58
6.7.3 Humectabilidad .....	58
6.7.4 Índice de dispersabilidad .....	59
6.7.5 Índice de solubilidad en agua .....	60
6.8 Estudio de vida de anaquel.....	60
6.8.1 Descripción del producto.....	60
6.9 Evaluación del efecto del consumo de las tres formulaciones sobre los factores de riesgo cardiovascular.....	61
6.9.1 Aclimatación de los animales de experimentación.....	61
6.9.2 Grupos experimentales .....	61
6.9.3 Sacrificio .....	62

6.9.4 Determinaciones en suero.....	62
6.9.5 Análisis histológico.....	62
6.9.6 Cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado y heces .....	63
6.10 Análisis estadístico .....	63
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
7.1 Caracterización de compuestos bioactivos de los subproductos de mango, durazno, Jamaica, tuna, orujo y granada .....	65
7.2 Caracterización fisicoquímica y funcional de los subproductos de mango, durazno, flor de Jamaica, tuna y uva.....	81
7.3 Selección del cultivar del subproducto de granada a adicionar en la formulación .....	86
7.3.1 Cuantificación de FDT, FDS y FDI.....	87
7.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	87
7.4 Estudio <i>in vivo</i> .....	90
7.4.1 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre el sobrepeso corporal .....	90
7.4.2 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre la resistencia a la insulina.....	94
7.4.3 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre los triglicéridos y colesterol en suero.....	96
7.4.4 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre la esteatosis hepática .....	97
7.5 Elaboración de diversas formulaciones .....	100
7.5.1 Identificación de fitoquímicos por UPLC-ESI-QTOF MS <sup>E</sup> .....	103
7.5.2 Caracterización fisicoquímica de las formulaciones.....	123
7.5.3 Caracterización funcional de las formulaciones.....	124
7.6 Vida de anaquel de las formulaciones desarrolladas .....	129

7.6.1 Índice de solubilidad en agua de las formulaciones almacenadas a diferentes temperaturas al final del almacenamiento (150 días). .....	129
7.6.2 Cambios de color durante el almacenamiento.....	131
7.6.3 Contenido de compuestos fenólicos extraíbles de las formulaciones almacenadas durante a diferentes temperaturas .....	137
7.6.4 Compuestos fenólicos no extraíbles.....	141
7.6.4.1 Polifenoles hidrolizables.....	141
7.6.4.2 Taninos condensados.....	142
7.7 Evaluación del efecto del consumo de las tres formulaciones desarrolladas sobre la obesidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina.....	144
7.7.1 Efecto del consumo de las formulaciones sobre el peso corporal .....	144
7.7.2 Efecto del consumo de las formulaciones sobre el consumo de alimento .....	148
7.7.3 Efecto del consumo de los suplementos sobre el perfil lipídico en sangre .....	150
7.7.4 Efecto del consumo de los suplementos sobre la resistencia a la insulina .....	153
7.7.5 Efecto del consumo de los suplementos sobre la esteatosis hepática	155
VIII. CONCLUSIONES .....	159
REFERENCIAS .....	161

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Suplementos alimenticios ricos en fibra vendidos en las tiendas de cadena de México .....	37
Cuadro 2. Gradiente de elución para polifenoles y fitoesteroles .....	51
Cuadro 3. Composición nutrimental de la dieta estándar y alta en grasa, fructosa y colesterol.....	54
Cuadro 4. Gradiente de elución para polifenoles extraíbles e hidrolizables.....	58
Cuadro 5. Contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble FDT, FDS y FDI de los subproductos .....	66
Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos extraíbles de los subproductos....	68
Cuadro 7. Contenido de antocianinas y betalaínas en los subproductos.....	70
Cuadro 8. Concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de compuestos fenólicos en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD.....	73
Cuadro 9. Identificación de compuestos fenólicos en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD-MS.....	75
Cuadro 10. Concentración ( $\text{ng/g}$ ) de antocianinas en los subproductos de uva y Jamaica.....	76
Cuadro 11. Identificación de carotenoides en subproductos de durazno y mango	78
Cuadro 12. Identificación de fitoesteroles en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD-MS .....	80
Cuadro 13. Propiedades de hidratación de los subproductos .....	82
Cuadro 14. Propiedades fisicoquímicas de los subproductos .....	84
Cuadro 15. Contenido de fibra dietaria y sus fracciones de los subproductos de diferentes cultivares de granada .....	87
Cuadro 16. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y macromoleculares de los subproductos de granada .....	89
Cuadro 17. Concentración de glucosa sanguínea, insulina e índice HOMA de ratas alimentadas con una dieta AGF y suplementadas con cálices y subproducto de Jamaica.....	95
Cuadro 18. Concentración de triglicéridos y colesterol total en ratas alimentadas con una dieta AGF y suplementadas con cálices y subproducto de Jamaica. ....	96

Cuadro 19. Contenido de compuestos bioactivos de las tres formulaciones desarrolladas.....	101
Cuadro 20. Polifenoles extraíbles y ácidos orgánicos identificados por UPLC-ESI-QTOF MS <sup>E</sup> en las tres formulaciones desarrolladas.....	104
Cuadro 21. Identificación de polifenoles hidrolizables por UPLC-ESI-QTOF MSE de las tres formulaciones desarrolladas. ....	121
Cuadro 22. Parámetros de color y pH de las tres formulaciones desarrolladas ..	123
Cuadro 23. Perfil lipídico en suero de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con las tres formulaciones desarrolladas.....	150
Cuadro 24. Parámetros en suero de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con las tres formulaciones desarrolladas.....	153

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos propuestos sobre el efecto del consumo de fibra y el riesgo de enfermedad cardiovascular. ....	24
Figura 2. Contenido de carotenoides en los subproductos de durazno y mango. ....	77
Figura 3. Contenido de $\beta$ -Sitoesterol en los subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna .....	79
Figura 4. Cultivares de granada seleccionados para el estudio .....	86
Figura 5. Contenido de fibra dietaria y compuestos fenólicos de los subproductos en estudio .....	90
Figura 6. Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto .....	91
Figura 7. Adipocitos de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa (AGF) y suplementada con cálices y subproducto de Jamaica. ....	92
Figura 8. Tamaño de los adipocitos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (AGF), y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto. ....	93
Figura 9. Hepatocitos de animales alimentados con una dieta AGF y suplementada con cálices y subproducto de Jamaica .....	98
Figura 10. Contenido de triglicéridos en hígado de ratas alimentadas con una dieta AGF, y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto. ....	99
Figura 11. Formulaciones desarrolladas en polvo y diluidas en agua. ....	102
Figura 12. Gráfico de estrella de los compuestos bioactivos de las formulaciones desarrolladas.....	101
Figura 13. Ácidos fenólicos identificados en las formulaciones desarrolladas ....	112
Figura 14. Elagitaninos y galotaninos identificados en las formulaciones desarrolladas.....	113
Figura 15. Flavonoides identificados en las formulaciones desarrolladas .....	115
Figura 16. Antocianinas identificadas en las formulaciones desarrolladas .....	116
Figura 17. Estilbenos, lignanos y xantonas identificados en las formulaciones desarrolladas.....	117
Figura 18. Ácidos orgánicos identificados en las formulaciones desarrolladas...	118

Figura 19. Polifenoles hidrolizables identificados en las formulaciones desarrolladas .....	120
Figura 20. Índice de solubilidad en agua de lo subproducto sin y con polidextrosa. ....	125
Figura 21. Índice de solubilidad en agua de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial .....	126
Figura 22. Porcentaje de humectabilidad de los subproductos. ....	127
Figura 23. Porcentaje de humectabilidad de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial .....	128
Figura 24. Índice de dispersabilidad de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial. ....	129
Figura 25. Índice de solubilidad en agua de las formulaciones al final del almacenamiento. ....	130
Figura 26. Cambio del parámetro $a^*$ de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	132
Figura 27. Cambio del parámetro $b^*$ de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	133
Figura 28. Cambio de la luminosidad ( $L^*$ ) de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	134
Figura 29. Cambio del croma de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	135
Figura 30. Cambio de color de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	136
Figura 31. Contenido de compuestos fenólicos de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. ....	138
Figura 32. Contenido de antocianinas de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento .....	140
Figura 33. Contenido de polifenoles hidrolizables de las formulaciones desarrolladas al final del almacenamiento. ....	142
Figura 34. Contenido de taninos condensados de las formulaciones desarrolladas al final del almacenamiento. ....	143

Figura 35. Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con los tres suplementos desarrollados.....	145
Figura 36. Adipocitos de animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas.....	148
Figura 37. Consumo de alimento de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas.....	149
Figura 38. Hepatocitos de animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas.....	155
Figura 39. Contenido de triglicéridos (a) y colesterol (b) hepático en animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas.....	156
Figura 40. Gráfico de estrella para los efectos <i>in vivo</i> evaluados.....	157



## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en México. Está conformada por una serie de patologías como aterosclerosis, hipertensión, arritmias, taquicardia ventricular, entre otras. Entre los principales factores de riesgo cardiovascular se encuentran las dislipidemias, la obesidad y sobrepeso, la diabetes mellitus tipo 2 y el consumo de tabaco.

Según datos del estudio FRIMEX (Factores de Riesgo en México), la obesidad o el sobrepeso (71.9%) seguido de la hipertensión (26.5%) constituyen los factores de mayor prevalencia (Meaney *et al.*, 2007). De la misma manera, el estudio Lindavista (Meaney *et al.*, 2013), realizado en mexicanos de clase media, reportó que esta población tiene un alto riesgo cardiovascular debido al conjunto de diversos factores de riesgo, siendo los de mayor prevalencia las dislipidemias (66%), sobrepeso (50%), hipertensión (32%), obesidad (24%), resistencia a la insulina (14%) y diabetes (6%).

La inactividad física, los malos hábitos alimenticios, el estilo de vida sedentario, y el consumo de tabaco o cigarrillo contribuyen en gran medida en la aparición de éstos factores. La dieta es un elemento clave para la prevención o control de dichos factores; por ello se recomienda una alimentación balanceada donde se incluya frutas y verduras como fuente de compuestos bioactivos, tales como, fibra dietaria y compuestos antioxidantes.

Una fuente reconocida de dichos compuestos lo constituyen algunos subproductos agroindustriales, que se caracterizan por ser materiales ricos en fibra dietaria y compuestos antioxidantes. Ambos son benéficos para el control de los factores de riesgo cardiovascular, por lo que éstos materiales pueden ser usados en el desarrollo de alimentos nutraceuticos.

Estos materiales de desecho son generados en grandes cantidades por la industria de elaboración de bebidas, representando del 20 al 60% de las materias

primas y constituyendo un problema de gestión para las empresas y un problema ambiental. En este trabajo se plantea elaborar un suplemento alimenticio, utilizando los subproductos de tuna, de la industria vitivinícola (orujo), la industria de jugos y néctares (mango, durazno y granada) y los cálices de Jamaica resultantes del proceso de decocción del agua de Jamaica.

Para ello se evaluaron algunas características fisicoquímicas, funcionales y contenido de compuestos bioactivos de cada material con la finalidad de seleccionar aquellos con mejores propiedades para el diseño del suplemento alimenticio. A continuación, se elaboraron tres suplementos con diferente perfil de compuestos bioactivos y se determinó su vida de anaquel. Por último, se evaluó el efecto del consumo de estos suplementos en la prevención de los factores de riesgo cardiovascular en un modelo animal.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Factores de riesgo cardiovascular

Según la OMS los factores de riesgo se definen como cualquier característica o exposición de un individuo que aumenta su probabilidad de presentar una enfermedad o lesión. Los factores de riesgo pueden ser modificables, o no modificables, es decir propios de la persona como la edad, el sexo, variaciones genéticas y predisposiciones (Katnelson *et al.* 2012).

#### 2.1.1 Factores de riesgo cardiovascular modificables

Los factores de riesgo modificables son aquellos que pueden ser corregidos o eliminados al realizar cambios en el estilo de vida como la obesidad, sedentarismo, consumo de alcohol, tabaco, hipertensión arterial, diabetes y dislipidemias (OMS, 2013).

##### 2.1.1.1. Sobrepeso y obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial, caracterizada por una acumulación de triacilglicéridos, que son el resultado de un consumo excesivo de energía en comparación al gasto energético (Nammi *et al.* 2004). La obesidad está fuertemente relacionada con los principales factores de riesgo cardiovascular como la presión arterial elevada, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 y dislipidemia (WHO; World Heart Federation; World, 2011). En México, el 72.5% de los adultos presentan sobrepeso u obesidad, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016.

En el sobrepeso y obesidad se presenta un aumento del tejido adiposo, que es una mezcla heterogénea de adipocitos, pre adipocitos, células endoteliales e inmunes; este tejido puede responder con rapidez y de forma dinámica a alteraciones en el exceso de nutrientes a través de la hipertrofia (aumento del tamaño) o hiperplasia (aumento del número) de los adipocitos (Halberg *et al.* 2008).

### **2.1.1.2 Diabetes y resistencia a la insulina**

La diabetes es una alteración metabólica crónica que se produce cuando el páncreas no genera insulina suficiente (Tipo 1) o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (Tipo 2) (Al *et al.*, 2004). A nivel mundial México ocupa el octavo lugar en la prevalencia de diabetes, y a nivel nacional esta enfermedad se encuentra entre las primeras causas de muerte, teniendo una prevalencia de 9.4% (ENSANUT, 2016). Cuando la diabetes no se controla la hiperglucemia desencadena las alteraciones más precoces de la diabetes mellitus, como el daño de varios órganos y sistemas, especialmente los nervios y complicaciones microvasculares y macrovasculares (OMS, 2006).

La insulina tiene un papel central en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el sistema periférico. La resistencia a la insulina es una condición fisiopatológica en la que una concentración normal de insulina no produce adecuadamente una respuesta normal en los tejidos periféricos sensibles a ésta, tales como el adiposo, muscular, e hígado. Bajo esta condición, las células beta pancreáticas secretan más insulina, presentándose un estado de hiperinsulinemia, de esta forma se puede mantener la normoglucemia aunque con el tiempo esto deja de ser posible, pues las células beta comienzan a ser disfuncionales (Kaur 2014).

Por tanto, la obesidad es el principal factor que contribuye a la hiperglucemia, e hiperinsulinemia, que conducen a la ineficiencia de acción de la insulina generando la condición de resistencia sistémica. Por otro lado, en la obesidad, los ácidos grasos libres circulan y se depositan en los miocitos del músculo esquelético y ocurre una acumulación de lípidos intramuscular, esto causa una regulación negativa de la expresión de la insulina, así como la reducción total del receptor de insulina (DeFronzo y Tripathy 2009).

### **2.1.1.3 Dislipidemia**

La dislipidemia es una serie de alteraciones producidas por concentraciones sanguíneas anormales de colesterol, triglicéridos y/o colesterol HDL. Su prevalencia

es aún mayor en sujetos con diabetes, hipertensión arterial o sobrepeso (Aguilar Salinas *et al.* 2004).

La dislipidemia típica de la obesidad consiste en un aumento de los triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres, disminución y disfunción de HDL y un ligero incremento de LDL con el aumento de LDL pequeñas y densas (Franssen *et al.* 2011). Asimismo, defectos en la acción de la insulina y la hiperglucemia podría dar lugar a alteraciones en la producción y el aclaramiento de las lipoproteínas del plasma originando las anomalías metabólicas que comúnmente acompañan la diabetes. La dislipidemia diabética consiste en bajos niveles en plasma de HDL, aumento de los triglicéridos y de la lipidemia postprandial, caracterizándose esta última por un aumento en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (Goldberg 2001).

### **2.1.2 Alternativas de prevención y tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular**

Entre las alternativas de tratamiento y prevención se encuentran evitar el consumo de alcohol, tabaco, grasas saturadas, grasas trans, colesterol y sal; y se recomienda aumentar la ingesta de pescado, frutas y verduras (WHO; World Heart Federation; World, 2011). Éstas últimas se caracterizan por contener fibra dietaria y compuestos bioactivos como polifenoles, carotenoides, betalaínas, fitoesteroles o saponinas, entre otros. En los apartados siguientes se hablará del efecto de la fibra dietaria y los compuestos fenólicos sobre los factores de riesgo cardiovascular de interés para este trabajo.

## **2.2 Fibra dietaria antioxidante**

Según la AACC (American Association of Cereal Chemist, 2001) la fibra dietaria (FD) es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Saura-Calixto (2011), considera que esta definición se podría ampliar, incluyendo a otros constituyentes no

digeribles (tanto de tipo carbohidratos como no carbohidratos) como almidón resistente, oligosacáridos, compuestos polifenólicos, proteínas indigeribles de la pared celular, y materiales derivados de animales como los amino polisacáridos.

Asociada a la matriz de la FD se encuentran cerca del 50% del total de los antioxidantes dietarios. Estos, por la acción de la microbiota bacteriana colónica son liberados de la matriz de fibra, produciendo metabolitos y un entorno antioxidante. Por tanto, una de las funciones de la FD es el transporte de antioxidantes como polifenoles y carotenoides a través del tracto gastrointestinal (Saura-Calixto 2011). Esta unión de FD y antioxidantes se conoce como fibra dietaria antioxidante, siendo un producto natural que combina los efectos benéficos de la FD y de los antioxidantes naturales (Saura-Calixto 1998).

De acuerdo a sus propiedades químicas y efectos fisiológicos, la fibra se puede clasificar en fibra dietética soluble (FDS) y fibra dietética insoluble (FDI). La FDS está formada en su mayoría por polisacáridos no-celulósicos, tales como, pectina, gomas y mucílagos, la FDS atrapa el agua formando soluciones con alta viscosidad y son las encargadas de retardar el vaciamiento gástrico, aumentar el volumen de las heces y disminuir su consistencia (Córdoba, 2005; Serra *et al.*, 2006); también reducen la absorción de nutrientes como glucosa, lípidos y colesterol en el intestino delgado, ya que se une a éstos disminuyendo su liberación al formar un gel que atenúa la glucosa postprandial y el incremento de los lípidos. Esta formación del gel también disminuye el vaciamiento gástrico, manteniendo los niveles de saciedad contribuyendo hacia una menor ganancia de peso (Klont 2000; Threapleton *et al.* 2013), además retarda la acción de enzimas digestivas (Ou *et al.* 2001).

La fibra dietaria insoluble (FDI), está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se caracteriza por ser capaz de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad en el colon distal, lo que produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal (Escudero Álvarez y González Sánchez 2006). Los componentes de este tipo de fibra son poco fermentables en el colon ascendente y en general, resisten la acción de los microorganismos del

intestino (Serra *et al.*, 2006). Tanto la FDI como la FDS, han demostrado tener un comportamiento sinérgico debido a sus diferentes efectos fisiológicos (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

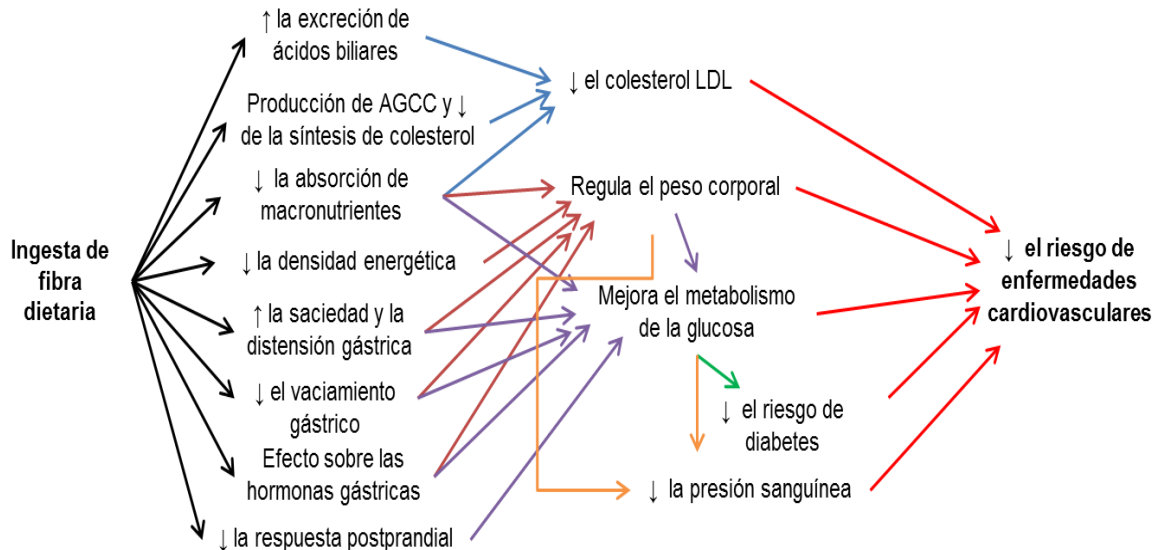
### **2.2.1 Fibra dietaria y factores de riesgo cardiovascular**

Estudios sistemáticos y metaanálisis han reportado que la ingesta de fibra dietaria está asociada de manera inversa con el riesgo de enfermedad cardiovascular y enfermedad coronaria; asimismo, la evidencia sugiere que la fibra insoluble y la proveniente de cereales y vegetales está inversamente con el riesgo de enfermedad coronaria y enfermedad cardiovascular, mientras que la fibra de frutas presenta una relación inversa tan solo con esta última (Threapleton *et al.* 2013).

En lo que respecta a la diabetes tipo II, un metaanálisis realizado con publicaciones desde 1966 hasta 2014 encontró una reducción significativa en el riesgo de la incidencia de esta patología debido al consumo de fibra dietaria de frutas y vegetales (Wang *et al.* 2016). La reducción de la diabetes tipo II y el consumo de fibra dietaria también se ha evaluado en población europea, destacando entre los mecanismos responsables la reducción en la adiposidad, mejora en el control glicémico disminuyendo la glicemia postprandial y la insulinemia, e incrementando la sensibilidad a la insulina; además de la regulación de hormonas intestinales (Consortium 2015). En los metaanálisis a diferencia de los estudios de intervención se encuentra que el control glicémico está asociado en mayor manera con la FDI y la proveniente de cereales que con la FDS, se cree que los mecanismos responsables de este efecto es la prevención de la absorción de proteínas y la modulación de vías de señalización de aminoácidos; asimismo se ha reportado recientemente que consumo de fibra mayores a 25 g/día para mujeres y 38 g/día para hombres reduce en 20 al 30% el riesgo de diabetes tipo II (Weickert y Pfeiffer 2018).

En general, el consumo de fibra dietaria puede mejorar las enfermedades cardiovasculares a través de varios mecanismos como la reducción de lípidos, la

regulación del peso corporal, la mejora del metabolismo de la glucosa, el control de la presión arterial y la reducción de la inflamación crónica (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos propuestos sobre el efecto del consumo de fibra y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Adaptado de Satija y Hu, 2012).

Los efectos hipolipidémicos de la fibra se deben al incremento en la viscosidad y a la capacidad de unión a ácidos biliares y lípidos, lo que disminuye su absorción. La FDI es capaz de adsorber ácidos biliares en el quimo, ocasionando su excreción a través de las heces; así estos ácidos biliares no entran a la circulación enterohepática y ya no pueden ser empleados para la síntesis *de novo* de colesterol y el organismo debe emplear el colesterol endógeno, disminuyendo así sus niveles en plasma (Zunft *et al.* 2003).

De la misma manera en la figura 1 se presentan los mecanismos de la FD para la regulación del peso corporal como lo son la disminución de la absorción de lípidos, carbohidratos, proteínas, el incremento en los niveles de saciedad y la regulación de hormonas relacionadas con el apetito.



## 2.3 Compuestos antioxidantes

Las frutas y los vegetales son una fuente importante de compuestos antioxidantes como compuestos fenólicos, carotenoides, betalainas, algunas vitaminas. Varios estudios sugieren que los efectos benéficos a la salud se deben a las interacciones aditivas y sinérgicas entre éstos compuestos (Liu, 2013).

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, que presentan uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo en las estructuras. Se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, y taninos (Liu, 2004). Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran los flavanoles, las flavanonas, las flavonas, los flavonoles, los isoflavonoides y las antocianinas, éstas últimas son glicósidos de derivados polihidroxi y polimetoxi de 2-fenilbenzopirilio o sales de flavilio; además de impartir color a las plantas (Kong *et al.* 2003). Los compuestos polifenólicos pueden ser extraíbles, pudiendo extraerse de la matriz del alimento con solventes acuosos y orgánicos y los polifenoles no extraíbles también conocidos como antioxidantes macromoleculares que permanecen en el residuo de la extracción. Estos últimos se pueden clasificar en dos fracciones: los polifenoles hidrolizables, estructuras de bajo peso molecular y las proantocianidinas no extraíbles, de alto peso molecular (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto 2015a).

Los carotenoides por su parte son un grupo ampliamente distribuido de pigmentos liposolubles que dan color amarillo, naranja y rojo a plantas, animales y microorganismos (Britton 1995). Finalmente, las betalainas son metabolitos secundarios nitrogenados de las plantas del orden de las *Caryophyllales*. Se trata de productos de la condensación del ácido betalámico con varios aminoácidos para formar betaxantinas, o con derivados glicosil para formar betacianinas, representado estas dos categorías amarillos y rojo-púrpura respectivamente. Las rutas de síntesis de las betalainas y las antocianinas son mutuamente excluyentes, por lo tanto los alimentos que contienen betacianinas no contienen antocianinas (Delgado-Vargas *et al.* 2000).

### 2.3.1 Compuestos antioxidantes y factores de riesgo cardiovascular

Un metaanálisis de ensayos controlados aleatorios ha reportado que el consumo de flavonoides presenta efectos diferenciales confirmados entre las subclases de flavonoides y los alimentos usados como fuente de estos, centrándose principalmente en los flavonoides de cacao, soya y te. Estos estudios soportan el efecto protector de los alimentos ricos en flavonoides sobre las enfermedades cardiovasculares en los que han podido obtener resultados contundente en lo que respecta a la disminución de la presión arterial y los niveles del colesterol LDL (Hooper et al. 2008). El consumo de polifenoles por humanos, generalmente a altas concentraciones puede tener un efecto benéfico sobre medidas antropométricas, metabolismo de lípidos y glucosa en suero, este efecto al parecer es mayor para productos ricos en polifenoles que para compuestos aislados, esto podría deberse a que a una mejor estabilización química dentro de la matriz y a efectos aditivos o sinérgicos, a pesar de esto no se puede establecer hasta el momento la dosis ideal, la matriz del alimento y la forma de suplementación para obtener los mejores resultados (Amiot et al. 2016).

Se ha reportado en estudios de intervención que frutas como la granada, uvas y bayas que tienen una alta concentración de flavonoles, antocianinas y proantocianidinas son muy efectivas en la reducción de factores de riesgo cardiovascular especialmente con efectos antihipertensivos e inhibición de la inhibición plaquetaria; y que frutas ricas en flavanonas como las naranjas y las toronjas presentan efectos hipercolesterolémicos, donde las antocianinas y procianidinas presentan poco efecto (Chong et al. 2010).

Para polifenoles se ha reportado que la ingesta total de flavonoides (quercetina, miricetina, luteolina, kaempferol) se correlaciona inversamente con las concentraciones en plasma de colesterol total y LDL (Arai et al. 2000). Así mismo, se ha demostrado que las antocianinas tienen propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes produciendo, efectos benéficos sobre la presión arterial y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en hombres pre-hipertensos (Hassellund et al. 2013). El

consumo, en sujetos sanos, durante un mes, de antocianinas presentes en fresas; redujo los valores de triglicéridos y colesterol total, incrementó HDL, la capacidad antioxidante en suero y los niveles de vitamina C; además mejoró las defensas antihemolíticas y la función plaquetaria (Alvarez-Suarez *et al.* 2014). Uno de los mecanismos más importantes de los compuestos antioxidantes para prevenir los factores de riesgo cardiovascular está en su acción antioxidante y anti-inflamatoria (Sánchez-Moreno *et al.*, 2000).

Entre los mecanismos responsables de estos efectos se encuentra que los compuestos fenólicos disminuyen la digestión y absorción de nutrientes, ya que se ha reportado que éstos compuestos pueden inhibir la actividad de enzimas digestivas que producen glucosa como la  $\alpha$ -amilasa, y las  $\alpha$ -glucosidasas, tales como sacarasa y maltasa. También inhiben a los transportadores responsables de la absorción de glucosa SGLT1 (Williamson 2013).

En lo que respecta a los polifenoles no extraíbles, se ha reportado el efecto hipolipidémico de las proantocianidinas, se ha demostrado que reducen los niveles de Apo B y colesterol LDL e incrementan los de colesterol HDL; los mecanismos a los cuales se le atribuye estos efectos son a la disminución de la absorción intestinal de lípidos, de la secreción de quilomicrones por el intestino y de VLDL por el hígado (Bladé *et al.* 2010). Se ha reportado, que las proantocianidinas ejercen su efecto biológico ya sean como compuestos no absorbidos (es decir como estructuras complejas que tienen la propiedad de unirse a almidones y proteínas que pueden tener efecto locales en el tracto gastrointestinal), absorbidos (tal vez de bajo peso molecular) y como metabolitos (producto de la fermentación colónica que pueden presentar efectos sistémicos en varios órganos) (Bladé *et al.* 2010).

## **2.4 Fuente de fibra antioxidante**

### **2.4.1 Cáliz de Jamaica**

Existen un gran número de estudios que reportan los efectos benéficos del consumo del extracto acuoso de la Jamaica, tanto en animales como en humanos

reportando en ambos sus propiedades para la disminución de colesterol y presión arterial (Hopkins *et al.*, 2013). Sáyago-Ayerdi *et al.* (2014) han reportado que los cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) resultantes del proceso de decocción para obtener agua de Jamaica, representan una buena fuente de fibra dietaria y compuestos polifenólicos. Estos autores evaluaron diferentes cultivares (Criolla, China, Rosalis y Tecoaapa); encontrando que la mayoría de los componentes quedan retenidos en los residuos de la decocción, pues solo algunos componentes como carbohidratos solubles, cenizas y polifenoles extraíbles son transferidos a la bebida. En concreto, este subproducto presentó un contenido de fibra dietaria entre 407.4–457.0 g/kg de materia seca y de 50.7–121.8  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/g de muestra seca de antioxidantes naturales. En este trabajo también se cuantificaron los polifenoles hidrolizables y los taninos condensados tanto en los cálices como de los subproductos, hasta el momento no hay reportes del perfil de polifenoles no extraíbles de este material. A partir de los resultados encontrados, los autores consideran al subproducto de Jamaica como una fuente de fibra dietaria antioxidante.

Por otro lado, la mayoría de los estudios *in vivo* realizados con la flor de Jamaica se han centrado en su extracto, ya sea acuoso o con algún tipo de solvente, habiendo muy pocos que se hayan enfocado en los cálices. El-Saadany *et al.* (1991) evaluaron la acción hipocolesterolémica de flores secas de Jamaica en ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol suplementadas durante 9 semanas con cálices de Jamaica al 5 y 10%; las concentraciones de colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos disminuyeron en un 55-60%, 61-65% y 80-87%, para ambas dosis. Sabzghabae *et al.* (2013) evaluaron el efecto del consumo de 2 g de cálices de Jamaica en polvo durante un mes sobre la dislipidemia en adolescentes obesos. Después del periodo de intervención, los jóvenes mostraron una disminución significativa en las concentraciones séricas de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos. (Moyano *et al.* 2016) evaluaron el potencial antiobesogénico de los cálices de Jamaica en polvo en ratones alimentados con una dieta alta en grasa durante 5 semanas. El peso corporal, la adiposidad y la concentración en plasma de glucosa y colesterol disminuyeron en comparación con los animales no tratados con

los cálices en polvo y este efecto fue independiente al control de la reducción del apetito. Además, la suplementación incrementó los niveles de GLP-1 (péptido similar al glucagón-1), redujo los niveles de citoquinas proinflamatorias en tejido adiposo blanco y aumentó IL-6 en tejido adiposo pardo.

En ensayos clínicos, modelos animales y cultivos celulares se reportó un posible efecto terapéutico de los extractos de Jamaica sobre el perfil lipídico (Guardiola y Mach 2014). El efecto del consumo de Jamaica sobre el metabolismo del colesterol se podría explicar mediante la inhibición de la HMGCoA reductasa (Yang *et al.* 2010). Por otro lado, varios estudios han demostrado el efecto hipotriglicéridémico del (-)-ácido hidroxicitrico a través de la inhibición competitiva de la enzima citoplasmática citrato liasa, inhibiéndose de esta manera la síntesis de triglicéridos (Carvajal-Zarrabal *et al.* 2005).

Hasta el momento no se ha reportado el efecto del consumo del subproducto de cálices de Jamaica ni efectos secundarios o adversos del consumo de Jamaica, ya que sus extractos tienen un bajo grado de toxicidad, con una dosis letal media de 2,000 a 5,000 mg/kg/día (Hopkins *et al.* 2013).

#### **2.4.2 Uva**

La uva es una buena fuente de nutrientes, contiene cantidades significativas de potasio, vitamina C y vitamina A y pequeñas cantidades de calcio y fósforo (Yadav *et al.* 2009). Además, contiene compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, polisacáridos, fibra dietaria, ácidos grasos poliinsaturados, entre otros (Iora *et al.* 2014).

Uno de los principales productos elaborados a partir de la uva es el vino en cuyo proceso de elaboración aproximadamente el 25% del peso de la uva resulta en un subproducto, conocido como orujo; este se compone de cáscara, remanente de pulpa, semillas y tallos. Estos residuos pueden ser esparcidos en el terreno y/o ser empleados como forraje, biomasa y composta. Asimismo, se les ha dado uso como biodiesel, fertilizantes y para obtener fibra dietética. En orujo de uva se ha reportado

la presencia de ácidos fenólicos, antocianinas, flavan-3-oles, flavonoles y estilbenos como el resveratrol (Ribeiro *et al.* 2015).

Existen un gran número de estudios que reportan el efecto tanto de la uva entera como de cada uno de sus componentes y su subproducto sobre el estrés oxidativo, la inflamación, la obesidad, las dislipidemias, la diabetes, los factores de riesgo cardiovascular, entre otros. Se ha propuesto que el efecto cardioprotector de las uvas se debe a la inhibición de la agregación plaquetaria, la disminución de la oxidación de las LDL, la reducción en el estrés oxidativo, la mejora en la función endotelial, su efecto benéfico sobre los lípidos en sangre, además de la disminución de la inflamación y la presión arterial (Wightman y Heuberger 2015).

El consumo de productos de la uva se ha asociado con una disminución en la cantidad de LDL (-17%), triglicéridos (-15%) y apoB, además de un posible aumento de la cantidad de HDL (+12%) y apoA1, tanto en sujetos sanos como en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Castilla *et al.* 2006).

Estudios realizados en ratones, con esta fibra dietaria antioxidante, demostró tener efectos hipolipidémicos (Martín-Carrón *et al.* 1999). Jimenez *et al.* (2008) evaluaron los efectos del consumo de 7.5 g/día (constituido por 5.25 g de fibra y 1400 mg de polifenoles) de fibra dietaria antioxidante de uva sobre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular durante 16 semanas. Esta fibra redujo significativamente el colesterol total, LDL y la presión arterial sistólica y diastólica. Además, en los sujetos hipercolesterolémicos originó una mayor reducción del colesterol total, LDL y triglicéridos.

En algunos productos alimenticios ya se ha incorporado el subproducto de uva como ingrediente funcional. Al evaluar la adición de este material en una masa agria de pan de centeno, se mejoró el contenido de fibra dietaria y el perfil de compuestos antioxidantes, así mismo afectó características sensoriales al incrementar la gomosidad del pan (Mildner-Szkudlarz *et al.* 2011). La fibra antioxidante de uva también se ha evaluado sobre la oxidación lipídica de pescado picado (Sanchez-

Alonso *et al.* 2007) y de hamburguesas de pechuga de pollo crudas y cocidas; en éstas últimas, su adición mejoró de forma significativa la estabilidad oxidativa, la vida de anaquel y la actividad antioxidante de las hamburguesas, esto sin afectar su aceptabilidad (Sáyago-Ayerdi *et al.* 2009). Asimismo, se ha empleado para mejorar el valor nutricional y el almacenamiento de yogurt y aderezos para ensalada (Tseng y Zhao 2013).

### **2.4.3 Mango**

Los desechos agroindustriales del procesamiento de mango (*Mangifera indica* L), están constituidos por semilla, pulpa fibrosa (bagazo) y cáscara; los cuales representan cerca del 40 al 60% del peso total de la fruta (Prieto *et al.*, 2005). El bagazo y la cáscara tiene una proporción FDI/FDS de 1.5:1, encontrándose en lo recomendado por Spiller (1986), quien indica que debe estar en el rango de 1.0-2.3, con el fin de obtener los efectos fisiológicos asociados a la fibra (Martínez *et al.* 2012).

Uno de los compuestos antioxidantes más importantes del mango es la mangiferina, cuya acción se ha evaluado en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, observándose una disminución en la concentración de colesterol total, LDL, triglicéridos e índice aterogénico (Muruganandan *et al.* 2005). Además que previene el estrés oxidativo mitocondrial a través de la reducción en la generación de especies reactivas de oxígeno (Pardo-Andreu *et al.* 2008) y que presenta acción antiinflamatoria a través de la inhibición de la expresión de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (Beltrán *et al.* 2004).

En ratones C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasa, el consumo de mango liofilizado disminuyó la resistencia a la insulina, mejoró la tolerancia a la glucosa, el perfil lipídico y redujo la adiposidad (Lucas *et al.* 2011). Gondi *et al.* (2015) evaluaron el consumo de cáscara de mango en polvo rica en polifenoles, carotenoides y fibra dietaria, especialmente FDS, reportaron un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes y una disminución de la peroxidación en plasma, riñón e hígado. Ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa y

suplementadas con subproducto de mango, se reportó una reducción de los niveles de glucosa y de esteatosis hepática (Amaya-Cruz et al. 2015b)

No todos los estudios se han centrado en modelos animales; Evans *et al.* (2014) determinaron los efectos de la suplementación con 10 g/día de mango liofilizado en sujetos obesos, y reportaron una reducción de los niveles de glucosa y de circunferencia de cadera.

En lo que respecta a los polifenoles no extraíbles varios autores han reportado el contenido total de estos tanto para el subproducto (taninos hidrolizables y NEPA) (Amaya-Cruz et al. 2015a) como el perfil de galotaninos para la pulpa (Manthey y Perkins-Veazie 2009).

#### **2.4.4 Granada**

La granada en los últimos años ha sido reconocida como un alimento funcional y fuente de compuestos bioactivos (Johanningsmeier y Harris, 2011). Se puede consumir en estado fresco o en productos procesados elaborados con la fruta entera como bebidas o mermeladas, dando lugar de esta manera a subproductos agroindustriales conformados principalmente de cáscara y arilos. La cáscara tiene como característica una mayor capacidad antioxidante que las semillas y la pulpa (Venkataramanamma *et al.* 2016). Además constituye cerca del 40% del peso del fruto y es rica en ácido elágico y sus derivados como los elagitaninos, punicalagina y punicalina, lo que le otorga una gran capacidad antioxidante (Cam y Icyer, 2015; Johanningsmeier y Harris, 2011). Sendra y Navarro, (2012) evaluaron las propiedades químicas, fisicoquímicas y funcionales de subproducto (arilos y cáscara) de la extracción directa de jugo de granada, encontrando un contenido de FDT, FDS y FDI de 50.3, 30.4 y 19.9%, respectivamente, lo que convierte lo en un material rico en fibra dietaria y con un buen balance entre FDI y FDS. En lo que respecta a las propiedades funcionales, el bagazo de granada puede retener 4.9 veces su peso en agua y 5.9 veces en aceite. Por lo anterior este subproducto se puede considerarse como un ingrediente funcional en productos alimenticios.



Aparte de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales se han evaluado los efectos a la salud como consecuencia de su consumo. Ahmed Hossin, (2009) evaluó en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica la suplementación, al 5, 10 y 15%, de cáscara de granada en polvo. Observaron una disminución en la ganancia de peso corporal, consumo de alimento, y los niveles de colesterol total, VLDL, LDL, triglicéridos y peroxidación lipídica al compararlos con los animales sin tratamiento. Este efecto anti aterogénico lo atribuyeron a la capacidad antioxidante de la granada. Así mismo se ha reportado que la suplementación con un extracto acuoso a partir de la cáscara de granada en ratas alimentadas con una dieta alta en aceite disminuyó el hígado graso no alcohólico, además de reducir el peso corporal, el daño hepático oxidativo, la hiperlipidemia y mejorar los niveles de las enzimas hepáticas.

Además, se ha reportado que la cáscara de granada disminuye la glucosa en la diabetes tipo 2 por medio de la reducción del estrés oxidativo y la peroxidación lipídica. Esto puede ser a través de la neutralización de las especies reactivas de oxígeno, el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes, la inducción de la actividad quelante de metales, la reducción de la formación de resistina y la inhibición o activación de factores de transcripción como NF  $\kappa$ B y PPAR  $\gamma$  (Banihani *et al.* 2013)

El subproducto de granada ya ha sido empleado como ingrediente funcional en helados (Cam *et al.* 2013), Mastrodi Salgado *et al.* (2012) además adicionaron un extracto seco en polvo a jugo de tomate y de naranja con fresa, en concentraciones no mayores a 0.5% con el fin de no afectar la aceptabilidad de los jugos, debido al sabor astringente de la cáscara.

Recientemente se ha reportado una caracterización detallada (61 compuestos) de los polifenoles hidrolizables y elagitaninos no extraíbles de un suplemento elaborado a partir de subproductos de uva y granada (Perez-Ramirez *et al.* 2018).

### 2.4.5 Durazno

La pulpa, cáscara y semilla son los residuos resultantes de la producción de jugo de durazno (*Prunus persica L.*). Tanto la cáscara como la pulpa, presentan una cantidad apreciable de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas; la cáscara tiene niveles significativamente mayores de minerales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante 20 veces mayores que la pulpa, sugiriendo su consumo como una fuente importante de antioxidantes naturales (Maleeha *et al.*, 2012).

Gasparotto *et al.* (2014) evaluaron *ex vivo* el durazno fresco, cáscara y pulpa, y pulpa conservada en almíbar. La fruta fresca presentó mayores propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como, mayor protección contra la citotoxicidad y el estrés oxidativo inducido, debido que tenían un contenido de metabolitos significativamente mayor que la pulpa en almíbar. Kono *et al.* (2013) realizaron un extracto de etil acetato de la pulpa de durazno el cual presentó actividad antihipertensiva y antiaterosclerótica, ya que atenúa la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico inducida por angiotensina II, además interfiere en la generación de especies reactivas de oxígeno y la elevación de calcio intracelular inducido por angiotensina II. Ahmed *et al.* (2010) realizaron un estudio clínico en voluntarios prehipertensivos durante 8 semanas, al final de la intervención disminuyeron los niveles de colesterol total y LDL, y la presión diastólica.

Se ha llevado a cabo el perfil de los polifenoles hidrolizables presentes en el subproducto de durazno encontrando ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, flavonoles, dihidroflavonoles, flavonas y estilbenos (Rodríguez-González *et al.* 2018a).

### 2.4.6 Tuna

La tuna es la fruta del nopal (*Opuntia ficus-indica*), es una baya ovalada con un gran contenido de semillas y de cáscara semidura con espinas. De la fruta, el 40 al 50% está conformado por la cáscara, 50-60% es pulpa y del 5 al 10% de semilla. Si se considera que la cáscara constituye gran parte del fruto, ésta sería por

consiguiente el mayor subproducto y puede usarse como fuente de diversos compuestos. Ramadan y Mörsel (2003) extrajeron la fracción lipídica de la cáscara (36.8 g/kg) y ésta resultó ser rica en ácidos grasos esenciales,  $\beta$ -caroteno, vitamina K1, vitamina E y esteroides, principalmente  $\beta$ -sitosterol y campesterol. La cáscara, al compararla con la pulpa y las semillas, de tres variedades, tiene mayor contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y mayor capacidad antioxidante; asimismo contiene más FDT, FDS y FDI que la pulpa, pero menos que las semillas (Jiménez-Aguilar et al., 2015).

Una de las características de la tuna es que es rica en betalainas, que son compuestos bioactivos responsables de sus efectos positivos para la salud. En ratas Wistar sanas evaluaron el efecto diurético y antioxidante de un extracto acuoso deshidratado de tuna (240 mg/kg/día), obteniendo un aumento significativo de los niveles sanguíneos de la glutatión peroxidasa, así como del volumen excretado de orina lo que causó una menor ganancia de peso corporal (Bisson et al., 2010). Butterweck *et al.*, (2011) investigaron el efecto de un licuado de cladodios de nopal y cáscara de tuna (75:25), sobre los niveles de glucosa e insulina en ratas sanas sometidas a una prueba de tolerancia a la glucosa; y encontraron que a diferencia de un extracto solo de cladodios, la mezcla desde concentraciones de 6 mg/kg disminuyó la concentración de glucosa en suero e incrementó de manera significativa los niveles basales de insulina; esto indica que la cáscara de la tuna tiene un efecto estimulante sobre la secreción de insulina.

La tuna también se ha evaluado en estudios poblacionales, sin embargo, los estudios se han centrado en la pulpa y no en la cáscara. El consumo de 250 g/día de pulpa de tuna en hombres no obesos-no diabéticos, que presentaban hipercolesterolemia primaria o hiperlipidemia combinada, se observó una reducción del colesterol total (12%), LDL (15%), Apo B (9%), triglicéridos (12%), fibrinógeno (11%), glucosa en sangre (11%), insulina (11% ) y ácido úrico (10%), mientras que el peso corporal, HDL, apolipoproteína AI, y la lipoproteína (a) se mantuvieron sin cambios (Wolfram *et al.*, 2002). Palumbo *et al.* (2003) reportaron que para pacientes con hipercolesterolemia familiar (HCF) el consumo de tuna durante 6 semanas

aumentó la incorporación de LDL por parte del hígado, lo que disminuyó los niveles de LDL y colesterol total, sin causar cambios en HDL y triglicéridos; esto indicó que el efecto hipolipidémico de la tuna se debe a la regulación positiva del receptor de LDL en hígado.

En lo que respecta a los polifenoles no extraíbles a la fecha no existen reportes de su perfil y contenido total.

## **2.5 Suplementos alimenticios**

Según la NOM-251-SSA1-2009 los suplementos alimenticios son productos a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementarla o suplir alguno de sus componentes. Estos suplementos pueden estar en forma de cápsulas, pastillas o polvo como lo es el caso de la fibra dietaria.

Con el fin de mejorar sus propiedades funcionales y sensoriales se les puede incorporar algunos aditivos alimentarios como hidrocoloides (carboximetilcelulosa, goma xantana), antiaglomerantes (dióxido de silicio, fosfato tricálcico) y edulcorantes (sucralosa, estevia, aspartame, acesulfame K); ya que estos tipos de productos debido a la naturaleza de sus ingredientes no presentan atributos sensoriales agradables en su mayoría.

En el Cuadro 1 se muestran los suplementos alimenticios presentes actualmente en las tiendas de cadena más grandes de México. Para seleccionar estos productos se consideró que fueran suplementos alimenticios en polvo, que se disolvieran en algún líquido y que incluyeran en su etiqueta la presencia de fibra dietaria y/o algún beneficio a la salud.

**Cuadro 1.** Suplementos alimenticios ricos en fibra vendidos en las tiendas de cadena de México

<b>Nombre</b>	<b>Componentes</b>	<b>Contenido de fibra/porción (gramos)</b>	<b>Calorías/porción (kcal)</b>
Flax seed Linaza	Salvado de trigo, proteína de soya, linaza canadiense	2.2	42
Mi fibra diaria plus	Salvado de trigo, proteína de soya vitaminada, fibra de maguey	5	56
Forte	Salvado de trigo, proteína de soya vitaminada, algas marinas, fibra de maguey	2.7	52
Fibra xotzil	Salvado de trigo, proteína de soya	5	65
Jugo verde (xotzil)	Piña, apio, perejil, limón, nopal	5	60
Jugo verde (Solanum)	Sacarosa, maltodextrina, fructosa, salvado de trigo, nopal, perejil, apio, piña, psyllium, alga espirulina, linaza, goma xantana, ciruela	4.1	264

Jugo verde mix con rasperry (Solanum)	Sacarosa, maltodextrina, fructosa, salvado de trigo, nopal, perejil, Extractos de: acaí, goji, granada, guaraná	4	306
Jugo verde (mi fibra diaria)	Nopal, piña, apio, salvado de trigo, perejil	5	52
Super food, corazón de alcachofa	Sacarosa, salvado de trigo, maltodextrina, nopal, perejil, apio, linaza, jugo deshidratado de toronja y naranja, concentrado de ciruela, alcachofa, semillas de chia	4	252
Metamucil	polvo de cáscara de Plántago psyllium	2.4	No especificado
Nopal y linaza	Nopal, linaza, aislado de proteína de soya	5.6	57
Metabolix reset	Maltodextrina, proteína aislada de suero de leche, fibra de avena, microcelulosa	7	138
Fibragrass	Psyllium, linaza, salvado de trigo, piña, garcinia	3.2	43.24
Hiper linafrut	Diente de león, fenogreco, malva, flor de Jamaica, salvado de	8.5	171

	trigo, toronja, linaza canadiense		
Linaza con ciruela	Linaza canadiense, ciruela, alfalfa, nopal, fructosa	7.2	65
Linaza con piña	Linaza canadiense, piña, alfalfa, nopal, fructosa	No especificado	65
Linaza con nopal	Linaza canadiense, nopal alfalfa	2.5	74
Linaza con manzana integral	Linaza canadiense, manzana integral, alfalfa, nopal y fructosa.	6.1	120
Fibra Linat	Salvado de trigo, frambuesa, linaza, malva, toronja, papaya, nopal	5.6	45
Nopalzin	Nopal deshidratado	5	31.6

A partir de la información presentada es evidente hay una gran área de oportunidad en el desarrollo de nuevos suplementos alimenticios que representen efectos comprobados a la salud, con una buena proporción de fibra soluble e insoluble, así como con compuestos antioxidantes que ya tienen un reconocido efecto a la salud. De la misma manera el uso de subproductos agroindustriales provenientes de frutas como ingredientes primarios representa una ventaja frente a los productos que se encuentran en el mercado.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las empresas procesadoras de bebidas generan residuos ricos en compuestos bioactivos como fibra dietaria, vitaminas, compuestos fenólicos, carotenoides, entre otros. Lo anterior sugiere que los residuos de éstas matrices alimentarias pueden ser sumamente interesantes, ya que tienen alto potencial de aprovechamiento como ingredientes funcionales. Es por ello que en este trabajo se plantea dar un valor agregado a los subproductos de la elaboración de bebidas refrescantes como la Jamaica, los provenientes de empresas procesadoras de jugos y néctares, como mango y granada; y las vitivinícolas, principalmente uvas tintas. Para la mayoría de estos materiales ya se han reportado efectos benéficos sobre los factores de riesgo cardiovascular, y cada uno tiene un perfil diferente de fibra dietaria y de compuestos polifenólicos; por esto en este trabajo se pretende desarrollar un suplemento alimenticio elaborado a partir de las mezclas en polvo de estos materiales con el fin de tener un suplemento con una mayor variedad de compuestos.

Este producto pretende ser utilizado para el control de algunos factores de riesgo cardiovascular como dislipidemias, obesidad/sobrepeso, y resistencia a la insulina. Esto es de suma relevancia ya que las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en México. En los que respecta a los factores de riesgo cardiovascular, se reporta una prevalencia de diabetes de 15.9%, 27% para dislipidemias y de 38.8% para sobrepeso u obesidad (ENSANUT, 2012).

Con base en los suplementos existentes en el mercado, se estableció que el tipo de desarrollo de este suplemento sea una mezcla de materiales que permitan un mayor beneficio a la salud, pero que este sea aceptado por el consumidor, mejorando las características sensoriales, pues el público en general tiene una mala percepción de esta clase de productos. De los suplementos actuales del mercado, la mayoría, están compuestos por fibra proveniente de cereales, y no se considera la fibra proveniente de frutas que tiene un mayor contenido de fibra dietaria soluble, con mayores beneficios fisiológicos reportados. Por otro lado, estos suplementos no son



ricos en compuestos antioxidantes, por lo que el utilizar frutas, éstas aportarían mayor cantidad de estos antioxidantes, lo que le daría un valor agregado al producto que se pretende desarrollar. Además, algunos de estos suplementos aportan un gran contenido calórico a la dieta, siendo esto una característica indeseable, por lo que el utilizar edulcorantes con bajo contenido calórico, mejoraría sus propiedades asociadas a salud.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Suplementos alimenticios elaborado con diferentes proporciones de los subproductos de mango, uva, cálices de Jamaica y granada, debido a su elevado contenido de fibra dietaria, compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles tendrán un efecto diferencial sobre el control de algunos factores de riesgo cardiovascular, obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Diseñar y evaluar un suplemento alimenticio, a base de subproductos agroindustriales para la prevención de factores de riesgo cardiovascular en un estudio *in vivo*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el contenido de compuestos bioactivos y las características fisicoquímicas, funcionales de los subproductos de tuna, durazno, uva, mango, cálices de Jamaica y granada
- Determinar el efecto del proceso de decocción de los cálices de Jamaica sobre la prevención de factores de riesgo cardiovascular.
- Elaborar diferentes formulaciones del suplemento alimenticio en función de su composición de fibra insoluble y soluble, y compuestos antioxidantes
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las diferentes formulaciones del suplemento y desarrollar un estudio de vida de anaquel
- Evaluar en un modelo animal el efecto de diferentes formulaciones del suplemento sobre la obesidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina.

## VI. METODOLOGÍA

### Materiales

#### 6.1 Material químico

Para la fibra dietaria total se empleó el kit total dietary fiber assay de la marca Sigma Aldrich. Kits para la determinación en suero de glucosa, triglicéridos, colesterol HDL, LDL, colesterol total con kits enzimáticos de la marca Spinreact. Insulina con kit de ELISA de la marca Merck Millipore.

#### 6.2 Material biológico

Para el primer estudio *in vivo* que tenía como finalidad evaluar el efecto del consumo de los cálices de Jamaica y su subproducto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular se emplearon ratas Wistar machos de  $260 \pm 20$  g de peso corporal. En el caso de la evaluación de los suplementos sobre el control de obesidad, dislipidemias y resistencia a insulina se usaron ratas Wistar machos de  $180 \pm 20$  g de peso corporal. Los animales se adquirieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, y se alimentaron con croqueta comercial para rata marca Rodent lab chow de Purina.

##### 6.2.1 Manejo de los materiales a utilizar

Se recolectaron subproductos de la elaboración de jugo de mango de la Sociedad Cooperativa de Trabajadores de Pascual, S.C.L ubicada en San Juan del Río, Querétaro, México. El subproducto de mango, variedad manila, está constituido de cáscara y remanentes de pulpa adheridos a ésta.

El subproducto de uva u orujo se obtuvo de viñedos La Redonda, ubicado en Ezequiel Montes, Querétaro, México. Este es el residuo del prensado de los racimos de uva para obtener el vino. Está compuesto de piel, semillas y tallos.

El subproducto de Jamaica está compuesto de los cálices resultantes de la obtención del extracto acuoso concentrado (6% p/v, tiempo de decocción: 20 min) empleado para obtener agua de Jamaica AGUAQ.

Para la granada se empleó el subproducto generado en la elaboración de jugo de granada. Se evaluaron 5 selecciones: 399, 407, 397, Teco y Apaseo. Todas fueron donadas por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Forestales), Celaya, Guanajuato.

Se evaluaron de la misma manera 3 cultivares de tuna: cristal, selección y roja lisa, de estos materiales se evaluó la cáscara. Estos materiales igualmente fueron donados por el INIFAP.

## **6.2.2 Preparación de las muestras**

Los subproductos se secaron a una temperatura de 55 °C, posteriormente se molieron y guardaron en congelación protegidos de la luz (Saura-Calixto, 2013).

## **6.3 Caracterización de los subproductos**

### **6.3.1 Caracterización de compuestos bioactivos**

#### **6.3.1.1 Fibra dietaria total, soluble e insoluble**

El contenido de fibra dietaria total (FDT), soluble (FDS) e insoluble (FDI), se determinó por el método enzimático-gravimétrico (AOAC 985.29, 2002) utilizando un kit enzimático. Las muestras secas se gelatinizaron con  $\alpha$ -amilasa estable y luego se digirieron con proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón presente en la muestra. Las muestras se filtraron para obtener la FDI, para esto se realizaron lavados en el residuo con etanol 78 %, etanol 95 % y acetona; al primer filtrado, es decir antes de realizar los lavados, se les agregó cuatro volúmenes de etanol 95%, con el objetivo de precipitar la fibra soluble, posteriormente se dejaron todas las muestras reposando toda la noche. Al día siguiente se filtraron las muestras de la misma manera que para la FDI. Se dejaron secar a 100 °C toda la noche y al siguiente día se registró el peso. Se determinaron cenizas y proteína total por el

método de Kjeldahl en los residuos con la finalidad de realizar la corrección del contenido de FDS y FDI.

### **6.3.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos extraíbles**

Para la obtención del extracto se empleó la metodología descrita por Hassan, Ismail, Abdulhamid, y Azlan (2011), se pesó 0.5 g de muestra y se agregó 20 mL de una solución de metanol/agua (50:50) acidificada con HCl para obtener un pH final de 2, se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 1500 x g durante 4 °C y se recuperó el sobrenadante (extracto A). Al residuo se le agregó nuevamente una mezcla de 20 mL de acetona/agua (70:30), y se agitó a temperatura ambiente por 1 h, posteriormente se centrifugó por 10 min a 1500 x g y 4 °C, y se recuperó el sobrenadante (extracto B).

Se mezclaron ambos extractos A y B para realizar la determinación de fenoles totales, flavonoides, antocianinas y capacidad antioxidante, el residuo de la extracción se conservó para las determinaciones de polifenoles no extraíbles.

### **6.3.1.3 Determinación de fenoles totales**

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el método de Folin y Ciocalteu (Singleton *et al.* 1998). Se tomó una alícuota del extracto obtenido en el punto 6.3.1.2 de cada uno de los subproductos, la cual se colocó en microplaca y se completó el volumen a 25 µL con agua destilada, se adicionó 12.5 µL del reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se agitó durante 5 min, y luego se agregó 62.5 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad y finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm (Singleton *et al.* 1998).

La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico, y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de muestra (mg equivalentes AG/g de muestra).

#### 6.3.1.4 Determinación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides de los extractos obtenidos se estimó usando el método colorimétrico descrito por Heimler *et al.* (2006), con modificaciones. Del extracto obtenido en 6.3.1.2, 40  $\mu\text{L}$  se mezclaron con 7.5  $\mu\text{L}$  de solución de nitrito de sodio al 5%, 15  $\mu\text{L}$  de solución recién preparada de cloruro de aluminio al 10% y 50  $\mu\text{L}$  de solución de hidróxido de sodio 1 M. El volumen final de la mezcla se ajustó a 250  $\mu\text{L}$  con agua desionizada. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 510 nm. El contenido total de flavonoides se expresó como equivalentes catequina/g de muestra.

#### 6.3.1.5 Determinación de antocianinas

Las antocianinas totales se cuantificaron en el subproducto de Jamaica y en el orujo. Se empleó el método de diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Se emplearon dos soluciones amortiguadoras (KCl, 0.025N a pH 1.0 y  $\text{CH}_3\text{COONa}_3\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 M a pH 4.5). La cuantificación de las antocianinas totales se expresó como mg eq. cianidina 3 glucósido/g, para el subproducto de Jamaica y como mg eq. malvidina-3-glucósido/g para el orujo, se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{Abs}_{\text{total}} = [(\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (\text{Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{Abs}_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}] \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Antocianinas monoméricas} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot 1000 \cdot \text{factor de dilución}}{\epsilon \cdot \text{distancia}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

Abs= Absorbancia total

PM= Peso molecular: cianidina 3 glucósido 448.8 g/mol, malvidina-3-glucósido: 493.4 g/mol

$\epsilon$ = Coeficiente de extinción molar; cianidina 3 glucósido: 26900  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; malvidina-3-glucósido: 28000  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Distancia= 1 cm

### **6.3.1.6 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH'**

Este método fue desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995), se basa en la disminución de la absorbancia del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) por la acción de los antioxidante, ya que es susceptible de reaccionar con éstos a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. La absorbancia del radical DPPH, diluido en metanol, se ajustó entre 0.75 y 0.78 a una longitud de onda de 515 nm. El trolox se empleó como estándar y se realizó una curva de calibración (50-800  $\mu\text{M}$ ). Se mezcló 2.5  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido en 6.3.1.2, con 20.2  $\mu\text{L}$  de metanol y 200  $\mu\text{L}$  del radical DPPH, esta reacción se incubó durante 6 min y se leyó la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición (vida de anaquel de las formulaciones durante el almacenamiento) o como TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox,  $\mu\text{mol/g}$ ).

### **6.3.1.7 Antioxidantes macromoleculares**

#### **6.3.1.7.1 Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPA)**

La cuantificación de proantocianidinas no extraíbles se realizó mediante la hidrólisis ácida con *n*-butanol del residuo (pellet) de la extracción del subproducto (6.3.1.11), siguiendo el método establecido por Zurita *et al.* (2012). Los residuos se secaron y se mezclaron con 10 mL de HCl/butanol (5:95, v/v) que contiene 0.7 g de  $\text{FeCl}_3/\text{L}$  y se incubaron a 100 °C por 1 h. Los tubos se centrifugaron a 3500 g por 10 min, recuperando los sobrenadantes. Se realizaron dos lavados del precipitado con 5 mL de HCl/butanol/ $\text{FeCl}_3$  y el volumen final se aforó a 25 mL. Las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de 450 y 555 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de proantocianidinas por g de muestra seca empleando para esto una curva previamente reportada en la literatura hecha con un concentrado de proantocianidinas poliméricas aislado de la vaina del algarrobo.



### **6.3.1.7.2 Cuantificación de polifenoles hidrolizables**

Al residuo de la técnica de fenoles extraíbles descrita anteriormente y se añadió 22 mL de metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), se dejó incubar a 85 °C durante 20 h. Después de este tiempo se centrifugaron los tubos a 5000 x g por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un matraz de 50 mL. El residuo se lavó dos veces con 10 mL de agua destilada, se centrifugó, los sobrenadantes se juntaron y se enrasó el volumen a 50 mL. Para el caso de las 3 formulaciones desarrolladas el pH se ajustó a 5.5 con NaOH 6M, se centrifugaron a 5000 g por 10 min, posteriormente una alícuota de estos se concentró a vacío en un SpeedVac™ y finalmente se resuspendió en la fase móvil inicial (Cuadro 2). Los polifenoles hidrolizables se cuantificaron con la técnica descrita para los polifenoles totales (6.3.1.3). (Saura-Calixto *et al.* 2007)

### **6.3.1.8 Identificación y cuantificación de compuestos antioxidantes y mono-di sacáridos por HPLC-DAD, HPLC-DAD-MSD**

La siguiente metodología se llevó a cabo para los subproductos de uva, mango, tuna, durazno, Jamaica y granada.

- **Preparación de la muestra**

Para la extracción de compuestos fenólicos, 25 mg de muestra seca se mezcló con 500 µL de acetona/agua (70:30, v/v), durante 1 min, posteriormente se homogenizó en el politrón y se centrifugó a 20000 x g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y se volvió a realizar el proceso de extracción con el precipitado; el extracto se concentró a vacío en un SpeedVac™ y finalmente se resuspendió en 100 µL de la fase móvil inicial (Cuadro 2).

La extracción de carotenoides se realizó de la siguiente manera: 100 mg de muestra seca fue mezclada con 2 mL de hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v), y se agitó en vortex durante 1 min. Posteriormente se centrifugó (25000 x g, 5 min, 4 °C), el sobrenadante fue recuperado y se volvió a realizar el proceso de extracción con el

precipitado. El extracto se concentró a vacío en un SpeedVac™ y finalmente se resuspendió en 100 µL de la fase móvil inicial (Cuadro 2).

Para la extracción de fitoesteroles, 50 mg de muestra seca fue mezclada con 1000 µL de hexano, y se agitó en un vortex durante 1 min, posteriormente se centrifugó a 24000 x g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y se volvió a realizar el proceso de extracción con el precipitado. El extracto se concentró a vacío en un SpeedVac™, finalmente se resuspendió en 100 µL de la fase móvil.

Para los mono y disacáridos (determinados en los cálices y el subproducto de Jamaica), 50 mg de muestra seca fue mezclada con 1000 µL de agua destilada y homogenizada en el politrón durante 1 min, posteriormente se centrifugó (25000 g, 5 min, 4 °C). El sobrenadante fue recuperado y concentrado a vacío en un SpeedVac™ y finalmente se resuspendió en 100 µL de la fase móvil.

- **Análisis cromatográfico**

Los compuestos fueron identificados y cuantificados usando un sistema Waters 600 HPLC-DAD (detector con arreglo de diodos). La cuantificación se realizó usando estándares para ácidos fenólicos, flavonoides, fitoesteroles, y mono y di sacáridos. Como estándares se emplearon los ácidos fenólicos: clorogénico, gálico, cumárico, cafeico, sinápico, elágico, 4-hidroxibenzoico, protocatecuico, rosmarínico y ferúrico; para flavonoides: epigallocatequina galato, epicatequina, catequina, kaempferol, galocatequina galato, quercetina, eriocitrina, hesperidina, rutina, y el estilbeno resveratrol; para fitoesteroles β-sitosterol y luteína, zeaxantina, α-tocoferol β-criptoxantina y β-caroteno para carotenoides; los monosacáridos: fructosa, glucosa, sacarosa, kestosa.

El análisis fue llevado a cabo empleando un sistema Agilent 1200 HPLC-DAD conectado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo Agilent 1100 SL equipado con una interfaz de electrospray. Las muestras fueron inyectadas en una columna en fase reversa [Zorbax octadecylsilane (ODS-C18), 15x4.6 mm]. El espectrómetro fue operado en el modo negativo usando las siguientes condiciones: voltaje capilar, 4000

V; presión del nebulizador, 40 psi; velocidad de flujo de gas de secado, 10 L/min; temperatura del gas, 300 °C; voltaje del skimmer, 50 V; voltaje del octapolo, 150 V; y voltaje de fragmentador, 130 V (Lomas-Soria *et al.* 2015).

Para ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas la fase móvil fue (A) agua con 1% ácido fórmico:acetonitrilo (90:10) y (B) acetonitrilo, empleando un gradiente de elución detallándose en el Cuadro 2, con un flujo de 0.8 mL/min y 20 µL como volumen de inyección. Se realizó un re-acondicionamiento de la columna durante 5 min, por lo que el tiempo total de corrida fue de 30 min. Se empleó un detector con arreglo de diodos, DAD, y se leyó a las siguientes longitudes de onda: 280 (ácidos hidroxibenzoicos), 320 (ácidos hidroxicinámicos y estilbenos), 360 (flavonoides) y 520 nm (antocianinas). La temperatura de columna fue 40 °C y de la muestra 4 °C.

Para fitoesteroles la fase móvil fue (A) metanol y (B) agua con 1% acetonitrilo, empleando un gradiente de elución detallado en el Cuadro 2., con un flujo de 0.8 mL/min y 20 µL como volumen de inyección. Se realizó un reacondicionamiento de la columna durante 5 min. El tiempo total de corrida fue de 35 min y el detector empleado fue el DAD. La absorbancia se leyó a 205 nm; la temperatura de columna fue de 40 °C y de la muestra 4 °C.

**Cuadro 2.** Gradiente de elución para polifenoles y fitoesteroles

Polifenoles			Fitoesteroles		
Tiempo (min)	% A	% B	Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5	0	85	15
10	80	20	15	100	0
25	60	40	30	100	0

Para carotenoides la fase móvil consistió de (A) metanol y (B) acetonitrilo en una proporción (A/B) de (55/45) bajo condiciones isocráticas, con un tiempo total de 30 min. Las absorbancias fueron medidas a 290 nm ( $\alpha$ -tocoferol) y 450 nm (carotenoides), las muestras se inyectaron en una columna Phenomenex C18 (250 mm×4.6 mm) (Amaya-Cruz *et al.*, 2015).

Para los mono- y disacáridos la fase móvil fue agua, se usó un flujo de 0.5 mL/min con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L y se emplearon condiciones isocráticas por 15 min. Se usó un detector de infrarrojo a 35 °C. La temperatura de la columna fue 80 °C y de la muestra 25 °C. La columna utilizada fue Hi-plex de intercambio iónico 7.7 x 300 mm con un poro de 8  $\mu$ m.

### **6.3.2 Caracterización fisicoquímica y funcional de los subproductos**

#### **6.3.2.1 Densidad aparente**

Se determinó empleando una probeta graduada (10 mL) previamente pesada. Se llenó con la muestra hasta 10 mL. El contenido se pesó y por diferencia se obtuvo el peso de la muestra. La densidad aparente se calculó como g/mL (Chau y Huang, 2004).

#### **6.3.2.2 Capacidad de hinchamiento**

Se pesaron 0.5 g de muestra y se agregaron en una probeta graduada de 10 mL. Se agregaron 5 mL de agua destilada. Se agitó ligeramente para eliminar las burbujas de aire atrapadas. Se dejó 18 h a temperatura ambiente con la finalidad que la muestra se asentara. Finalmente se midió el volumen ocupado por la muestra (mL). La capacidad de hinchamiento se expresó como mL/g de muestra seca (Mateos-Aparicio *et al.* 2010).

#### **6.3.2.3 Capacidad de Retención de Agua (CRA)**

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Robertson *et al.* (2000). A 1 g de muestra se le añadió 30 mL de agua destilada y se dejó hidratar durante 18 h. Posteriormente se centrifugó a 3000 x *g* por 20 min y el precipitado se secó a peso constante. La CRA se expresó como la cantidad de agua retenida por gramo de muestra seca.

#### **6.3.2.4 Capacidad de Retención de Aceite (CRAC)**

Se llevó a cabo la misma metodología que para CRA, sustituyendo el agua por aceite vegetal. La CRAC se expresó como la cantidad de aceite retenido por gramo de muestra seca (Robertson *et al.*, 2000).

### **6.3.2.5 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA)**

Se pesaron 2.5 g de muestra y se adicionaron 50 mL de agua destilada, se agitó durante 30 min. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 3000 xg por 15 min. El sobrenadante se decantó y secó a 100 °C durante 24 h, y el gel retenido en los tubos se pesó (Anderson 1982). El ISA y el IAA se calcularon de la siguiente manera:

$$\text{ISA (\%)} = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

$$\text{IAA} = \frac{\text{Peso del gel}}{\text{Peso de la muestra} - \text{Peso seco del sobrenadante}}$$

## **6.4 Evaluación del efecto del consumo de cálices y subproducto de Jamaica sobre los factores de riesgo cardiovascular**

Debido a que no había reportes sobre el efecto del consumo del subproducto de Jamaica sobre la prevención de algunos de los factores de riesgo cardiovascular, este se evaluó en un modelo de obesidad con complicaciones.

### **6.4.1 Aclimatación de los animales de experimentación**

Las ratas se sometieron a un período de adaptación de una semana en el bioterio, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h cada uno, a temperatura y humedad controladas ( $25 \pm 2$  °C y  $55 \pm 15\%$  respectivamente) y con acceso libre a comida y agua. Los experimentos con animales se diseñaron de acuerdo al protocolo de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Querétaro, siguiendo los lineamientos estipulados en la NOM-062-ZOO-1999. El protocolo se aprobó por el comité de bioética con el número de oficio CBQ17/071.

### **6.4.2 Grupos experimentales**

Se formaron 4 grupos de 8 animales cada uno. El primer grupo (control negativo), se alimentó con dieta estándar. El segundo grupo (control positivo), se alimentó con la dieta alta en grasa y fructosa (AGF) La dieta estuvo constituida por 60.22% de croqueta comercial, o dieta estándar, 18.75% de manteca de cerdo,

18.75% de fructosa, 1% de minerales y 0.03% de vitaminas. La composición nutrimental de ambas dietas se presenta en el Cuadro 3. Para los dos grupos restantes, la dieta AGF se suplementó con los cálices de Jamaica en polvo y el subproducto. El grupo con los cálices de Jamaica se tuvo con el fin de evaluar el efecto del proceso de decocción sobre los efectos ya reportados para los cálices. El contenido de fibra se ajustó de tal manera que los animales tuvieran un consumo equivalente de fibra de 35 g por 2000 kcal que es el consumo recomendado para personas. El estudio se llevó a cabo durante 16 semanas, durante las que se midieron semanalmente el peso corporal y el consumo de alimento.

**Cuadro 3.** Composición nutrimental de la dieta estándar y alta en grasa, fructosa y colesterol

	<b>Dieta estándar (%)</b>	<b>Dieta alta en grasa, fructosa y colesterol (%)</b>
<b>Humedad</b>	3.8	2.3
<b>Proteína</b>	25.0	15.1
<b>Lípidos</b>	11.4	26.9
<b>Carbohidratos</b>	47.5	47.3
<b>Fibra</b>	5.3	3.2
<b>Minerales</b>	7.0	5.2

#### **6.4.3 Evaluación del cáliz y el subproducto de Jamaica como tratamiento preventivo para factores de riesgo cardiovascular**

Al final de la semana 16 de experimentación los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 horas. Se tomó una muestra de sangre por punción cardíaca y se centrifugó durante 10 min a 2500 xg para obtener el suero, éste se almacenó a -70 °C hasta su análisis. Además, se extrajeron hígado y tejido adiposo.

#### 6.4.3.1 Resistencia a insulina

- **Determinación de glucosa**

La cantidad de glucosa en suero se cuantificó con un kit enzimático de la marca Spinreact.

- **Cuantificación de insulina**

La cuantificación de la insulina se realizó en las muestras de suero utilizando un kit basado en el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de la marca Millipore. A partir del resultado obtenido se calculó el índice de resistencia a la insulina HOMA (homeostatic model assessment, por sus siglas en inglés), con el fin de determinar si los animales presentaron algún grado de resistencia a la insulina.

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina} \left( \frac{\mu\text{U}}{\text{ml}} \right) * \text{Glucosa} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22.5}$$

#### 6.4.3.2 Perfil lipídico

En el suero se cuantificó la concentración de triglicéridos y colesterol total, mediante kits enzimáticos (Spinreact).

#### 6.4.3.3 Análisis histológico

Una sección de hígado y de tejido adiposo fueron fijadas en formalina-solución amortiguadora al 10% y posteriormente embebida en parafina. Los tejidos fueron seccionados con un micrótopo y teñidos con hematoxilina y eosina, para ser posteriormente observados en un microscopio electrónico. Para cuantificar el tamaño de los adipocitos se empleó el software Zen.

#### 6.4.3.4 Cuantificación de triglicéridos en hígado y heces

La extracción de triglicéridos se llevó a cabo según el método de Norris *et al.* (2003). El contenido de triglicéridos fue cuantificado usando un kit enzimático de la marca Spinreact.

## 6.5 Formulación del suplemento

En la fase de conceptualización del suplemento se definieron las siguientes características del producto:

- **Alimento funcional:** Se buscaron las siguientes características en el suplemento:

Contenido de fibra dietaria total mayor al 50%, compuestos antioxidantes extraíbles: 2-5% peso seco y antioxidantes macromoleculares: 5-15% peso seco.

- **Nueva formulación:** Mezcla de FD de fuentes alternativas a los cereales y bajo en azúcar.
- **Aceptabilidad sensorial:** En lo que respecta a sabor, olor y granulosidad.

Así mismo se llevó a cabo un grupo de enfoque con diez personas relacionadas al posgrado de alimentos de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se empleó un grupo de enfoque con el fin de conocer diversos puntos de vista y opiniones y de esta manera identificar nuevas oportunidades respecto al producto que se buscaba desarrollar. En este caso el grupo estuvo dirigido hacia el producto, y al comienzo se les explicó a los participantes lo que era un suplemento alimenticio y posteriormente se les planteó 18 preguntas. La sesión se grabó tanto en audio como en video previa autorización de los participantes. Como resultado se encontró que las características deseadas en el producto son las siguientes:

- Sabor, olor y color agradable
- Fácil de disolver
- Producto natural libre de conservantes artificiales
- Sin apelmazamiento
- Poca turbidez
- Bajo en calorías
- Antioxidante

Se desarrollaron 3 formulaciones, a partir de los subproductos de mango, granada, uva y Jamaica, presentes en distintas proporciones. Así, la formulación 1 se caracterizó por un mayor contenido de uva (45%), la 2 por un mayor contenido de



Jamaica (45%) y la 3 de los subproductos de mango y granada (22.5%). Como aditivos se empleó sucralosa, ya que no aporta contenido calórico y es estable a pH ácido, y dióxido de silicio como anti aglomerantes. No se emplearon conservantes ya que se trata de un producto en polvo con una actividad de agua muy baja y con un pH ácido.

### **6.6 Identificación de polifenoles extraíbles e hidrolizables y ácidos orgánicos por UPLC-ESI-QTOF MS<sup>E</sup> en las formulaciones desarrolladas.**

Para la preparación de la muestra de los polifenoles extraíbles, se siguió el procedimiento del apartado 6.3.1.3, este se concentró al vacío en un SpeedVac<sup>TM</sup>, finalmente se resuspendió en la fase móvil. Para los polifenoles hidrolizables se empleó la metodología explicada en el apartado 6.3.1.5.2.

Para el perfil fitoquímico se empleó un UPLC acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con movilidad de iones (qTOF MS<sup>E</sup>) con una interfase de ionización por electrospray (ESI) (Vion; Waters Co, Milford, USA). Se empleó la metodología descrita por Rodríguez-González *et al.* (2018) con algunas modificaciones. 2  $\mu$ L de muestra se inyectó en una columna ACQUITY UPLC-BEH C18, (2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m) a 35°C. La fase móvil fue (A) agua con 0.1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico, el gradiente de elución se explica en el Cuadro 5, con un flujo de 0.4 mL/min. La adquisición de los datos se realizó empleando un espectrómetro de masas en modo positivo para las antocianinas y en modo negativo para los demás compuestos fenólicos y para los ácidos orgánicos. La ionización se realizó en un rango de masa de 50-1800 Da. El voltaje del capilar se estableció en 2 kV; la temperatura de la fuente en 120 °C; el nitrógeno se empleó como gas de solvatación a 800L/h y 450 °C, y de cono a 50 L/h. La energía de colisión baja se estipuló en 5 eV y una rampa de alta de 15 a 45 eV. Una solución de leucina-encefalina (50 pg/mL, 10  $\mu$ L/min) se empleó para la corrección de masa. La identificación de los fitoquímicos se llevó a cabo analizando su masa exacta (error de masa <10 ppm), su distribución isotópica y el patrón de fragmentación comparándolo con espectros de masa previamente reportado en la literatura.

**Cuadro 4.** Gradiente de elución para polifenoles extraíbles e hidrolizables

<b>Polifenoles</b>		
<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	95	5
2	95	5
22	5	95
25	5	95
27	95	5
30	95	5

## **6.7 Caracterización fisicoquímica y funcional de las formulaciones**

### **6.7.1 Color**

Las muestras en polvo se colocaron en cajas Petri en una capa uniforme y se registraron las lecturas correspondientes al espacio CIELAB a través de los parámetros de  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $L^*$  y  $h$ , empleando un colorímetro marca Minolta 2002.

### **6.7.2 pH**

Las muestras en polvo fueron diluidas en agua de acuerdo a la sugerencia de uso de acuerdo a la concentración de fibra por cada porción: a un volumen de 250 mL de agua se le adicionaron 12.2, 11.2 y 12.6 g de las formulaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Posteriormente se midió el pH empleando un potenciómetro de la marca Horiba.

### **6.7.3 Humectabilidad**

Se pesaron 10 g de cada formulación y se vaciaron sobre 100 g de agua destilada contenida en un vaso de precipitado de diámetro interno de 80 mm. Se determinó el tiempo al cual el polvo desapareció de la superficie. Este tiempo se conoce como tiempo de humectación. La prueba se realizó a la misma temperatura para todas las muestras, llegando a un tiempo máximo a los 60 min, ya que para algunos polvos puede ser necesario más que este tiempo para completar la humectación. Si el polvo es pobremente humectable, se medirá la cantidad de polvo

que no desaparece de la superficie del agua después de 1, 20 y 60 min. En estos casos se eliminó el polvo con cuidado de la superficie del agua con una cuchara, se secó y pesó para cuantificar la cantidad de polvo que no se hundió (Fitzpatrick *et al.*, 2016). El porcentaje de humectabilidad se estimó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de humectabilidad} = 100 \times \frac{\text{polvo hundido (g)}}{\text{polvo inicial (g)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

#### 6.7.4 Índice de dispersabilidad

La dispersabilidad es la capacidad del polvo para mojarse sin formar grumos en el agua. El índice de dispersabilidad se define como el porcentaje (%) de materia seca que pasa a través de un tamiz después de que es mezclada por un corto tiempo con una espátula. Para su medición se añadió 10 g de polvo en un vaso de precipitado de 250 mL con 100 mL de agua desionizada a 25 °C y luego se mezcló vigorosamente con una espátula durante 15 s con el fin de hacer 25 movimientos completos a lo largo del diámetro del vaso de precipitado. Después de eso, las muestras reconstituidas se vertieron sobre el tamiz de 250 micras para separar las partículas dispersadas en la suspensión en base a la medida de la dispersión, y las muestras que se pasaron por el tamiz se recolectaron para su posterior secado a 105 °C durante toda la noche. Al día siguiente la materia seca se pesó y se calculó el índice de dispersabilidad de la siguiente manera (Ji *et al.*, 2016):

$$\text{Índice de dispersabilidad} = \frac{P_{ms} + (100 + P_m)}{P_m + \frac{100 - H}{100}}$$

Donde:

$P_{ms}$  (% p/p): peso de la muestra seca después de tamizar

$P_m$ : peso de la muestra

$H$  (% p/p): es el contenido de humedad de la muestra

### **6.7.5 Índice de solubilidad en agua**

Se pesaron 2.5 g de muestra y se adicionaron 50 mL de agua destilada, se agitó durante 30 min. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 3000 xg por 15 min. El sobrenadante se decantó y secó a 100 °C durante 24 h. El ISA se calculó de la siguiente manera (Anderson 1982):

$$\text{ISA (\%)} = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

## **6.8 Estudio de vida de anaquel**

### **6.8.1 Descripción del producto**

Suplemento alimenticio en polvo rico en fibra dietaria (>50%) y compuestos antioxidantes (extraíbles: 2-5% y macromoleculares: 5-15% peso seco). Elaborado a partir de subproductos que fueron seleccionados en etapas anteriores de este proyecto, es decir: mango, uva, granada y cálices de Jamaica. Como ingredientes secundarios contiene sucralosa y dióxido de silicio. El producto se empacó en bolsas de aluminio laminado recubiertas con polietileno, con la finalidad de que fuera una barrera a la luz y a los gases. El diseño de almacenamiento fue reverso y cada muestreo se almacenó en congelación que es donde los procesos deteriorativos para este producto se hacen más lentos.

En este tipo de producto los principales eventos deterioradores: son cambios físicos como la ganancia de humedad, que se buscó disminuir a través de las características del empaque; y las reacciones oxidativas, las cuales causan la degradación de los compuestos bioactivos que son claves en este producto. Por lo tanto, el contenido de éstos fue el indicador crítico. Para este indicador, el límite de aceptabilidad (cutoff) se estableció como un contenido de compuestos polifenólicos extraíbles menor al 2%.

Para el estudio de vida de anaquel se almacenaron 15 g de las 3 formulaciones seleccionadas en bolsas de aluminio laminado recubiertas con polietileno de 15 x 15 cm. Para las condiciones de almacenamiento se evaluaron 3 temperaturas: 25, 35 y

45°C. Los muestreos se realizaron en los días 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 y 150. Se cuantificaron los compuestos fenólicos extraíbles (6.3.1.3), antocianinas (6.3.1.5), color (6.7.1), pérdida de peso (peso inicial-peso final), capacidad antioxidante (6.3.1.6), y en el día 150 del almacenamiento se cuantificaron antioxidantes macromoleculares (6.3.1.7.1 y 6.3.1.7.2) e índice de solubilidad en agua (6.7.5).

## **6.9 Evaluación del efecto del consumo de las tres formulaciones sobre los factores de riesgo cardiovascular**

Con la finalidad de determinar si las tres formulaciones desarrolladas presentan algún efecto para la prevención de factores de riesgo cardiovascular, éstas fueron evaluadas en un modelo de ratas macho Wistar con peso de 180 g provenientes del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla. Esta cepa es propensa a la obesidad, por lo que diversos autores recomiendan un tamaño de muestra de 8-10 animales por grupo con el fin de reducir la variabilidad e incrementar la confianza estadística. Los experimentos con animales se diseñaron de acuerdo al protocolo de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Querétaro, siguiendo los lineamientos estipulados en la NOM-062-ZOO-1999. El protocolo se aprobó por el comité de bioética con el número de oficio CBQ17/071.

### **6.9.1 Aclimatación de los animales de experimentación**

Las ratas se sometieron a un período de adaptación de una semana en el bioterio, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h cada uno, a temperatura y humedad controladas ( $20 \pm 2$  °C y  $55 \pm 15\%$  respectivamente) y con acceso libre a comida y agua.

### **6.9.2 Grupos experimentales**

Se formaron 5 grupos de 8 animales cada uno. Durante todo el experimento, se llevó a cabo el monitoreo de la conducta de los mismos. Los grupos que se formaron fueron los siguientes: el primer grupo (control) se alimentó con una dieta estándar Lab chow 5001 de Purina. El segundo grupo (control) se alimentó con una dieta hipercalórica; alta en grasa (20%), fructosa (18%), colesterol (1%) y colato de

sodio (0.25%), las dietas se ajustaron con caseína para tener 19% de proteína. Para los 3 grupos restantes, los suplementos se incorporaron a la dieta hipercalórica. De acuerdo a lo que se encuentra reportado, se ajustó el contenido de suplemento hasta obtener en la dieta un 8% de fibra. La dieta comercial contiene 3.33% de fibra, por lo tanto, las formulaciones se adicionaron en un 4.67%. Los animales consumieron éstas dietas durante 10 semanas que fue la duración del estudio. El consumo de agua y alimento fue *ad libitum*.

Cada 5 semanas se registró el consumo de alimento y cada semana el peso corporal, el cuál fue comparado con la curva de crecimiento publicada por Harlan para las ratas macho Wistar, ya que si algún animal pierde más del 20% de su peso deberá ser sacrificado.

### **6.9.3 Sacrificio**

Al final de la experimentación, los animales se mantuvieron en ayuno durante 10 a 12 h. A la mañana siguiente se sacrificaron por decapitación y se tomó una muestra de sangre que se centrifugó durante 10 min a 2500 xg para obtener el suero. Posteriormente se realizó una incisión con bisturí esterilizado desde el tórax hasta el ano, separando la piel y el músculo para tener acceso a las vísceras abdominales. Se llevó a cabo la recolección de tejido adiposo, aorta e hígado, los cuáles se lavaron con solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%). Una parte de estas muestras se almacenó en solución amortiguadora de formalina al 10% (pH 7.6) para los análisis histológicos y la restante a -70 °C hasta su posterior análisis.

### **6.9.4 Determinaciones en suero**

Se cuantificó glucosa y perfil lipídico: colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos, con kits enzimáticos de la marca Spinreact. Además, se cuantificó insulina con kit de ELISA de la marca Millipore.

### **6.9.5 Análisis histológico**

Una sección de hígado y de tejido adiposo fueron fijadas en formalina-solución amortiguadora al 10% y posteriormente embebida en parafina. Los tejidos fueron seccionados con un micrótomo y teñidos con hematoxilina y eosina, luego

observados en un microscopio electrónico. Para cuantificar el tamaño de los adipocitos se empleó el software Zen.

#### **6.9.6 Cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado y heces**

Para la extracción de lípidos se pesaron 100 mg de tejido congelado y se homogenizaron con 100  $\mu$ L de NaCl 0.15 M y 1000  $\mu$ L de cloroformo:metanol (2:1). Posteriormente, se incubó a -20 °C durante 4 h y las muestras se centrifugaron a 11 200 xg por 5 min a 4 °C. Finalmente la fase inferior se recuperó y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La cuantificación de triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL se llevó a cabo en este extracto empleando kit enzimáticos de la marca Spinreact.

En el caso de la extracción de lípidos en heces, se pesaron 50 mg de heces secas y molidas, que posteriormente se homogenizaron durante 1 min con 200  $\mu$ L de NaCl 0.9% y 800  $\mu$ L de cloroformo:metanol (2:1). Las muestras se centrifugaron a 7000 xg durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se incubó por 3 h a -20 °C. Pasado este tiempo las muestras se centrifugaron a 11 200 xg por 5 min a 4 °C, la fase inferior se recuperó y se evaporó hasta sequedad en el SpeedVac®. El contenido de colesterol y triglicéridos se determinó con kits enzimáticos.

#### **6.10 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) y los de las pruebas *in vivo* como la media  $\pm$  el error estándar (EE). Para los datos con distribución normal, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95% y la diferencia entre los subproductos y los tratamientos evaluados se realizó mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey. En los datos de vida de anaquel la comparación con el grupo control, se llevó a cabo por el método de Dunnett. Para los datos no paramétricos se empleó una comparación para todos los pares por el método de Steel-Dwass. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 10 y los gráficos de estrella se realizaron en R software





## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Caracterización de compuestos bioactivos de los subproductos de mango, durazno, Jamaica, tuna, orujo y granada

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de fibra dietaria total (FDT), soluble (FDS) e insoluble (FDI). El subproducto de Jamaica presentó hasta tres veces más FDT que los subproductos de tuna (19.1%) y mango (22.9%), y 1.7 veces más que el de durazno (39.5%). Sáyago-Ayerdi *et al.* (2014) caracterizaron los cálices resultantes de la decocción de 4 cultivares mexicanos de Jamaica y reportaron contenido de FDT, FDS y FDI de 40.7-45.7%, 7.1-10.9% y 29.8-37.8%, respectivamente. Éstos valores son menores a los obtenidos en este trabajo, y esto puede estar relacionado al proceso de decocción ya que dichos autores utilizaron tiempos más corto (5 min), en comparación a los 20 min a los cuales fue sometida la Jamaica de este estudio, posiblemente, a tiempos más prolongados se podrían lixiviar más componentes al agua y de esta forma concentrar la fibra dietaria. Además, el subproducto de Jamaica es un material que tiene una buena proporción de FDI:FDS.

El orujo de uva contiene 60.5% de FDT, sin embargo, presenta una baja cantidad de fibra soluble (2.89%). Estos resultados son similares a lo reportado por Tseng y Zhao (2013), quién encontró valores de 61.3% para FDT, 59.8% para FDI y 1.4% para FDS en orujo de uvas tinta de la variedad Pinot Noir. Las uvas tintan se caracterizan porque tienen un contenido de FDT mayor que las blancas (Deng *et al.*, 2011).

Respecto al subproducto de durazno este tiene 2 y 1.7 veces más concentración de FDT que los subproductos de tuna y mango, respectivamente. Este subproducto es importante ya que fue el de mayor proporción de FDS en relación a la FDT (29.2%). Grigelmo *et al.* (1999) evaluaron concentrados de fibra dietaria de varios subproductos industriales, entre ellos el durazno, y reportaron contenido de

FDT entre 30.7–36.1%, de los cuales el 23.8% corresponde a la FDI y el 12.3% a la FDS. Así mismo, Amaya-Cruz *et al.* (2015) evaluaron este mismo tipo de subproducto de durazno y reportan valores de 37.6%, 13.4% y 24.3% para FDT, FDS y FDI, respectivamente. Los anteriores valores son por tanto similares a los reportados en este trabajo.

En cuanto al subproducto de mango, que se encuentra compuesto principalmente por cáscara y remanentes de pulpa, presentó 47.88% de FDT, siendo significativamente mayor al contenido del subproducto de tuna y durazno. García-Magaña *et al.* (2013) cuantificaron el contenido de fibra dietaria de subproducto de mango de las variedades Ataulfo y Tommy Atkins, obteniendo valores de FDT de 22.5-24.5% para la pulpa y 23.6-38.7% para la cáscara, el contenido de FDS fue de 4.9-6.2% y 11.1-12.1% y para la FDI de 17.5-17.6% y 16.5-26.6%, para la pulpa y la cáscara respectivamente. El valor obtenido en este trabajo para FDT fue muy similar.

**Cuadro 5.** Contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble FDT, FDS y FDI de los subproductos

Material	Fibra dietaria total	Fibra dietaria soluble	Fibra dietaria insoluble	Relación FDI:FDS
Mango	47.88±1.05 <sup>b</sup>	15.13±0.25 <sup>a</sup>	32.75±0.80 <sup>c</sup>	68.4 : 31.6
Durazno	39.50±0.20 <sup>c</sup>	11.72±0.27 <sup>b</sup>	27.95±0.46 <sup>cd</sup>	70.8 : 29.2
Jamaica	67.16±0.78 <sup>a</sup>	18.44±0.13 <sup>a</sup>	48.43±0.72 <sup>b</sup>	72.1 : 27.9
Tuna roja lisa	19.09±0.87 <sup>d</sup>	4.37±0.49 <sup>cd</sup>	14.72±0.59 <sup>e</sup>	77.1 : 22.9
Orujo de uva	60.51±0.04 <sup>a</sup>	2.89±0.52 <sup>d</sup>	57.62±0.48 <sup>a</sup>	95.2 : 4.8

Los valores se expresan en porcentaje en base a materia seca y representan la media ± DE. Determinaciones con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en el mismo renglón indican diferencia significativa (p=0.05) (Prueba de Tukey-Kramer).

El subproducto de tuna tuvo el menor contenido de FDT, Jiménez-Aguilar *et al.* (2015) reportaron para cáscara de tunas rojas contenido de FDT, FDS y FDI de 43-51%, 10-19% y 28-35% respectivamente, siendo aproximadamente el doble a lo

encontrado en este trabajo, éstas diferencias pueden atribuirse a la variedad de cultivo.

En todos los subproductos, la FDI fue la fracción más abundante en relación a la FDT. El orujo presentó la mayor proporción (95%), seguido de la tuna (77%), el mango (77%), la Jamaica (72%) y el durazno (71%) (Cuadro 5). Sin embargo, la fracción de FDS, fue mayor para todos los subproductos que la encontrada en el salvado de algunos cereales (2-4%) (Grigeldo-Miguel *et al.*, 1999), a excepción del orujo.

Tanto la FDI como la FDS, tienen un efecto fisiológico diferente, por lo tanto ambas se deben consumir en proporciones adecuadas, con la finalidad de lograr un comportamiento sinérgico; se recomienda consumir ambas fracciones en una relación de 70:30 a 50:50 (FDI:FDS), con el fin de maximizar los beneficios de cada fracción (Schneeman 1987). Todos los subproductos, excepto el orujo de uva, se encuentran dentro de éstos valores (Cuadro 5). Éstas proporciones, (70:30, 50:50), son las que se encuentran de forma general en las frutas, por ello es que se considera que es más completa la fibra dietaria de las frutas porque tiene mayor contenido de FDS y por lo tanto, se le ha relacionado con mayor cantidad de efectos fisiológicos.

La fibra dietaria insoluble se encuentra relacionada con la regulación intestinal, la absorción de agua y un aumento de la masa fecal (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006), además de una disminución de la ganancia de peso corporal y mejora de la resistencia a la insulina a través de un aumento de oxidación de ácidos grasos en hígado (Isken *et al.*, 2010). En el caso de la FDS al mezclarse con el agua se incrementa su viscosidad, esta propiedad es la encargada de retardar el vaciamiento gástrico, así como, de disminuir la absorción de nutrientes como la glucosa, lípidos y colesterol en el intestino delgado, pues al unirse a éstos reduce su liberación (Klont 2000). Así mismo, retarda la acción de enzimas digestivas como la alfa amilasa (Ou *et al.*, 2001), disminuyendo así la glicemia postprandial.

La fibra dietaria tiene asociados compuestos polifenólicos, éstos destacan como agentes bioactivos que previenen o disminuyen el desarrollo de enfermedades crónicas (Keith y Christy, 2010). Se clasifican como extraíbles, que son aquellos que son solubles en solventes orgánicos, o como antioxidantes macromoleculares, que permanecen retenidos en el residuo de la extracción (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2015). De los extraíbles, el subproducto de mango fue el que presentó mayor concentración 97.28 mg Eq. AG/g (Cuadro 6), éstos resultados son similares a lo reportado por Ajila *et al.* (2007) quienes analizaron un extracto acetónico de la piel del mango. Igualmente Ajila y Prasada (2013) evaluaron mangos en diferentes estados de madurez de las variedades Raspuri y Badami y encontraron valores de 54.6-109.7 mg Eq AG/g.

**Cuadro 6.** Contenido de compuestos fenólicos extraíbles de los subproductos

Material	Compuestos fenólicos <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>2</sup>
Mango	97.28±9.69 <sup>a</sup>	9.94±0.21 <sup>b</sup>
Durazno	10.14±1.09 <sup>c</sup>	3.01±0.20 <sup>d</sup>
Subproducto de Jamaica	6.83±0.18 <sup>d</sup>	5.44±0.24 <sup>c</sup>
Tuna roja lisa	9.64±0.50 <sup>cd</sup>	2.45±0.29 <sup>d</sup>
Orujo de uva	27.75±2.20 <sup>b</sup>	26.25±0.29 <sup>a</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p=0.05) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>Compuestos fenólicos (mg Equivalentes de ácido gálico/g). <sup>2</sup>Flavonoides (mg Equivalentes de catequina/g).

Después del subproducto de mango, el orujo de uva presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles (Cuadro 6), presentando el doble que el subproducto de tuna y durazno y 5 veces más que el de Jamaica. Deng *et al.* (2011) reportaron valores de 21.4–26.7 mg Eq AG/g para extractos de acetona:agua (70:30, v/v) acidificado con 0.1% de orujo de uva de variedades tintas, siendo esto casi el doble en lo encontrado para variedades blancas (11.6–15.8 mg AG/g). Así mismo de la variedad Cabernet Sauvignon, se han reportado valores mayores que los encontradas en este trabajo (74.75 mg AG/g); sin embargo, esta es una de las variedades que mayor concentración de compuestos fenólicos se le ha reportado

(Rockenbach *et al.*, 2011). El orujo de uva presentó la mayor concentración de flavonoides (26.2 mg Eq Cat/g) en comparación con los demás subproductos.

Los subproductos de durazno y tuna mostraron concentraciones similares de compuestos fenólicos (9.64-10.14 mg Eq AG/g) y flavonoides (2.45-3.01 mg Eq Cat/g), respectivamente.

Para durazno se ha reportado un contenido de compuestos fenólicos de 7.12 a 8.81 para la pulpa y de 12.09 a 13.54 mg Eq AG/g para la piel. Estos resultados dependen de la variedad estudiada (Manzoor *et al.*, 2012) y son similares a los encontrados en este trabajo, ya que el subproducto es una mezcla de piel y pulpa. Estos mismos autores cuantificaron los flavonoides totales, y reportaron valores entre 5.99-7.85 para la piel, y 3.01-4.99 mg CE/g para la pulpa, el resultado de este trabajo es también similar a los valores reportados para la pulpa (3.01 mg Eq Cat/g).

Durante el proceso de elaboración de agua de Jamaica parte de los compuestos polifenólicos extraíbles se solubilizan a la bebida y los restantes continúan en el subproducto. Este subproducto fue el que presentó la menor concentración de compuestos fenólicos, 6.83 mg GAE/g. Sayago-Ayerdi *et al.* (2007) reportaron contenidos de 5.3 mg GAE/g hasta el 13.4 mg GAE/g para residuos de decocción de diferentes cultivares de flor de Jamaica mexicana, valores similares a lo encontrado en este trabajo (6.8 mg GAE/g). Respecto al contenido de flavonoides, este fue significativamente mayor al de durazno y la tuna, siendo 1.7 y 2.2 veces mayor, respectivamente. No existen reportes de flavonoides en este residuo, solamente en cálices. En los cálices Borrás-Linares *et al.* (2015) reportaron contenidos de 4.19 hasta 22.6 mg Eq de quercetina/g.

También se cuantificaron las antocianinas monoméricas por la técnica de pH diferencial y se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p= 0.05$ ) entre el subproducto de Jamaica y el orujo. En contraste, al contenido de fenoles, el subproducto de Jamaica tuvo 5 veces más antocianinas que el orujo (Cuadro 7). Durante el proceso de decocción parte de las antocianinas se solubilizan en la bebida

de Jamaica y las demás quedan retenidas en los cálices. Además éstos compuestos se pueden degradar durante el tratamiento térmico debido la hidrólisis de enlaces glucosídicos, seguido de la conversión de las agliconas en chalconas que finalmente resultan en  $\alpha$ -diacetona (Marston y Hostettmann, 2006). Hasta el momento no se había reportado el contenido de antocianinas del subproducto de Jamaica.

En cuanto al contenido de antocianinas del orujo, este fue 5.1 veces menor que el de la Jamaica; se ha reportado concentraciones de antocianinas de 0.89 mg Eq de malvidina 3 glucósido/g para orujo de la variedad Cabernet Sauvignon (Deng *et al.*, 2011). La diferencia con lo encontrado en este trabajo puede deberse a diferentes condiciones en el proceso de elaboración del vino, así como en las condiciones edafoclimáticas del viñedo.

**Cuadro 7.** Contenido de antocianinas y betalaínas en los subproductos

Material	Antocianinas <sup>1</sup>	Betalaínas	
		Betaxantinas <sup>3</sup>	Betacianinas <sup>4</sup>
Mango	ND	ND	ND
Durazno	ND	ND	ND
Jamaica	12.139±0.11 <sup>a</sup>	ND	ND
Tuna roja lisa	ND	22.997±0.27	0.258±0.00
Orujo de uva	20.412±0.06 <sup>b</sup>	ND	ND

Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de t-student). <sup>1</sup>Antocianinas (mg Equivalentes de cianidina 3 glucósido/g). <sup>2</sup>Antocianinas (mg Equivalentes de malvidina 3 glucósido/g) <sup>3</sup>Betaxantinas ( $\mu$ g equivalentes de betaxantina/g). <sup>4</sup>Betacianinas ( $\mu$ g equivalentes de betacianina/g). ND. No detectada

Se ha reportado, en estudios de intervención, que el consumo de antocianinas mejora la sensibilidad a la insulina, el perfil de lipoproteínas, incluyendo un aumento del HDL y una reducción del LDL; disminuye la actividad de la CETP y los niveles de la proteína C reactiva ultrasensible, moléculas de adhesión (sVCAM-1) y citocinas proinflamatorias; además tiene un efecto antioxidante al reducir los niveles de LDL oxidada, malondialdehído y radicales libres. Su consumo por pacientes con diabetes

tipo 2 les reduce la glucosa en ayuno y les aumenta la concentración de adiponectina en suero (Guo y Ling, 2015).

Finalmente, el subproducto de tuna fue el único material en el cual se detectaron betalaínas (Cuadro 7). Jiménez-Aguilar *et al.* (2015) reportaron que en frutos de tuna, éstas se concentran principalmente en la pulpa, seguido de la cáscara y finalmente en las semillas. En variedades rojas, Rojo San Martín y Rojo Cenizo, se encontraron valores de 144.3-834.3 µg eq betaxantina/g y 163.5-1346.8 µg equivalentes de betacianina/g, valores inferiores a lo reportado en este trabajo.

Como parte de la caracterización nutracéutica de los subproductos se realizó la cuantificación detallada de compuestos fenólicos, en la que se incluyó 10 ácidos fenólicos, 6 flavanoles, 2 flavononas, un flavonol y un estilbeno (Cuadro 8). El subproducto de durazno presenta como componentes mayoritarios los ácidos clorogénico y gálico, epicatequina y catequina, mientras que, para mango, los principales compuestos fueron el ácido clorogénico, gálico, cafeico y ferúlico, epicatequina y rutina. Los ácidos clorogénico y gálico, la epicatequina, la catequina y el resveratrol fueron los más abundantes para el orujo; el ácido clorogénico, la epicatequina y la catequina, para Jamaica y los ácidos clorogénico y gálico para la tuna.

Mercado-Mercado *et al.* (2015) reportaron en residuos de decocción como principales compuestos polifenólicos al ácido siríngico, la catequina y el ácido clorogénico, similar a lo reportado en este trabajo.

En el subproducto de durazno, el contenido de ácido elágico y rosmarínico, galocatequina galato y quercetina fue significativamente mayor que los demás subproductos. Así mismo, en el mango, las concentraciones de ácido gálico, cafeico, 4-hidroxibenzoico y protocatecuico, kaempferol, hesperidina y rutina fueron significativamente mayor que para los demás materiales. En cuanto al orujo de uva, ácido sinápico, epicatequina, eriocitrina y resveratrol fueron mayores; las variaciones en el perfil con lo ya reportado para orujo de uva pueden deberse a la variedad, el

lugar de cultivo, el clima, la madurez y el tiempo de fermentación (Yu y Ahmedna, 2012).

El contenido de ácido clorogénico y catequina de la tuna fue significativamente mayor que para los demás subproductos, y la epigalocatequina galato para la Jamaica (Cuadro 8).

El ácido clorogénico y el gálico fueron los ácidos fenólicos más abundantes en los subproductos. El ácido clorogénico es uno de los más abundantes en la dieta y la evidencia sugiere que modula el metabolismo de lípidos y carbohidratos; potencializa la acción de la insulina (estudio *in vivo*), disminuye la absorción intestinal de glucosa (estudio *in vivo*), además estimula el ingreso de glucosa a los adipocitos (estudio en células). También disminuye la ganancia de peso corporal y la acumulación de grasa visceral a través de la inhibición de la absorción de lípidos y la activación del metabolismo lipídico en hígado (estudio *in vivo*) (Meng *et al.*, 2013)

El ácido gálico tiene una reconocidos efectos benéficos a la salud; Huang *et al.* (2015) administraron en ratas wistar alimentadas con una dieta alta en fructosa (66%), 10 o 30 mg de ácido gálico/kg de peso corporal y encontraron que disminuyó la hiperglicemia y mejoró el metabolismo de glucosa en el hígado, todo esto debido a una sobrerregulación de proteínas involucradas con la transducción de la señal de insulina en el hígado, incluyendo el receptor de insulina, IRS1, fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), AKT/PKB y GLUT 2; además en hígado, disminuyó la expresión de fructosa 1,6-bifosfatasa (gluconeogénesis) y sobrerreguló proteínas relacionadas con la glucólisis: hexocinasa, fosfofructocinasa y aldolasa. Por lo tanto, se espera que los subproductos, especialmente los de mango y Jamaica, tengan esta actividad.



**Cuadro 8.** Concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de compuestos fenólicos en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD

Compuestos polifenólicos	Tiempo de retención	Durazno	Mango	Orujo	Jamaica	Tuna
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Clorogénico	2.1	151.36 $\pm$ 1.45 <sup>c</sup>	170.55 $\pm$ 5.58 <sup>b</sup>	84.61 $\pm$ 2.58 <sup>d</sup>	69.76 $\pm$ 3.51 <sup>e</sup>	210.57 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>
Gálico	4.4	83.15 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	334.05 $\pm$ 8.83 <sup>a</sup>	168.62 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	4.14 $\pm$ 0.20 <sup>e</sup>	22.67 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>
Cumárico	16.1	DLD	7.75 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.37 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
Cafeico	12.3	4.28 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	74.10 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	1.40 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.35 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>
Sinápico	19.1	DLD	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>
Elágico	29.7	6.47 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	DLD	2.80 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.88 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	2.87 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>
4-hidroxibenzoico	9.8	9.13 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	3.19 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	4.33 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Protocatecuico	14.3	1.06 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	12.05 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Rosmarínico	26.6	0.09 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	DLD	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Ferúlico	18.7	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	70.05 $\pm$ 9.71 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
<b>Flavonoides: flavanoles</b>						
Epigallocatequina galato	25.6	0.85 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	DLD	0.40 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.21 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Epicatequina	2.4	27.51 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	232.70 $\pm$ 7.49 <sup>b</sup>	506.53 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	18.63 $\pm$ 0.46 <sup>cd</sup>	7.94 $\pm$ 0.23 <sup>d</sup>
Catequina	3.0	33.74 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	18.15 $\pm$ 0.21 <sup>bc</sup>	29.12 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	34.69 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	83.73 $\pm$ 9.64 <sup>a</sup>

Kaempferol	13.1	DLD	0.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	DLD	0.04 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>ab</sup>
Galocatequina galato	24.8	0.16 ± 0.00 <sup>a</sup>	DLD	0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>
Quercetina	27.8	12.93 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.69 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.27 ± 0.76 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.15 <sup>c</sup>
<b>Flavonoides: flavononas</b>						
Eriocitrina	19.4	0.05 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>bc</sup>	DLD
Hesperidina	24.2	DLD	4.94 ± 0.24	DLD	DLD	DLD
<b>Flavonoides: Flavonoles</b>						
Rutina	20.4	15.70 ± 0.38 <sup>b</sup>	129.67 ± 2.48 <sup>a</sup>	4.03 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.85 ± 0.16 <sup>c</sup>	1.50 ± 0.18 <sup>c</sup>
<b>Estilbenos</b>						
Resveratrol	33.5	DLD	DLD	97.62 ± 1.70 <sup>a</sup>	DLD	DLD

Datos expresados como media ± DE. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).  
DLD: Debajo del Límite de Detección

**Cuadro 9.** Identificación de compuestos fenólicos en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD-MS

Compuestos polifenólicos	Tiempo de retención	Durazno (mAbs)	Mango (mAbs)	Orujo (mAbs)	Jamaica (mAbs)	Tuna (mAbs)
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Cinámico	13.7	23.70 ± 1.18 <sup>b</sup>	209.27 ± 8.07 <sup>a</sup>	DLD	7.89 ± 0.35 <sup>c</sup>	6.60 ± 0.33 <sup>c</sup>
Caftárico	14.2	120.43 ± 1.69 <sup>b</sup>	128.35 ± 9.71 <sup>b</sup>	178.77 ± 4.88 <sup>a</sup>	26.24 ± 2.39 <sup>e</sup>	52.69 ± 2.35 <sup>d</sup>
Cutárico	20.9	DLD	DLD	220.03 ± 7.44 <sup>a</sup>	DLD	DLD
Siríngico	23.6	17.52 ± 1.09 <sup>a</sup>	13.35 ± 0.23 <sup>a</sup>	16.83 ± 2.14 <sup>a</sup>	15.32 ± 1.51 <sup>a</sup>	16.57 ± 1.81 <sup>a</sup>
<b>Flavonoides: flavanoles</b>						
Procianidina B2	21.2	61.66 ± 2.58 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.07 <sup>c</sup>	7.11 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.89 ± 0.22 <sup>bc</sup>
Procianidina B1	13.4	16.51 ± 3.63 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.14 <sup>b</sup>	17.23 ± 1.65 <sup>a</sup>	2.92 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.12 <sup>b</sup>

DLD: Debajo del Límite de Detección

Además de los compuestos fenólicos cuantificados por HPLC-DAD empleando estándares, se identificaron, por HPLC-DAD-MS, 4 ácidos fenólicos y 2 flavanoles (Cuadro 10); para completar el perfil los que se buscaron fueron diferentes a los que ya se habían cuantificado previamente por HPLC-DAD. De éstos, el ácido cinámico se encuentra principalmente en el mango, el ácido caftárico y cutárico en el orujo, el ácido siríngico no presentó diferencia estadística significativa entre los subproductos. En relación a los flavonoides, la procianidina B1 es mayoritaria en los subproductos de durazno y uva, y la procianidina B2 en el durazno.

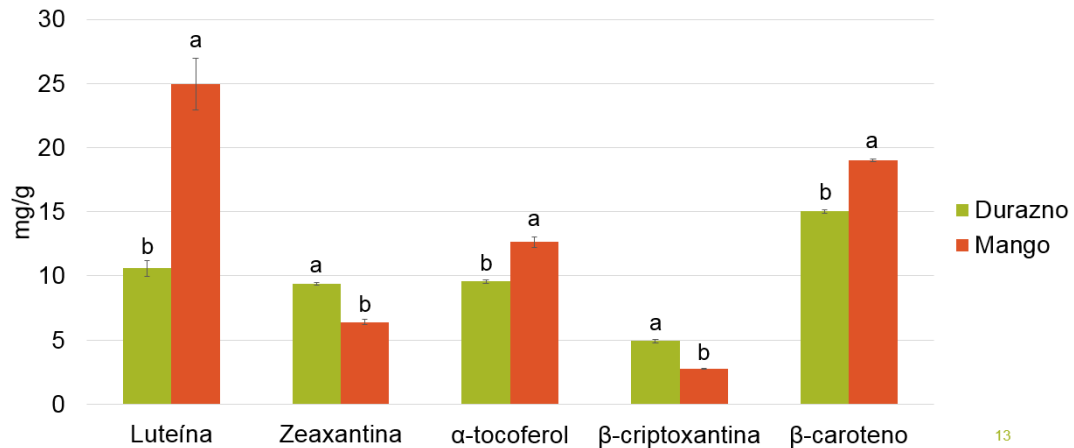
**Cuadro 10.** Concentración (ng/g) de antocianinas en los subproductos de uva y Jamaica

Antocianinas	Tiempo de retención	Orujo	Jamaica
Delfinidina-3-glucósido	9.3	2.42±0.006 <sup>b</sup>	6.20±0.05 <sup>a</sup>
Cianidina-3-glucósido	11.2	0.86±0.02 <sup>b</sup>	3.58±0.18 <sup>a</sup>
Malvidina-3-glucósido	12.6	4.49±0.03 <sup>a</sup>	2.73±0.23 <sup>b</sup>
Peonidina-3-glucósido	12.9	1.47±0.02 <sup>a</sup>	1.16±0.10 <sup>b</sup>
Delfinidina-3-acetilglucósido	14.0	0.97±0.02	DLD
Cianidina-3-acetilglucósido	14.6	DLD	0.38±0.06
Peonidina-3-acetilglucósido	15.3	1.79±0.06	DLD
Malvidina-3-acetilglucósido	15.8	0.97±0.02	1.09±0.15
Delfinidina-3-p-cumarilglucósido	16.5	2.37±0.04 <sup>b</sup>	3.23±0.11 <sup>a</sup>
Cianidina-3-p-cumarilglucósido	16.9	3.35±0.04 <sup>a</sup>	2.01±0.12 <sup>b</sup>
Peonidina-3-acetilglucósido	17.6	1.02±0.02	0.93±0.08
Malvidina-3-acetilglucósido	18.2	0.87±0.00 <sup>a</sup>	0.51±0.08 <sup>b</sup>

Los valores representan la media ± DE. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con la prueba *t* de student. DLD: Debajo del Límite de Detección

Así mismo, se cuantificaron las antocianinas en el subproducto de uva y Jamaica por HPLC-DAD (Cuadro 10). La malvidina-3-glucósido, la cianidina-3-p-cumarilglucósido, delfinidina-3-p-cumarilglucósido y la delfinidina-3-glucósido fueron

mayoritarias en el orujo de uva, siendo la malvidina-3-glucósido la que presentó una concentración superior (4.49 ng/g), como ya se ha reportado en orujo de uva (Yu y Ahmedna, 2012). En este, el contenido de antocianinas varía con el método de vinificación y los tiempo de contacto; cuanto más largo el tiempo de contacto, menor será el contenido de antocianinas que permanece en el orujo (Gómez-Plaza *et al.*, 2006). Por otro lado, la delfinidina-3-glucósido, la delfinidina-3-p-cumarilglucósido, la cianidina-3-glucósido y la peonidina-3-glucósido fueron las más abundantes del subproducto de Jamaica. Las antocianidinas más frecuentes reportadas en los cálices de Jamaica, son cianidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-sambubiosido, y delfinidina-3-sambubiosido (Borrás-Linares *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta el momento no se había reportado el contenido de antocianinas en subproductos de cálices de Jamaica.



**Figura 2.** Contenido de carotenoides en los subproductos de durazno y mango. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

Se cuantificaron los carotenoides en los subproductos de mango y durazno (Figura 2). De los carotenos cuantificados,  $\beta$ -caroteno y luteína fueron los más abundantes en los subproductos de mango y durazno, aunque el mango presentó dos veces más luteína que el durazno. De igual manera, la  $\beta$ -criptoxantina se encontró en menor cantidad en los dos subproductos. Luteína,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -

caroteno fueron significativamente mayores en mango, mientras que zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina lo fueron en durazno.  $\beta$ -caroteno y luteína son de los carotenoides con mayor propiedades antioxidantes, siendo muy activos contra especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Igielska-Kalwat *et al.*, 2015). En este mismo sentido, se ha reportado que la luteína es muy efectiva para reducir la oxidación de las LDL e inhibe la respuesta inflamatoria de los monocitos a las LDL atrapada en la pared arterial (Dwyer *et al.*, 2001). En lo que respecta a la identificación de carotenoides, en el subproducto de mango se identificaron fitoflueno, luteoxantina,  $\gamma$ -tocoferol y zeinoxantina; de igual manera y similar a lo reportado por Amaya *et al.* (2015) solo el subproducto de durazno presentó  $\gamma$ -caroteno y  $\zeta$ -caroteno (Cuadro 11).

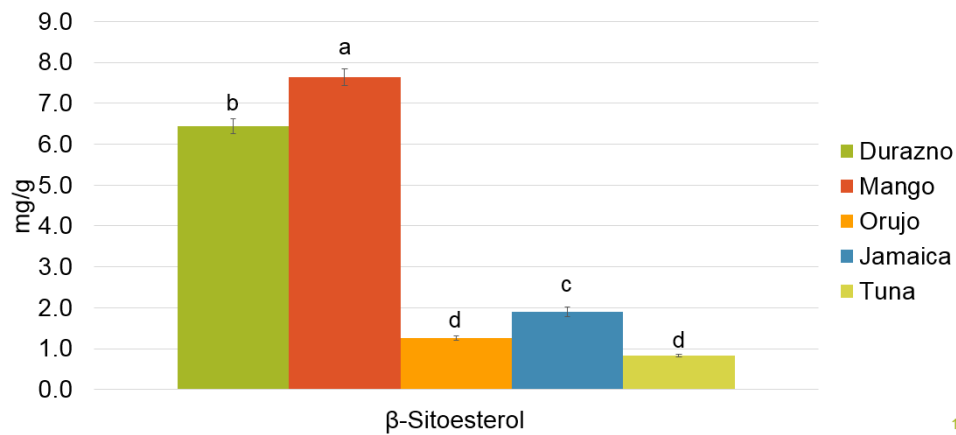
**Cuadro 11.** Identificación de carotenoides en subproductos de durazno y mango

Carotenoides	Tiempo de retención (min)	Durazno (mAbs)	Mango (mAbs)
Fitoflueno	2.1	DLD	3.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Fitoeno	2.6	6.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
Violaxantina	5.8	1.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	7.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Luteoxantina	6.1	DLD	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
$\gamma$ -Tocoferol	6.4	DLD	22.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>
Zeinoxantina	9.9	DLD	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Neoxantina	10.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
Neocromo	13.1	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
$\gamma$ -Caroteno	22.6	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	DLD
$\zeta$ -Caroteno	27.0	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	DLD

Los valores son áreas y se expresan en mAbs y representan la media  $\pm$  DE. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con la prueba *t* de student. DLD: Debajo del Límite de Detección

En relación a los fitoesteroles, se cuantificó  $\beta$ -sitoesterol en todos los subproductos, presentando el mango el mayor contenido (7.6 mg/g) seguido del durazno (6.4 mg/g). El mango tuvo 4.0, 6.1 y 9.2 veces más fitoesteroles que Jamaica, orujo y tuna, respectivamente (Figura 3).

Entre los fitoesteroles identificados brasicasterol, ergosterol,  $\beta$ -campesterol y campesterol-3- $\beta$ -glucopiranosido fueron mayoritarios en el subproducto de durazno, fucosterol y  $\Delta$ 7-avenasterol en mango, estigmastanol y sitoesteril-3- $\beta$ -glucopiranosido en orujo, y  $\Delta$ 7-estigmasterol en tuna (Cuadro 13). Se ha reportado que los fitoesteroles disminuyen el colesterol LDL al desplazar el colesterol de las micelas mixtas en el intestino delgado de modo que inhibe parcialmente la absorción del colesterol (Gylling y Simonen, 2015).



**Figura 3.** Contenido de  $\beta$ -Sitoesterol en los subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

**Cuadro 12.** Identificación de fitoesteroles en subproductos de durazno, mango, orujo, Jamaica y tuna por HPLC-DAD-MS

Fitoesteroles	Tiempo de retención	Durazno (mAbs)	Mango (mAbs)	Orujo (mAbs)	Jamaica (mAbs)	Tuna (mAbs)
Brasicasterol	2.3	17.49 ± 0.25 <sup>a</sup>	10.99 ± 0.42 <sup>b</sup>	10.27 ± 0.27 <sup>b</sup>	6.91 ± 0.33 <sup>c</sup>	6.12 ± 0.21 <sup>c</sup>
Ergosterol	2.7	14.41 ± 1.18 <sup>a</sup>	3.07 ± 0.18 <sup>c</sup>	7.81 ± 0.02 <sup>b</sup>	3.56 ± 0.54 <sup>c</sup>	5.10 ± 0.08 <sup>c</sup>
Fucosterol	3.0	7.97 ± 0.13 <sup>b</sup>	9.56 ± 0.29 <sup>a</sup>	5.60 ± 0.37 <sup>c</sup>	2.01 ± 0.17 <sup>d</sup>	6.12 ± 0.20 <sup>c</sup>
β-Campesterol	4.1	42.59 ± 1.05 <sup>a</sup>	28.14 ± 1.56 <sup>b</sup>	23.25 ± 2.27 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.19 <sup>c</sup>	3.26 ± 0.19 <sup>c</sup>
Δ5-Avenasterol	5.3	1.44 ± 0.15 <sup>d</sup>	LDL	5.39 ± 0.37 <sup>a</sup>	3.18 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.22 <sup>c</sup>
Δ7-Estigmasterol	5.9	8.20 ± 0.25 <sup>b</sup>	1.34 ± 0.29 <sup>d</sup>	3.13 ± 0.03 <sup>cd</sup>	5.18 ± 0.21 <sup>c</sup>	16.03 ± 1.15 <sup>a</sup>
Δ7-Avenasterol	6.4	7.46 ± 0.42 <sup>b</sup>	8.84 ± 0.27 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.12 <sup>d</sup>	4.49 ± 0.39 <sup>c</sup>	3.11 ± 0.04 <sup>d</sup>
Estigmastanol	8.1	31.05 ± 1.76 <sup>c</sup>	51.98 ± 0.43 <sup>b</sup>	65.05 ± 1.80 <sup>a</sup>	DLD	DLD
Sitoesteril-3-β-glucopiranósido	20.0	28.86 ± 0.91 <sup>c</sup>	22.87 ± 0.99 <sup>c</sup>	55.91 ± 5.15 <sup>a</sup>	42.98 ± 0.63 <sup>b</sup>	32.34 ± 0.91 <sup>c</sup>
Campesteril-3-β-glucopiranósido	20.4	11.24 ± 1.46 <sup>a</sup>	9.40 ± 0.25 <sup>ab</sup>	10.55 ± 0.46 <sup>ab</sup>	8.40 ± 0.23 <sup>bc</sup>	6.26 ± 0.12 <sup>c</sup>
Estigmasteril-3-β-glucopiranósido	23.3	1.68 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.11 <sup>a</sup>	DLD	1.19 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.10 <sup>a</sup>

DLD: Debajo del Límite de Detección



## **7.2 Caracterización fisicoquímica y funcional de los subproductos de mango, durazno, flor de Jamaica, tuna y uva**

Con la finalidad de elegir los materiales que pudieran presentar las mejores características para ser empleados en el suplemento que se pretende desarrollar, se evaluaron las características fisicoquímicas y funcionales de los subproductos de mango, durazno, tuna, flor de Jamaica y uva.

Muchos de los beneficios a la salud de la fibra dietaria están asociados a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales; y éstas a su vez dependen de la fuente alimenticia, el método de extracción de la fibra, la estructura, la composición química y el tamaño de partícula (Martínez *et al.*, 2012; Peerajit *et al.*, 2012). En el Cuadro 14 se presentan los resultados de las propiedades de hidratación: capacidad de retención de agua e hinchamiento de los subproductos en estudio.

La fibra puede contener agua dentro de su matriz en tres formas: la que está unida a los polisacáridos hidrofílicos, la que está mantenida dentro de la matriz de la fibra y la que está atrapada dentro del lumen de la pared celular (Robertson y Eastwood 1981). A su vez las propiedades de hidratación de la fibra dietaria están relacionadas con la estructura química de los polisacáridos y otros factores como la porosidad, el tamaño de partícula, la forma iónica, el pH, la temperatura, la fuerza iónica, el tipo de iones en la solución y el estrés ejercido sobre la fibra. La capacidad de retención de agua (CRA) representa la cantidad de agua retenida por la fibra cuando ésta es sujeta a fuerzas externas como la de centrifugación.

El subproducto de Jamaica fue el que mayor CRA presentó, reteniendo hasta 6.5 veces su peso en agua siendo hasta dos veces más que para el subproducto de tuna, uva y mango. La CRA del subproducto de Jamaica fue mayor que lo reportado para cereales (5.5 g/g, Sangnark y Noomhorm, 2004), pero menor a lo reportado para fibras de cítricos (10 g/g, Lario *et al.*, 2004). Este resultado puede deberse a que el subproducto de Jamaica tiene un mayor contenido de FDS que los demás subproductos (Cuadro 6). De manera general se puede decir que los subproductos no presentaron una alta CRA, pues según Leterme *et al.* (1998) ésta debe oscilar

entre 10 y 12 g de agua/g de fibra. Sin embargo, el subproducto de Jamaica quien presentó mayor CRA podrían presentar algunas de las características fisiológicas relacionadas con la CRA; como lo es un mayor volumen de las heces y por lo tanto un mayor tránsito intestinal, lo anterior cuando se trata de FDI; esto se podría esperar en el subproducto de Jamaica, pues el 72.1% de su contenido de FDT corresponde a FDI (Cuadro 6). Así mismo la CRA está influenciada por la fibra soluble, que está en mayor proporción en el subproducto de durazno (29.2%), pues al atrapar agua forma soluciones viscosas y se une a colesterol, grasas y azúcares disminuyendo de esta manera su absorción intestinal y por lo tanto su concentración en sangre (Blackwood *et al.*, 2000).

**Cuadro 13.** Propiedades de hidratación de los subproductos

Subproducto	CRA <sup>1</sup>	Hinchamiento <sup>2</sup>
Mango	2.88±0.04 <sup>d</sup>	6.49±0.03 <sup>c</sup>
Durazno	4.17±0.15 <sup>b</sup>	5.25±0.28 <sup>d</sup>
Subproducto de Jamaica	6.50±0.09 <sup>a</sup>	8.33±0.28 <sup>b</sup>
Tuna roja lisa	3.20±0.06 <sup>c</sup>	9.82±0.27 <sup>a</sup>
Orujo de uva	2.78±0.14 <sup>d</sup>	4.49±0.01 <sup>e</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p=0.05) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>Capacidad de Retención de Agua (g/g). <sup>2</sup>Hinchamiento (mL/g).

En el Cuadro 13 se presentan también los resultados de la capacidad de hinchamiento, que es la relación entre el volumen ocupado por la muestra inmersa en un exceso de agua después de que alcanza un equilibrio y el peso de la muestra; representando así el volumen de muestra hidratada bajo fuerzas de gravedad. La fibra dietaria puede interactuar con el agua a través de la retención de agua en estructuras capilares como resultado de la fuerza de tensión superficial, y por medio la retención de agua a través de puentes de hidrógeno y formas dipolo (Chen *et al.*, 1984).

El subproducto de tuna presentó la mayor capacidad de hinchamiento, seguido del subproducto de Jamaica; éstos resultados fueron mayores a los de concentrados de fibra de maracuyá, guayaba, piña y mango (7.2, 1.4, 6.6 y 4.6 mL/g, respectivamente) (Martínez *et al.*, 2012). En ese trabajo el concentrado de fibra de mango tuvo una menor capacidad de hinchamiento (4.6 mL/g) que el subproducto evaluado en este estudio (6.49 mL/g). Los subproductos de uva y durazno presentaron los valores más bajos; este comportamiento puede deberse a que el subproducto de tuna podría tener expuesto una mayor área superficial, ya que puede estar compuesta por partículas de menor tamaño que las demás. En este sentido, a pesar de que todas pasaron por la malla 40 no se conoce la distribución del tamaño de las mismas, grupos polares, grupos de ácidos urónicos y otros sitios de unión al agua que se encuentra a su alrededor, además la capacidad de hinchamiento está relacionada con el contenido de fibra dietaria, especialmente pectinas (Navarro-González *et al.*, 2011).

Se ha reportado que los mucilagos de las especies *Opuntia*, entre las cuales se encuentra la tuna, son ricos en este polisacárido (Florian *et al.*, 2001). Por otra parte, el orujo de uva que es el que mayor proporción de fibra insoluble tiene (Cuadro 6), es el que presentó los menores valores para CRA e hinchamiento. Éstos resultados demuestran que el subproducto de Jamaica es un buen candidato para ser empleado en alimentos que requieran retención de humedad (Chau *et al.*, 2007).

Además de retener agua, la fibra tiene la capacidad de retener aceite como se muestra en el Cuadro 14. Los subproductos de uva y tuna fueron los que mayor capacidad de absorción de aceite (CRAC) presentaron. Así mismo, la CRAC de todos los subproductos evaluados fue mayor que la reportada para manzana (0.60 g/g), pero similar a la de la fibra extraída de toronja (1.20-1.52 g/g) y naranja (1.81 g/g) (Figuerola *et al.*, 2005).

La CRAC es una propiedad tecnológica que se encuentra relacionada con la naturaleza de la superficie, la densidad, y el grosor de las partículas (Femenia *et al.*, 1997); partículas que presentan mayor superficie de contacto tienen una mayor

capacidad para retener componentes de naturaleza lipídica (López *et al.*, 1996). Valores altos de CRAC están asociados con capacidad de la fibra para evitar la pérdida de grasa durante el procesamiento de alimentos y la reducción de los niveles de colesterol en suero mediante la adsorción de grasa (triglicéridos, ácidos biliares y colesterol) en la luz intestinal (Navarro-González *et al.*, 2011). Los bajos valores de CRAC pueden deberse a que los subproductos tienen poco contenido de lignina (Navarro-González *et al.*, 2011), y a que la naturaleza de los constituyentes de los subproductos es mucho más hidrofílica que lipofílica, éstas diferencias podría deberse a diferentes estructuras físicas y químicas.

**Cuadro 14.** Propiedades fisicoquímicas de los subproductos

Subproducto	CRAC <sup>1</sup>	Densidad aparente <sup>2</sup>	ISA <sup>3</sup>	IAA <sup>4</sup>
Mango	1.28 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>a</sup>	57.19±1.40 <sup>a</sup>	9.31±0.19 <sup>b</sup>
Durazno	1.46 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.69 ± 0.01 <sup>b</sup>	42.60±1.29 <sup>b</sup>	10.23±0.44 <sup>b</sup>
Subproducto de Jamaica	1.75 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.00 <sup>c</sup>	16.48±0.42 <sup>c</sup>	9.41±0.22 <sup>b</sup>
Tuna roja lisa	1.90 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.72 ± 0.01 <sup>a</sup>	55.15±1.86 <sup>a</sup>	13.57±0.52 <sup>a</sup>
Orujo de uva	1.95 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>d</sup>	18.96±0.83 <sup>c</sup>	4.40±0.01 <sup>c</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p=0.05) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>Capacidad de Retención de Aceite (mL/g). <sup>2</sup>Densidad aparente (g/mL). <sup>3</sup>Índice de Solubilidad de Agua (%). <sup>4</sup>Índice de Absorción de Agua (g gel/g muestra).

El Cuadro 14 muestra también los resultados para densidad aparente, ésta es una medida de la forma en la que se encuentra empacado un material granular, como los subproductos en polvo, definiéndose como la relación entre la masa y el volumen total de la muestra, incluyendo los poros y los huecos dentro y entre las partículas (Santomaso *et al.*, 2003); cuanto menor sea la densidad aparente, mayor es la porosidad del material (Zhao *et al.*, 2009). La densidad aparente de los subproductos de mango y la tuna fueron significativamente mayores que para los demás subproductos, siendo el de orujo el que presentó el menor valor (0.52 g/mL). Los

valores de todos los subproductos fueron mayores a los reportados para fibra de manzana, avena y salvado de trigo; 0.46, 0.42 y 0.39 g/mL, respectivamente (Chen *et al.*, 1988). La baja densidad aparente del orujo podría indicar que este tiene una mayor porosidad y área superficial que los demás. Esto podría explicar que tal vez este sea el mecanismo por el cual este material esté atrapando físicamente el aceite, sin embargo no lo sería para el subproducto de tuna, que a pesar de tener una alta CRAC, en comparación con los demás materiales, presenta una densidad aparente es mayor; lo que podría indicar que las interacciones se deba a una naturaleza lipofílica de las partículas.

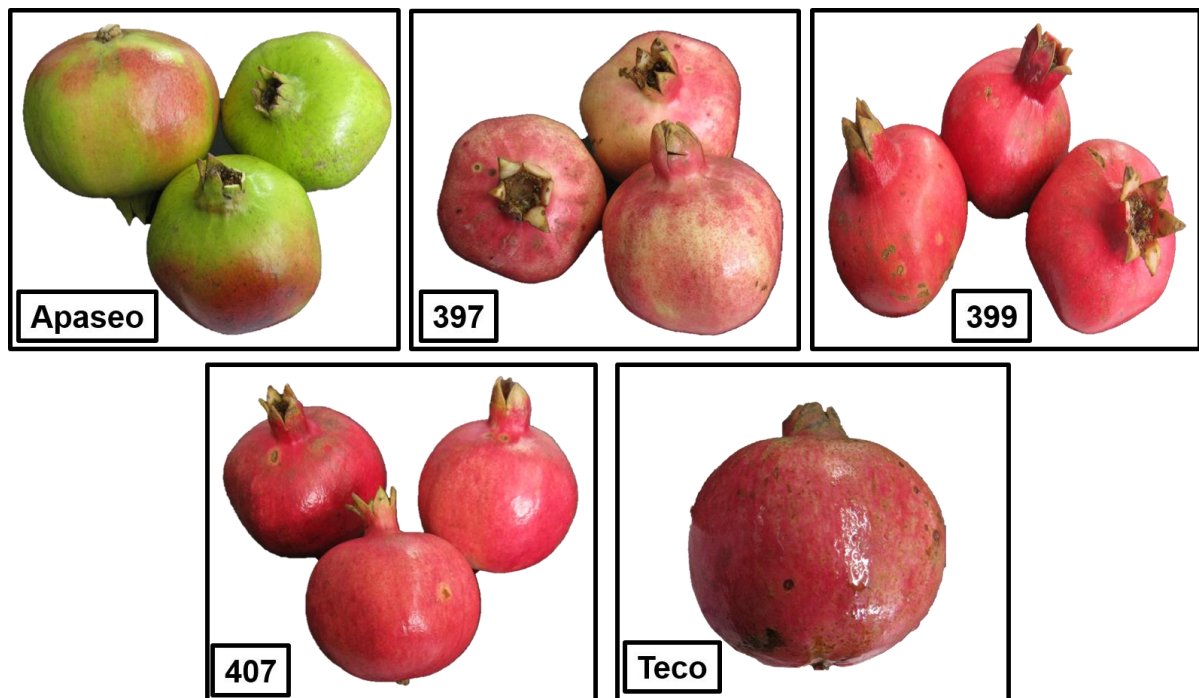
El ISA mide la cantidad de componentes solubles liberados de la matriz del alimento. Los ISA encontrados en este trabajo son desde 16.48% para el subproducto de Jamaica, hasta 57.19% para el subproducto de mango (Cuadro 14). En el caso del mango, el resultado es similar a lo reportado por Sharma *et al.* (2013), 63%, para pulpa de mango en polvo, pues este subproducto se encuentra conformado principalmente por pulpa. El alto valor de ISA en los subproductos de mango y tuna (sin diferencias estadísticas entre sí) en relación a los demás subproductos, puede deberse a su composición. En concreto, probablemente éstos materiales tienen una mayor cantidad de azúcares que se están disolviendo en el agua, y este efecto podría no deberse a la FDS, porque el subproducto de Jamaica, es el de menor valor de ISA (16.48%), pero mayor contenido de FDS (Cuadro 6). De igual manera los resultados de ISA estarían sugiriendo que los subproductos de mango, tuna y durazno serían los más convenientes para ser empleados en soluciones, pues tienen una mayor solubilidad en agua y se busca que el suplemento quede en solución, así mismo, indican que con los subproductos de uva y Jamaica se tendría una mayor necesidad de usar agentes suspensores.

Como se puede ver en el Cuadro 14, el subproducto de tuna mostró el mayor IAA (13.57 g/g) siendo menor a lo reportado para subproductos de pulpa de mango en polvo (39 g/g; Sharma *et al.*, 2013). Los subproductos de mango, durazno y Jamaica no presentaron diferencia estadística significativa y el orujo de uva presentó el menor valor. El IAA es un importante parámetro desde el punto de vista de los

efectos fisiológicos de la fibra dietaria, porque la absorción de agua incrementa el bolo y produce un efecto de saciedad, los cuales pudieran ser mayor en el subproducto de tuna. El IAA, al igual que la capacidad de hinchamiento, está relacionado con la capacidad de la fibra de atraer y retener el agua a través de sus enlaces de hidrógeno.

### 7.3 Selección del cultivar del subproducto de granada a adicionar en la formulación

En el INIFAP se están desarrollando una gran variedad de cultivares con la finalidad de mejorar sus propiedades nutracéuticas, para ser empleados en la elaboración de jugos. Por lo tanto, se seleccionaron cinco materiales que presentan alto rendimiento agrícola: Apaseo, 397, 399, 407 y teco (Figura 4). En todos los casos, el subproducto está compuesto de cáscara, semillas y remanentes de arilos, y se les realizó una cuantificación de fibra dietaria y compuestos polifenólicos.



**Figura 4.** Cultivares de granada seleccionados para el estudio

### 7.3.1 Cuantificación de FDT, FDS y FDI

El cultivar Apaseo tiene mayor concentración de FDT (44.2%) que los otros cultivares, que se encontraban en el 27-33%. En todos los casos, la FDI fue la fracción más abundante siendo mayor su proporción en el cultivar 399 (85.6%) y menor en Teco (75.6%), mientras que Apaseo tuvo una mayor proporción de fibra soluble (18.3%) (Cuadro 15). Hasnaoui *et al.* (2014) cuantificaron la FDT de la cáscara de 12 cultivares de granada, y reportaron contenidos entre 33.1 y 62.1%. Éstos resultados demuestran que la cantidad de estos compuestos dependen del genotipo y las condiciones ambientales (Gebruers *et al.*, 2010). Debido a que el suplemento que se quiere desarrollar deberá ser rico en FD, el cultivar Apaseo es el indicado para la formulación ya que tiene un mayor contenido de FDT, FDS y FDI.

**Cuadro 15.** Contenido de fibra dietaria y sus fracciones de los subproductos de diferentes cultivares de granada

Cultivar	FD Total <sup>1</sup>	FD insoluble <sup>1</sup>	FD soluble <sup>1</sup>
<b>Apaseo</b>	44.2 ± 0.0a	36.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.2a
<b>397</b>	30.2 ± 0.4c	24.9 ± 1.4b	5.2 ± 1.0bc
<b>399</b>	29.1 ± 0.2cd	24.9 ± 0.5b	4.1 ± 0.2c
<b>407</b>	33.5 ± 1.2b	27.0 ± 0.7b	6.4 ± 0.5abc
<b>Teco</b>	27.1 ± 0.9d	20.5 ± 1.4c	6.5 ± 0.5ab

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa (p=0.05) (Prueba de Tukey-Kramer). FD: fibra dietaria. <sup>1</sup> Porcentaje (%).

### 7.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos polifenólicos también fueron cuantificados en los subproductos de granada, tanto los extraíbles como los macromoleculares (Cuadro 16). La granada es uno de los frutos con mayor contenido de polifenoles, y se ha reportado que la piel tiene cantidades importantes de punicalaginas, ácido gálico, ácido elágico y antocianinas (Fischer *et al.*, 2011).

El contenido de fenoles extraíble (compuestos fenólicos totales) fue de 115.4 a 179.3, siendo mayor para el cultivar Apaseo, estos valores fueron superiores a los reportado por Fischer *et al.* (2011) de 101.85 mg EGG/g, pero menores a lo reportado en cáscara para 12 cultivares de granada, oscilando entre 205.07 y 276.35 mg EAG/g (Hasnaoui *et al.* 2014). Las variaciones pueden deberse a los solventes empleados para realizar la extracción y a que en éstos estudios solo emplearon cáscara de granada y se ha reportado que la pulpa, de la cual hay remanentes en el subproducto en estudio tiene un contenido aproximado de 24.4 mg EAG/g (Li *et al.*, 2006) y las semillas, que son parte del bagazo, de 13.5 mg EAG/g (Gozlekci *et al.*, 2011). Esto podría diluir la concentración de éstos compuestos.

En lo que respecta a los antioxidantes macromoleculares, el cultivar 407 presentó el mayor contenido de proantocianidinas no extraíbles (5.4 mg/g) y Apaseo el de polifenoles hidrolizables (7.9 mg/g). La granada se caracteriza por ser una buena fuente de polifenoles hidrolizables y se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir a la enzima lipasa, ya que se pueden unir, acomplejar y precipitar las proteínas a través de una inhibición no competitiva o un mecanismo mixto (Sergent *et al.*, 2012). Por lo tanto, este tipo de subproducto podría disminuir la absorción de triglicéridos.

Ambigaipalan *et al.* (2016) han reportado que los polifenoles hidrolizables se encuentran principalmente en la cáscara y en la membrana divisora. Éstos pueden ser elagitaninos o galotaninos; los elagitaninos son esterés del grupo hexahidroxidifenol, mientras los galotaninos contienen una molécula de glucosa; en granada se ha reportado que los mayoritarios son ácido elágico y monogaloil-hexosido. Por su parte, las proantocianidinas o proantocianidinas no extraíbles son oligómeros o polímeros formados de flavan-3-ol (catequina) y se ha reportado que están en menor concentración que los polifenoles hidrolizables y fue la misma tendencia observada en este estudio. En base a los resultados anteriormente mencionados, el cultivar Apaseo podría ser la selección más adecuada para la



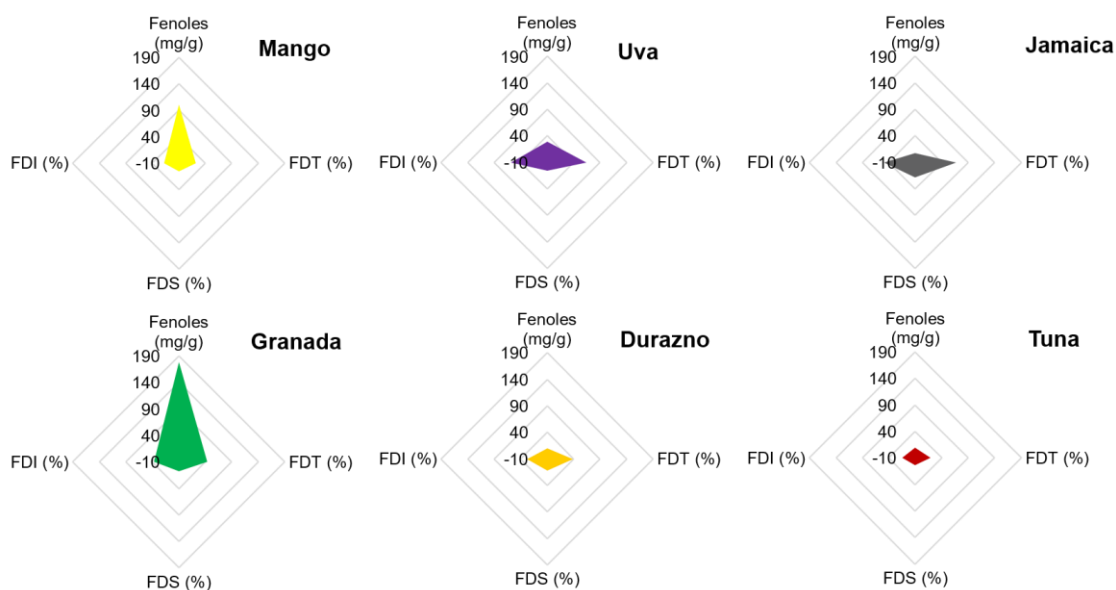
elaboración del suplemento, ya que también es el que presentó el mayor contenido de fenoles extraíbles y taninos hidrolizables.

**Cuadro 16.** Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y macromoleculares de los subproductos de granada

	<b>Compuestos fenólicos totales<sup>1</sup></b>	<b>Proantocianidinas no extraíbles<sup>1</sup></b>	<b>Polifenoles hidrolizables<sup>1</sup></b>
<b>Apaseo</b>	179,3 ± 2,5a	4,2 ± 0,1b	7,9 ± 0,1a
<b>397</b>	122,4 ± 3,4bc	2,5 ± 0,1c	5,7 ± 0,4b
<b>399</b>	116,6 ± 0,5c	3,6 ± 0,4b	5,8 ± 0,1b
<b>407</b>	115,4 ± 3,0c	5,4 ± 0,3a	4,4 ± 0,1c
<b>Teco</b>	129,7 ± 3,8b	4,3 ± 0,0b	3,2 ± 0,2d

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>mg/g.

Debido a que el suplemento que se busca desarrollar deberá ser abundante en fibra dietaria y compuestos polifenólicos, se seleccionó a los subproductos que presentaron el mayor contenido de éstos compuestos bioactivos. En la Figura 5 se presenta un gráfico radial para cada uno de los subproductos estudiados. Se observa que los subproductos de uva, mango, cálices de Jamaica y granada presentaron las mayores áreas, pues tienen mayor contenido de FDT y compuestos bioactivos; mientras que los subproductos de tuna y durazno fueron descartados para la formulación.



**Figura 5.** Contenido de fibra dietaria y compuestos fenólicos de los subproductos en estudio

## 7.4 Estudio *in vivo*

El subproducto de Jamaica presentó contenidos de fibra dietaria y compuestos antioxidantes recomendables para el diseño de suplemento alimenticio. Sin embargo, a diferencia de los demás subproductos que se pretenden utilizar, no existen hasta el momento reportes sobre el efecto del consumo de este subproducto sobre el peso corporal, dislipidemia y resistencia a la insulina.

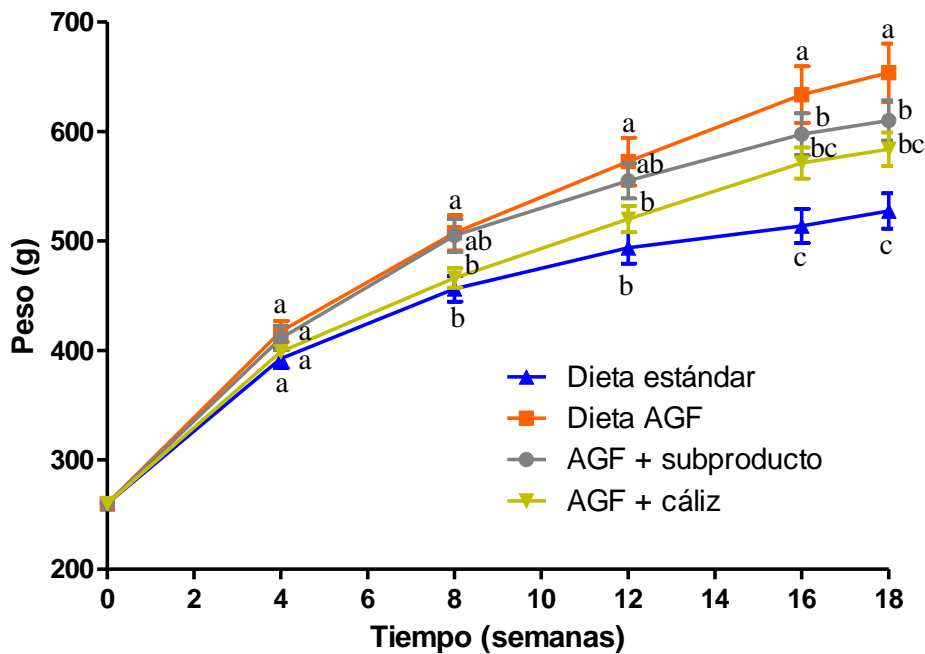
Por lo tanto, se llevó a cabo durante 18 semanas un estudio *in vivo* con animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa y suplementada con 8% de fibra proveniente del subproducto y de los cálices de Jamaica (empleado como control).

### 7.4.1 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre el sobrepeso corporal

En la Figura 6 se presentan los resultados de peso corporal de los 4 grupos de experimentación: alimentados con la dieta estándar (control sano), alimentados

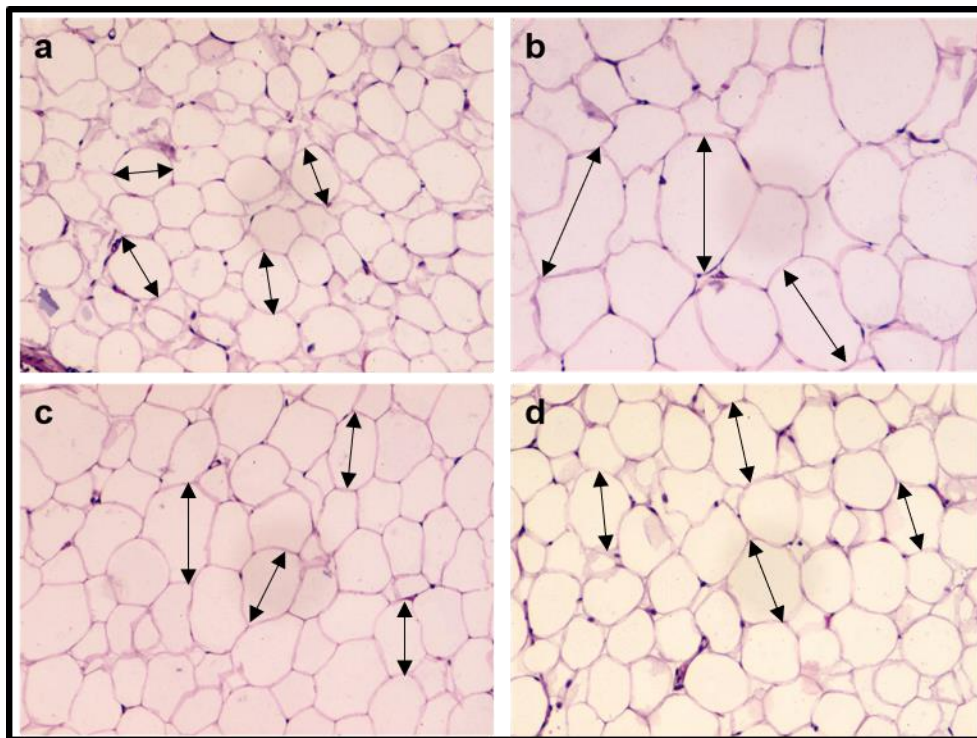
con la dieta alta en grasa y fructosa (AGF) y alimentados con la dieta AGF y suplementados con los cálices de Jamaica y su subproducto al 8%.

A partir de la octava semana se presentó diferencia estadística significativa ( $p=0.05$ ) entre los animales del control sano y los alimentados con la dieta AGF. Al finalizar el estudio, (semana 18), el peso promedio del grupo control sano fue 20.2% menor que el de la dieta AGF. El aumento en el peso corporal de los animales obesos es ocasionado por el exceso de energía ingerida, dicha energía se almacena en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, los cuales pueden sintetizarse a partir de los ácidos grasos de la dieta o bien mediante el metabolismo de la fructosa (Huang *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE.

En relación a los tratamientos, los animales suplementados con los cálices presentaron una menor ganancia de peso corporal en comparación con los suplementados con el subproducto. Fue así como en la semana 18 los grupos suplementados con los cálices y el subproducto disminuyeron la ganancia de peso corporal en un 14 y 9%, respectivamente. Esa disminución de peso corporal estuvo relacionada con una menor hipertrofia (tamaño de los adipocitos) de los animales tratados (Figuras 7 y 8). El tamaño de los adipocitos fue diferente estadísticamente ( $p= 0.05$ ) entre los animales tratados y los del grupo de la dieta AGF; la suplementación con subproducto de Jamaica en esta segunda dieta logró revertir el tamaño de los adipocitos a valores similares a los de la dieta estándar (Figura 7).

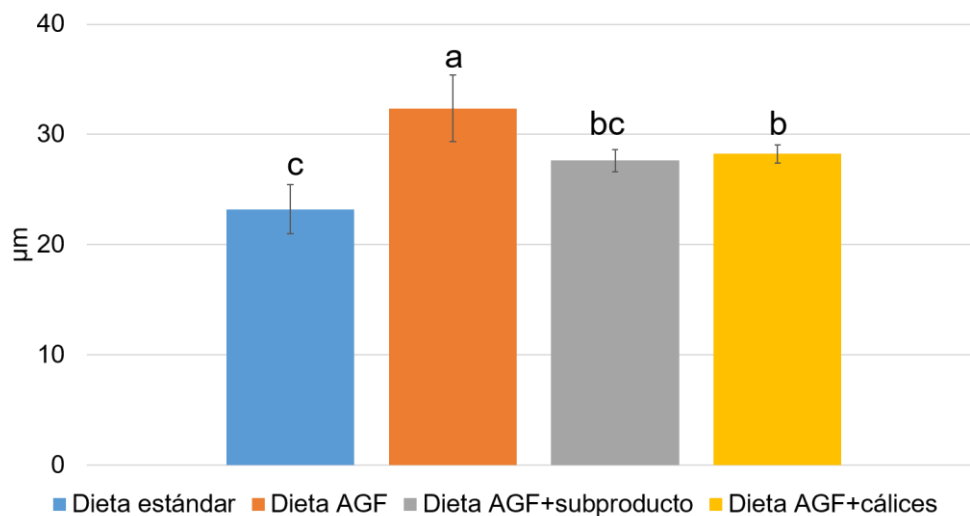


**Figura 7.** Adipocitos de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa (AGF) y suplementada con cálices y subproducto de Jamaica. (a) dieta estándar (b) dieta AGF; (c) dieta AGF+cálices; (d) dieta AGF+subproducto (300x)

El cáliz, a pesar de que tiene un menor porcentaje de fibra dietaria que el subproducto, tiene más compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y ácidos orgánicos, a lo cual podría deberse esta menor

ganancia de peso, pues se ha reportado que la regulación del peso corporal, para extractos de *Hibiscus sabdariffa*, se atribuye al contenido de antocianinas y ácidos orgánicos como el hidroxícitrico. Kim *et al.* (2007) reportaron que el consumo de antocianinas de cálices de Jamaica redujo la ganancia de peso corporal en ratones obesos a través de la inhibición de la adipogénesis. Además, *Hibiscus sabdariffa* inhibe la sintasa de ácidos grasos y la diferenciación de los adipocitos (Kim *et al.*, 2003).

Los efectos *in vivo* reportados para extractos de cálices de Jamaica atribuyen sus efectos no solo los compuestos fenólicos, sino a los ácidos orgánicos, especialmente el ácido hibiscus y el ácido hidroxícitrico. Con relación al ácido hidroxícitrico, se ha reportado que su efecto antiobesogénico se debe a la reducción de la lipogénesis *de novo*, por medio de la reducción de acetil-CoA, y el incremento de la oxidación de los lípidos; y disminuye la concentración de mRNA, en el tejido adiposo, de la sintasa de ácidos grasos, acetil-CoA carboxilasa 1 y SREBP1c (Chuah *et al.*, 2013).



**Figura 8.** Tamaño de los adipocitos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (AGF), y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto. Los

datos se expresan como la media  $\pm$  EE. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

#### **7.4.2 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre la resistencia a la insulina**

Se evaluó el efecto del consumo de los cálices de Jamaica y su subproducto sobre la resistencia a la insulina. Al evaluar la concentración de glucosa en suero, se encontró que -como era esperable- los animales del grupo de la dieta AGF presentan las concentraciones más altas de glucosa (218.5 mg/dL) siendo 55.7% mayor a la presentada por los animales de la dieta estándar (140.3 mg/dL) (Cuadro 18). El aumento de glucosa en sangre está relacionado con el consumo de grasa y de la fructosa contenida en la dieta. Se ha reportado que una dieta alta en grasa aumenta la producción hepática de glucosa a través de glucogenólisis y de gluconeogénesis (Jin *et al.*, 2013).

Los grupos suplementados con los cálices de Jamaica y su subproducto presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucosa respecto al control obeso y similares al control sano, ya que está fue menor en un 38.3 y 36.4%, respectivamente, en relación al grupo de la dieta AGF. Moyano *et al.* (2016) atribuyen el efecto hipoglicémico de los cálices en polvo a un incremento de la concentración de GLP-1. Este efecto se debe a que se ha reportado que GLP1 aumenta la secreción de insulina, incrementa la masa de las células  $\beta$  pancreáticas, disminuye la gluconeogénesis hepática, disminuye la liberación de glucagón, mejora la sensibilidad a la insulina, aumenta la saciedad y disminuye el vaciamiento gástrico (Prasad-Reddy y Isaacs, 2015). El aumento de GLP-1 puede deberse a la generación de ácidos grasos de cadena corta por parte de la microbiota intestinal a partir de la fibra dietaria. Además, la activación de receptores de GLP1 aumenta el aclaramiento de glucosa y triglicéridos por parte del tejido adiposo pardo, quien lo usa para termogénesis (Kooijman *et al.*, 2015).

Una consecuencia del consumo de una dieta alta en fructosa es la resistencia a la insulina que induce una hiperinsulinemia compensatoria (Elliott *et al.*, 2002). Esto

explica el hecho de que los animales alimentados con la dieta AGF presentaron mayores concentraciones séricas de esta hormona (98%) en comparación con el grupo alimentado con la dieta estándar. El grupo tratado con el subproducto de Jamaica no presentó diferencia estadística ni con el grupo sano ni con el grupo de la dieta AGF, a diferencia del grupo suplementado con los cálices que mostraron diferencia estadísticamente significativa con el grupo de la dieta AGF (Cuadro 17). Por lo tanto, este efecto podría estar más relacionado con el contenido de polifenoles que con fibra dietaria.

Entre los efectos reportados de los polifenoles para la mejora de la homeostasis de la glucosa y la resistencia a la insulina se encuentra la reducción de la absorción intestinal de carbohidratos de la dieta, por medio de la inhibición de enzimas digestivas y de transportadores intestinales (SGLT1 y SGLT2), así como la mejora de la función de las células  $\beta$  pancreáticas y la acción de la insulina (Bahadoran *et al.*, 2013).

**Cuadro 17.** Concentración de glucosa sanguínea, insulina e índice HOMA de ratas alimentadas con una dieta AGF y suplementadas con cálices y subproducto de Jamaica

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	Índice HOMA-IR
Sanas	140.3 ± 10.8 b	1.03 ± 0.14 b	9.0 ± 3.1 b
Dieta AGF	218.5 ± 25.7 a	2.04 ± 0.13 a	25.2 ± 4.3 a
Dieta AGF + cálices	134.8 ± 34.1 b	1.19 ± 0.17 b	10.2 ± 2.1 b
Dieta AGF + subproducto	138.9 ± 6.9 b	1.56 ± 0.21 ab	13.1 ± 5.9 b

Datos expresados como media ± EE. Determinaciones con ocho animales cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

### 7.4.3 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre los triglicéridos y colesterol en suero

Los animales alimentados con una dieta AGF incrementaron en un 55.9% los niveles de triglicéridos en comparación con el grupo sano. La concentración de triglicéridos del grupo tratado con los cálices fue similar al de la dieta AGF y al grupo del subproducto no presentó diferencia estadística respecto a los dos controles (Cuadro 18). El incremento de triglicéridos con la dieta AGF puede deberse a que, en el hígado, la fructosa es metabolizada hasta acetil Co-A, que provee los carbonos necesarios para la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena larga, que posteriormente son esterificados para formar triglicéridos (Havel, 2005).

De acuerdo con los resultados obtenidos con los tratamientos, la mayor reducción de triglicéridos se presentó en el grupo suplementado con el subproducto (17.8%), esto podría deberse a que este tiene un mayor contenido de fibra dietaria y de polifenoles hidrolizables (3.3 mg/g vs 1.9 mg/g de los cálices). Han *et al.* (2015) reportaron que la suplementación con fibra dietaria proveniente de la avena y del trigo dio lugar a una disminución en la expresión de SREBP-1, la sintasa de ácidos grasos y acetil-CoA carboxilasa, todos éstos involucrados en la síntesis de ácidos grasos.

**Cuadro 18.** Concentración de triglicéridos y colesterol total en ratas alimentadas con una dieta AGF y suplementadas con cálices y subproducto de Jamaica.

Grupo	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)
Dieta estándar	83.9±5.9b	125.6±3.0a
Dieta AGF	130.8±8.9a	115.8±3.7ab
Dieta AGF + cálices	115.3±8.2a	107.7±1.8b
Dieta AGF + subproducto	107.5±7.1ab	111.1±1.9b

Datos expresados como media ± EE. Determinaciones con ocho animales cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).



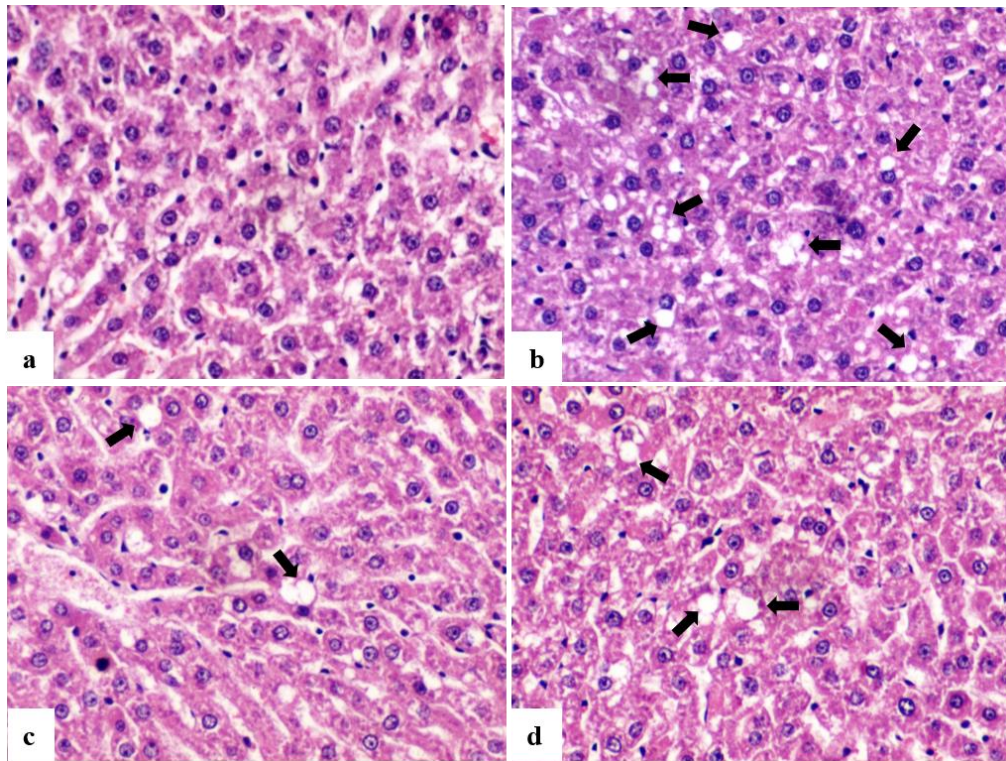
De igual manera, respecto a los polifenoles extraíbles, se ha reportado que un extracto etanólico de cálices de Jamaica aumenta la excreción de lípidos, ya sea a través la inhibición de las lipasas o una saturación competitiva de los transportadores intestinales (Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2009), lo que causaría una disminución de triglicéridos circulantes en suero.

En relación al contenido de colesterol total en suero no hubo diferencia significativa entre los controles. Así mismo, los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo obeso pero si respecto al control; no obstante, éstas diferencias no son relevantes desde el punto de vista fisiológico.

#### **7.4.4 Efecto del consumo de cálices de Jamaica y su subproducto sobre la esteatosis hepática**

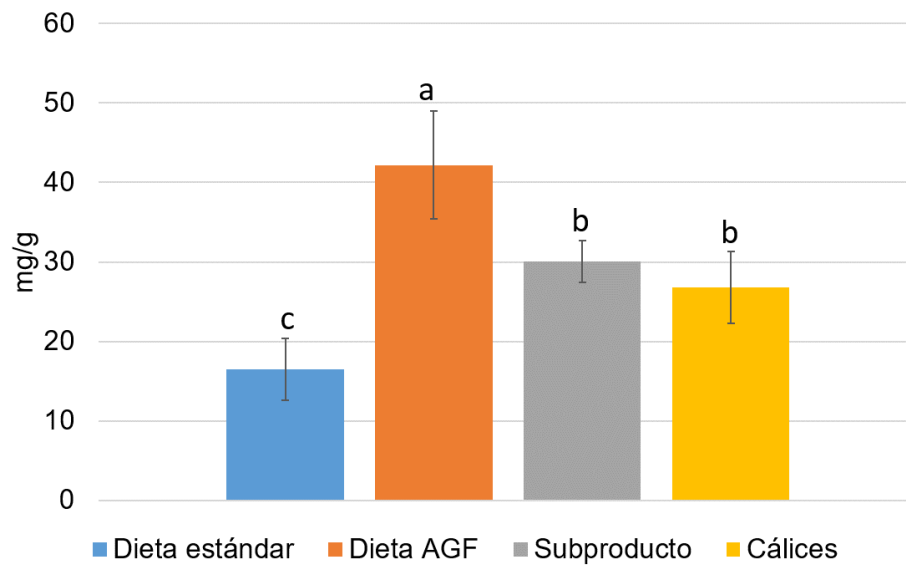
En las micrografías de los hepatocitos se puede observar que los hígados de los animales alimentados con la dieta estándar no mostraron vacuolas lipídicas, lo que significa un grado 0 de esteatosis; sin embargo, en los hepatocitos de las ratas del grupo AGF presenta un grado 2 de esteatosis, siendo esteatosis macrovesicular ya que las vesículas lipídicas desplazan el núcleo celular a la periferia. Ambos grupos tratados presentaron grado 1 de esteatosis, indicando que la suplementación con cálices o con subproducto de Jamaica disminuyó los depósitos de grasa en el hígado (Figura 9).

Además de observar los depósitos de grasa a nivel microscópico se cuantificaron los triglicéridos en el hígado (Figura 10). Así, se encontró que los animales alimentados con la dieta AGF tienen 2.5 veces más triglicéridos que los del grupo de la dieta estándar. En lo que respecta a los tratamientos, la suplementación con el subproducto o los cálices de Jamaica disminuyó un 28.7 y 36.4%, respectivamente, el contenido de triglicéridos en comparación con el grupo AGF.



**Figura 9.** Hepatocitos de animales alimentados con una dieta AGF y suplementada con cálices y subproducto de Jamaica (a) dieta estándar (b) dieta AGF; (c) dieta AGF+cálices; (d) dieta AGF+subproducto (100x).

Se debe señalar que la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos está relacionada con un aumento en la absorción de ácidos grasos asociado en un aumento en la lipólisis en el tejido adiposo y/o un aumento en la ingesta de grasa de la dieta, como fue el caso de la dieta alta en grasa dada los animales (Rodríguez *et al.*, 2016).



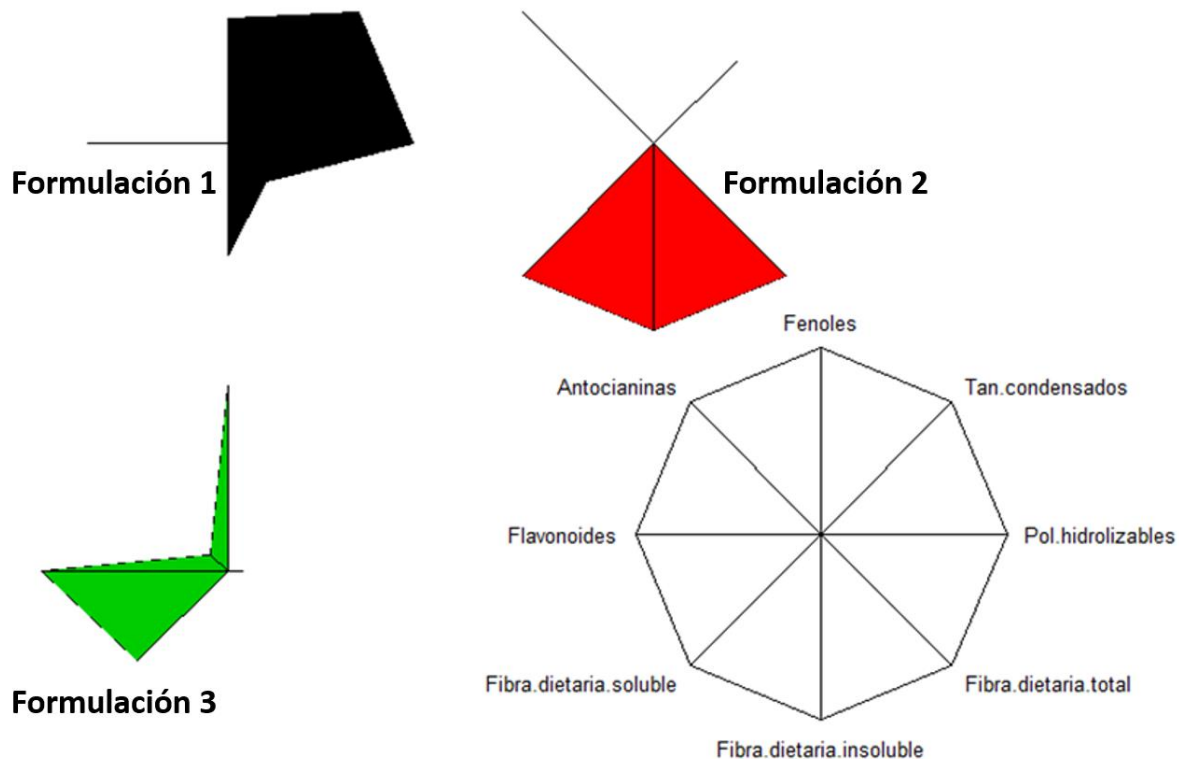
**Figura 10.** Contenido de triglicéridos en hígado de ratas alimentadas con una dieta AGF, y suplementadas con cálices de Jamaica y su subproducto. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

La menor concentración de triglicéridos en los animales tratados puede estar relacionada con el contenido en polifenoles y fibra dietaria. Así, se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden disminuir y/o prevenir el daño a los hepatocitos a través de diversos mecanismos de acción: (a) reduciendo la lipogénesis *de novo* por medio de la disminución de SREBP-1c (b) aumentando la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos debido a una sobre regulación de PPAR- $\alpha$ , (c) mejorando la sensibilidad a la insulina, que fue uno de los efectos comprobados en este estudio (d) reduciendo el estrés oxidativo mediante el aumento de los niveles de las defensas antioxidantes via Nrf2, y (e) atenuando las vías inflamatorias (Rodríguez *et al.*, 2016). La fibra por su parte se ha reportado en un estudio con ratones que incrementar la expresión de PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ , esta expresión fue mucho mayor para fibra de avena que para fibra de trigo. PPAR- $\alpha$  regula la obesidad incrementando la oxidación de ácidos grasos en hígado y disminuye los triglicéridos circulantes responsables de la hipertrofia e hiperplasia de las células adiposas. PPAR- $\gamma$  puede mejorar la acción de la insulina y aumentar la oxidación de los ácidos grasos libres (Han *et al.* 2015).

## **7.5 Elaboración de diversas formulaciones**

Debido a que se observó que el subproducto de Jamaica si presenta un efecto benéfico en la prevención de factores de riesgo cardiovascular éste se seleccionó para el diseño y la evaluación del suplemento a desarrollar. Pero antes de llevar a cabo el diseño y selección de las formulaciones se establecieron los siguientes parámetros para cada una de las formulaciones: contenido de fibra dietaria mayor al 50%, compuestos polifenólicos extraíbles mayor al 2% y antioxidantes macromoleculares entre el 5 al 15%, todo ello en peso seco.

A partir de las condiciones establecidas con anterioridad se diseñaron 3 formulaciones (Figura 11 y Cuadro 19): mayor contenido de antioxidantes macromoleculares (Formulación 1), mayor contenido de fibra dietaria (Formulación 2) y mayor contenido de polifenoles extraíbles (Formulación 3). Éstos resultados se pueden observar en la Figura 11; en la formulación 1 destaca el mayor contenido de proantocianidinas no extraíbles y polifenoles hidrolizables; en la formulación 2 sobresale el contenido de fibra dietaria total y sus fracciones soluble e insoluble y en la formulación 3 los polifenoles extraíbles como fenoles y flavonoides totales.



**Figura 11.** Gráfico de estrella de los compuestos bioactivos de las formulaciones desarrolladas

En lo que respecta a los atributos sensoriales la apariencia de las formulaciones se puede apreciar en la Figura 12. La granada confiere un sabor astringente a las formulaciones, por lo tanto, ésta se usó en una proporción no mayor al 22.5% para incrementar la aceptabilidad sensorial del producto. Como edulcorante no calórico, se empleó sucralosa al 0.02%.

**Cuadro 19.** Contenido de compuestos bioactivos de las tres formulaciones desarrolladas

Composición	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Fenoles totales (mg EAG/g)	40.17 ± 0.36 <sup>b</sup>	24.00 ± 0.93 <sup>c</sup>	48.99 ± 0.23 <sup>a</sup>
Flavonoides (mg EC/g)	9.28 ± 1.02 <sup>ab</sup>	7.15 ± 0.27 <sup>b</sup>	9.98 ± 1.39 <sup>a</sup>
*Antocianinas (mg EC3G/g)	2.93 ± 0.26	5.98 ± 0.36	3.31 ± 0.46

<b>Polifenoles extraíbles (%)</b>	<b>4.02</b>	<b>2.40</b>	<b><u>4.89</u></b>
Proantocianidinas no extraíbles (mg EPA/g)	99.04 ± 3.98 <sup>a</sup>	79.29 ± 2.86 <sup>b</sup>	53.20 ± 0.76 <sup>c</sup>
Polifenoles hidrolizables (mg EAG/g)	6.99 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.48 ± 0.21 <sup>b</sup>	5.11 ± 0.31 <sup>b</sup>
<b>Antioxidantes macromoleculares (%)</b>	<b><u>10.60</u></b>	<b>8.48</b>	<b>5.83</b>
<b>Fibra dietaria total (%)</b>	<b>62.33 ± 0.04<sup>b</sup></b>	<b><u>67.42 ± 0.50<sup>a</sup></u></b>	<b>60.22 ± 0.06<sup>c</sup></b>
Fibra dietaria insoluble (%)	43.29 ± 0.14 <sup>b</sup>	45.87 ± 0.33 <sup>a</sup>	39.46 ± 0.34 <sup>c</sup>
Fibra dietaria soluble (%)	19.03 ± 0.11 <sup>b</sup>	21.55 ± 0.84 <sup>a</sup>	20.76 ± 0.38 <sup>a</sup>

Resultados expresados en base seca. Promedio de 3 determinaciones independientes ± desviación estándar. Letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia estadística por la prueba de Tukey ( $p = 0.05$ ) para datos con distribución paramétrica. EGA: Equivalentes de ácido gálico, EC: equivalentes de catequina, EC3G: equivalentes de cianidina 3-glucósido, EPA: equivalentes de proantocianidinas. \*distribución no paramétrica (prueba de Steel Dwass).



**Figura 12.** Formulaciones desarrolladas en polvo y diluidas en agua.

### 7.5.1 Identificación de fitoquímicos por UPLC-ESI-QTOF MS<sup>E</sup>

Además de la cuantificación general de compuestos bioactivos, se realizó una identificación detallada de polifenoles extraíbles y ácidos orgánicos (Cuadro 20) y polifenoles hidrolizables (Cuadro 21) de las formulaciones desarrolladas.

En las tres formulaciones desarrolladas se identificaron un total de 26 ácidos hidroxibenzoicos, 31 ácidos hidroxicinámicos, 3 elagitaninos, 5 galotaninos, 28 flavonoles, 22 flavonoles, 20 antocianinas, 5 flavanonas, 6 lignanos, 16 estilbenos, 3 xantonoides y 15 ácidos orgánicos (Cuadro 21). La formulación 3 (Figura 13) con mayor contenido total de polifenoles extraíbles presentó 15 de los 26 ácidos hidroxibenzoicos como mayoritarios (ácido gálico, ácido gálico 4-O-glucósido, ácido 2-hidroxibenzoico, ácido 4-hydroxybenzoic 4-O-glucósido, ácido isovanílico, digaloil glucósido, ácido 5-O-galoilquínico, ácido gálico 3-O-galato, ácido elágico 4-O-glucósido, ácido digálico, ácido elágico 4-O-arabinósido, ácido galágico, ácido elágico, 4- galoilpirogaloil, ácido elágico 4-O-acetilxilósido). Por otro lado, en la formulación 2, se identificaron 21 de los 31 ácidos hidroxicinámicos detectados, donde resalta la presencia de los siguientes: dicafeoilquínicos, sinapínico, isoferúlico, 5-feruloilquínico y p-cumárico 4-O-ácido glicólico (Figura 13).

**Cuadro 20.** Polifenoles extraíbles y ácidos orgánicos identificados por UPLC-ESI-QTOF MS<sup>E</sup> en las tres formulaciones desarrolladas

Nombre del compuesto	Tiempo retención (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Error de masa (ppm)	Aducto	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
<b>ÁCIDOS FENÓLICOS</b>									
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido gálico 4-O-glucósido	0,81	C13H16O10	332,07	332,08	2,42	[M-H]-	582453,6 ± 24219,0	199858,6 ± 1473,3	602903,4 ± 4223,9
Ácido gálico	1,03	C7H6O5	170,02	170,02	2,39	[M-H]-	66212,3 ± 843,1	32785,6 ± 39,4	74999,9 ± 772,3
Ácido 2,3-Dihidroxibenzoico	1,08	C7H6O4	154,03	154,03	2,57	[M-H]-	ND	343,9 ± 1,5	ND
Ácido 2-Hidroxibenzoico	1,16	C7H6O3	138,03	138,03	-3,16	[M-H]-	383,2 ± 17,1	393,2 ± 2,3	479,7 ± 25,6
Ácido 4-Hidroxibenzoico 4-O-glucósido	1,16	C13H16O8	300,08	300,08	0,61	[M-H]-	1015,5 ± 12,9	913,1 ± 43,8	1302,7 ± 22,3
Ácido 2,4-Dihidroxibenzoico	1,53	C7H6O4	154,03	154,03	1,40	[M-H]-	ND	459,0 ± 22,1	ND
Ácido protocatecuico 4-O-glucósido	1,58	C13H16O9	316,08	316,08	2,88	[M-H]-	7317,9 ± 240,5	29949,8 ± 599,8	12098,6 ± 484,4
Ácido isovanílico	1,60	C8H8O4	168,04	168,04	2,00	[M-H]-	636,4 ± 9,6	755,1 ± 38,9	801,2 ± 13,2
Ácido protocatecuico	1,89	C7H6O4	154,03	154,03	2,96	[M-H]-	668,9 ± 36,1	935,5 ± 30,0	693,3 ± 16,4
Ácido siríngico	2,23	C9H10O5	198,05	198,05	-0,06	[M-H]-	335,1 ± 27,6	469,7 ± 8,5	390,6 ± 112,9
Digaloil glucósido	2,57		484,09	484,09	0,57	[M-H]-	45420,1 ± 1773,1	9464,7 ± 486,8	54519,6 ± 1180,2
Ácido 3,5-Dihidroxibenzoico	3,30	C7H6O4	154,03	154,03	0,53	[M-H]-	116,5 ± 0,0	241,3 ± 2,7	141,4 ± 17,2
Ácido 5-O-Galoilquinico	3,48	C14H16O10	344,07	344,07	-0,95	[M-H]-	3046,6 ± 284,2	819,7 ± 43,6	4254,0 ± 245,2
Ácido gálico 3-O-galato	3,73	C14H10O9	322,03	322,03	0,53	[M-H]-	15525,0 ± 1312,8	3791,1 ± 69,3	20876,7 ± 881,5
Ácido vanílico	4,06	C8H8O4	168,04	168,04	-0,96	[M-H]-	333,9 ± 5,9	312,7 ± 1,7	177,1 ± 0,0
Metil digalato II	4,14		336,05	336,05	2,10	[M-H]-	5163,3 ± 0,0	20858,4 ± 46,1	10814,5 ± 789,4
Ácido benzoico	4,20	C7H6O2	122,04	122,04	3,92	[M-H]-	126,7 ± 1,7	174,9 ± 6,0	95,1 ± 15,5
Ácido elágico 4-O-glucósido	4,71	C20H16O13	464,06	464,06	1,21	[M-H]-	74498,1 ± 853,2	32386,9 ± 1005,0	130053,6 ± 284,1
Ácido digálico	5,23	C14H10O9	322,03	322,03	2,19	[M-H]-	4277,4 ± 275,2	618,1 ± 4,0	7398,5 ± 77,7
Ácido gálico etil ester	5,33	C9H10O5	198,05	198,05	2,27	[M-H]-	15086,4 ± 2,6	11366,9 ± 91,8	7447,5 ± 33,9
Ácido elágico 4-O-arabinósido	5,42	C19H14O12	434,05	434,05	0,99	[M-H]-	51976,3 ± 143,4	20262,7 ± 512,6	84950,0 ± 1257,9
Ácido galálgico	5,59	C28H12O16	604,01	604,01	-7,25	[M-H]-	595,3 ± 44,0	ND	943,4 ± 9,0
Ácido elágico	5,60	C14H6O8	302,01	302,01	2,97	[M-H]-	227214,2 ± 2061,3	93420,4 ± 636,0	344189,0 ± 434,5
4-Galoilpirogaloil	5,92	C13H10O7	278,04	278,04	0,85	[M-H]-	ND	ND	177,9 ± 13,6



Ácido elágico 4-O-acetil-xilósido	6,19	C21H16O13	476,06	476,06	-8,47	[M-H]-	1042,3 ± 26,5	ND	1355,1 ± 50,1	
Ácido 4-hidroxibenzoico	6,67	C7H6O3	138,03	138,03	3,68	[M-H]-	165,4 ± 4,0	691,6 ± 29,9	207,6 ± 29,6	
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>										
Ácido cinámico	1,43	C9H8O2	148,05	148,05	2,26	[M-H]-	673,2 ± 7,1	445,5 ± 22,2	433,8 ± 14,9	
Ácido 3-cafeoilquinico	2,45	C16H18O9	354,10	354,10	2,70	[M-H]-	34731,3 ± 442,9	148856,1 ± 5335,2	69965,7 ± 297,0	
Ácido caftárico	2,45	C13H12O9	312,05	312,05	-2,73	[M-H]-	107,2 ± 0,0	100,9 ± 0,0	81,9 ± 0,0	
Ácido m-cumárico	2,64	C9H8O3	164,05	164,05	-0,04	[M-H]-	301,5 ± 21,9	212,0 ± 11,5	396,7 ± 14,5	
Ácido cafeico 4-O-aspartico	3,36	C13H13NO7	295,07	295,07	-3,64	[M-H]-	157,0 ± 5,8	538,8 ± 9,5	262,8 ± 9,0	
Ácido 4-p-cumaroilquinico	3,61	C16H18O8	338,10	338,10	-0,20	[M-H]-	1515,8 ± 82,0	8169,9 ± 47,8	2997,0 ± 15,5	
Ácido o-cumárico	3,61	C9H8O3	164,05	164,05	1,49	[M-H]-	504,9 ± 2,6	1234,7 ± 25,2	573,5 ± 35,7	
Ácido rosmarínico	3,61	C18H16O8	360,08	360,08	-8,66	[M-H]-	ND	1260,2 ± 0,0	ND	
Ácido cafeico 4-O-glucósido	3,71	C15H18O9	342,10	342,09	-2,44	[M-H]-	769,8 ± 0,0	1471,7 ± 132,9	816,3 ± 0,0	
Ácido 4-cafeoilquinico	3,86	C16H18O9	354,10	354,10	2,17	[M-H]-	19516,5 ± 254,1	79007,9 ± 570,7	37343,5 ± 1452,9	
Ácido p-cumárico 4-O-glucósido	4,07	C15H18O8	326,10	326,10	1,08	[M-H]-	3420,7 ± 4,5	1541,5 ± 3,6	3362,8 ± 98,3	
Ácido cafeico	4,12	C9H8O4	180,04	180,04	1,77	[M-H]-	1666,2 ± 61,7	4106,4 ± 65,9	2077,5 ± 131,8	
Ácido 5-cafeoilquinico	4,13	C16H18O9	354,10	354,10	2,35	[M-H]-	14928,2 ± 121,5	56354,6 ± 477,1	28764,8 ± 1211,9	
Ácido ferúlico	4,14	C10H10O4	194,06	194,06	-7,79	[M-H]-	240,2 ± 0,5	321,8 ± 4,4	206,6 ± 14,3	
Ácido cafeico etil ester	4,36	C11H12O4	208,07	208,07	0,62	[M-H]-	128,2 ± 17,1	95,8 ± 0,0	162,7 ± 0,0	
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	4,50	C16H20O9	356,11	356,11	-0,94	[M-H]-	1247,4 ± 12,6	1163,2 ± 5,4	1206,8 ± 11,2	
Ácido 3-feruloilquinico	4,58	C17H20O9	368,11	368,11	0,96	[M-H]-	386,1 ± 0,0	2513,3 ± 0,0	759,2 ± 19,8	
Ácido 5-p-Cumaroilquinico	4,73	C16H18O8	338,10	338,10	1,02	[M-H]-	1560,6 ± 30,9	5769,8 ± 65,4	2499,5 ± 125,6	
Ácido p-cumárico 4-O-ácido málico	5,06	C13H12O7	280,06	280,06	0,03	[M-H]-	57,3 ± 0,0	ND	ND	
Ácido 4-feruloilquinico	5,09	C17H20O9	368,11	368,11	1,10	[M-H]-	1027,9 ± 0,0	3713,2 ± 104,6	1891,7 ± 0,0	
Ácido 4-sinapoilquinico	5,14	C18H22O10	398,12	398,12	-2,27	[M-H]-	ND	298,2 ± 0,0	ND	
Ácido p-cumárico	5,14	C9H8O3	164,05	164,05	0,67	[M-H]-	384,0 ± 17,8	336,3 ± 4,4	237,4 ± 2,3	
Ácido p-cumárico 4-O-ácido quinico	5,30	C16H18O8	338,10	338,10	-0,68	[M-H]-	669,1 ± 0,0	ND	918,8 ± 0,0	
Ácido 3,4-dicafeoilquinico	5,43	C25H24O12	516,13	516,13	0,11	[M-H]-	2806,6 ± 0,0	3248,7 ± 211,7	ND	
Ácido 5-feruloilquinico	5,54	C17H20O9	368,11	368,11	1,24	[M-H]-	450,1 ± 15,0	2508,5 ± 201,6	615,6 ± 2,6	
Ácido isoferúlico	5,66	C10H10O4	194,06	194,06	-0,09	[M-H]-	140,8 ± 8,5	193,5 ± 1,5	117,7 ± 8,4	
Ácido sinápinico	5,73	C11H12O5	224,07	224,07	0,67	[M-H]-	ND	262,9 ± 4,5	162,9 ± 0,0	
Ácido p-cumárico 4-O-ácido glicólico	5,86	C11H10O5	222,05	222,05	0,10	[M-H]-	75,9 ± 0,0	220,5 ± 27,3	121,7 ± 6,4	

Ácido 3,5-dicafeoilquinico	6,27	C25H24O12	516,13	516,13	-2,24	[M-H]-	ND	1151,3 ± 42,0	673,6 ± 0,0
Ácido 4,5-dicafeoilquinico	6,70	C25H24O12	516,13	516,13	0,97	[M-H]-	467,3 ± 4,4	1466,3 ± 0,0	852,4 ± 74,3
p-Coumaric acid ethyl ester	9,50	C11H12O3	192,08	192,08	1,49	[M-H]-	1318,4 ± 31,3	928,1 ± 0,0	636,1 ± 45,9
<b>Elagitánicos</b>									
Granatina A	1,65	C34H24O22	784,08	784,07	-2,31	[M-H]-	111059,9 ± 1420,7	42752,1 ± 524,5	180755,1 ± 1679,0
Punicalagina	3,70	C48H28O30	1084,07	1084,06	-2,44	[M-H]-	405488,7 ± 2963,2	176538,4 ± 2040,4	543233,8 ± 4480,3
Punicalina	3,99	C34H22O22	782,06	782,06	-2,87	[M-H]-	38739,2 ± 1763,0	10001,8 ± 515,9	73451,5 ± 796,0
<b>Galotaninos</b>									
Galoil-bis HHDP hexósido (casuarictina)	4,24	C41H28O26	936,09	936,08	-3,09	[M-H]-	32540,5 ± 1896,3	10698,8 ± 302,0	61472,4 ± 2373,3
Pedunculagina	4,36	C34H24O22	784,08	784,08	-0,17	[M-H]-	161711,0 ± 2584,5	62102,7 ± 1823,1	236362,6 ± 11041,8
Pentagaloilglucosa	5,58	C41H32O26	788,11	788,11	-1,94	[M-H]-	110122,2 ± 2504,0	20115,2 ± 877,8	165074,8 ± 3243,7
Trigaloilglucosa isómero	5,76	C27H24O18	636,10	636,10	-0,57	[M-H]-	ND	985,4 ± 0,0	687,5 ± 728,5
Trigaloilglucosa	6,04	C27H24O18	636,10	636,10	1,06	[M-H]-	ND	297,6 ± 0,0	990,9 ± 0,0
<b>FLAVONOIDES</b>									
<b>Flavanoles</b>									
(+)-Galocatequina	1,66	C15H14O7	306,07	306,07	2,41	[M-H]	45801,5 ± 289,9	16751,7 ± 20,0	57660,0 ± 2064,2
(+)-Catequina 3-O-glucosa	2,13	C21H24O11	452,13	452,13	-7,05	[M-H]	1276,4 ± 13,9	1024,3 ± 0,3	752,8 ± 68,3
(-)-Epigalocatequina	3,44	C15H14O7	306,07	306,07	1,50	[M-H]	2659,7 ± 133,6	991,7 ± 17,8	4963,9 ± 272,2
Procianidina dímero B3	3,45	C30H26O12	578,14	578,14	-1,75	[M-H]	52777,2 ± 644,0	35870,6 ± 280,4	31048,8 ± 53,6
(+)-Catequina	3,79	C15H14O6	290,08	290,08	1,38	[M-H]	189879,1 ± 2365,9	152638,2 ± 1544,3	100048,8 ± 6498,0
(-)-Epicatequina 3-O-glucosa	3,89	C21H24O11	452,13	452,13	0,03	[M-H]	5632,4 ± 62,4	4063,7 ± 243,1	3213,6 ± 110,2
Procianidina trímero EEC	4,02	C45H38O18	866,21	866,20	-4,16	[M-H]	9268,1 ± 241,3	7929,9 ± 18,2	5467,6 ± 108,7
Metil galato	4,14	C8H8O5	184,04	184,04	1,16	[M-H]	2002,5 ± 60,0	8736,2 ± 128,7	4518,3 ± 96,9
Procianidina dímero B1	4,34	C30H26O12	578,14	578,14	-1,21	[M-H]	46469,0 ± 2733,9	40081,5 ± 167,2	23184,6 ± 966,4
(+)-Galocatequina 3-O-galato	4,35	C22H18O11	458,08	458,08	-0,85	[M-H]	579,6 ± 24,1	254,6 ± 0,0	703,1 ± 0,0
Procianidina trímero T2	4,45	C45H38O18	866,21	866,20	-3,98	[M-H]	8581,0 ± 273,9	6657,0 ± 156,5	4869,3 ± 100,0
(-)-Epicatequina	4,68	C15H14O6	290,08	290,08	2,15	[M-H]	190099,4 ± 7093,7	152711,2 ± 408,0	91650,3 ± 1653,7
(-)-Epigalocatequina 3-O-galate	4,75	C22H18O11	458,08	458,08	-9,20	[M-H]	2033,8 ± 130,5	821,2 ± 22,7	3522,4 ± 428,0
Procianidina trímero C1	4,94	C45H38O18	866,21	866,20	-3,20	[M-H]	27958,1 ± 409,3	22044,5 ± 216,9	15245,0 ± 232,6
Procianidina dímero B2	5,12	C30H26O12	578,14	578,14	-2,10	[M-H]	7343,4 ± 86,5	4817,1 ± 68,1	4467,5 ± 101,6

(+)-Catequina 3-O-galato	5,17	C22H18O10	442,09	442,09	-1,09	[M-H]	771,4 ± 39,0	ND	977,8 ± 25,0
Procianidina dímero B7	5,44	C30H26O12	578,14	578,14	-6,91	[M-H]	ND	2458,5 ± 38,5	ND
Procianidina dímero B4	5,82	C30H26O12	578,14	578,14	-3,05	[M-H]	4754,8 ± 71,9	3330,5 ± 78,1	2628,8 ± 74,8
(-)-Epicatequina 3-O-galato	5,83	C22H18O10	442,09	442,09	-2,19	[M-H]	15439,5 ± 798,1	5042,9 ± 81,2	16218,4 ± 1020,4
Procianidina dímero B5	6,24	C30H26O12	578,14	578,14	-5,19	[M-H]	1103,1 ± 52,4	637,3 ± 0,0	704,1 ± 12,8
Procianidina dímero A2	6,60	C30H24O12	576,13	576,13	-1,01	[M-H]	2970,8 ± 161,9	2201,5 ± 193,0	1705,0 ± 53,3
Prodelfinidina dímero B3	7,38	C30H26O14	610,13	610,13	-3,93	[M-H]	1468,5 ± 81,4	6088,2 ± 62,4	2694,4 ± 14,6
<b>Flavanonas</b>									
Eriodictiol	4,68	C15H12O6	288,06	288,06	1,09	[M-H]	2910,9 ± 102,9	2260,4 ± 108,2	1253,9 ± 2,7
Naringina	6,17	C27H32O14	580,18	580,18	-5,21	[M-H]	313,1 ± 43,3	323,7 ± 0,0	210,0 ± 0,0
Hesperidina	6,74	C28H34O15	610,19	610,19	0,25	[M-H]	428,8 ± 35,4	415,5 ± 0,0	418,3 ± 0,0
Neohesperidina	7,42	C28H34O15	610,19	610,19	-1,39	[M-H]	981,8 ± 32,4	ND	1071,5 ± 17,5
Naringenina	8,67	C15H12O5	272,07	272,07	-1,39	[M-H]	851,2 ± 9,1	592,0 ± 18,3	755,9 ± 67,7
<b>Flavonoles</b>									
Miricetina 3-O-rutinósido	3,52	C27H30O17	626,15	626,14	-7,01	[M-H]	ND	402,6 ± 0,0	ND
Kaempferol 3-O-soforosido 7-O-glucósido	3,61	C33H40O21	772,21	772,20	-7,32	[M-H]	ND	567,0 ± 18,4	ND
Quercetina 3-O-ramnósido	4,09	C21H20O11	448,10	448,10	-0,10	[M-H]	2295,1 ± 141,8	3492,1 ± 67,3	2097,4 ± 129,2
Ramnetina	4,23	C16H12O7	316,06	316,06	-4,61	[M-H]	186,7 ± 0,0	176,8 ± 6,1	ND
Quercetina 4'-O-glucósido	4,44	C21H20O12	464,10	464,10	7,56	[M-H]	6999,4 ± 30,3	6977,2 ± 168,7	6756,7 ± 98,9
3,7-Dimetilquercetina	4,72	C17H14O7	330,07	330,07	-4,46	[M-H]	856,6 ± 90,4	625,7 ± 0,0	575,6 ± 0,0
Quercetina 3-O-xilosil-glucurónido	4,92	C26H26O17	610,12	610,11	-4,40	[M-H]	ND	884,1 ± 94,2	508,0 ± 13,6
Quercetina 3-O-xilosil-rutinósido	5,18	C32H38O20	742,20	742,19	-7,98	[M-H]	ND	2036,2 ± 62,4	1075,5 ± 0,0
Quercetina 3,4'-O-diglucósido	5,18	C27H30O17	626,15	626,15	-3,86	[M-H]	ND	2450,2 ± 0,0	ND
Kaempferol 3,7-O-diglucósido	5,19	C27H30O16	610,15	610,15	0,69	[M-H]	552,2 ± 0,0	355,9 ± 0,0	ND
Quercetina 3-O-soporósido	5,19	C27H30O17	626,15	626,14	-6,76	[M-H]	2292,6 ± 21,2	2459,6 ± 0,0	2403,7 ± 1,6
Kaempferol 3-O-glucosil-ramnosil-galactósido	5,20	C33H40O20	756,21	756,21	0,38	[M-H]	ND	759,1 ± 0,0	ND
Miricetina 3-O-galactósido	5,26	C21H20O13	480,09	480,09	-1,39	[M-H]	12317,7 ± 22,0	21344,6 ± 14,8	10091,0 ± 711,7
Quercetina 3-O-glucosil-xilósido	5,39	C26H28O16	596,14	596,14	-3,88	[M-H]	8498,2 ± 350,8	37771,3 ± 261,2	18447,1 ± 219,0
Isoramnetina 3-O-galactósido	5,60	C22H22O12	478,11	478,11	-0,14	[M-H]	14870,4 ± 426,9	3384,8 ± 22,3	21619,3 ± 246,9

Quercetina 3-O-ramnosil-galactósido	5,70	C27H30O16	610,15	610,15	-8,18	[M-H]	10776,8 ± 292,1	24292,9 ± 1269,6	18428,2 ± 807,5	
Dihidroquercetina	5,86	C15H12O7	304,06	304,06	0,80	[M-H]	1062,3 ± 21,9	588,5 ± 8,4	806,4 ± 115,1	
Miricetina 3-O-ramnósido	5,87	C21H20O12	464,10	464,10	1,35	[M-H]	109129,4 ± 7521,1	61799,8 ± 300,1	125893,6 ± 7977,9	
Kaempferol 3-O-glucurónido	5,88	C21H18O12	462,08	462,08	-6,63	[M-H]	1454,8 ± 35,1	950,1 ± 42,2	1368,8 ± 185,2	
Miricetina 3-O-glucósido	6,02	C21H20O13	480,09	480,09	-0,89	[M-H]	ND	611,4 ± 69,2	511,4 ± 11,9	
Quercetina 3-O-arabinósido	6,13	C20H18O11	434,08	434,09	1,27	[M-H]	17352,6 ± 3006,9	3267,8 ± 391,1	21495,8 ± 4058,5	
Kaempferol 3-O-rutinósido	6,18	C27H30O15	594,16	594,16	-3,25	[M-H]	12272,8 ± 422,8	7845,5 ± 732,5	14914,5 ± 224,3	
Kaempferol 3-O-galactósido	6,36	C21H20O11	448,10	448,10	1,51	[M-H]	13423,1 ± 258,8	10020,3 ± 54,5	12481,7 ± 221,0	
Isoramnetina 4'-O- glucósido	6,52	C22H22O12	478,11	478,11	-0,48	[M-H]	5469,6 ± 250,1	5096,9 ± 153,1	3151,9 ± 168,0	
Miricetina	6,72	C15H10O8	318,04	318,04	3,06	[M-H]	11371,7 ± 354,2	15566,6 ± 78,7	17423,8 ± 630,3	
Quercetina	7,85	C15H10O7	302,04	302,04	2,25	[M-H]	28335,3 ± 315,7	26091,5 ± 417,6	34535,7 ± 125,1	
Kaempferol	8,85	C15H10O6	286,05	286,05	2,40	[M-H]	2712,7 ± 61,3	1375,2 ± 26,2	3078,3 ± 17,9	
Isoramnetina	9,07	C16H12O7	316,06	316,06	1,43	[M-H]	5900,0 ± 163,7	2591,2 ± 52,1	4708,7 ± 448,8	
<b>Antocianinas</b>										
Delfinidina 3-O- glucósido	3,64	C21H21O12	465,10	465,11	7,27	[M-e]+	698,3 ± 17,1	1364,9 ± 2,9	947,6 ± 42,5	
Delfinidina 3-O-sambubioside	3,65	C26H29O16	597,15	597,15	0,28	[M-e]+	19525,3 ± 242,6	175183,1 ± 81,2	87911,9 ± 2345,8	
Cianidina 3-O- glucósido	4,12	C21H21O11	449,11	449,11	9,30	[M-e]+	321,9 ± 28,6	658,8 ± 58,6	620,5 ± 56,8	
Cianidina 3-O-sambubiósido	4,14	C26H29O15	581,15	581,15	-0,52	[M-e]+	22427,9 ± 357,8	148306,9 ± 516,5	88143,8 ± 440,7	
Petunidina 3-O- glucósido	4,27	C22H23O12	479,12	479,12	5,54	[M-e]+	885,2 ± 1,7	744,9 ± 24,4	912,4 ± 36,5	
Pelargonidina 3-O-arabinósido	4,54	C20H19O9	403,10	403,11	9,19	[M-e]+	ND	ND	36,8 ± 0,0	
Peonidina 3-O- glucósido	4,66	C22H23O11	463,12	463,13	5,51	[M-e]+	761,1 ± 21,9	590,1 ± 13,8	687,1 ± 0,0	
Malvidina 3-O- glucósido	4,70	C23H25O12	493,13	493,13	-0,59	[M-e]+	37345,0 ± 63,6	26308,6 ± 1357,3	33292,8 ± 37,5	
Pelargonidina 3-O-(6"-succinil- glucósido)	4,70	C25H25O13	533,13	533,13	1,87	[M-e]+	83,4 ± 0,0	101,6 ± 0,0	ND	
Cianidina 3-O-(6"-caffeoil-glucósido)	5,21	C30H27O14	611,14	611,15	9,05	[M-e]+	124,5 ± 0,0	ND	379,9 ± 39,3	
Cianidina 3,5-O-diglucósido	5,71	C27H31O16	611,16	611,16	4,57	[M-e]+	ND	249,3 ± 0,0	165,6 ± 1,6	
Pelargonidina 3-O- glucósido	5,75	C21H21O10	433,11	433,12	3,82	[M-e]+	238,0 ± 17,9	81,0 ± 0,0	673,6 ± 81,6	
Malvidina 3-O-(6"-acetil-glucósido)	5,84	C25H27O13	535,15	535,15	8,76	[M-e]+	304,7 ± 0,0	233,6 ± 0,0	229,7 ± 0,0	
Delfinidina 3-O-(6"-malonil-glucósido)	5,87	C24H23O15	549,09	549,08	-6,25	[M-e]+	59,8 ± 0,0	71,5 ± 5,8	58,6 ± 0,0	
Petunidina 3-O-ramnósido	5,95	C22H23O10	447,13	447,13	-4,24	[M-e]+	191,4 ± 25,1	182,3 ± 39,2	159,4 ± 9,2	

Cianidina 3-O-rutinósido	6,19	C27H31O15	595,17	595,17	8,28	[M-e]+	71,7 ± 0,0	51,6 ± 0,0	109,8 ± 6,8
Malvidina 3-O-(6"-cafeoil-glucósido)	6,24	C32H31O15	655,17	655,17	6,16	[M-e]+	ND	ND	57,9 ± 0,0
Malvidina 3-O-(6"-p-coumaroil-glucósido)	6,75	C32H31O14	639,17	639,17	5,36	[M-e]+	1390,8 ± 57,3	426,5 ± 12,2	1434,5 ± 39,6
Malvidina 3-O-glucósido 4-vinilfenol (Pigment A)	6,75	C31H29O13	609,16	609,17	8,49	[M-e]+	131,1 ± 0,0	66,8 ± 0,0	148,9 ± 18,3
Peonidina 3-O-(6"-p-coumaroil-glucósido)	7,09	C31H29O13	609,16	609,17	7,02	[M-e]+	1502,1 ± 287,9	853,7 ± 134,0	1236,4 ± 155,8
<b>LIGNANOS</b>									
Dimetilmatairesinol	4,26	C22H26O6	386,17	386,17	2,11	[M-H]-	314,0 ± 8,2	ND	313,0 ± 0,0
7-Oxomatairesinol	6,13	C20H20O7	372,12	372,12	-2,95	[M-H]-	186,4 ± 0,0	173,9 ± 0,0	ND
7-Hidroximatairesinol	6,99	C20H22O7	374,14	374,14	1,84	[M-H]-	229,2 ± 44,7	201,2 ± 0,0	258,8 ± 0,0
Secoisolariciresinol	7,02	C20H26O6	362,17	362,17	-4,90	[M-H]-	437,5 ± 40,1	409,2 ± 27,5	290,2 ± 0,0
Lariciresinol-sesquilignano	7,42	C30H36O10	556,23	556,23	-2,03	[M-H]-	5961,3 ± 709,5	4716,9 ± 17,0	4090,0 ± 132,9
Secoisolariciresinol-sesquilignano	7,63	C30H38O10	558,25	558,24	-8,09	[M-H]-	322,4 ± 23,0	348,7 ± 0,0	ND
<b>ESTILBENOS</b>									
Piceatannol	3,80	C14H12O4	244,07	244,07	-5,17	[M-H]-	121,6 ± 3,5	ND	ND
<i>trans</i> -Resveratrol 3-O-glucósido	5,02	C20H22O8	390,13	390,13	2,00	[M-H]-	535,9 ± 5,6	345,4 ± 0,7	435,4 ± 0,0
<i>cis</i> -Resveratrol 2-C-glucósido	5,73	C20H22O8	390,13	390,13	-4,75	[M-H]-	623,1 ± 40,9	527,7 ± 53,4	435,2 ± 37,7
Piceatannol 3-O-glucósido	5,86	C20H22O9	406,13	406,13	0,66	[M-H]-	582,5 ± 28,4	484,2 ± 34,4	347,6 ± 0,0
δ-Viniferina	6,80	C28H22O6	454,14	454,14	-3,34	[M-H]-	1819,8 ± 115,4	1271,6 ± 8,7	1104,5 ± 67,1
<i>trans</i> -Resveratrol 5-O-glucósido	6,83	C20H22O8	390,13	390,13	0,96	[M-H]-	726,8 ± 16,1	622,1 ± 38,7	454,2 ± 27,5
<i>trans</i> -Resveratrol	7,12	C14H12O3	228,08	228,08	-0,34	[M-H]-	701,0 ± 46,3	514,5 ± 0,2	249,7 ± 165,5
Dehydro-glucosyl-resveratrol	7,13	C20H20O8	388,12	388,12	4,12	[M-H]-	1426,2 ± 0,0	1717,0 ± 0,0	897,7 ± 0,0
Ampelopsina C	7,83	C42H32O9	680,20	680,20	-4,57	[M-H]-	676,0 ± 0,0	437,5 ± 30,5	ND
Hopeaphenol	8,14	C56H42O12	906,27	906,26	-7,17	[M-H]-	13683,8 ± 924,5	7458,7 ± 541,0	9801,6 ± 2768,4
ε-Viniferin	8,61	C28H22O6	454,14	454,14	-1,10	[M-H]-	2413,7 ± 90,2	988,1 ± 10,2	1587,3 ± 390,3
Isohopeaphenol	8,61	C56H42O12	906,27	906,26	-8,29	[M-H]-	1434,8 ± 50,7	499,2 ± 0,0	1056,0 ± 9,9
Amuerensin G	8,86	C42H32O9	680,20	680,20	-2,68	[M-H]-	3141,3 ± 125,3	955,0 ± 7,6	2789,0 ± 88,0
Ampelopsin E	9,01	C42H32O9	680,20	680,20	-3,95	[M-H]-	2637,5 ± 23,1	1371,6 ± 11,9	ND
α-Viniferina	9,22	C42H30O9	678,19	678,19	-2,64	[M-H]-	1501,3 ± 13,1	211,4 ± 0,0	2050,4 ± 0,0
Ampelopsin H	9,51	C56H42O12	680,20	680,20	-7,27	[M-H]-	839,6 ± 42,7	409,3 ± 0,0	882,9 ± 93,6
<b>XANTONAS</b>									
Mangiferina	3,88	C19H18O11	422,08	422,08	-7,45	[M-H]-	2147,8 ± 6,5	1515,8 ± 39,4	5792,4 ± 48,0

Isomangiferina	4,92	C19H18O11	422,08	422,08	0,08	[M-H] <sup>-</sup>	ND	ND	724,6 ± 24,7
Mangiferitina	6,73	C13H8O6	260,03	260,03	-1,91	[M-H] <sup>-</sup>	ND	ND	209,8 ± 1,6
<b>ÁCIDOS ORGÁNICOS</b>									
Ácido glucónico	0,55	C6H12O7	196,0583	196,0586	1,31	[M-H] <sup>-</sup>	25427,1 ± 1936,7	14141,8 ± 708,9	21662,8 ± 529,9
Ácido glucurónico	0,55	C6H10O7	194,0427	194,0429	1,33	[M-H] <sup>-</sup>	5200,3 ± 460,2	4546,2 ± 236,0	3119,3 ± 8,9
Ácido glucárico	0,58	C6H10O8	210,0376	210,0374	-0,86	[M-H] <sup>-</sup>	3361,9 ± 409,0	3862,2 ± 129,1	2119,9 ± 17,3
Ácido malónico	0,58	C3H4O4	104,0110	104,0111	1,59	[M-H] <sup>-</sup>	99,7 ± 2,3	104,4 ± 1,6	91,7 ± 4,7
Ácido hidroxicitrico	0,59	C6H8O8	208,0219	208,0222	1,38	[M-H] <sup>-</sup>	5647,2 ± 228,3	23873,5 ± 294,7	13252,2 ± 768,1
Ácido isocítrico	0,59	C6H8O7	150,0164	150,0169	3,00	[M-H] <sup>-</sup>	3192,5 ± 31,2	3073,6 ± 132,0	2048,0 ± 113,4
Ácido hibiscus	0,64	C6H6O7	190,0114	190,0117	1,83	[M-H] <sup>-</sup>	88889,9 ± 714,0	213571,9 ± 1355,2	136402,7 ± 1693,5
Ácido maleico	0,67	C4H4O4	116,0110	116,0114	3,61	[M-H] <sup>-</sup>	341,5 ± 5,0	ND	179,4 ± 11,6
Ácido citracónico	0,70	C5H6O4	130,0266	130,0268	1,45	[M-H] <sup>-</sup>	3368,3 ± 882,5	1345,0 ± 41,5	2858,9 ± 55,1
Ácido cítrico	0,73	C6H8O7	192,0270	192,0272	1,14	[M-H] <sup>-</sup>	115093,1 ± 119,8	51570,6 ± 425,4	125202,2 ± 435,4
Ácido hibiscus dimetilester	0,79	C8H10O7	218,0427	218,0411	-7,15	[M-H] <sup>-</sup>	159,3 ± 13,5	220,9 ± 13,8	174,2 ± 3,7
Ácido fumárico	0,82	C4H4O4	116,0110	116,0111	1,34	[M-H] <sup>-</sup>	ND	153,0 ± 5,5	ND
Ácido hibiscus 6-O-metil ester	0,87	C7H8O7	204,0270	204,0271	0,39	[M-H] <sup>-</sup>	2407,6 ± 40,0	9369,4 ± 717,6	3903,7 ± 132,7
Ácido shiquímico	1,18	C7H10O5	174,0528	174,0533	2,87	[M-H] <sup>-</sup>	662,5 ± 174,1	541,4 ± 57,8	751,2 ± 3,3
Ácido quínico	3,86	C7H12O6	192,0634	192,0636	1,25	[M-H] <sup>-</sup>	8958,4 ± 6,0	37230,8 ± 23,2	17078,9 ± 304,1

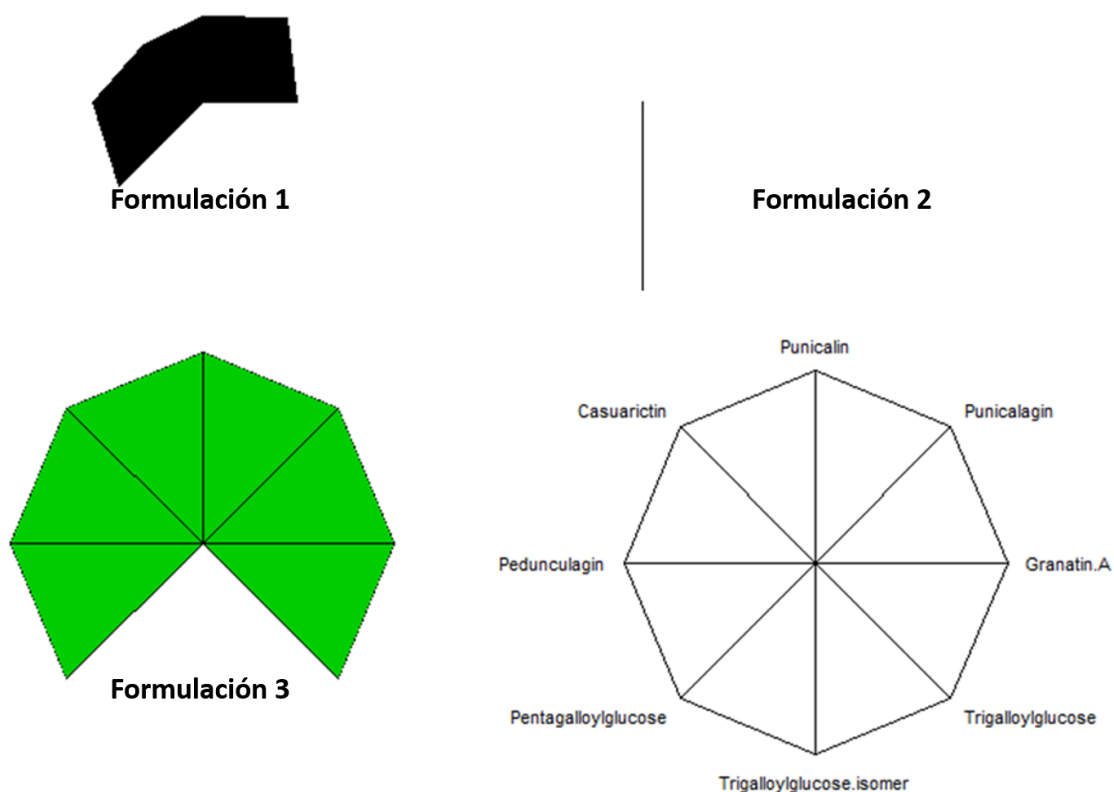
Los resultados son expresados como cuentas ± desviación estándar. ND: no detectado.

Dentro de polifenoles hidrolizables extraíbles están los galotaninos y elagitaninos. Los galotaninos están compuestos de ácido gálico mientras que los elagitaninos se caracterizan por ser conjugados hidrolizables que contienen uno o más grupos del del ácido hexahidroxidifénico (HHDP, por sus siglas en inglés), el cual es una forma dimérica del ácido gálico, que tiene esterificado una azúcar, especialmente glucosa (García *et al.*, 2015). Se ha reconocido el mango y la granada como una buena fuente de galotaninos (Barnes *et al.*, 2016). La Formulación 3 (Figura 14), que tiene mayor contenido de éstos subproductos, presentó 4 de los 5 galotaninos identificados como mayoritarios: casuarictina, pedunculagina, tri-galoil glucosa y penta-galoil glucosa, este último previamente reportado en pulpa y cáscara de mango (Berardini *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2018).

Los elagitaninos por otro lado, se ha reportado que son predominantes en los frutos de granada, siendo los mayoritarios la punicalagina y la punicalina, a quienes se le atribuye los efectos a la salud de esta fruta. Ambos, junto con la granatina A, fueron identificados en todas las formulaciones (Cuadro 20), siendo abundantes en la formulación 3 (Figura 14), ya que tiene mayor contenido de subproducto de granada y se ha reportado que éstos compuestos están contenidos principalmente en el pericarpio y mesocarpio de ésta (García *et al.*, 2015).





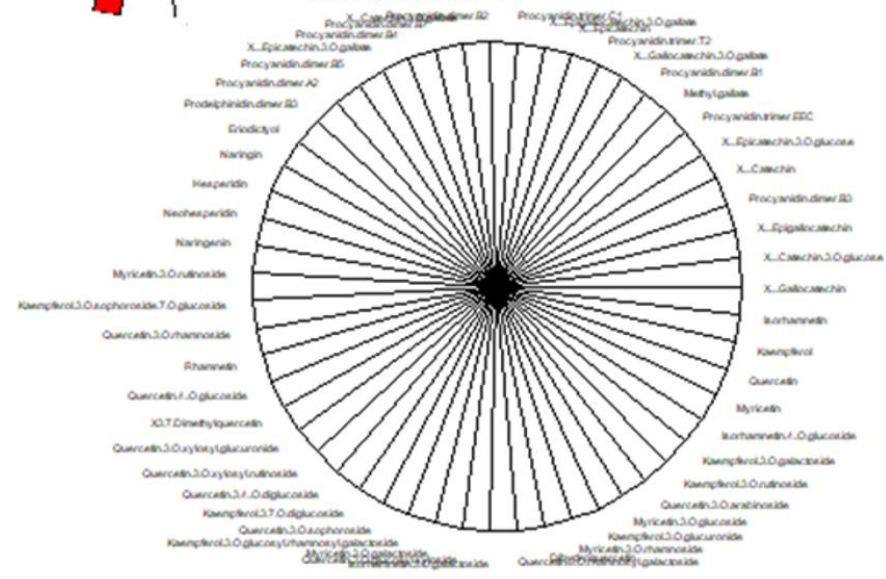
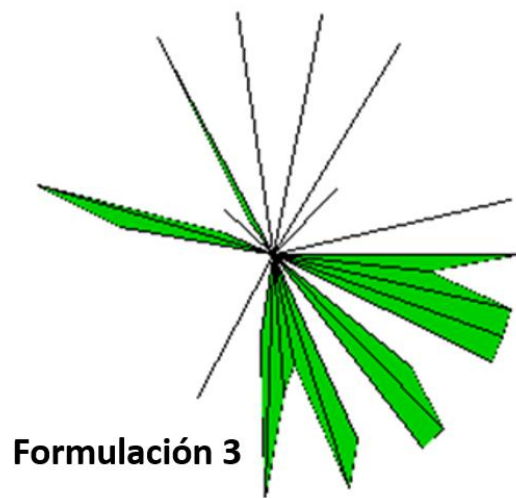
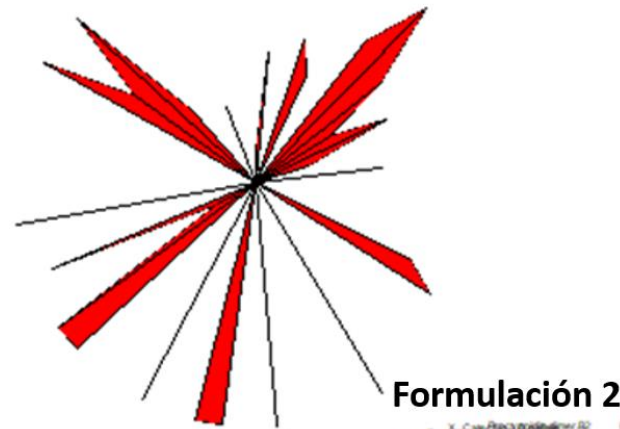


**Figura 14.** Elagitaninos y galotaninos identificados en las formulaciones desarrolladas

Los flavonoides por su parte se clasifican en flavonoles, flavanonas, isoflavonoides, flavonas, flavan-3-oles, flavanoles y antocianinas. De éstos, los flavonoles son el subgrupo que se encuentra de forma mayoritaria en frutas y vegetales, y de éstos, junto con sus glucósidos, se identificaron 28 compuestos (11 derivados de quercetina, 6 de kaemferol, 4 de miricetina, 2 de isoramnetina) en las tres formulaciones (Cuadro 20). En la formulación 2, que tiene un mayor contenido de subproducto de Jamaica seguido de orujo de uva, se identificaron como más abundantes 12 de éstos flavonoles. En lo que respecta al subgrupo de los flavanoles y las flavanonas, tuvo más compuestos mayoritarios la formulación 1 (Figura 15), la cual contenía 13 flavanoles y 3 flavanonas (eriodictiol, naringenina, hesperidina). En los flavanoles para la formulación 1 destacan los dímeros y trímeros de procianidina. El orujo de uva contiene semillas y en éstas las procianidinas representan la mayor parte del extracto de polifenoles; se trata de estructuras complejas compuestas de

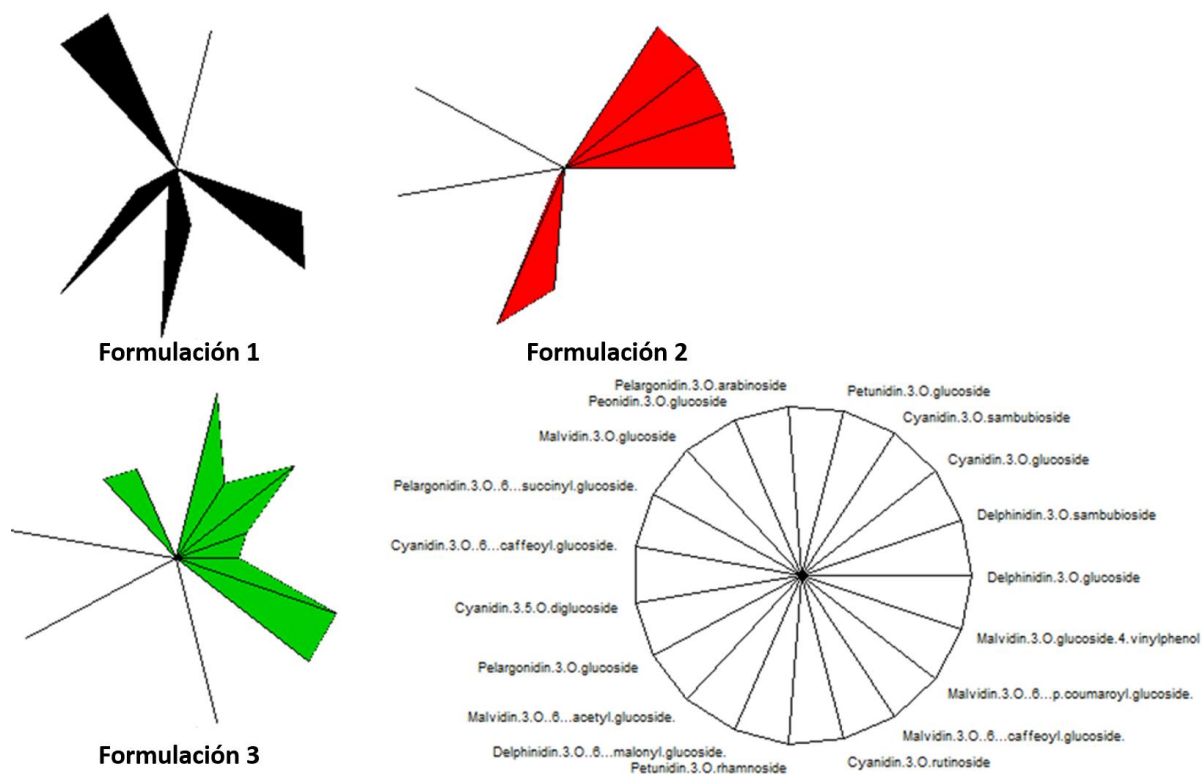
unidades de flavan-3-oles, (catequina, epicatequina y otros) que están asociadas a través de enlaces interflavonoides ésteres de galato (Ivan *et al.*, 2012)

Debido a los efectos a la salud reportados para las antocianinas éstas también fueron identificadas en las formulaciones (Figura 16). En la formulación 1, que tiene como ingrediente mayoritario el orujo de uva, fueron identificadas como mayoritarias: peonidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-6"-acetil-glucósido, petunidina 3-O-ramnósido y la peonidina 3-O-6"-p-coumaroil-glucósido. Para el orujo de uva, las antocianinas que se han reportado como más abundantes son delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina 3-glucósidos y sus derivados acilados con ácidos cinámicos (Narduzzi *et al.*, 2015), todas estas se encontraron en las formulaciones. En la formulación 2, donde el subproducto de Jamaica es el mayoritario, las principales antocianinas identificadas fueron: delfinidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-glucósido, pelargonidina 3-O-6"-sucinil-glucósido, cianidina 3,5-O-diglucósido, delfinidina 3-O-6"-malonil-glucósido, delfinidina 3-O-sambubiósido y cianidina 3-O-sambubiósido. Éstas últimas se han reportado como mayoritarias en la Jamaica, siendo las responsables de la coloración roja brillante (Cisse *et al.*, 2009). Por otro lado, en la formulación 3, se encontraron como mayoritarias 8 de las 20 antocianinas identificadas: petunidina 3-O-glucósido, pelargonidina 3-O-arabinósido, cianidina 3-O-6"-cafeoil-glucósido, pelargonidina 3-O-glucósido, cianidina 3-O-rutinósido, malvidina 3-O-6"-caffeoil-glucósido, malvidina 3-O-6"-p-coumaroil-glucósido y malvidina 3-O-glucósido 4-vinilfenol.



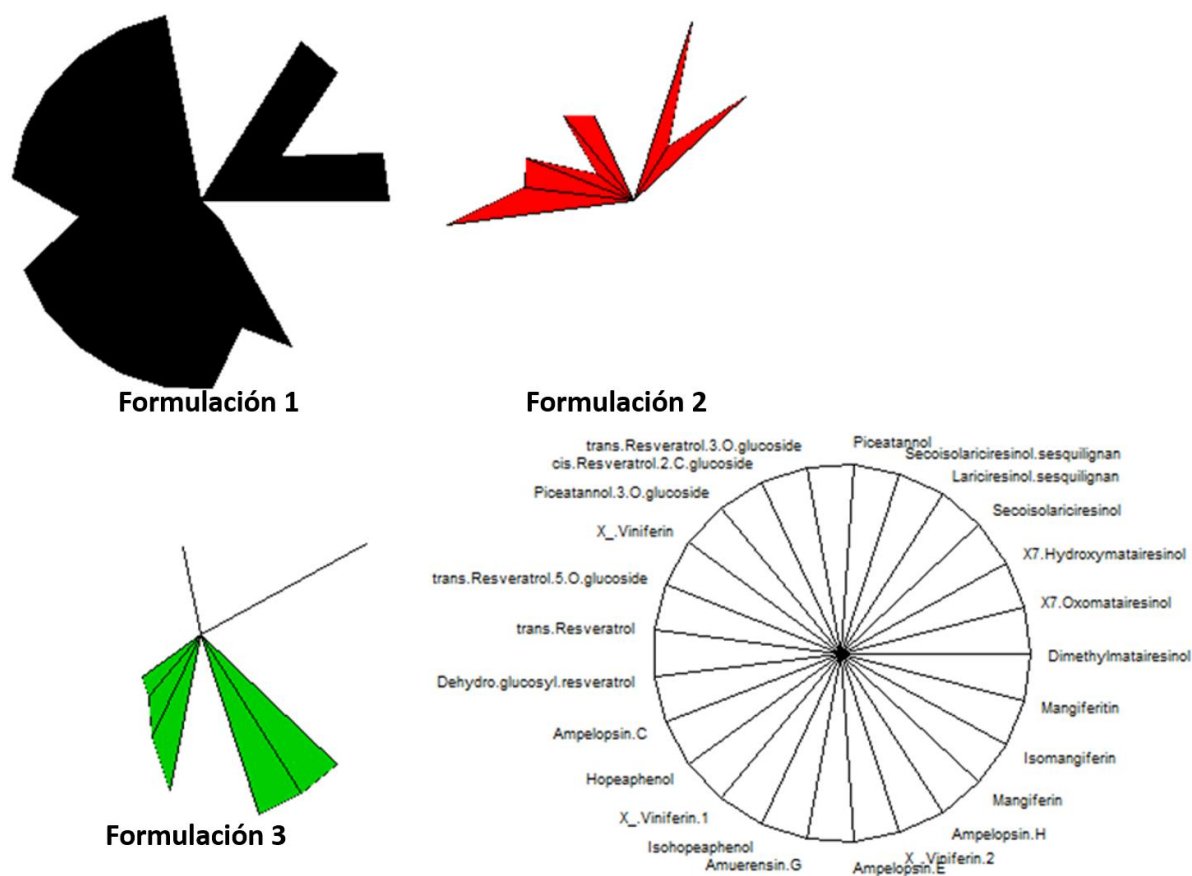
**Figura 15.** Flavonoides identificados en las formulaciones desarrolladas

Los estilbenos también son polifenoles extraíbles. 16 fueron identificados en las formulaciones y 14 fueron más abundantes en la formulación 1 (Figura 17). Los estilbenos actúan como fitoalexinas (compuestos antimicrobianos) y son de los polifenoles de mayor importancia de la uva. Entre los mayoritarios encontrados en la formulación 1 fueron los siguientes: trans-resveratrol, glucósidos de resveratrol como: trans-resveratrol 3-O-glucósido, cis-resveratrol 2-C-glucósido, trans-resveratrol 5-O-glucósido; δ-viniferina, ε-viniferina, ampelopsina C, ampelopsin H y ampelopsina E (dímeros de resveratrol); piceatanol y piceatanol 3-O-glucósido (oligómeros de resveratrol), amuerensina, isohopeafenol y hopeafenol. Isohopeafenol y ampelopsina H se ha reportado en hojas, raíces y tallos de la vid (Flamini *et al.*, 2015). Cabe mencionar que el orujo de uva además de semillas y pieles contiene tallos de la vid.



**Figura 16.** Antocianinas identificadas en las formulaciones desarrolladas  
 De igual manera se identificaron 6 lignanos (Cuadro 20), los cuales son considerados como fitoestrógenos y se metabolizan a través de un proceso microbiano donde las

reacciones de desmetilación y deshidroxilación son claves para su biotransformación (Ozidal *et al.*, 2016). De los lignanos identificados, 4 son mayoritarios en la Formulación 1 (Figura 17): dimetilmatairesinol, 7-oxomatairesinol, lariciresinol-sesquilignano, secoisolariciresinol y secoisolariciresinol-sesquilignano. El secoisolariciresinol es uno de los lignanos más comúnmente encontrados en plantas, además de ser un producto de la degradación microbiana del siringaresinol y del lariciresinol (Mosele *et al.*, 2015).

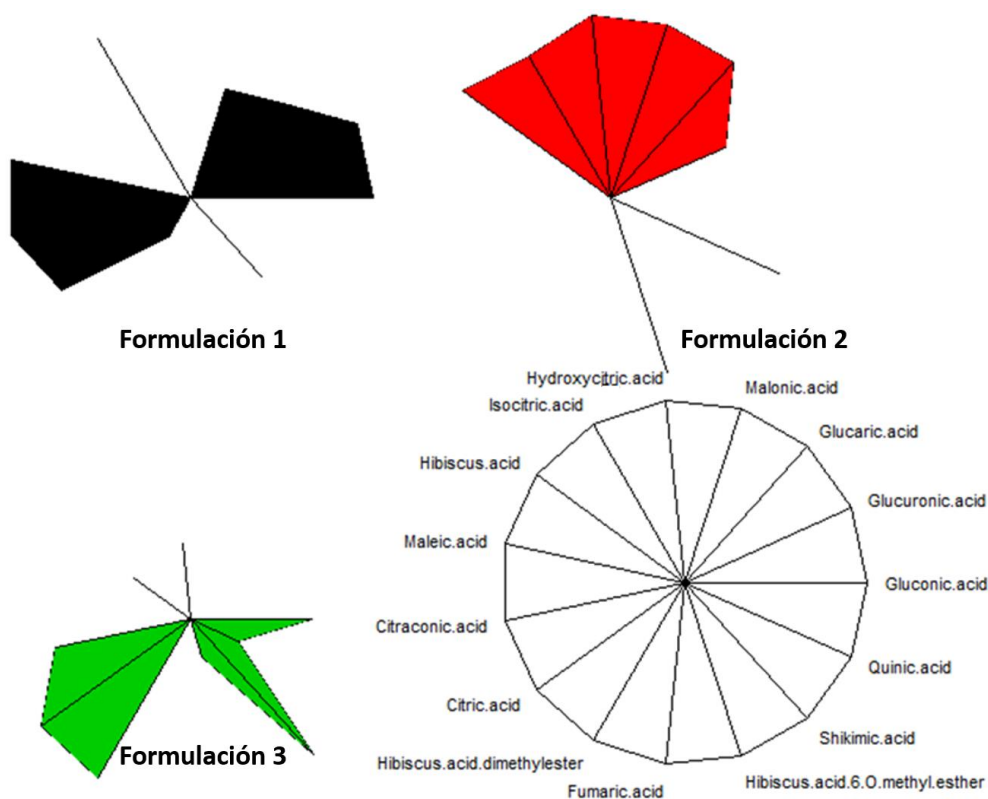


**Figura 17.** Estilbenos, lignanos y xantonas identificados en las formulaciones desarrolladas

Asimismo, 3 xantonas características del mango fueron identificadas: mangiferina, isomangiferina y mangiferitina. La mangiferina se origina a través de la ruta del ácido shikimico con los aminoácidos fenilalanina y tirosina como intermediarios (Matkowski *et al.*, 2013). Este compuesto constituye un importante nutraceutico de origen natural con amplias aplicaciones debido a los efectos que se han reportado a la salud

(Kulkarni y Rathod, 2014). Como era esperable estas xantonas fueron mayoritarias en la formulación 3 (Figura 17) con el mayor contenido de subproducto de mango (Imran *et al.*, 2017).

De los 15 ácidos orgánicos identificados, 8 fueron mayoritarios en la formulación 2 (Figura 18): ácido glucárico, malónico, fumárico, quínico, hibiscus, hibiscus 6-O-metil ester, hibiscus dimetil ester e hidroxicitrico. Los cálices de Jamaica se caracterizan por tener un alto porcentaje de ácidos orgánicos y a pesar de que se trata de su subproducto no todo fue lixiviado a la bebida. Morales-Luna *et al.* (2018) reportaron que el principal ácido orgánico de las variedades blanca y criolla de los cálices de Jamaica es el ácido hibiscus, seguido de su derivado dimetilado, asimismo sugieren que el efecto antiobesogénico de los cálices de Jamaica se debe no sólo a las antocianinas sino también a éstos compuestos.

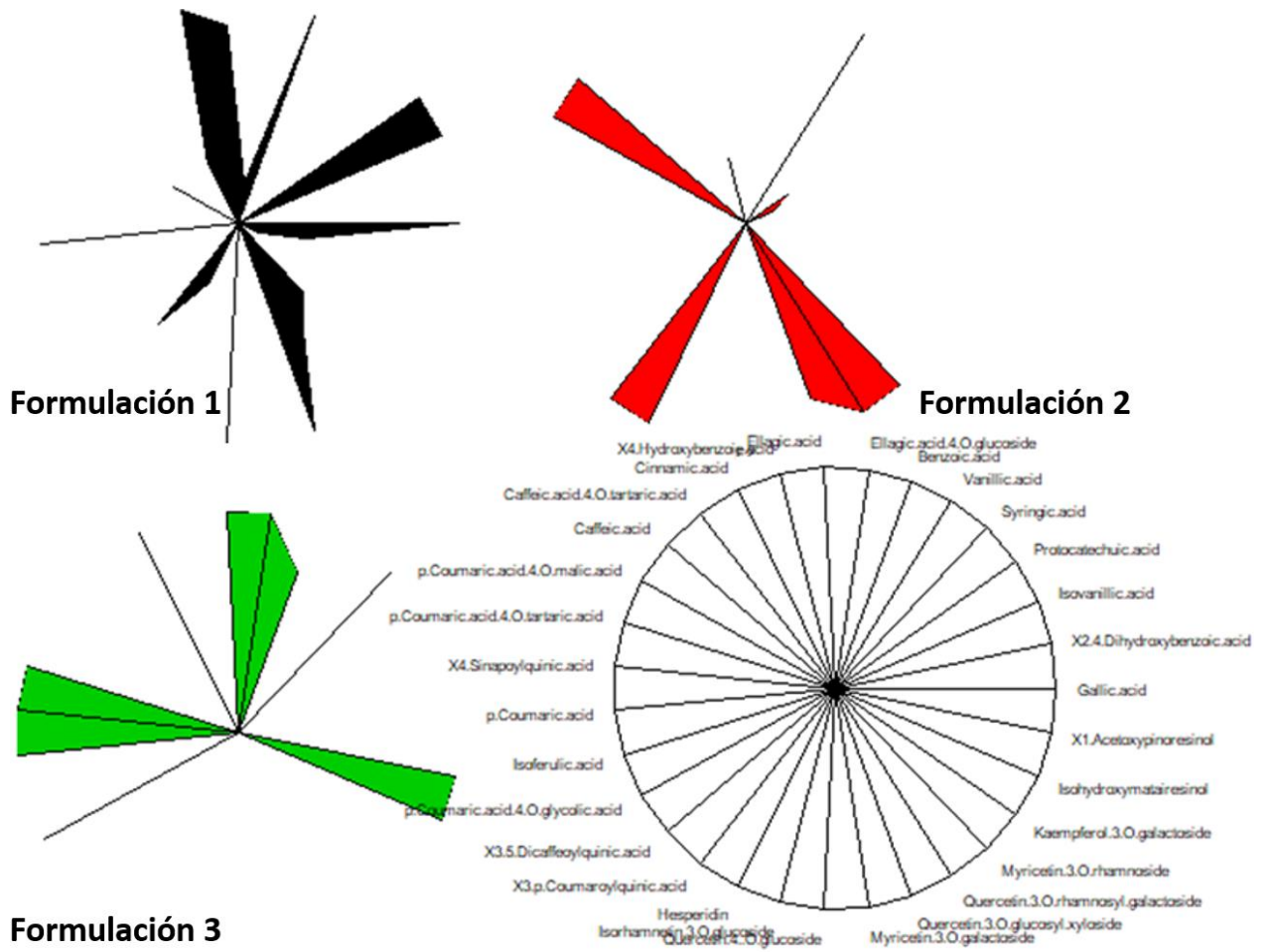


**Figura 18.** Ácidos orgánicos identificados en las formulaciones desarrolladas

Respecto a la fracción de polifenoles hidrolizables, 10 ácidos hidroxibenzoicos, 11 ácidos hidroxicinámicos, 8 flavonoides (1 flavanona, 7 flavonoles) y 3 lignanos fueron identificados (Cuadro 21). Éstas dos primeras familias de compuestos fenólicos se han reportado previamente como constituyentes de los polifenoles hidrolizables (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2015). De los 11 ácidos hidroxicinámicos identificados, 6 fueron mayoritarios en la formulación 3, y 5 en la formulación 2. Por otro lado, la formulación 1 es más abundante en 6 ácidos hidroxibenzoicos que las demás (Figura 19): ácido gálico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido isovanílico, ácido protocatecuico, ácido benzoico y ácido 4-hidroxibenzoico. Igualmente, sólo en esta formulación 1 se identificaron miricetina 3-O-galactósido, ácido 2,4-dihidroxibenzoico y matairesinol. Por otro lado, la formulación 2 fue la única en la que se identificaron kaemferol 3-O-galactósido, ácido isoferúlico y el ácido 3,5-dicafeoilquínico, mientras que los compuestos específicos de la formulación 3 fueron: isoramnetina 3-O-glucósido y ácido cafeico ácido 4-O-tartarico (Cuadro 21). Así mismo, la formulación 3 se caracterizó por tener un mayor contenido de los lignanos isohidroximatairesinol y 1-acetoxipinoresinol.

El número de compuestos identificados en esta fracción (21) fue inferior al de los identificados en la fracción de polifenoles extraíbles (180). Esto puede deberse a que las fuertes condiciones de extracción (temperatura y pH) a las cuales se someten los residuos de la extracción para poder extraerlos de la matriz puede dañar sus estructuras originales (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2015b).

A partir de estos análisis, se puede destacar que cada una de las formulaciones presenta un perfil diferente en compuestos bioactivos. En base a esto se espera que en el estudio *in vivo* también se presenten efectos diferenciales



**Figura 19.** Polifenoles hidrolizables identificados en las formulaciones desarrolladas



**Cuadro 21.** Identificación de polifenoles hidrolizables por UPLC-ESI-QTOF MSE de las tres formulaciones desarrolladas.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Erro de masa (ppm)	Aducto	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
<b>ÁCIDOS FENÓLICOS</b>									
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido gálico	1,03	C7H6O5	170,0215	170,0225	5,7655	[M-H]-	92,4 ± 5,8	72,2 ± 4,3	ND
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	1,53	C7H6O4	154,0266	154,0275	5,6833	[M-H]-	69,4 ± 9,3	ND	ND
Ácido isovanílico	1,60	C8H8O4	168,0423	168,0419	-2,1243	[M-H]-	195,9 ± 0,0	65,8 ± 0,3	46,0 ± 5,3
Ácido protocatecuico	1,89	C7H6O4	154,0266	154,0273	4,5784	[M-H]-	305,5 ± 21,3	188,4 ± 12,0	153,8 ± 12,8
Ácido siríngico	2,23	C9H10O5	198,0528	198,0520	-3,9383	[M-H]-	ND	69,3 ± 15,7	121,4 ± 11,1
Ácido vanílico	4,06	C8H8O4	168,0423	168,0418	-2,9207	[M-H]-	ND	53,7 ± 4,3	51,9 ± 5,4
Ácido benzoico	4,20	C7H6O2	122,0368	122,0372	3,8183	[M-H]-	409,3 ± 15,3	169,9 ± 4,6	353,9 ± 16,8
Ácido elágico 4-O-glucósido	4,71	C20H16O13	464,0591	464,0580	-2,2508	[M-H]-	151,7 ± 0,0	131,3 ± 0,0	241,0 ± 16,8
Ácido elágico	5,60	C14H6O8	302,0063	302,0072	2,9843	[M-H]-	14283,0 ± 106,6	4095,4 ± 16,7	15431,6 ± 432,4
Ácido 4-hidroxibenzoico	6,67	C7H6O3	138,0317	138,0320	2,4283	[M-H]-	91,4 ± 0,0	53,3 ± 0,0	36,4 ± 0,0
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>									
Ácido cinámico	1,43	C9H8O2	148,0524	148,0531	4,5822	[M-H]-	95,1 ± 1,9	65,7 ± 2,5	164,9 ± 2,4
Ácido cafeico 4-O-ácido tartárico	1,61	C13H12O9	312,0481	312,0491	3,0713	[M-H]-	ND	ND	97,6 ± 2,8
Ácido cafeico	4,12	C9H8O4	180,0423	180,0424	0,8654	[M-H]-	84,3 ± 0,0	140,4 ± 1,2	84,9 ± 16,8
Ácido p-cumárico 4-O-ácido málico	5,06	C13H12O7	280,0583	280,0582	-0,4023	[M-H]-	209,6 ± 14,7	409,0 ± 37,9	109,2 ± 0,2
Ácido p-cumárico 4-O-t ácido tartárico	5,13	C13H12O8	296,0532	296,0517	-5,1712	[M-H]-	121,1 ± 1,1	ND	121,9 ± 13,6
Ácido 4-sinapoilquinico	5,14	C18H22O10	398,1213	398,1200	-3,1415	[M-H]-	ND	248,7 ± 49,8	342,4 ± 0,0
Ácido p-cumárico	5,14	C9H8O3	164,0473	164,0478	2,9390	[M-H]-	88,3 ± 5,9	59,7 ± 11,4	91,6 ± 2,1
Ácido isoferúlico	5,66	C10H10O4	194,0579	194,0580	0,6147	[M-H]-	ND	4591,4 ± 282,4	ND
Ácido p-cumárico 4-O-ácido glicólico	5,86	C11H10O5	222,0528	222,0531	1,0508	[M-H]-	ND	158,2 ± 8,6	171,6 ± 0,0
Ácido 3,5-dicafeoilquinico	6,27	C25H24O12	516,1268	516,1219	-9,5046	[M-H]-	ND	426,4 ± 0,0	ND
Ácido 3-p-cumaroilquinico	7,13	C16H18O8	338,1002	338,0998	-1,0851	[M-H]-	282,4 ± 16,1	315,0 ± 52,9	237,6 ± 2,4
<b>FLAVONOIDES</b>									
<b>Flavanonas</b>									
Hesperidina	6,74	C28H34O15	610,1898	610,1855	-7,0393	[M-H]-	322,4 ± 0,0	638,9 ± 316,2	190,7 ± 1,3
<b>Flavonoles</b>									
Isoramnetina 3-O-glucósido	3,76	C22H22O12	478,1111	478,1148	7,6818	[M-H]-	ND	ND	105,6 ± 0,0
Quercetina 4'-O-glucósido	4,44	C21H20O12	464,0955	464,0999	9,5486	[M-H]-	5886,4 ± 347,0	3983,4 ± 0,0	ND

Miricetina 3-O-galactósido	5,26	C21H20O13	480,0904	480,0898	-1,2883	[M-H]-	404,4 ± 32,6	ND	ND
Quercetina 3-O-glucosil-xyloside	5,39	C26H28O16	596,1377	596,1360	-2,8577	[M-H]-	325,5 ± 0,0	300,4 ± 80,6	166,0 ± 0,0
Quercetina 3-O-ramnosil-galactósido	5,70	C27H30O16	610,1534	610,1480	-8,8504	[M-H]-	392,8 ± 9,5	544,0 ± 121,9	198,3 ± 2,3
Miricetina 3-O-ramnósido	5,87	C21H20O12	464,0955	464,0929	-5,5366	[M-H]-	233,8 ± 0,0	314,6 ± 0,0	173,7 ± 22,7
Kaempferol 3-O-galactoside	6,36	C21H20O11	448,1006	448,0992	-3,1030	[M-H]-	ND	218,7 ± 0,0	ND

**LIGNANOS**

Isohidroximatairesinol	4,83	C20H22O7	374,1366	374,1364	-0,5020	[M-H]-	466,0 ± 35,6	435,9 ± 26,8	724,5 ± 2,1
1-Acetoxipinoresinol	6,64	C22H24O8	416,1471	416,1480	2,0311	[M-H]-	2861,5 ± 164,6	1992,5 ± 0,0	4683,2 ± 37,2
Matairesinol	7,57	C20H22O6	358,1416	358,1432	4,4765	[M-H]-	368,8 ± 23,2	ND	ND

Los resultados son expresados como cuentas ± desviación estándar. ND: no detectado.

### 7.5.2 Caracterización fisicoquímica de las formulaciones

En el Cuadro 22 se presentan los parámetros de color en el espacio L, a\* y b\*. La coordenada L indica luminosidad, la a\* indica rojo(+a)/verde(-a), y b\* amarillo(+b)/azul(-b). Con base en esto, la formulación 2 presenta un color más rojo que las demás. Esto se debe a que esta presenta un mayor contenido de subproducto de Jamaica, donde las antocianinas son un compuesto clave y responsable de dicho color, por esta misma razón la formulación tiene un color menos rojo, ya que tiene un menor contenido de Jamaica. De acuerdo con la coordenada b\* la formulación 3 tiene un color más amarillo que las demás, pues contiene más mango y granada que las formulaciones 1 y 2, y estos subproductos se caracterizan por contener carotenoides responsables del color amarillo. En la Figura 11 se puede apreciar de una forma más visual el color de las 3 formulaciones.

**Cuadro 22.** Parámetros de color y pH de las tres formulaciones desarrolladas

Parámetro	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
L	42,09 ± 0,71 b	37,12 ± 0,80 c	44,58 ± 0,17 a
a*	8,88 ± 0,03 c	14,42 ± 0,15 a	10,83 ± 0,14 b
b*	10,75 ± 0,10 b	6,10 ± 0,24 c	12,15 ± 0,09 a
C	13,94 ± 0,09 c	15,66 ± 0,21 b	16,27 ± 0,12 a
h	50,42 ± 0,17 a	22,91 ± 0,70 c	48,28 ± 0,43 b
pH	3,53 ± 0,01 a	3,15 ± 0,02 b	3,38 ± 0,01 c

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en el mismo renglón indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

El pH es una medida de ácidos orgánicos en su forma iónica, en escala logarítmica, por lo tanto, diferencias pequeñas se relacionan directamente con las diferencias en la concentración de los ácidos orgánicos. Es así como el pH bajo de las formulaciones está relacionado a la naturaleza ácida de los cálices de Jamaica,

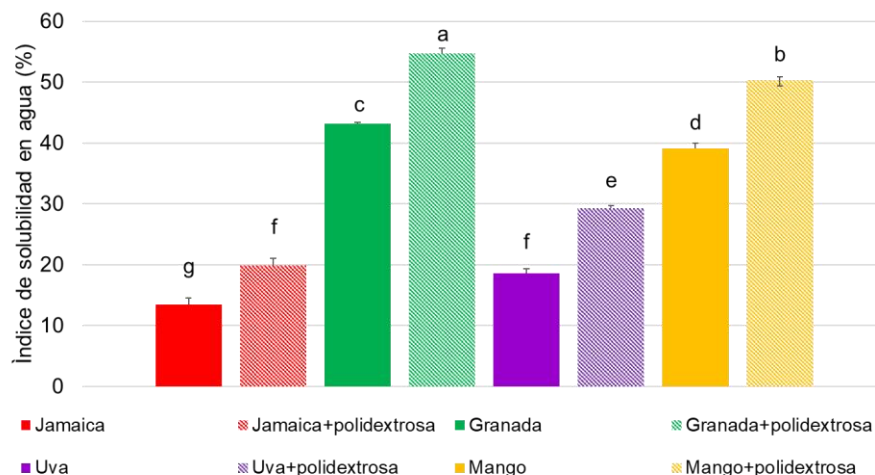
indicando de esta manera que la formulación 2 tiene un mayor contenido de ácidos orgánicos (Cuadro 22).

### **7.5.3 Caracterización funcional de las formulaciones**

Los suplementos desarrollados son productos que deben ser hidratados previos a su consumo, por lo que su capacidad para hidratarse es un atributo esencial. La rehidratación de éstos materiales incluye una serie de etapas como humectabilidad, hundimiento, dispersión, hinchamiento, desintegración, y solubilización o disolución. Sin embargo, en sistemas con agitación, como es el caso de la forma de consumo de los suplementos alimenticios en polvo, donde se le pide al consumidor que mezcle el polvo con el líquido, el proceso de hidratación se centra en dos puntos clave, la humectabilidad y la solubilidad (Fitzpatrick *et al.*, 2016). Con base en esto y a lo obtenido en el grupo de enfoque donde se manifestó que era deseable que las formulaciones se disolvieran fácilmente y que no formaran grumos, se evaluó el índice de solubilidad en agua (ISA), la humectabilidad y la dispersabilidad de los cuatro subproductos seleccionados, así como de las tres formulaciones desarrolladas las cuales fueron comparadas con un suplemento comercial elaborado con nopal y linaza que es de los más consumidos por la población mexicana.

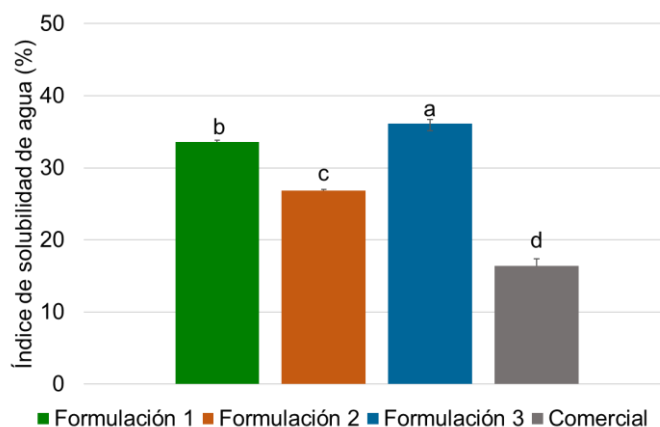
El índice de solubilidad en agua (ISA) indica el porcentaje del material que es soluble en agua. En este sentido, el subproducto de granada, seguido del de mango, presentaron el mayor ISA (Figura 20), indicando que tiene un mayor contenido de compuestos solubles como FDS, carbohidratos, entre otros. El subproducto de Jamaica presentó el menor ISA, pues la mayoría de sus compuestos solubles fueron lixiviados al agua durante el proceso de decocción (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2014); el bajo ISA del subproducto de uva puede explicarse a su gran contenido de FDT (63.8%) siendo en su mayoría FDI (90.4%). Debido a la baja solubilidad de los subproductos, menor al 43%, se empleó povidexrosa a una concentración del 10%, ya que una de sus funciones es incrementar la solubilidad, además de ser una fuente de FDT. Al adicionar povidexrosa a los subproductos de Jamaica, granada, uva y

mango, el ISA de los subproductos se incrementó en un 48.4, 26.5, 57.9 y 28.7%, respectivamente, en comparación con su ISA inicial.



**Figura 20.** Índice de solubilidad en agua de lo subproducto sin y con polidextrosa. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

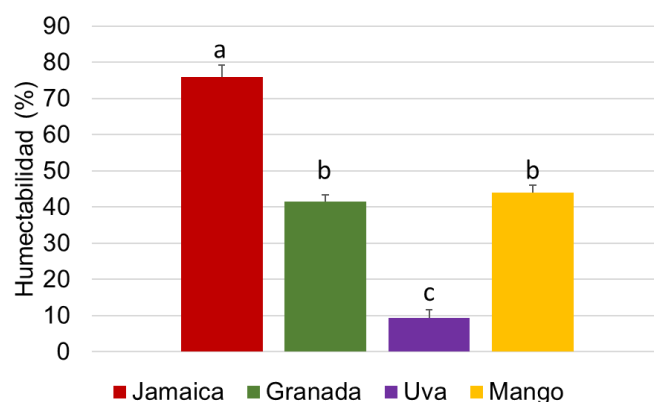
El ISA de las tres formulaciones desarrolladas adicionadas con polidextrosa fue notablemente mayor (63.6-120.6%) a las del suplemento comercial a base de linaza y nopal (Figura 21), esto se debe tanto al tamaño de partícula de los ingredientes como a la composición de los mismos, ya que el suplemento comercial presenta un gran tamaño de partícula heterogéneo y de naturaleza poco soluble. La formulación 3 presentó un mayor ISA, pues tiene una mayor proporción de granada y mango, quienes presentaron los mayores índices de solubilidad (Figura 21). Las formulaciones desarrolladas no se solubilizan completamente en agua, pues contienen FDI y otros constituyentes que no se solubilizarán, por lo que finalmente se forma una dispersión.



**Figura 21.** Índice de solubilidad en agua de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

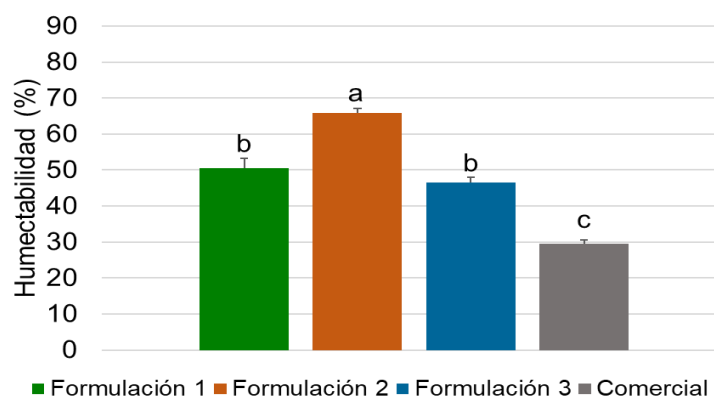
La humectabilidad se refiere al contacto inicial del polvo con el agua o con el líquido empleado para la disolución del producto en polvo. Durante este paso el líquido penetra entre las partículas del producto y va humedeciendo su superficie (Fitzpatrick *et al.*, 2016). Se determinó la humectabilidad de los subproductos, las formulaciones desarrolladas y el suplemento comercial. Este parámetro es crítico, pues de la habilidad de éstos materiales para disolverse y dispersarse en agua determina la conveniencia de su uso (de Beer *et al.*, 2018).

El subproducto de Jamaica presentó la mayor humectabilidad (75.9%) seguido del mango (44.1%) y la granada (41.5%) (Figura 22). La uva por su parte presenta una humectabilidad menor al 10%, es decir, menos del 10% se humedece al estar en contacto con el agua; esta pobre humectabilidad ocasiona que la mayoría del producto se quede flotando en la superficie, esto puede deberse a que el subproducto de uva presenta baja densidad aparente (Cuadro 14), lo que hace que el producto flote, aunado a una posible superficie hidrofóbica que no es fácilmente humectable y a atracciones fuertes inherentes entre las moléculas que constituyen el polvo (Barbosa-Canovas *et al.*, 2005).



**Figura 22.** Porcentaje de humectabilidad de los subproductos. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

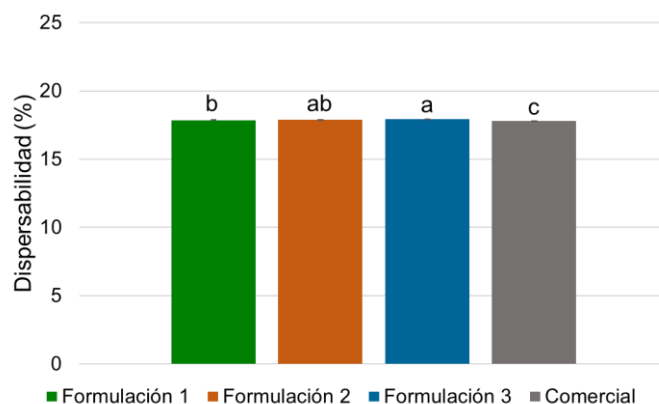
La humectabilidad de las formulaciones desarrolladas fue en promedio 84% mayor que la del producto comercial (Figura 23). La formulación 2 presenta la mayor humectabilidad debido a que su ingrediente mayoritario es el subproducto de Jamaica, el cual se humecta con mayor facilidad. La humectabilidad de los subproductos, las formulaciones y el producto comercial se ve influenciada por factores como las propiedades físicas del polvo y la composición de la superficie (hidrofílica/hidrofóbica) (Richard *et al.*, 2013).



**Figura 23.** Porcentaje de humectabilidad de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

El índice de dispersabilidad se emplea para describir la capacidad del polvo para mojarse sin formar grumos. La dispersión es un proceso dinámico en el que se libera continuamente partículas del material a la fase acuosa que se encuentra a su alrededor (Fang *et al.*, 2011). A pesar de que se presentó diferencia estadística entre las formulaciones y el producto comercial, la diferencia entre estos valores fue muy pequeña, y por tanto, sin verdadera relevancia tecnológica (Figura 24). Todos los productos presentan grumos y se dispersan de una manera muy lenta lo que puede estar relacionado con su baja humectabilidad. Por esta razón, se debería aclarar en la etiqueta que el producto, al momento de agregarlo al agua, se debe mezclar vigorosamente.





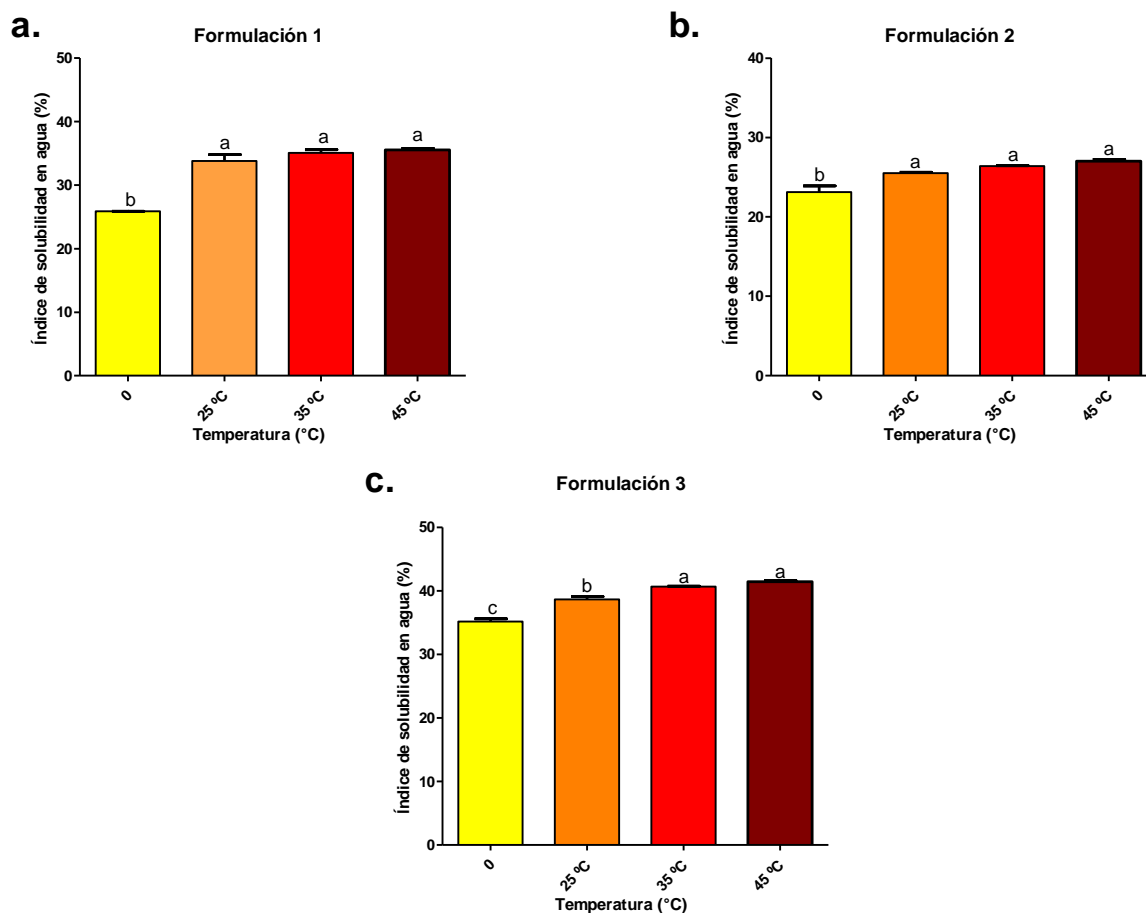
**Figura 24.** Índice de dispersabilidad de las formulaciones desarrolladas comparadas con un producto comercial. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

## 7.6 Vida de anaquel de las formulaciones desarrolladas

Como parte del desarrollo de las formulaciones que se llevaron a cabo en este trabajo, se planteó y desarrolló un estudio de vida de anaquel. A continuación, se muestran los resultados de las variables monitoreadas durante el almacenamiento, que se realizó a través de un diseño reversa, es decir, que todas las mediciones se realizaron al mismo tiempo al final del estudio. En este trabajo se seleccionaron temperaturas 25, 35 y 45°C, como representativas de la temperatura ambiente registrada en diferentes zonas de México.

### 7.6.1 Índice de solubilidad en agua de las formulaciones almacenadas a diferentes temperaturas al final del almacenamiento (150 días).

El ISA es un parámetro importante en este tipo de productos en los cuales uno de los mayores inconvenientes percibidos por los consumidores es la baja solubilidad. La figura 25 presenta el ISA al final del almacenamiento (día 150) para las 3 formulaciones y las 3 temperaturas, siendo los valores en todos los casos estadísticamente diferentes al compararse con las formulaciones antes del almacenamiento.



**Figura 25.** Índice de solubilidad en agua de las formulaciones al final del almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

El incremento en la solubilidad resultó ser dependiente de la temperatura, es decir, a mayor temperatura de almacenamiento mayor solubilidad de las formulaciones, y viceversa, presentando un incremento a los 45 °C de 37.4, 16.7 y 18.8% para las formulaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Éstos resultados pueden deberse a un proceso de degradación de la pectina a través de reacciones de despolimerización y desmetilación (Moufle, Jamet, y Karoui, 2018). Estos procesos de despolimerización afectaron de manera diferencial a cada uno de los subproductos contenidos en las formulaciones y resulta notorio cómo en la

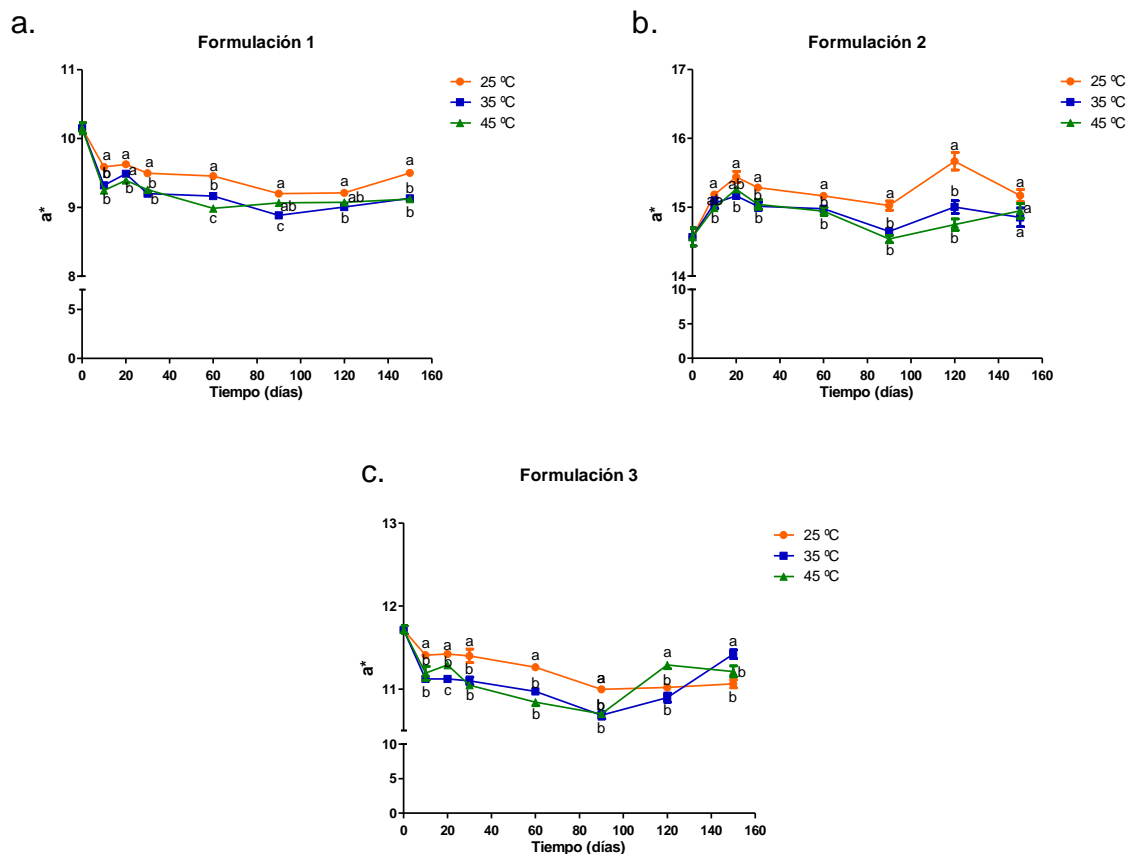
formulación 1 este proceso fue mayor, ya que presentó un mayor porcentaje de solutos disueltos en agua al final del almacenamiento.

### **7.6.2 Cambios de color durante el almacenamiento**

No solo es importante la cuantificación de parámetros que tienen relevancia nutricional, sino también de aquellos que pueden llegar a tener implicaciones en la percepción del consumidor, razón por la cual se midió el color (escala CIE Lab) durante el almacenamiento. De manera general para todos los parámetros de color que se presentan a continuación los menores cambios de color se presentaron a 25 °C, mientras que para 35 y 45 °C se observaron comportamientos similares.

El parámetro  $a^*$  representa que el color rojo (+a) o verde (-a) en la muestra de interés, en este caso como ya se mostró anteriormente, y por la naturaleza de los ingredientes, todas las formulaciones contienen antocianinas provenientes de los subproductos de Jamaica y uva, que le otorgan un color característico al producto desarrollado.

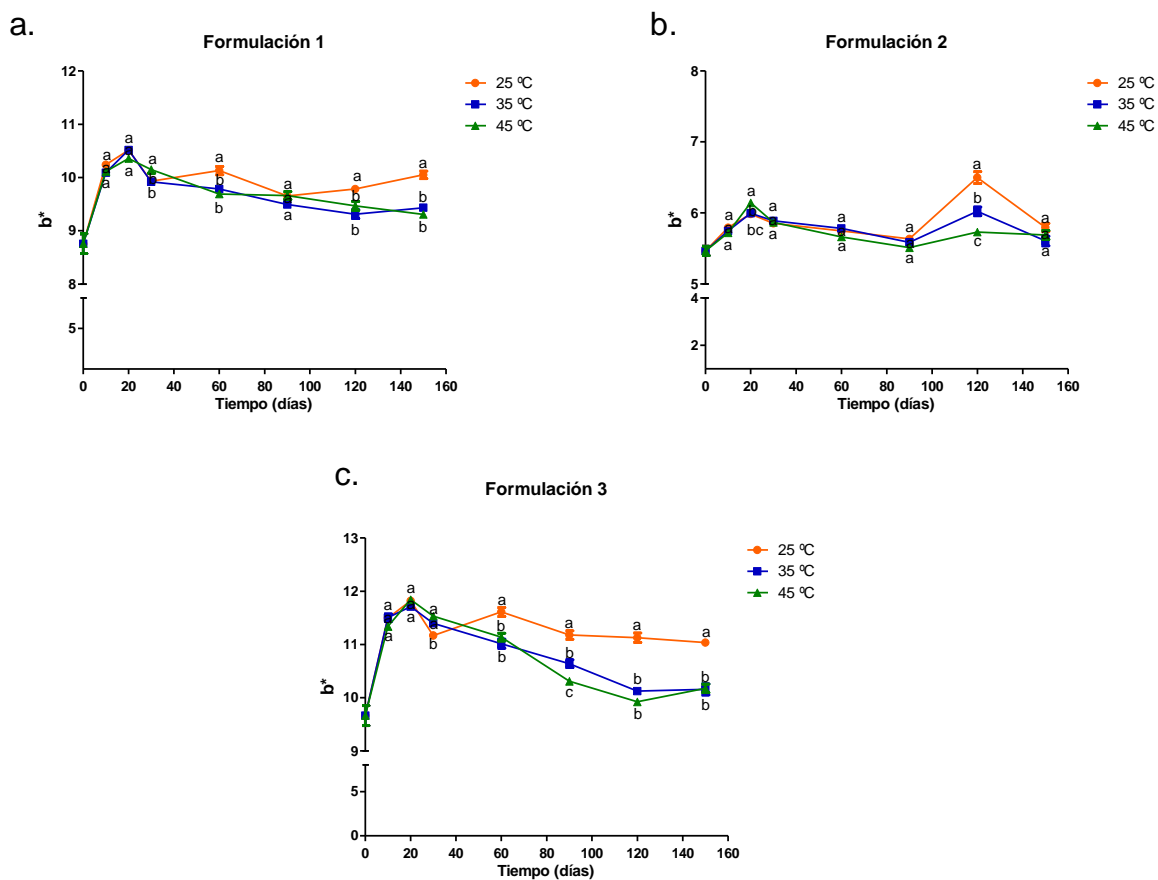
La formulación 1 y 3 presentaron un comportamiento similar, con una pérdida de color el día 10 que después se mantuvo estable (Figura 26 a y c), mientras que para el caso de la formulación 2 (Figura 26 b) hubo un incremento en el valor al día 10 manteniéndose después constante.



**Figura 26.** Cambio del parámetro  $a^*$  de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa.

El parámetro  $b^*$  también fue monitoreado, este indica la coloración amarilla ( $+b^*$ ) o verde ( $-b^*$ ) de una muestra (Figura 27). La formulación 3 (Figura 27 c) presentó los mayores valores de  $b^*$ , al tener mayor contenido de los subproductos de granada y mango que se caracterizan por un color amarillo otorgado por los carotenoides. La tendencia general observada para este parámetro fue un incremento en los primeros 10 días de almacenamiento permaneciendo después constante a lo largo del tiempo monitoreado. Sin embargo, para la formulación 3, se presentó una disminución a los 35 y 45 °C al final del almacenamiento. En general hubo una disminución importante a los 35 y 45 °C. Se ha reportado que los incrementos cambios en el parámetro  $b^*$  se debe a reacciones de Maillard (*Moufle et*

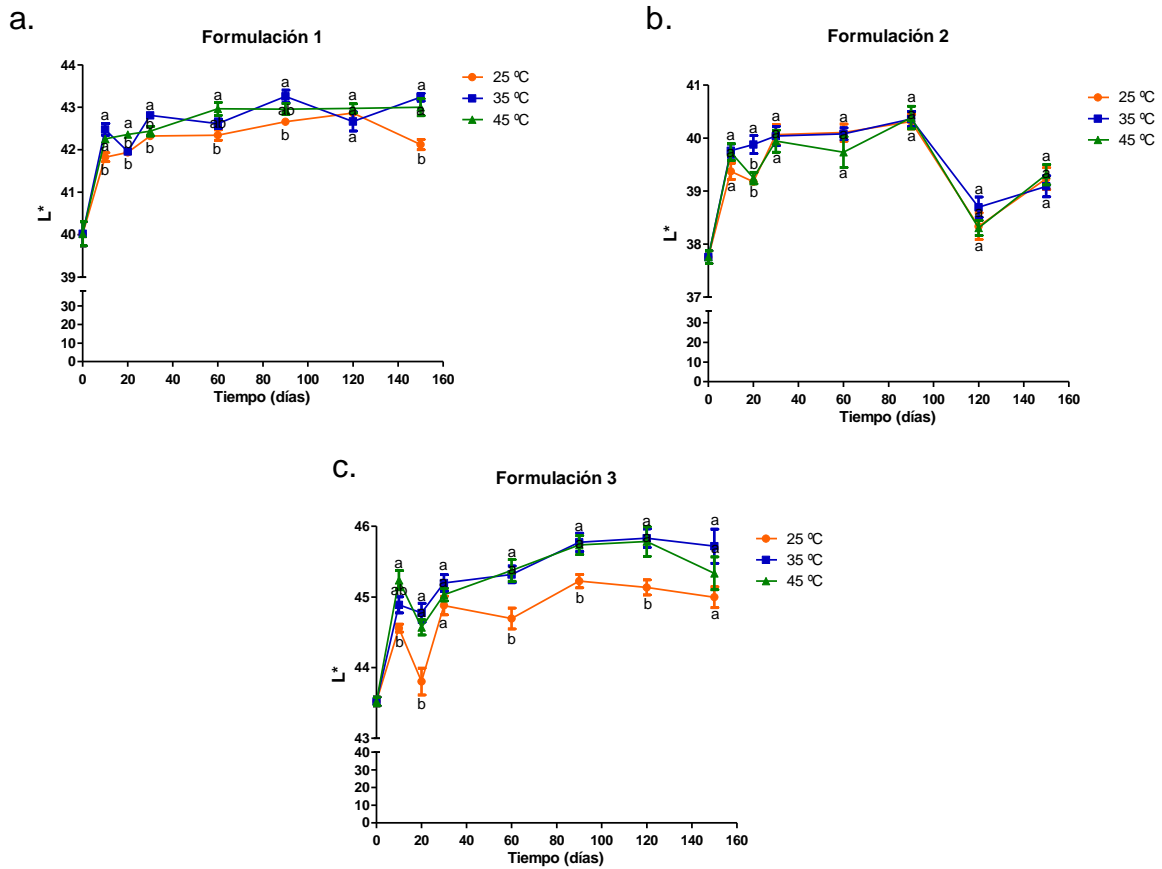
al., 2018), así como a una mayor concentración de chalconas (Mazza y Francis, 1995) producto de degradación de las antocianinas contenidas en las formulaciones, que podría explicar el comportamiento de la formulación 2 (Figura 27 b). Asimismo, la oxidación de compuestos como flavanoles resulta en la formación de pigmentos amarillos-naranjas (Pérez-Magariño y González-San José, 2004)



**Figura 27.** Cambio del parámetro  $b^*$  de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

También se monitoreó la luminosidad (L) indicando qué tan blanca (L+100) o negra (L-0) es una muestra (Figura 28). En general las formulaciones 1 y 3 a las tres temperaturas incrementaron el valor de luminosidad permaneciendo después

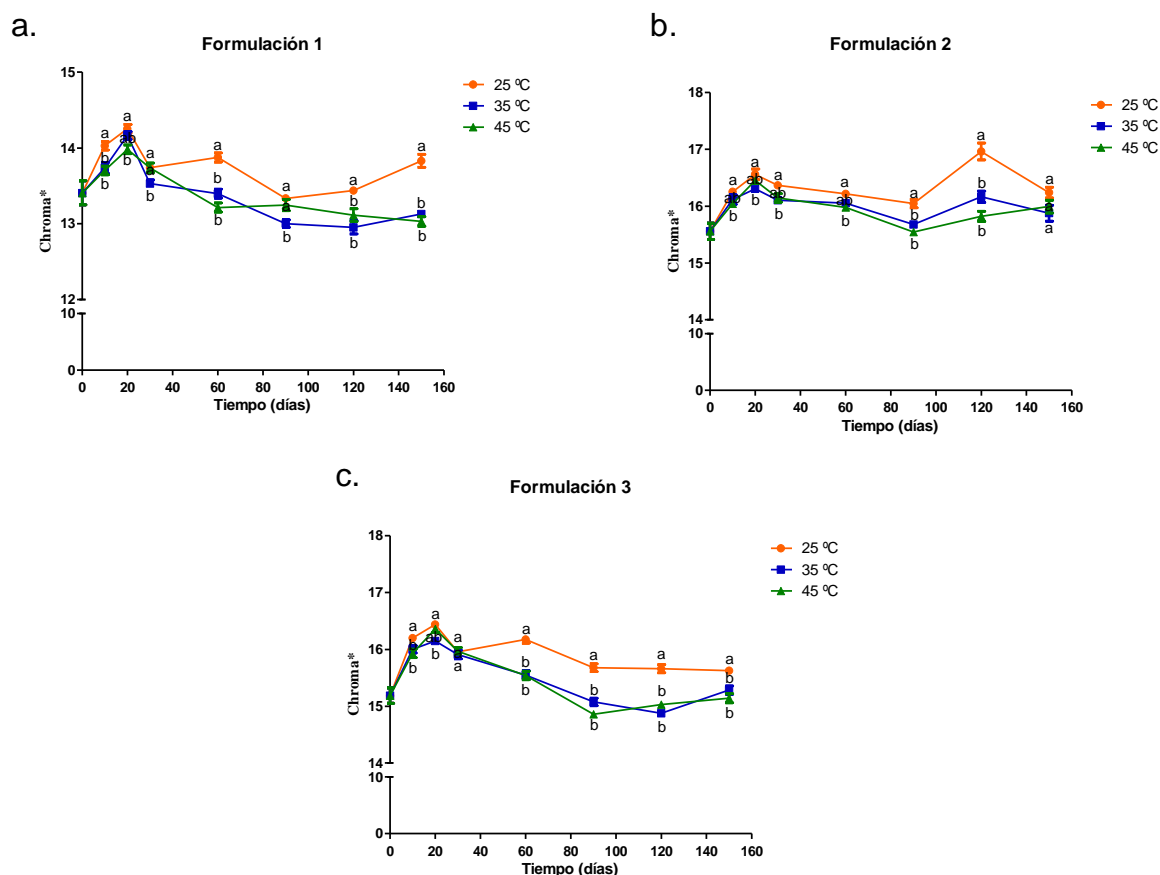
constante a través del tiempo y con menores cambios a la temperatura de 25 °C. En el caso de la formulación 2 la temperatura de almacenamiento no tuvo un efecto significativo sobre la luminosidad. Lo que está sucediendo puede deberse a la oxidación y por consiguiente a la pérdida de compuestos responsables del color como antocianinas y carotenoides. En este sentido, se ha reportado en el caso del vino que la progresiva pérdida de antocianinas durante el añejamiento podría ser la responsable de un aumento de la luminosidad (Heras-Roger *et al.*, 2014).



**Figura 28.** Cambio de la luminosidad ( $L^*$ ) de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

El parámetro croma indica la intensidad/saturación del color; en todas las formulaciones este incrementa hasta el día 20, manteniéndose después constante a

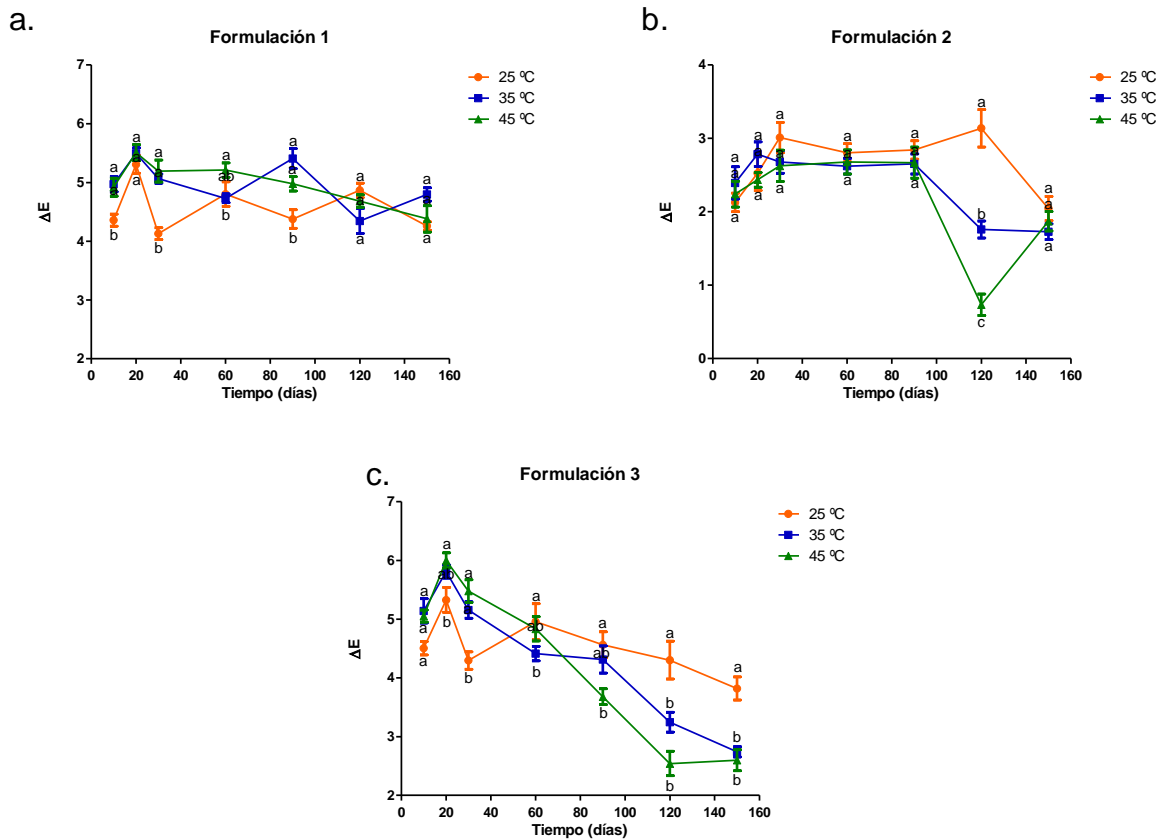
través del tiempo (Figura 29). Las coloraciones más intensas (mayor croma) se presentan en las muestras de las tres formulaciones almacenadas a 25 °C, siendo estadísticamente diferente a las almacenadas a 35 y 45 °C que presentan valores menores. Esto puede deberse a que a temperaturas más elevadas hay una mayor pérdida de los compuestos responsables de la coloración, como los compuestos fenólicos al ser susceptibles a la hidrólisis y oxidación (Harbourne *et al.*, 2013).



**Figura 29.** Cambio del croma de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

Los cambios de color ( $\Delta E$ ) fueron calculados como el cambio en los parámetros L,  $a^*$  y  $b^*$  entre las formulaciones del día inicial (tiempo 0) y los diversos días muestreados (Figura 30). Mokrzycki y Tatol (2012) han establecido los

siguientes intervalos con el fin de determinar si hay diferencias visibles entre dos muestras: 0-0.05 no es notoria, 0.5-1.5 levemente notoria, 1.5-3.0 notoria, 3.0-6.0 muy visible y mayor a 6 la diferencia es grande. A partir de esto podemos decir que la menor diferencia, siendo apenas perceptibles por el ojo humano en un observador promedio, es para la formulación 2, siendo menor a 3 unidades, caso contrario a la formulación 1 donde los cambios de color oscilaron entre 4 y 6 unidades siendo un cambio muy perceptible por parte de un individuo.



**Figura 30.** Cambio de color de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

La formulación 3 (Figura 30c) presentó en los primeros días de almacenamiento un incremento en los cambios de color, pero dicho cambio fue



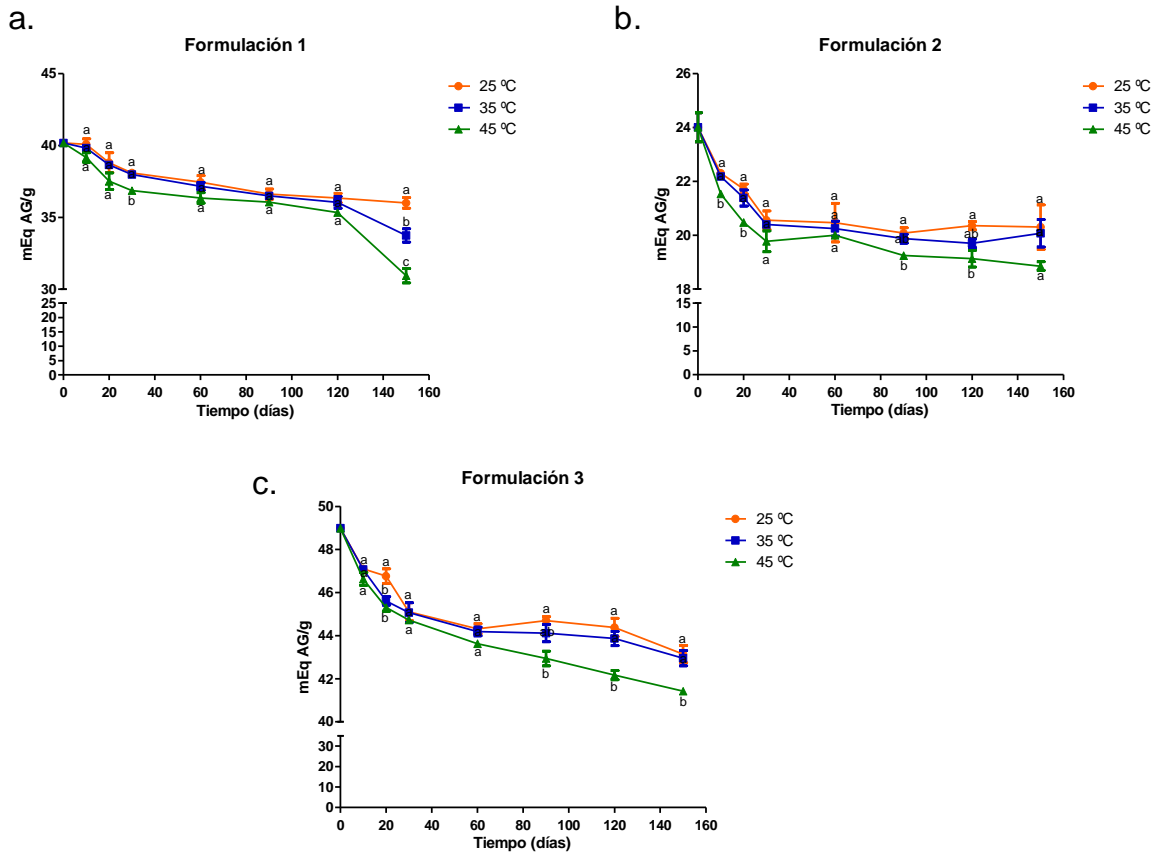
reversible a partir del día 30 de almacenamiento. Estos datos sugieren que dicha formulación disminuye su pérdida de color a través del tiempo., llegando a los 150 días a valores menores a 3 unidades, lo que es un cambio notorio. Para las formulaciones 2 y 3 el mayor cambio de color se presentó a los 25 °C, influenciado por los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  que tuvieron un comportamiento similar. Los cambios en el color pueden deberse a la actividad de enzimas como la pectin metilesterasa, polifenol oxidasa, peroxidasa u otras enzimas que no fueran inactivadas durante el procesamiento de los suplementos (Martínez Sánchez *et al.*, 2016)

### **7.6.3 Contenido de compuestos fenólicos extraíbles de las formulaciones almacenadas a diferentes temperaturas**

Cuando se trata de vida de anaquel de productos alimenticios se deben tener presentes diversas variables como lo son la naturaleza del producto, su composición, los ingredientes, el procesamiento, el empaque, las condiciones de almacenamiento, la distribución y la manipulación del mismo, y para el producto que se desarrolló en este trabajo el aspecto nutricional es crucial (Hough 2010), pues se busca que los compuestos fenólicos no se pierdan durante el almacenamiento. Por este motivo la concentración de fenoles totales (Figura 31) y antocianinas (Figura 32) fue medida a través del almacenamiento con la finalidad de monitorear los cambios que pudieran presentarse en su contenido.

El porcentaje de pérdida fue dependiente de la temperatura y del tiempo de almacenamiento, ya que al incrementar éstos la pérdida de compuestos fenólicos fue mayor. A 25 °C, la mayor pérdida la presentó la formulación 2 (15%), a 35 °C las formulaciones 1 y 2 (16%) y a 45 °C las formulaciones 1 y 2 (23 y 21%, respectivamente). La formulación 3 a pesar de tener el mayor contenido de compuestos fenólicos, tan sólo se perdió el 15% de estos a 45 °C y 150 días de almacenamiento. Se ha reportado que los compuestos fenólicos contribuyen a la calidad en las frutas en términos de color, aroma, sabor y flavor (Tomás-Barberán y Espín, 2001), por lo tanto se espera que en la formulación 3, al perder menos polifenoles extraíbles (Figura 32c), se conserven mejor dichas características.

Aunque se ha observado una pérdida de polifenoles extraíbles a lo largo del tiempo, esta no es tan alta como se esperaría en una bebida ya preparada, pues una ventaja que representan los productos en polvo es que el bajo contenido de humedad disminuye las reacciones químicas (de Beer *et al.*, 2018). Así, se ha reportado que un incremento en la actividad de agua afecta la estabilidad de los polifenoles durante el almacenamiento (Rocha *et al.*, 2016).



**Figura 31.** Contenido de compuestos fenólicos de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

Se ha reportado que los ácidos cítrico y ascórbico incrementan la degradación de compuestos fenólicos en temperaturas alrededor de 40 °C (de Beer *et al.*, 2018). En concreto, el ácido ascórbico oxida directamente a los flavan-3-oles, y el furfural, que es un producto de la degradación del ácido ascórbico, reacciona de igual manera con estos compuestos formando aductos diméricos, el ácido cítrico por su parte

incrementa la oxidación del ácido ascórbico (de Beer *et al.*, 2018). Según el perfil de compuestos bioactivos (Cuadro 20), las formulaciones 1 y 3 tienen mayor contenido de ácido cítrico, y el ácido ascórbico se ha reportado como constituyente de estas frutas.

Los compuestos fenólicos son el indicador crítico del estudio de vida de anaquel que se diseñó y como límite de aceptabilidad se determinó un contenido del 2%, es decir 20 mg EAG/g. Con base en esto y bajo las condiciones del estudio para las formulaciones 1 y 3 se puede decir que la vida de anaquel es mayor a 150 días (5 meses) a las tres temperaturas estudiadas (25, 35 y 45°C), ya que no se alcanzó a presentar la falla durante el estudio. La formulación 2 si presentó un comportamiento diferente ya que su contenido de compuestos fenólicos es menor. A 25 °C los datos se ajustan a un modelo exponencial de 3 parámetros (ecuación 4), donde el parámetro a corresponde a una asíntota (ecuación 5) indicando que bajo este modelo la concentración de compuestos fenólicos no llegará a ser menor de 2.02%. Por lo tanto, la vida de anaquel de la F2 almacenada a 25 °C sería mayor a 150 días.

$$a+b*\text{Exp}[c*\text{días}] \text{ (Ec. 4)}$$

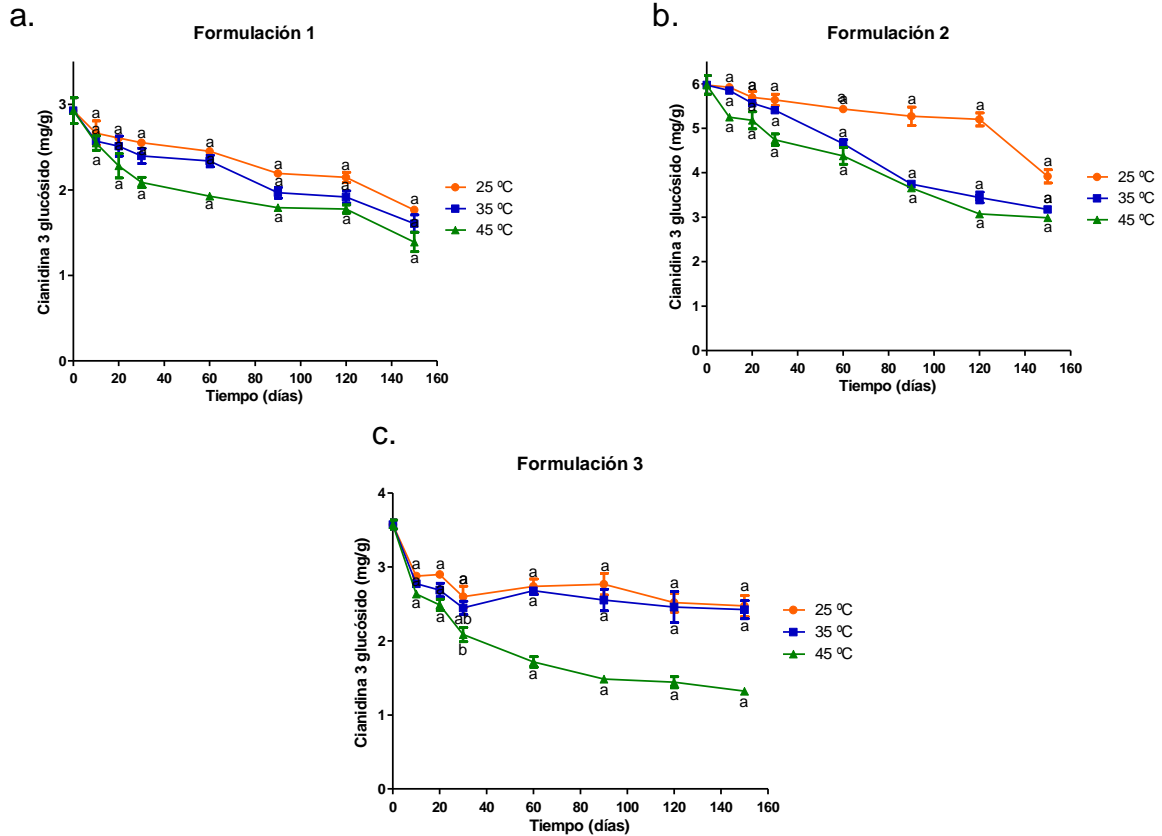
$$20.24+3.78*\text{Exp}[-0.05*\text{días}] \text{ (Ec. 5)}$$

La formulación 2 a 35 °C y 45 °C también se ajustó a un modelo exponencial de tres parámetros (ecuación 4). Para el caso del almacenamiento a 35 °C la vida de anaquel es de  $66 \pm 17$  días, indicando que es de 1.6 a 2.7 meses bajo las condiciones estudiadas (ecuación 6). Para esta misma formulación, F2, a 45 °C, la vida de anaquel es de tan solo  $26 \pm 4$  días. Por lo tanto, esta formulación no se recomienda almacenar a temperaturas mayores a 25 °C con la finalidad de prolongar su vida de anaquel.

$$19.90+4.10*\text{Exp}[-0.05*\text{días}] \text{ (Ec. 6)}$$

$$19.25+4.71*\text{Exp}[-0.07*\text{días}] \text{ (Ec. 7)}$$

Por otro lado, el cambio en el contenido de antocianinas durante el almacenamiento se presenta en la Figura 34. Los datos presentan una distribución no paramétrica y no hubo diferencia estadística entre las tres temperaturas de almacenamiento; sin embargo, se observa una pérdida de esas antocianinas mayor a la temperatura de 45 °C principalmente para las formulaciones 2 y 3.



**Figura 32.** Contenido de antocianinas de las formulaciones desarrolladas durante el almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

Se ha reportado que la estabilidad de las antocianinas depende de varios factores como las propiedades intrínsecas del alimento y el procesamiento como el pH, la temperatura de almacenamiento, la estructura química y la concentración de las antocianinas, la luz, el oxígeno, la presencia de enzimas, proteínas e iones metálicos (Rein 2005). Por ejemplo el hecho que se trate de un producto en polvo

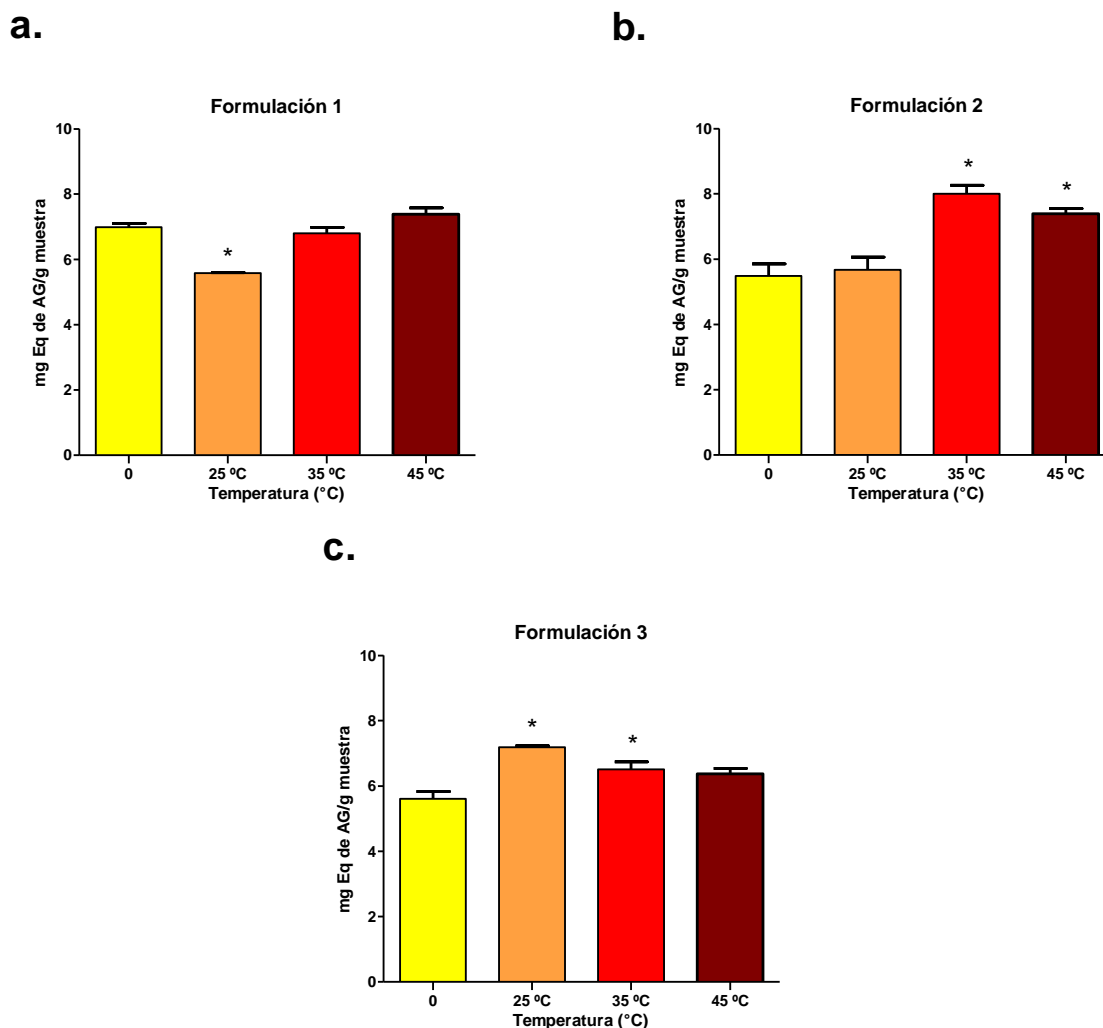
y no un líquido, es una ventaja, pues se ha reportado diferencias en los mecanismos de degradación de las antocianinas en condiciones sólidas y acuosas, así a pH altos las antocianinas en estado sólido son más estables que en líquido, siendo menor la degradación para las antocianinas aciladas (Iliopoulou *et al.*, 2015), ya que éstas son más resistentes a la degradación térmica comparadas con las no aciladas. Las antocianinas aciladas en presencia de un calentamiento severo se rompen en su correspondiente acil-glucósidos y la aglicona (antocianidina) que posteriormente se transforma en chalcona que se rompe a ácido protocatecuico y floroglucinaldehído (Sadilova *et al.*, 2007). En el perfil realizado por UPLC (Cuadro 20) se identificaron 7 antocianinas aciladas, de éstas 2 fueron mayoritarias en la formulación 1, 2 en la formulación 2 y 3 en la formulación 3.

#### **7.6.4 Compuestos fenólicos no extraíbles**

Hasta el momento no hay reportes del efecto del almacenamiento sobre los compuestos fenólicos no extraíbles en productos de este tipo. Debido a que estos compuestos son parte importante de los suplementos desarrollados, se cuantificaron los polifenoles hidrolizables (Figura 33) y los proantocianidinas no extraíbles (Figura 34) al final del almacenamiento (150 días) para las 3 temperaturas.

##### **7.6.4.1 Polifenoles hidrolizables**

Cada una de las formulaciones presentó un comportamiento diferente no dependiente de la temperatura (Figura 33). La mayor pérdida se presentó a 25 °C para la formulación 1 con un 20%, y el mayor incremento a los 35 °C para la formulación 2 con 46%. La formulación 3 presentó un aumento a 25 °C (40%) y a 35 °C (27%). El incremento en los polifenoles hidrolizables puede deberse a reacciones de condensación entre los ácidos fenólicos, ya que debido al carácter ácido de los grupos hidroxilo y a las propiedades nucleofílicas de los anillos fenólicos, éstas moléculas son altamente reactivas y pueden sufrir diferentes tipos de reacciones durante el procesamiento y almacenamiento (Tarascou *et al.* 2010).

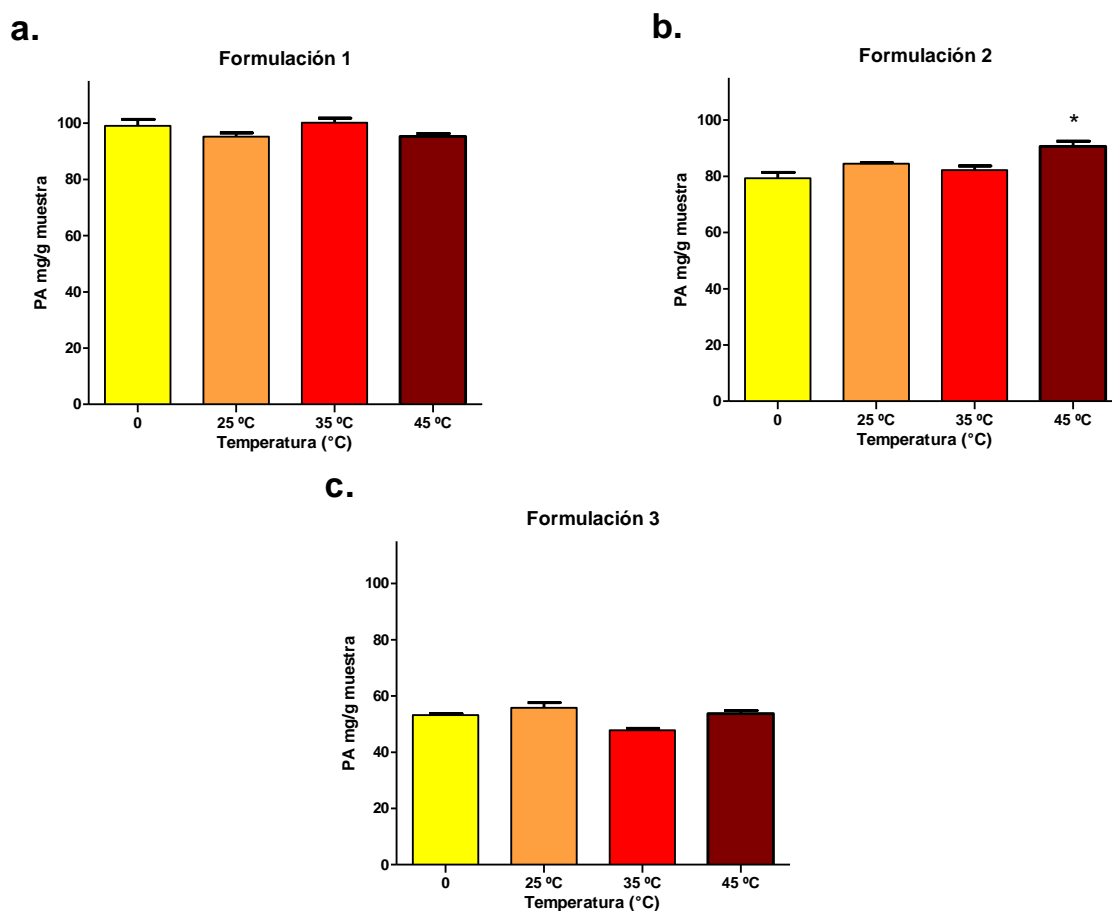


**Figura 33.** Contenido de polifenoles hidrolizables de las formulaciones desarrolladas al final del almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. \* indica diferencia significativa versus la muestra control, prueba de Dunnett ( $p=0.05$ )

#### 7.6.4.2 Proantocianidinas no extraíbles

Los cambios de los taninos condensados durante el almacenamiento ha sido reportado previamente para productos como el vino (Vallverd *et al.*, 2017), pero no para productos en polvo como los que se desarrollaron en este trabajo. En el caso de la formulación 1 que es la que tiene un mayor contenido de proantocianidinas no extraíbles, la temperatura no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de

éstos a los 5 meses de almacenamiento (Figura 34 a). Para la formulación 2 (Figura 34 b), almacenar el suplemento a 45 °C ocasionó un incremento significativo (14%) con respecto al control. Para la formulación 3, quien tiene menor contenido de proantocianidinas no extraíbles (Figura 34 c), la temperatura de almacenamiento no tuvo un efecto estadístico. El efecto encontrado en la formulación 2, con mayor contenido de antocianinas, puede deberse a reacciones de polimerización junto con flavanoles monoméricos y condensados (Vallverd *et al.*, 2017).



**Figura 34.** Contenido de proantocianidinas no extraíbles de las formulaciones desarrolladas al final del almacenamiento. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. \*indica diferencia significativa versus la muestra control, prueba de Dunnett ( $p=0.05$ )

## **7.7 Evaluación del efecto del consumo de las tres formulaciones desarrolladas sobre la obesidad, la dislipidemia y la resistencia a la insulina**

### **7.7.1 Efecto del consumo de las formulaciones sobre el peso corporal**

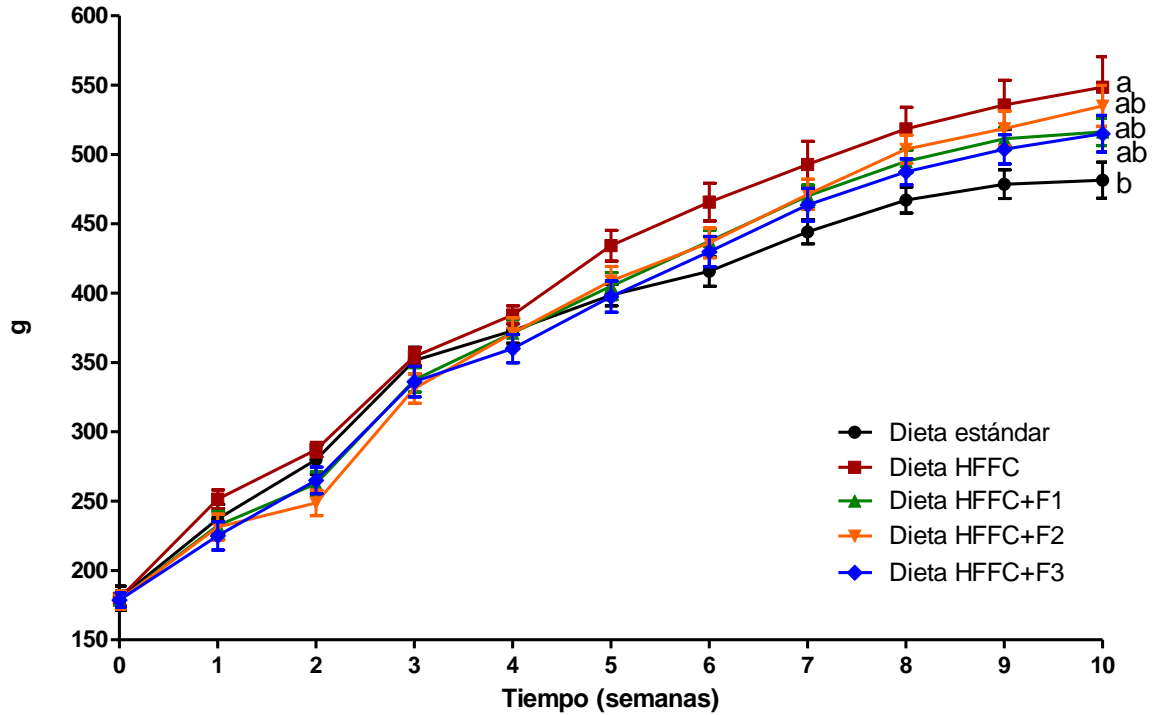
En la Figura 35 se presentan los resultados de peso corporal de los 5 grupos experimentales: alimentados con la dieta estándar, alimentados con la dieta alta en grasa, fructosa y colesterol (dieta AGFC) y los 3 grupos restantes son los tratamientos, es decir, los alimentados con la dieta AGFC y suplementados con cada una de las tres formulaciones desarrolladas, formulación 1: dieta AGFC+F1, formulación 2: dieta AGFC+F2 y formulación 3: dieta AGFC+F3.

En la primera semana del estudio *in vivo*, los animales alimentados con la dieta AGFC comenzaron a ganar peso de una manera más rápida que los demás grupos. En la última semana del estudio, se presentó diferencia estadística significativa ( $p=0.05$ ) entre los animales alimentados con la dieta estándar y los alimentados con la dieta AGFC. El peso promedio del grupo AGFC es 14% mayor que el de la dieta estándar. Este incremento se debe al exceso de energía ingerida, la cual se almacenan en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, éstos pueden ser sintetizados a partir de los ácidos grasos de la dieta o bien mediante el metabolismo de la fructosa (Huang *et al.*, 2011).

En lo que respecta a los suplementos, ninguno de los tres presentaron diferencias estadísticamente significativa ( $p=0.05$ ) con ninguno de los grupos controles. Sin embargo, los animales alimentados con la formulación 1 y 3 presentaron la mayor disminución en la ganancia de peso corporal respecto a los animales alimentados con la dieta AGFC al final del estudio, siendo la disminución de la ganancia del 5.9 y 6.1%, respectivamente. A lo largo del experimento el grupo AGFC+F3 presentó el menor peso corporal. Los animales alimentados con la dieta AGFC+F2 presentaron una menor disminución en la ganancia de peso corporal respecto al grupo AGFC del 2.5%.



Por lo tanto, el consumo de las formulaciones sí presenta un efecto en la disminución de peso corporal, siendo este efecto mayor para la formulación 3, la cual contiene proporciones iguales de cada uno de los subproductos empleados y como característica especial tiene un mayor contenido de polifenoles extraíbles que las formulaciones 1 y 2 (Cuadro 19).



**Figura 35.** Peso corporal de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con los tres suplementos desarrollados. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE.

Se ha reportado el efecto derivado del consumo de manera individual de granada, uva, Jamaica y mango, sin embargo, los estudios están centrados principalmente en la evaluación de extractos y no tanto a los materiales en polvo o a sus subproductos. En lo que respecta a granada, se han evaluado extractos metanólicos de la cáscara, flor y semillas en un modelo animal alimentado con una dieta alta en grasa, sacarosa y fructosa y no observaron efectos en la disminución en la ganancia de peso corporal (Harzallah *et al.*, 2016); de igual manera Neyrinck *et al.* (2013) observaron que el consumo de un extracto de cáscara de granada rico en polifenoles no modificó la ganancia de peso corporal de los animales. Sin embargo

autores como Hashemi (2017) reportan una disminución significativa del peso corporal al administrar extracto de granada en forma de tableta en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa.

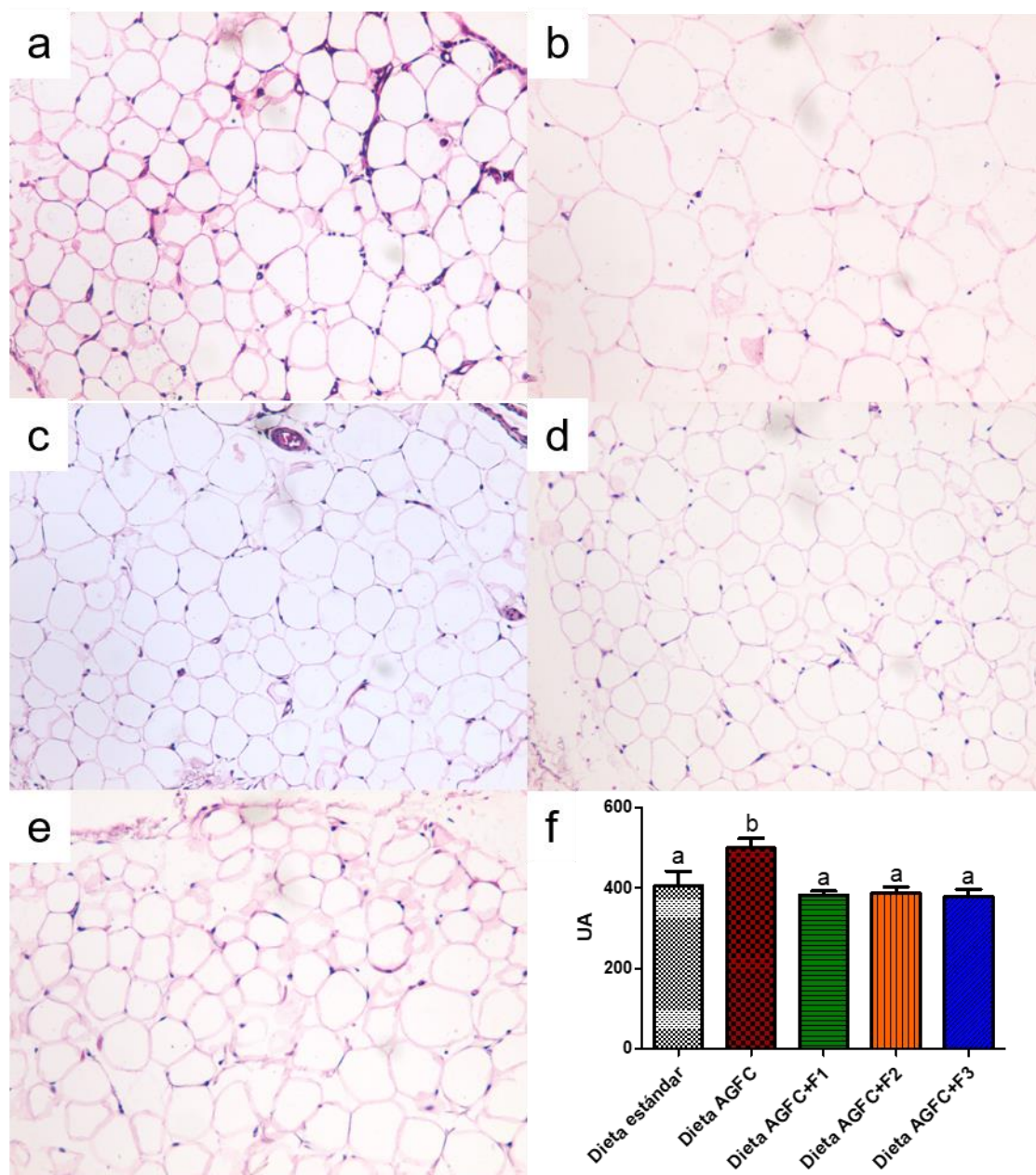
En el caso del subproducto de mango, se ha reportado previamente que no disminuye de manera significativa la ganancia de peso corporal (Amaya-Cruz *et al.*, 2015), de la misma manera, el consumo de pulpa y jugo de mango no han presentado efecto en la reducción de peso de los animales de experimentación (Natal *et al.*, 2017; Ojo *et al.*, 2016).

Para el subproducto de Jamaica, en este proyecto se comprobó que su consumo presentó un efecto significativo en la disminución del peso corporal (9%) de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa. En el caso del orujo de uva, es un material que se ha estudiado ampliamente. Se ha reportado que un extracto de este disminuye la ganancia de masa grasa, sin reducir el consumo de alimento pero tiene un impacto significativo sobre la composición de la microbiota (Van Hul *et al.*, 2017). Rosenzweig *et al.* (2017) al administrar 50 mg/día a ratones alimentados con una dieta alta en grasa reportan una disminución del peso corporal del 70% en relación al grupo control. Por otro lado, Yu *et al.* (2017) al administrar 6.9, 13.8 y 20.7% de subproducto de uva no encontraron efecto en el peso corporal de los animales.

Por lo tanto, la disminución en la ganancia del peso corporal que se está presentando en las formulaciones podría deberse a un efecto sinérgico entre los polifenoles extraíbles de sus ingredientes, pues como se mencionó anteriormente ni la granada ni el mango han demostrado tener efecto sobre la disminución del peso corporal y la formulación 3 es la que tiene un mayor contenido de éstos subproductos. Igualmente, si el efecto se debiera al orujo de uva el mayor efecto se debería haber observado en la formulación 1 y si fuera por el subproducto de Jamaica, en la formulación 2. En relación al efecto sinérgico, se ha reportado por ejemplo que el efecto combinado de la genisteína, quercetina y resveratrol es mayor que los

compuestos por separado, en adipocitos 3T3-L1, suprimiendo la adipogénesis e incrementando la apoptosis de los adipocitos (Park *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que un incremento en el tamaño de los adipocitos, hipertrofia, es un predictor de la glucosa y el perfil lipídico alterado en sangre (Laforest *et al.*, 2015). Por lo tanto, se realizó el estudio histológico del tejido adiposo visceral de los diferentes grupos (Figura 36). Los adipocitos de los animales alimentados con la dieta AGFC incrementaron en un 23.4% su tamaño con relación a los de la dieta estándar. El consumo de los suplementos desarrollados fue capaz de disminuir el tamaño de los mismos del 22 al 24% en comparación con la dieta AGFC, no presentando diferencia estadística con los animales de la dieta estándar (Figura 36e).

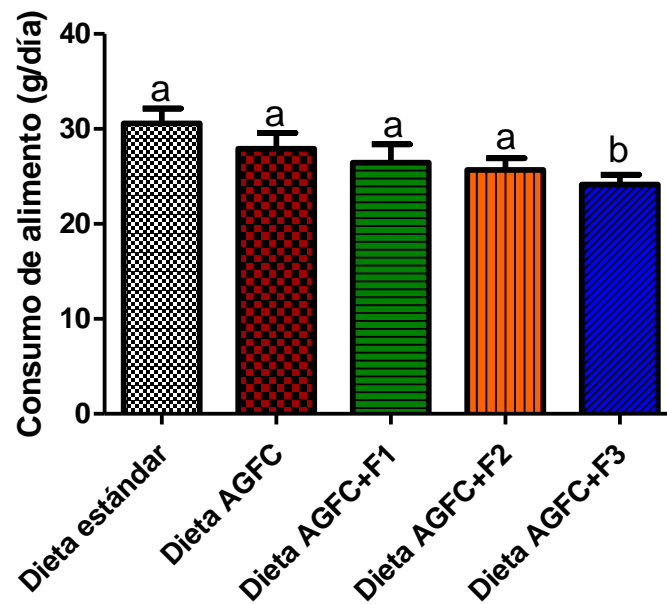


**Figura 36.** Adipocitos de animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas (a) dieta estándar (b) dieta AGFC; (c) dieta AGFC+F1; (d) dieta AGFC+F2; (e) dieta AGFC+F3, (f) tamaño de los adipocitos (100x)

### 7.7.2 Efecto del consumo de las formulaciones sobre el consumo de alimento

Con la finalidad de determinar si la suplementación de la dieta AGFC con las formulaciones desarrolladas mostró un efecto sobre la saciedad, se determinó el consumo de alimento promedio de cada grupo. El consumo de alimento fue mayor

en los animales que consumieron la dieta estándar, seguido de los animales alimentados con la dieta AGFC. Se presentó diferencia estadística significativa entre el consumo por día de la dieta estándar y la AGFC con la formulación 3. Es así como la reducción de la ganancia de peso (Figura 35) de este grupo pudiera estar relacionada con un efecto de saciedad que origina un menor consumo de alimento, cabe señalar que esta formulación tiene un contenido de fibra menor que las otras dos formulaciones (Cuadro 19), por lo que este efecto puede estar relacionado con su mayor contenido de polifenoles extraíbles. Se ha reportado que los polifenoles de la canela y el café tienen la capacidad de estimular a las células intestinales L para secretar GLP-1, que se considera como un factor de saciedad (Johnston *et al.*, 2003; Hlebowicz *et al.*, 2009).



**Figura 37.** Consumo de alimento de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplemen

tadas con las tres formulaciones desarrolladas. Datos expresados como media  $\pm$  EE. Valores con diferente letra indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

### 7.7.3 Efecto del consumo de los suplementos sobre el perfil lipídico en sangre

En el Cuadro 23 se muestran los valores de triglicéridos en sangre de los 5 grupos experimentales. Los animales alimentados con la dieta estándar tienen en promedio una concentración de 59 mg/dL, y los animales alimentados con la dieta AGFC tienen una concentración mayor en un 60.4% (95 mg/dL). Este aumento en los niveles de triglicéridos puede deberse a que, en el hígado, la fructosa es metabolizada hasta acetil Co-A, que provee los carbonos necesarios para la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena larga, que posteriormente son esterificados para formar triglicéridos (Havel, 2005).

Estadísticamente no hay diferencia significativa entre los grupos controles; sin embargo, sí hay diferencia entre los grupos suplementados con las formulaciones 1 y 2 vs el grupo AGFC ( $p=0.05$ ), presentando una reducción del 47.3 y 37.7% respectivamente. El menor efecto lo presentaron los animales del grupo AGFC+F3, con una reducción del 35.2% respecto al grupo AGFC.

**Cuadro 23.** Perfil lipídico en suero de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con las tres formulaciones desarrolladas

	Dieta estándar	Dieta AGFC	Dieta AGFC+F1	Dieta AGFC+F2	Dieta AGFC+F3
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	59.61 ± 4.48 <sup>ab</sup>	95.63 ± 7.18 <sup>a</sup>	50.39 ± 8.98 <sup>b</sup>	59.56 ± 10.33 <sup>b</sup>	61.98 ± 7.52 <sup>ab</sup>
<b>*Colesterol total (mg/dL)</b>	63.22 ± 2.23 <sup>c</sup>	136.12 ± 11.11 <sup>a</sup>	77.75 ± 4.17 <sup>bc</sup>	111.12 ± 9.97 <sup>ab</sup>	98.57 ± 6.44 <sup>ab</sup>
<b>Colesterol LDL (mg/dL)</b>	38.96 ± 1.60 <sup>c</sup>	58.98 ± 2.88 <sup>a</sup>	49.65 ± 2.86 <sup>abc</sup>	55.06 ± 5.01 <sup>ab</sup>	43.27 ± 2.72 <sup>bc</sup>
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	18.19 ± 1.35 <sup>a</sup>	9.73 ± 1.49 <sup>c</sup>	11.73 ± 0.70 <sup>bc</sup>	14.80 ± 1.11 <sup>ab</sup>	10.61 ± 0.87 <sup>bc</sup>

Datos expresados como media ± EE. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) prueba de Tukey-Kramer; \*( $p=0.05$ ) prueba de Steel-Dwass

De esta manera podemos decir que en lo que respecta a los triglicéridos en suero los mayores efectos lo presentaron las formulaciones 1 y 2, que se caracterizan por tener un mayor contenido de polifenoles no extraíbles y fibra dietaria, respectivamente. De acuerdo al perfil de compuestos fitoquímicos, la formulación 1

tiene la mayor cantidad de proantocianidinas (Cuadro 20); se ha reportado que proantocianidinas disminuyen la actividad de la lipasa pancreática (Moreno *et al.*, 2003), además de la secreción de quilomicrones en el intestino (Pal, Naissides, y Mamo, 2004) lo que reduce la absorción de las grasas de la dieta. Del Bas *et al.* (2008) reportan que procianidinas de semilla de uva, en células HepG2, inhiben la síntesis *de novo*, y la secreción de triglicéridos. Estas mismas procianidinas, en hígados de ratones, disminuyen la expresión de diacilglicerol acil transferasa 2 y de fosfatasa del ácido fosfatídico (Del Bas *et al.* 2009; Vargas y Vargas *et al.* 2015). Por otro lado, la fibra dietaria, ingrediente predominante en la formulación 2, tiene influencia en el metabolismo de lípidos y no solo por un efecto físico de atrapamiento, sino a través de la disminución en la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos: SREBP-1, sintasa de ácidos grasos y acetil-CoA carboxilasa (Han *et al.*, 2015).

Los niveles de colesterol en sangre también fueron cuantificados (Cuadro 23). El consumo de la dieta AGFC originó un incremento de 2.1 veces en los niveles del colesterol de los animales respecto al grupo de la dieta estándar. Los datos presentaron una distribución no paramétrica y al realizar la comparación entre los grupos, el grupo AGFC+F1 presentó diferencia estadística con el grupo AGFC, mientras que los grupos AGFC+F3, AGFC+F2 y AGFC fueron diferentes al grupo alimentado con la dieta estándar. De manera similar a los resultados de triglicéridos, la formulación 1 presentó el mayor efecto, ocasionando una reducción del 43% en la concentración de colesterol total en suero. Al evaluar la capacidad de adsorción de colesterol de la yema de huevo de los subproductos (datos no mostrados), se encontró que el orujo de uva tenía la mayor capacidad de retención (165.8 mg/g) y este es el ingrediente mayoritario de la formulación 1. Caso contrario ocurrió con el subproducto de Jamaica que presentó la menor capacidad para adsorber colesterol (34.5 mg/g), y este es el ingrediente mayoritario de la formulación 2, lo cual podría tener relación con los mayores niveles de colesterol en sangre. Asimismo, se ha reportado que las proantocianidinas de la semilla de uva, mayoritarias en la formulación 1, disminuyen la expresión de HMG-CoA reductasa y HMG-CoA

sintetasa (enzimas involucradas en la biosíntesis del colesterol), e incrementan la de CPT1 (enzima que controla la  $\beta$ -oxidación) (Del Bas *et al.*, 2008; Del Bas *et al.*, 2009)

Como parte del perfil lipídico, se cuantificó el colesterol LDL y HDL (Cuadro 23). El grupo alimentado con la dieta AGFC presentó un incremento del 51% y una reducción del 46%, para el colesterol LDL y HDL, respectivamente, además de una diferencia estadística significativa respecto al grupo de la dieta estándar. Para el colesterol LDL, el grupo AGFC+F3 no presentó diferencia estadística frente al grupo de la dieta estándar a diferencia de los grupos AGFC+F1 y AGFC+F2. Por lo tanto, el efecto más pronunciado sobre el LDL podría deberse a los polifenoles extraíbles que son más abundantes en la formulación 3, o al mayor contenido de los subproductos de mango y granada. En el caso de los polifenoles extraíbles algunos posibles mecanismos de acción serían la modulación del metabolismo de los lípidos a través de la lipasa sensible a la hormona, acetil CoA-carboxilasa, carnitina acil transferasa y PPAR- $\gamma$ 1 (Vasanthan *et al.*, 2016). En el caso de granada se ha reportado el efecto sobre la disminución de triglicéridos y colesterol total de un extracto acuoso-metanólico de su cáscara, en ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos (Sadeghipour *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que un extracto rico en polifenoles de cáscara de granada redujo los niveles de colesterol total y LDL en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, este efecto podría estar relacionado con la modulación de bacterias intestinales (Neyrinck *et al.*, 2013).

El colesterol HDL se incrementó con la suplementación de las formulaciones 1, 2 y 3, 20.5, 52.1 y 9.0% en comparación con el grupo AGFC, respectivamente; el grupo AGFC+F2 no presentó diferencia estadística ( $p=0.05$ ) con el de la dieta estándar.

La formulación 1, que se caracteriza por tener un mayor contenido de polifenoles no extraíbles, tiene como ingrediente mayoritario el orujo de uva, pudiendo ser el responsable del efecto que se está observando tanto para triglicéridos como para colesterol total. Yu *et al.* (2017) reportaron que la suplementación al 6.9% con subproducto de uva durante 10 semanas presentó



efectos tanto positivos como negativos en el perfil lipídico; disminuyendo los niveles de triglicéridos, pero incrementando los de colesterol total y LDL. El consumo del subproducto de uva ocasionó una regulación negativa en el hígado de los genes asociados con la síntesis de ácidos grasos (ACC, FAS) y otros relacionados con el metabolismo de lípidos (HSL, LDRD, PPAR $\gamma$ ).

#### 7.7.4 Efecto del consumo de los suplementos sobre la resistencia a la insulina

En el cuadro 24 se encuentran condensados los resultados asociados a la resistencia a la insulina. Los niveles de glucosa en sangre son un indicativo de su metabolismo en el cuerpo. La dieta AGFC se caracteriza por generar un estado de resistencia a la insulina en los animales, y ésta es una característica común asociada a la obesidad. El consumo de la dieta AGFC causó un incremento del 25.8% de los niveles de glucosa en suero de los animales, siendo esta concentración diferente significativamente frente al grupo de la dieta estándar ( $p=0.05$ ). En lo que respecta a los tratamientos, todos presentaron una disminución de la concentración de glucosa, siendo de 28.4, 13.9 y 17.2% para los grupos AGFC+F1, AGFC+F2 y AGFC+F3 respectivamente. Los animales suplementados con las formulaciones 1 y 3 no presentaron diferencia estadística con el grupo de la dieta estándar.

**Cuadro 24.** Parámetros en suero de ratas alimentadas con una dieta AGFC y suplementadas con las tres formulaciones desarrolladas

	Dieta estándar	Dieta AGFC	Dieta AGFC+F1	Dieta AGFC+F2	Dieta AGFC+F3
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	100.43 $\pm$ 2.71 <sup>b</sup>	125.76 $\pm$ 7.29 <sup>a</sup>	90.05 $\pm$ 3.46 <sup>b</sup>	108.27 $\pm$ 4.61 <sup>ab</sup>	104.15 $\pm$ 3.93 <sup>b</sup>
<b>Insulina (ng/mL)</b>	2.39 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	5.21 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	4.41 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	4.49 $\pm$ 0.47 <sup>ab</sup>	3.73 $\pm$ 0.21 <sup>bc</sup>
<b>*Índice HOMA</b>	17.26 $\pm$ 1.65	47.58 $\pm$ 4.28	28.33 $\pm$ 2.05	35.40 $\pm$ 4.32	28.35 $\pm$ 2.57
<b>Índice TyG</b>	7.98 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	8.69 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	7.62 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	7.99 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	8.03 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

Datos expresados como media  $\pm$  EE. Valores con diferente letra en la misma fila indican diferencia significativa ( $p=0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer); \*( $p=0.05$ ) prueba de Steel-Dwass.

En el Cuadro 24 se indican las concentraciones de insulina en suero de los animales en estudio al término de los tratamientos. Se observa una diferencia estadística

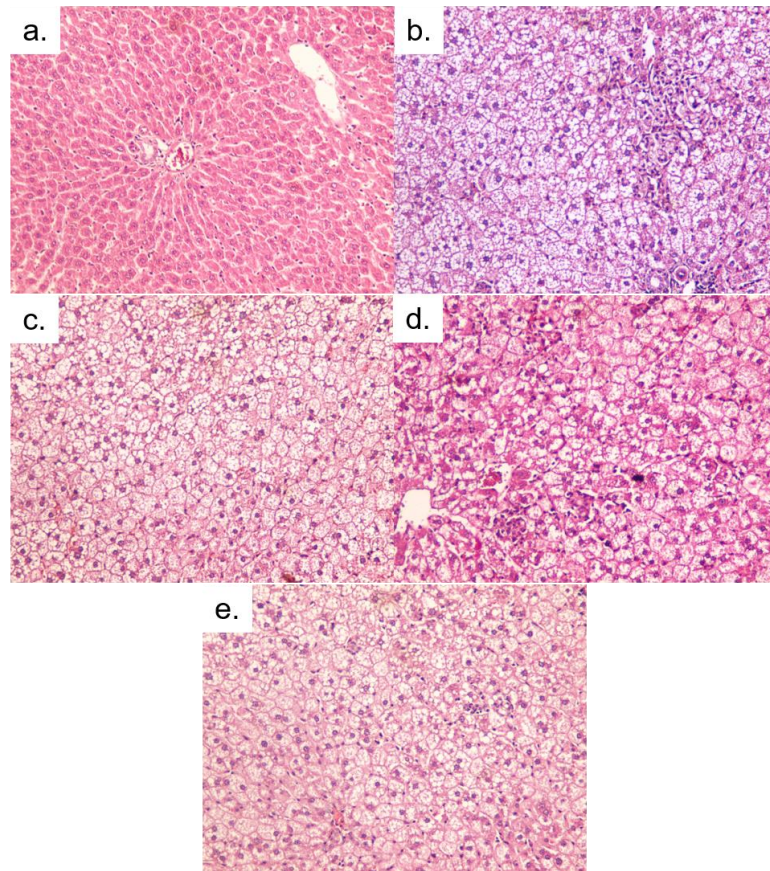
significativa entre el grupo AGFC, presentando 2.1 más insulina que el grupo alimentado con la dieta estándar. Los grupos AGFC+F1 y AGFC+F2 no presentaron diferencia con el grupo AGFC, a pesar de presentar una disminución de 15.3 y 13.8%, respectivamente. Caso contrario ocurrió con la F3, que disminuyó en 28.4% la concentración de insulina, no presentando diferencia estadística con el grupo de la dieta estándar.

A partir de estos resultados tanto los polifenoles extraíbles como los no extraíbles son los que están presentando un mayor efecto en la resistencia a la insulina. El efecto de la fibra no es tan significativo como el de dichos fitoquímicos.

Con la finalidad de estimar la resistencia a la insulina de los animales, se estimaron los índices HOMA y TyG (triglicérido y glucosa) (Cuadro 24). Como era esperarse, los animales alimentado con la dieta AGFC presentaron un índice HOMA 2.7 veces mayor que el grupo dieta estándar. Al tratarse de datos no paramétricos, y al realizar el análisis estadístico correspondiente, este grupo presentó diferencia estadística significativa con todos los demás ( $p=0.05$ ). El grupo AGFC+F1, al tener una menor desviación estándar que el grupo AGFC+F3, fue diferente estadísticamente al grupo AGFC, sin embargo, ambos presentaron reducciones del índice HOMA del 40.4%.

Para el índice TyG, los animales alimentados con la dieta AGFC mostraron niveles significativamente mayores (8.9%) que los alimentados con la dieta estándar y los grupos suplementados, quienes no presentaron diferencia estadística con el grupo alimentado con la dieta estándar ( $p=0.05$ ), mostrando reducciones de 12.3, 8.0 y 7.6% para los AGFC+F1, AGFC+F2 y AGFC+F3.

### 7.7.5 Efecto del consumo de los suplementos sobre la esteatosis hepática

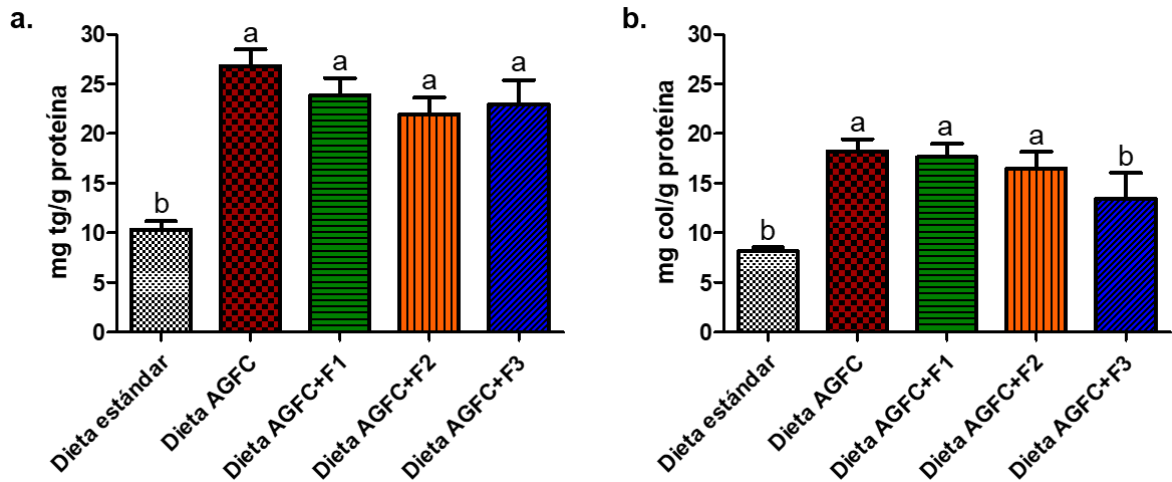


**Figura 38.** Hepatocitos de animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones desarrolladas (a) dieta estándar (b) dieta AGFC; (c) dieta AGFC+F1; (d) dieta AGFC+F2; dieta AGFC+F3 (100x).

En la Figura 38 se presentan los cortes histológicos de los hepatocitos de las ratas alimentadas con la dieta estándar (Figura 38 a) vs las alimentadas con la dieta AGFC (Figura 38 b) y suplementadas con las formulaciones (Figura 38 c, d y e). Es evidente que el consumo de la dieta AGFC produce esteatosis hepática o esteatohepatitis que se caracteriza por la acumulación excesiva de lípidos y la inflamación en el hígado. Si ésta continua podría dar lugar a fibrosis y cirrosis. De manera global, éstas alteraciones se deben principalmente a anomalías en el metabolismo hepático de lípidos que puede producirse por la ingesta excesiva de colesterol y grasa en la dieta (Li *et al.*, 2016), lo que a su vez está ligado con las concentraciones mayores de colesterol total y triglicéridos en suero (Cuadro 23). El análisis histológico revela que todos los animales alimentados con la dieta AGFC, ya

sea el control o los suplementados, presentan el cuarto grado de esteatosis, siendo este el más alto e indicando que todas las células tienen gotas lipídicas almacenadas en su interior. Esto ocasiona que casi todos los núcleos de los hepatocitos se encuentren hacia la periferia de la célula. Asimismo, en la Figura 38 b, se puede apreciar la presencia de xantomas (círculo negro) que contiene un grupo de macrófagos, indicando una inflamación severa que está ligada. El consumo de las formulaciones no disminuyó los depósitos de grasas de manera visual. Este resultado puede deberse a que la dieta fue demasiado agresiva con este órgano y por lo tanto el consumo de un alimento no fue suficiente para prevenir su daño.

Sin embargo, al cuantificar las concentraciones de triglicéridos y colesterol en hígado, sí se observaron ciertos efectos de la suplementación con las formulaciones (Figura 39). En lo que respecta al contenido de triglicéridos no hubo diferencia estadística significativa ( $p=0.05$ ) entre los tratamientos frente al grupo con la dieta AGFC. Sin embargo, el grupo de la formulación 2 presentó la mayor disminución en el contenido de triglicéridos (19%) y los grupos de las formulaciones 1 y 3 disminuyeron 9.6 y 14.3% respecto al grupo AGFC.

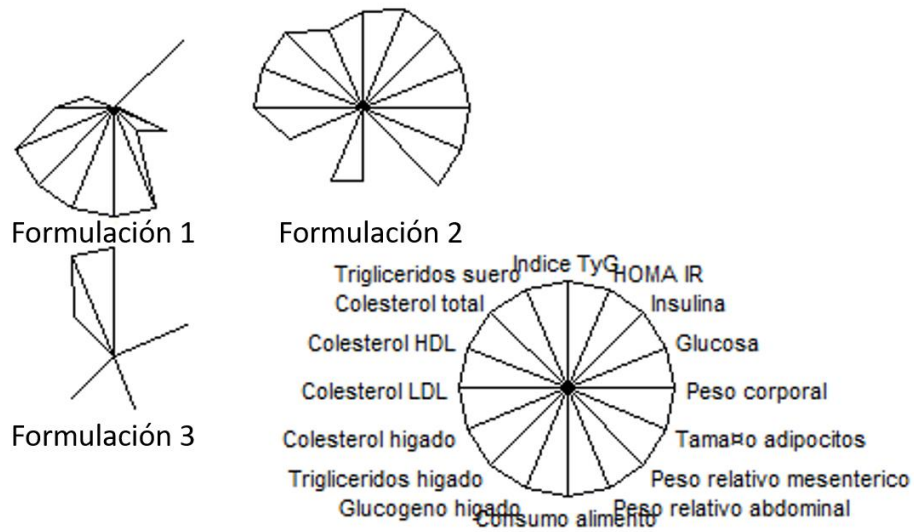


**Figura 39.** Contenido de triglicéridos (a) y colesterol (b) hepático en animales alimentados con una dieta AGFC y suplementada con las formulaciones

desarrolladas. Datos expresados como media  $\pm$  DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra indican diferencia significativa.

En este trabajo, las concentraciones de triglicéridos y colesterol en suero y en hígado fueron menores para los grupos suplementados con las formulaciones en comparación con los animales alimentados con la dieta AGFC, indicando que los niveles elevados de lípidos fueron revertidos por el consumo de las formulaciones.

Con la finalidad de tener una visión general gráfica de los datos obtenidos en el estudio *in vivo* se realizó un gráfico de estrella (Figura 40), donde tan solo es deseable que las áreas de colesterol HDL sea mayor y que las demás sean disminuidas. En este sentido, se puede apreciar como el mayor efecto lo presentó la formulación 3 seguido de la formulación 1, por lo tanto, los polifenoles extraíbles y los no extraíbles son los mayores responsables del efecto observado, ya que la formulación 2 al tener un mayor contenido de fibra dietaria total mejora muy pocos de los efectos evaluados.



**Figura 40.** Gráfico de estrella para los efectos *in vivo* evaluados

A partir de los resultados obtenidos se podría decir que cada una de las formulaciones presentó un efecto diferencial sobre los efectos observados en el modelo *in vivo*, esto a pesar de que las 3 formulaciones están elaboradas con los mismos 4 ingredientes tan solo en diferentes proporciones (subproductos de mango, Jamaica, granada y uva); mostrando de esta manera que su composición es clave y podrían estarse presentando efectos sinérgicos entre los compuestos bioactivos que presentan y sería una perspectiva que se debería evaluar en trabajos posteriores. De igual manera se esperaba que la formulación que contenía un mayor contenido de fibra dietaria presentara mejores efectos, pero no fue así, dando a entender que a la hora de diseñar este tipo de productos es más relevante el contenido y composición de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles. Estos resultados confirman resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo donde resultó ser más relevante para el efecto sobre obesidad los polifenoles extraíbles del subproducto de durazno que la fibra dietaria.

## VIII. CONCLUSIONES

- Entre los subproductos alimentarios analizados, el subproducto de Jamaica y el orujo presentaron una alta concentración de fibra. Sin embargo, el orujo no presenta una relación adecuada entre FDS y FDI.
- Entre los subproductos alimentarios analizados, el subproducto de granada tiene las mayores concentraciones de compuestos fenólicos totales seguido del de mango y uva, mientras el subproducto de Jamaica fue el más rico en antocianinas seguido del orujo.
- El proceso de decocción de cálices de Jamaica disminuyó el 50% el contenido de compuestos fenólicos extraíbles, incluyendo flavonoides y antocianinas, manteniendo en cualquier caso contenidos relevantes de estos compuestos. Al mismo tiempo, el proceso de decocción incrementó el contenido de fibra dietaria por un efecto de concentración.
- En un estudio en un modelo animal de obesidad se concluyó que el proceso de decocción de Jamaica disminuyó los efectos *in vivo* sobre los factores de riesgo cardiovascular, al compararlo con el efecto de los cálices. No obstante, los resultados mostraron que es un subproducto prometedor para ser empleado en la prevención de esteatosis hepática, resistencia a la insulina, obesidad e hipertrigliceridemia.
- Los efectos benéficos *in vivo* del consumo de los cálices producto podría deberse a un mayor contenido de compuestos fenólicos extraíbles, especialmente antocianinas, y ácidos orgánicos; en el caso del subproducto el efecto podría atribuirse a un mayor contenido de fibra dietaria y polifenoles hidrolizables.
- “Los diferentes perfiles de compuestos bioactivos y propiedades fisicoquímicas de los subproductos estudiados permiten el diseño de formulaciones ricas en diferentes fracciones de interés (polifenoles extraíbles, polifenoles no extraíbles, fibra dietaria). Una vez realizadas las tres formulaciones enriquecidas en cada una de estas fracciones se llevó a cabo un análisis detallado de las mismas, comprobando que efectivamente presentaban dichos perfiles diferenciados”

- El contenido de fibra dietaria insoluble de las formulaciones afectó el índice de solubilidad de agua de éstas y la povidona mejoró significativamente la solubilidad en agua de los subproductos e hizo que las formulaciones desarrolladas fueran mejores que el suplemento comercial, asimismo debido a la composición y propiedades físicas de los ingredientes primarios las formulaciones desarrolladas presentan una baja dispersabilidad.
- El estudio de vida de anaquel mostró que los polifenoles no extraíbles fueron muy estables al final del almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas: 25, 35 y 45 °C. Por el contrario, en los tres suplementos desarrollados la degradación de los polifenoles totales y las antocianinas resultó dependiente del tiempo y de la temperatura de almacenamiento.
- El estudio en un modelo animal de obesidad, suplementado con las tres formulaciones desarrolladas mostró que los suplementos presentaron efectos diferenciales sobre los factores de riesgo cardiovascular evaluados en el modelo animal. En concreto, los suplementos con mayor contenido de polifenoles extraíbles y no extraíbles presentaron un efecto mayor en la prevención de los factores de riesgo cardiovascular que el suplemento rico en fibra dietaria, indicando que el efecto biológico puede estar causado en mayor manera por la presencia de éstos fitoquímicos y no tanto por la fibra. Globalmente, los suplementos desarrollados presentaron muy buenos efectos en la reducción de la dislipidemia y la resistencia a la insulina, por lo que podrían emplearse en la prevención de dichos factores de riesgo.
- La vida de anaquel de las formulaciones 1 y 3 a las tres temperaturas estudiadas (25, 35 y 45 °C) y la formulación 2 a 25 °C será mayor a los 5 meses evaluados en este trabajo. La formulación 2 a 35 y 45 °C tendrá una vida de anaquel de  $66 \pm 17$  y  $26 \pm 4$  días, respectivamente.



## REFERENCIAS

- AOAC. (2002). Official methods of analysis (17th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists
- Aguilar Salinas, C.A., Gómez Pérez, F.J., Lerman Garbe, I., Vázquez Chávez, C., Pérez Méndez, Ó., and Posadas Romero, C. 2004. Posición de la sociedad mexicana de nutrición y endocrinología diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias: posición de la sociedad mexicana de nutrición y endocrinología. *Rev. Endocrinol. y Nutr.* **12**: 7–41. [Online] Available: <http://medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2004/er041b.pdf> [2017 Nov. 7].
- Ahmed Hossin, F.L. 2009. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) peels and it's extract on obese hypercholesterolemic rats. *Pakistan J. Nutr.* **8**: 1251–1257. [Online] Available: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjn/2009/1251-1257.pdf> [2017 Nov. 7].
- Ajila, C.M., Naidu, K.A., Bhat, S.G., and Prasada, R. 2007. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. *Food Chem.* **105**: 982–988.
- Ajila, C.M., and Prasada, R. 2013. Mango peel dietary fiber: Composition and associated bound phenolics. *J. Funct. Foods* **5**: 444–450.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga, C., Busco, F., Quiles, J.L., Cordero, M.D., Bompadre, S., Mezzetti, B., and Battino, M. 2014. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J. Nutr. Biochem.* **25**: 289–294. United States. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.11.002.
- Amaya-Cruz, D.M., Rodriguez-Gonzalez, S., Perez-Ramirez, I.F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M.A., and Reynoso-Camacho, R. 2015a. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *J. Funct. Foods* **17**: 93–102. doi:10.1016/j.jff.2015.04.051.
- Amaya-Cruz, D.M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M.A., and Reynoso-Camacho, R. 2015b. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *J. Funct. Foods* **17**: 93–102. doi:10.1016/j.jff.2015.04.051.
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A.C., and Shahidi, F. (n.d.). No Title.
- Amiot, M.J., Riva, C., and Vinet, A. 2016. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes. Rev.* **17**: 573–586. doi:10.1111/obr.12409.
- Anderson, R.A. 1982. Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. *Cereal Chem.* **59**: 265–269.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., and Kinae, N. 2000.

- Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* **130**: 2243–2250. United States. doi:10.1093/jn/130.9.2243.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., and Azizi, F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **12**: 43. BioMed Central. doi:10.1186/2251-6581-12-43.
- Banihani, S., Swedan, S., and Alguraan, Z. 2013. Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutr. Res.* **33**: 341–348. United States. doi:10.1016/j.nutres.2013.03.003.
- Barbosa-Canovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., and Yan, H. 2005. Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality. *Edited By* K. Academic. Plenum Publishers, New York.
- Barnes, R.C., Krenek, K.A., Meibohm, B., Mertens-talcott, S.U., and Talcott, S.T. 2016. Urinary metabolites from mango ( *Mangifera indica* L . cv . Keitt ) galloyl derivatives and in vitro hydrolysis of gallotannins in physiological conditions. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**: 542–550. doi:10.1002/mnfr.201500706.
- Del Bas, J.M., Ricketts, M.L., Baiges, I., and Quesada, H. 2008. Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**: 1172–1181.
- Del Bas, J.M., Ricketts, M.L., Vaqué, M., and Sala, E. 2009. Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**: 805–814.
- de Beer, D., Pauck, C.E., Aucamp, M., Liebenberg, W., Stieger, N., van der Rijst, M., and Joubert, E. 2018. Phenolic and physicochemical stability of a functional beverage powder mixture during storage – effect of the microencapsulant inulin and food ingredients. *J. Sci. Food Agric.* **98**: 2925–2934. doi:10.1002/j.
- Beltrán, A.E., Alvarez, Y., Xavier, F.E., Hernanz, R., Rodriguez, J., Núñez, A.J., Alonso, M.J., and Salaices, M. 2004. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Eur. J. Pharmacol.* **499**: 297–305. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.073.
- Berardini, N., Carle, R., and Schieber, A. 2004. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**: 2208–2216. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/rcm.1611.
- Bisson, J.-F., Daubie, S., Hidalgo, S., Guillemet, D., and Linares, E. Diuretic and antioxidant effects of Cacti-Nea, a dehydrated water extract from prickly pear fruit, in rats. *Phytother. Res.* **24**: 587–594. England. doi:10.1002/ptr.2996.
- Blackwood, A.D., Salter, J., Dettmar, P.W., and Chaplin, M.F. 2000. Dietary fibre,

- physicochemical properties and their relationship to health. *J. R. Soc. Promot. Health* **120**: 242–247. England.
- Bladé, C., Arola, L., and Salvadó, M.-J. 2010. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**: 37–59. doi:10.1002/mnfr.200900476.
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P.A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J.F., and Segura-Carretero, A. 2015. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Ind. Crops Prod.* **69**: 385–394.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**: 25–30.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **9**: 1551–1558. United States.
- Butterweck, V., Semlin, L., Feistel, B., Pischel, I., Bauer, K., and Verspohl, E.J. (n.d.). Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. *Phyther. Res.* **25**: 370–375. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/ptr.3271.
- Cam, M., Erdogan, F., Aslan, D., and Dinc, M. 2013. Enrichment of functional properties of ice cream with pomegranate by-products. *J. Food Sci.* **78**: 1543–1550. United States. doi:10.1111/1750-3841.12258.
- Cam, M., and Icyer, N.C. Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *J. Food Sci. Technol.* **52**: 1489–1497. India. doi:10.1007/s13197-013-1148-y.
- Carvajal-Zarrabal, O., Hayward-Jones, P.M., Orta-Flores, Z., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D.M., Aguilar-Uscanga, M.G., and Pedroza-Hernandez, M.F. 2009. Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**: 1–5. Hindawi. doi:10.1155/2009/394592.
- Carvajal-Zarrabal, O., Waliszewski, S.M., Barradas-Dermitz, D.M., Orta-Flores, Z., Hayward-Jones, P.M., Nolasco-Hipolito, C., Angulo-Guerrero, O., Sanchez-Ricano, R., Infanzon, R.M., and Trujillo, P.R. 2005. The consumption of *Hibiscus sabdariffa* dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **60**: 153–159. Netherlands. doi:10.1007/s11130-005-9023-x.
- Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J.L., Lucas, M.F., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., and Lasunción, M.A. 2006. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**: 252–262. American Society for Nutrition. [Online] Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825703> [2017 Nov. 7].

- Chau, C.F., and Huang, Y.L. 2004. Characterization of passion fruit seed fibres - a potential fibre source. *Food Chem.* **85**: 189–194.
- Chong, M.F.-F., Macdonald, R., and Lovegrove, J.A. 2010. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br. J. Nutr.* **104**: 28–39. Cambridge University Press. doi:DOI: 10.1017/S0007114510003922.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., and Sock, O. 2009. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition et principales utilisations. *Fruits* **64**: 179–193.
- Consortium, T.I. 2015. Dietary fibre and incidence of type 2 diabetes in eight European countries: the EPIC-InterAct Study and a meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* **58**: 1394–1408. doi:10.1007/s00125-015-3585-9.
- DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. 2009. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32**: 157–163. United States. doi:10.2337/dc09-S302.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., and Paredes-López, O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**: 173–289. Taylor & Francis.
- Deng, Q., Penner, M.H., and Zhao, Y. 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int.* **44**: 2712–2720. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.026.
- Dwyer, J.H., Navab, M., Dwyer, K.M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merz, C.N., and Fogelman, A.M. 2001. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation* **103**: 2922–2927. United States.
- el-Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M., and El-Massry, R.A. 1991. Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Nahrung* **35**: 567–576. GERMANY.
- Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., and Havel, P.J. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**: 911–922. United States. doi:10.1093/ajcn/76.5.911.
- Escudero Álvarez, E., and González Sánchez, P. 2006. Dietary fibre. *Nutr. Hosp.* **21**: 61–72. Spain.
- Evans, S.F., Meister, M., Mahmood, M., Eldoumi, H., Peterson, S., Perkins-Veazie, P., Clarke, S.L., Payton, M., Smith, B.J., and Lucas, E.A. 2014. Mango supplementation improves blood glucose in obese individuals. *Nutr. Metab. Insights* **7**: 77–84. SAGE Publications. doi:10.4137/NMI.S17028.
- Fang, C., Kim, H., Noratto, G., Sun, Y., Talcott, S.T., and Mertens-talcott, S.U. 2018. Gallotannin derivatives from mango (*Mangifera indica* L.) suppress adipogenesis and increase thermogenesis in 3T3-L1 adipocytes in part through

- the AMPK pathway. *J. Funct. Foods* **46**: 101–109.
- Fang, Y., Selomulya, C., Ainsworth, S., Palmer, M., and Chen, X. 2011. On quantifying the dissolution behaviour of milk protein concentrate. *Food Hydrocoll.* **25**: 503–510.
- Femenia, A., Lefebvre, A.-C., Thebaudin, J.-Y., Robertson, J.A., and Bourgeois, C.-M. 1997. Physical and Sensory Properties of Model Foods Supplemented with Cauliflower Fiber. *J. Food Sci.* **62**: 635–639. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb15426.x.
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I., and Asenjo, F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chem.* **91**: 395–401. doi:10.1016/j.foodchem.2004.04.036.
- Fischer, U.A., Carle, R., and Kammerer, D.R. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chem.* **127**: 807–821. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156.
- Fitzpatrick, J.J., van Lauwe, A., Coursol, M., O'Brien, A., Fitzpatrick, K.L., Ji, J., and Miao, S. 2016. Investigation of the rehydration behaviour of food powders by comparing the behaviour of twelve powders with different properties. *Powder Technol.* **297**: 340–348. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.04.036.
- Flamini, R., Rosso, M., and Bavaresco, L. 2015. Study of grape polyphenols by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (UHPLC / QTOF) and suspect screening analysis. *J. Anal. Methods Chem.* **2015**: 1–10. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2015/350259.
- Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E.S.G., and Kastele, J.J.P. 2011. Obesity and dyslipidemia. *Med. Clin. North Am.* **95**: 893–902. Elsevier. doi:10.1016/J.MCNA.2011.06.003.
- Garcia-Magana, M. de L., Garcia, H.S., Bello-Perez, L.A., Sayago-Ayerdi, S.G., and de Oca, M.M.-M. 2013. Functional properties and dietary fiber characterization of mango processing by-products (*Mangifera indica* L., cv Ataulfo and Tommy Atkins). *Plant foods Hum. Nutr.* **68**: 254–258. Netherlands. doi:10.1007/s11130-013-0364-y.
- García, R., Espín, J., Aaby, K., Alasalvar, C., Heinonen, M., Jacobs, G., Voorspoels, S., Koivumaki, T., Kroon, P., Pelvan, E., Saha, S., and Tomás, F. 2015. Validated method for the characterization and quantification of extractable and nonextractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 6555–6566. doi:10.1021/acs.jafc.5b02062.
- Giusti, M.M., and Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Page *in* *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc.

doi:10.1002/0471142913.faf0102s00.

- Goldberg, I.J. 2001. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 965–971. Oxford University Press. doi:10.1210/jcem.86.3.7304.
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., and López-Roca, J.M. 2006. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chem.* **97**: 87–94. doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.025.
- Gondi, M., Basha, S.A., Bhaskar, J.J., Salimath, P. V, and Rao, U.J.S.P. 2015. Anti-diabetic effect of dietary mango (*Mangifera indica* L.) peel in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Sci. Food Agric.* **95**: 991–999. England. doi:10.1002/jsfa.6778.
- Gozlekci, S., Saracoglu, O., Onursal, E., and Ozgen, M. 2011. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacogn. Mag.* **7**: 161–164. India. doi:10.4103/0973-1296.80681.
- Grigeldo-Miguel, N., Gorinstein, S., and Martín-Belloso, O. 1999. Characterisation of peach dietary fibre concentrate as a food ingredient. *Food Chem.* **65**: 175–181.
- Guardiola, S., and Mach, N. 2014. Therapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa*: a review of the scientific evidence. *Endocrinol. y Nutr. órgano la Soc. Española Endocrinol. y Nutr.* **61**: 274–295. doi:10.1016/j.endonu.2013.10.012.
- Guo, H., and Ling, W. 2015. The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: experimental evidence and clinical perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **16**: 1–13. United States.
- Gylling, H., and Simonen, P. 2015. Phytosterols, phytosteranols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients* **7**: 7965–7977. Switzerland.
- Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., and Scherer, P.E. 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**: 753–768. United States. doi:10.1016/j.ecl.2008.07.002.
- Han, S., Jiao, J., Zhang, W., Xu, J., Wan, Z., Zhang, W., Gao, X., and Qin, L. 2015. Dietary fiber prevents obesity-related liver lipotoxicity by modulating sterol-regulatory element binding protein pathway in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet. *Sci. Rep.* **5**: 1–10. England. doi:10.1038/srep15256.
- Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J., and O’Riordan, D. 2013. Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages - A review. *Food Res. Int.* **50**: 480–486.
- Harzallah, Arij Hammami, Mohamed Kępczyńska, M., Hislop, D.C., Arch, J., Cawthorne, M., and Mohamed, Z. 2016. Comparison of potential preventive effects of pomegranate flower, peel and seed oil on insulin resistance and inflammation in high fat and high sucrose diet-induced- obesity mice model. *Arch. Physiol. Biochem.* **122**.

- Hashemi, J.M. 2017. Efficacy of pomegranate (*Punica granatum*) extract on experimentally metabolic syndrome rat with high fructose diet. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* **6**: 227–237. [Online] Available: [www.ijpras.com](http://www.ijpras.com) [2017 Oct. 30].
- Hasnaoui, N., Wathelet, B., and Jiménez-Araujo, A. 2014. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chem.* **160**: 196–203. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.089>.
- Hassan, F.A., Ismail, A., Abdulhamid, A., and Azlan, A. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds in bambangan (*Mangifera pajang* Kort.) peels and their free radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 9102–9111.
- Hassellund, S.S., Flaa, A., Kjeldsen, S.E., Seljeflot, I., Karlsen, A., Erlund, I., and Rostrup, M. 2013. Effects of anthocyanins on cardiovascular risk factors and inflammation in pre-hypertensive men: a double-blind randomized placebo-controlled crossover study. *J. Hum. Hypertens.* **27**: 100–106. England. doi:[10.1038/jhh.2012.4](https://doi.org/10.1038/jhh.2012.4).
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., Vincieri, F.F., and Romani, A. 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.* **99**: 464–469.
- Heras-Roger, J., Pomposo-Medina, M., Díaz-Romero, C., and Darias-Martín, J. 2014. Copigmentation, colour and antioxidant activity of single-cultivar red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **239**: 13–19.
- Hlebowicz, J., Hlebowicz, A., Lindstedt, S., Björgell, O., Höglund, P., Holst, J.J., Darwiche, G., and Almér, L.-O. 2009. Effects of 1 and 3 g cinnamon on gastric emptying, satiety, and postprandial blood glucose, insulin, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, glucagon-like peptide 1, and ghrelin concentrations in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**: 815–821. American Society for Nutrition. doi:[10.3945/ajcn.2008.26807](https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26807).
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., and Cassidy, A. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**: 38–50. [Online] Available: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/88.1.38>.
- Hopkins, A.L., Lamm, M.G., Funk, J., and Ritenbaugh, C. 2013. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia* **85**: 84–94. doi:[10.1016/j.fitote.2013.01.003](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.01.003).
- Hough, G. 2010. Introduction. Pages 1–21 *in* Sensory shelf life estimation of food products.
- Huang, D.-W., Chang, W.-C., Wu, J.S.-B., Shih, R.-W., and Shen, S.-C. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet. *Nutr. Res.* doi:[10.1016/j.nutres.2015.10.001](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.10.001).

- Van Hul, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., Rhimi, M., Chira, K., Teissedre, P.-L., Delzenne, N.M., Maguin, E., Guilbot, A., Brochot, A., Gerard, P., Bäckhed, F., and Cani, P.D. 2017. Reduced obesity, diabetes and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*: ajpendo.00107.2017. American Physiological Society. doi:10.1152/ajpendo.00107.2017.
- Igielska-Kalwat, J., Goscianska, J., and Nowak, I. 2015. [Carotenoids as natural antioxidants]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **69**: 418–428. Poland.
- Iliopoulou, I., Thaeron, D., Baker, A., Jones, A., and Robertson, N. 2015. Analysis of the thermal degradation of the individual anthocyanin compounds of black carrot (*Daucus carota* L.): a new approach using high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 7066–7073. United States. doi:10.1021/acs.jafc.5b02543.
- Imran, M., Arshad, M.S., Butt, M.S., Kwon, J., Arshad, M.U., and Sultan, M.T. 2017. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. *Lipids Health Dis.* **16**: 1–17. Lipids in Health and Disease. doi:10.1186/s12944-017-0449-y.
- Iora, S.R.F., Maciel, G.M., Zielinski, A.A.F., Silva, M. V, Pontes, P.V. de A., Haminiuk, C.W.I., and Granato, D. 2014. Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**: 62–69. Wiley/Blackwell (10.1111). doi:10.1111/ijfs.12583.
- Isken, F., Klaus, S., Osterhoff, M., Pfeiffer, A.F.H., and Weickert, M.O. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Biochem.* **21**: 278–84. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.12.012.
- Ivan, I., Jungfer, E., Ritter, C., Santiago-schübel, B., Thiele, B., Fett, R., and Galensa, R. 2012. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. *Food Res. Int.* **48**: 848–855. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.001.
- Ji, J., Fitzpatrick, J., Cronin, K., Crean, A., and Miao, S. 2016. Assessment of measurement characteristics for rehydration of milk protein based powders. *Food Hydrocoll.* **54**, Part A: 151–161. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.027.
- Jiménez-Aguilar, D.M., López-Martínez, J.M., Hernández-Brenes, C., Gutiérrez-Urbe, J.A., and Welti-Chanes, J. 2015. Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *J. Food Compos. Anal.* **41**: 66–73.
- Jimenez, J.P., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Diaz-Rubio, M.E., Garcia-Diz, L., Goni, I., and Saura-Calixto, F. 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* **24**: 646–653. United States.



doi:10.1016/j.nut.2008.03.012.

- Jin, E.S., Beddow, S.A., Malloy, C.R., and Samuel, V.T. 2013. Hepatic glucose production pathways after three days of a high-fat diet. *Metabolism* **62**: 152–162. doi:<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.07.012>.
- Johanningsmeier, S.D., and Harris, G.K. (n.d.). Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. : 181–204. doi:10.1146/annurev-food-030810-153709.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N., and Morgan, L.M. 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 728–733. American Society for Nutrition. [Online] Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522730> [2017 Oct. 30].
- Katnelson, M.J., Della-morte, D., Sacco, R.L., and Rundek, T. 2012. Stroke prevention: recent achievements and new challenges. *Period. Biol.* **114**: 409–419.
- Kaur, J. 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**: 1–21. United States. doi:10.1155/2014/943162.
- Keith, M., and Christy, A. 2010. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutr. Diet. Suppl.* **2**: 1–12.
- Klont, R. 2000. Fibre in the new millennium. *World Food Ingredients* **April/May**: 52–59.
- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., and Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923–933. England.
- Kooijman, S., van den Heuvel, J.K., and Rensen, P.C.N. 2015. Neuronal control of brown fat activity. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**: 657–668. United States. doi:10.1016/j.tem.2015.09.008.
- Kulkarni, V.M., and Rathod, V.K. 2014. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. *Ind. Crop. Prod.* **52**: 292–297. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.indcrop.2013.10.032.
- Laforest, S., Labrecque, J., Michaud, A., Cianflone, K., and Tchermof, A. 2015. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **52**: 301–313. Taylor & Francis. doi:10.3109/10408363.2015.1041582.
- Lario, Y., Sendre, E., Garcia-Perez, J., Fuentes, C., Sayas Barbera, E., Fernandez Lopez, J., and Perez Alvarez, J. Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products<sup>1</sup>. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **5**: 113–117. doi:10.1016/j.ifset.2003.08.001.
- Li, S., Zeng, X., Zhou, X., Wang, H., Jo, E., Robinson, S., Xu, A., and Ye, J. 2016. Dietary cholesterol induces hepatic inflammation and blunts mitochondrial

- function in the liver of high-fat-fed mice. *J. Nutr. Biochem.* **27**: 96–103.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., and Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* **96**: 254–260. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>.
- Lomas-Soria, C., Pérez-Ramírez, I.F., Caballero-Pérez, J., Guevara-Gonzalez, R.G., Guevara-Olvera, L., Loarca-Piña, G., Guzman-Maldonado, H.S., and Reynoso-Camacho, R. 2015. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* **26**: 761–8. doi:[10.1016/j.jnutbio.2015.02.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.006).
- Lucas, E.A., Li, W., Peterson, S.K., Brown, A., Kuvibidila, S., Perkins-Veazie, P., Clarke, S.L., and Smith, B.J. 2011. Mango modulates body fat and plasma glucose and lipids in mice fed a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* **106**: 1495–1505. England. doi:[10.1017/S0007114511002066](http://dx.doi.org/10.1017/S0007114511002066).
- Manthey, J.A., and Perkins-Veazie, P. 2009. Influences of harvest date and location on the levels of  $\beta$ -carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **57**: 10825–10830. American Chemical Society. doi:[10.1021/jf902606h](http://dx.doi.org/10.1021/jf902606h).
- Manzoor, M., Anwar, F., Mahmood, Z., Rashid, U., and Ashraf, M. 2012. Variation in minerals, phenolics and antioxidant activity of peel and pulp of different varieties of peach (*Prunus persica* L.) fruit from Pakistan. *Molecules* **17**: 6491–6506. Switzerland.
- Marston, A., and Hostettmann, K. 2006. Separation and quantification of flavonoids. Pages 433–471 in O.M. Andersen and K. Markham, eds. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, New York.
- Martín-Carrón, N., Saura-Calixto, F., and Goñi, I. 1999. Effects of dietary fibre- and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1183–1188. John Wiley & Sons, Ltd. doi:[10.1002/1097-0010\(200006\)80:8<1183::AID-JSFA617>3.0.CO;2-G](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0010(200006)80:8<1183::AID-JSFA617>3.0.CO;2-G).
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez-Álvarez, J.A., and Viuda-Martos, M. 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chem.* **135**: 1520–1536. doi:[10.1016/j.foodchem.2012.05.057](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.057).
- Martínez Sánchez, A., Tarazona Díaz, M.P., García González, A., Gómez, P., and Aguayo, E. 2016. Effect of high-pressure homogenization on different matrices of food supplements. *Food Sci. Technol. Int.* **0**: 1–12. doi:[10.1177/1082013216642887](http://dx.doi.org/10.1177/1082013216642887).
- Mastrodi Salgado, J., Baroni Ferreira, T.R., de Oliveira Biazotto, F., and Dos Santos Dias, C.T. 2012. Increased antioxidant content in juice enriched with dried extract of pomegranate (*Punica granatum*) peel. *Plant Foods Hum. Nutr.* **67**: 39–43.

Netherlands. doi:10.1007/s11130-011-0264-y.

- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., and Rupérez, P. 2010. High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **11**: 445–450. doi:10.1016/j.ifset.2010.02.003.
- Matkowski, A., Kus, P., Goralska, E., and Wozniak, D. 2013. Mangiferin a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. *Mini-Reviews Med. Chem.* **13**: 439–455. doi:10.2174/1389557511313030011.
- Mazza, G., and Francis, F.J. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**: 341–371.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., and Hu, Y. (n.d.). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. doi:10.1155/2013/801457.
- Mercado-Mercado, G., Blancas-Benitez, F.J., Velderrain-Rodríguez, G.R., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Alvarez-Parrilla, E., and Sáyago-Ayerdi, S.G. Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Funct. Foods* **18**: 171–181. doi:10.1016/j.jff.2015.07.001.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A., and Pacyński, M. 2011. Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**: 1485–1493. Wiley/Blackwell (10.1111). doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02643.x.
- Mokrzycki, W., and Tatol, M. 2012. Color difference Delta E - A survey. *Mach. Grapics Vis.* **20**: 383–411.
- Morales-Luna, E., Perez-Ramirez Iza, F., Salgado, L.M., Castano-Tostado, E., Gomez-Aldapa Carlos, A., and Reynoso-Camacho, R. 2018. The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanins content. *J. Sci. Food Agric. England.* doi:10.1002/jsfa.9220.
- Moreno, D.A., Ilic, N., Poulev, A., and Brasaemle, D.L. 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* **19**: 876–879.
- Mosele, J.I., Macià, A., and Motilva, M. 2015. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. *Molecules* **20**: 17429–17468. doi:10.3390/molecules200917429.
- Moufle, A., Jamet, J., and Karoui, R. 2018. Impact of temperature cycling and isothermal storage on the quality of acidic and neutral shelf-stable dairy desserts packaged in flexible pouches. *Food bioprocess Technol.* **11**: 380–398. *Food and Bioprocess Technology*.
- Moyano, G., Sáyago-Ayerdi, S.G., Largo, C., Caz, V., Santamaria, M., and Tabernero, M. 2016. Potential use of dietary fibre from *Hibiscus sabdariffa* and *Agave tequilana* in obesity management. *J. Funct. Foods* **21**: 1–9.

doi:10.1016/j.jff.2015.11.011.

- Muruganandan, S., Srinivasan, K., Gupta, S., Gupta, P.K., and Lal, J. 2005. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 497–501. doi:10.1016/j.jep.2004.12.010.
- Nammi, S., Koka, S., Chinnala, K.M., and Boini, K.M. 2004. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Nutr. J.* **3**: 3. doi:10.1186/1475-2891-3-3.
- Narduzzi, L., Stanstrup, J., and Mattivi, F. 2015. Comparing wild American grapes with *Vitis vinifera*: A metabolomics study of grape composition. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 6823–6834.
- Natal, D.I.G., Rodrigues, K.C. da C., Moreira, M.E. de C., de Queiróz, J.H., Benjamin, L. dos A., dos Santos, M.H., Sant’Ana, H.M.P., and Martino, H.S.D. 2017. Bioactive compounds of the Ubá mango juices decrease inflammation and hepatic steatosis in obese Wistar rats. *J. Funct. Foods* **32**: 409–418. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.023.
- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., and Periago, M.J. 2011. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Res. Int.* **44**: 1528–1535.
- Neyrinck, A.M., Van Hée, V.F., Bindels, L.B., De Backer, F., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. 2013. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br. J. Nutr.* **109**: 802–809. Cambridge University Press. doi:10.1017/S0007114512002206.
- Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M., and Kahn, C.R. 2003. Muscle-specific PPAR $\gamma$ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **112**: 608–18. American Society for Clinical Investigation.
- Ojo, B., El-Rassi, G.D., Payton, M.E., Perkins-Veazie, P., Clarke, S., Smith, B.J., and Lucas, E.A. 2016. Mango supplementation modulates gut microbial dysbiosis and short-chain fatty acid production independent of body weight reduction in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J. Nutr.* **146**: 1483–1491. American Society for Nutrition. doi:10.3945/jn.115.226688.
- Ou, S., Kwok, K., Li, Y., and Fu, L. 2001. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 1026–1029. United States.
- Ozidal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., and Chen, F. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* **8**: 1–36. doi:10.3390/nu8020078.
- Pal, S., Naissides, M., and Mamo, J. 2004. Polyphenolics and fat absorption. *Int. J.*

- Obes. Relat. Metab. Disord. **28**: 324–326.
- Palumbo, B., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, J., Oguogho, A., Budinsky, A., Palumbo, R., and Sinzinger, H. (n.d.). Prickly pear induces upregulation of liver LDL binding in familial heterozygous hypercholesterolemia. *Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur.* **6**: 35–39. Poland.
- Pardo-Andreu, G.L., Barrios, M.F., Curti, C., Hernández, I., Merino, N., Lemus, Y., Martínez, I., Riaño, A., and Delgado, R. 2008. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol. Res.* **57**: 79–86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.12.004>.
- Park, H.J., Yang, J.-Y., Ambati, S., Della-Fera, M.A., Hausman, D.B., Rayalam, S., and Baile, C.A. 2008. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J. Med. Food* **11**: 773–783. doi:10.1089/jmf.2008.0077.
- Peerajit, P., Chiewchan, N., and Devahastin, S. 2012. Effects of pretreatment methods on health-related functional properties of high dietary fibre powder from lime residues. *Food Chem.* **132**: 1891–1898. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.022.
- Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. 2015a. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: intake in four European countries. *Food Res. Int.* **74**: 315–323. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.007.
- Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. 2015b. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Res. Int.* **74**: 315–323. Elsevier.
- Pérez-Magariño, S., and González-San José, M.L. 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 1181–1189.
- Perez-Ramirez, I.F., Reynoso-Camacho, R., Saura-Calixto, F., and Perez-Jimenez, J. 2018. Comprehensive characterization of extractable and nonextractable phenolic compounds by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole time-of-flight of a grape/pomegranate pomace dietary supplement. *J. Agric. Food Chem.* **66**: 661–673. United States. doi:10.1021/acs.jafc.7b05901.
- Ramadan, M.F., and Mörsel, J.-T. 2003. Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chem.* **83**: 447–456.
- Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki Univ. Helsinki: 10–14.
- Ribeiro, L.F., Ribani, R.H., Francisco, T.M.G., Soares, A.A., Pontarolo, R., and

- Haminiuk, C.W.I. 2015. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. life Sci.* **1007**: 72–80. Netherlands. doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.005.
- Richard, B., Page, J.F. Le, Schuck, P., Andre, C., Jeantet, R., and Delaplace, G. 2013. Towards a better control of dairy powder rehydration processes. *Int. dairy J.* **31**: 18–28.
- Robertson, J.A., and Eastwood, M.A. 1981. An investigation of the experimental conditions which could affect water-holding capacity of dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **32**: 819–825. John Wiley & Sons, Ltd.
- Robertson, J.A., de Monredon, F.D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., and Thibault, J.-F. 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a european collaborative study. *LWT - Food Sci. Technol.* **33**: 72–79.
- Rocha, D.F., Lanari, M.C., Zamora, M.C., and Chirife, J. 2016. Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT - Food Sci. Technol.* **70**: 162–170. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.038.
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliani, V., Genovese, M.I., Gonçalves, A.E. de S.S., and Fett, R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem.* **127**: 174–179.
- Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Amaya-Cruz, D.M., Gallegos-Corona, M.A., Ramos-Gomez, M., Mora, O., and Reynoso-Camacho, R. 2018a. Polyphenol-rich peach (*Prunus persica* L.) by-product exerts a greater beneficial effect than dietary fiber-rich by-product on insulin resistance and hepatic steatosis in obese rats. *J. Funct. Foods* **45**: 58–66. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.010.
- Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S., Rodríguez-García, M.E., and Reynoso-Camacho, R. 2018b. Improvement of physico-chemical properties and phenolic compounds bioavailability by concentrating dietary fiber of peach (*Prunus persica*) juice by-product. *J. Sci. Food Agric.* **98**: 3109–3118. England.
- Rosenzweig, T., Skalka, N., Rozenberg, K., Elyasiyan, U., Pinkus, A., Green, B., Stanevsky, M., and Drori, E. 2017. Red wine and wine pomace reduced the development of insulin resistance and liver steatosis in HFD-fed mice. *J. Funct. Foods* **34**: 379–389.
- Sadeghipour, A., Eidi, M., Kavgani, A.I., Ghahramani, R., Shahabzadeh, S., and Anissian, A. 2014. Lipid Lowering Effect of *Punica granatum* L. Peel in High Lipid Diet Fed Male Rats. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*: 1–5.
- Sadilova, E., Carle, R., and Stintzing, F. 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**:

1461–1471.

- Sanchez-Alonso, I., Solas, M.T., and Borderias, A.J. 2007. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. *J. Food Sci.* **72**: 94–101. United States. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00273.x.
- Sangnark, A., and Noomhorm, A. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Res. Int.* **37**: 66–74. doi:10.1016/j.foodres.2003.09.007.
- Santomaso, A., Lazzaro, P., and Canu, P. 2003. Powder flowability and density ratios: the impact of granules packing. *Chem. Eng. Sci.* **58**: 2857–2874. doi:10.1016/S0009-2509(03)00137-4.
- Satija, A., and Hu, F.B. 2012. Cardiovascular benefits of dietary fiber. *Curr. Atheroscler. Rep.* **14**: 505–514. Current Science Inc. doi:10.1007/s11883-012-0275-7.
- Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4303–4306. American Chemical Society. doi:10.1021/JF9803841.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 43–49. American Chemical Society. doi:10.1021/jf1036596.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., and Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* **101**: 492–501.
- Sayago-Ayerdi, S.G., Arranz, S., Serrano, J., and Goni, I. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7886–7890. United States. doi:10.1021/jf070485b.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Brenes, A., Viveros, A., and Goñi, I. 2009. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Sci.* **83**: 528–533. doi:https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.038.
- Sáyago-Ayerdi, S.G., Velázquez-López, C., Montalvo-González, E., and Goñi, I. 2014. By-product from decoction process of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces as a source of polyphenols and dietary fiber. *J. Sci. Food Agric.* **94**: 898–904. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/jsfa.6333.
- Schneeman, B. 1987. Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr. Rev.* **45**: 129–132.
- Sendra, E., and Navarro, C. (n.d.). Chemical , physico-chemical and functional properties of pomegranate ( *Punica granatum* L .) bagasses powder co-product. *J. Food Eng.* **110**: 220–224. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.05.029.
- Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., and Schneider, Y.-J. 2012.

- Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food Chem.* **135**: 68–73. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.074>.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M. 1998. Oxidants and Antioxidants Part A. *Methods in Enzymology*. Elsevier.
- Tarascou, I., Souquet, J.M., Mazauric, J.P., Carrillo, S., Coq, S., Canon, F., Fulcrand, H., and Cheynier, V. 2010. No Title. *Arch. Biochem. Biophys* **501**: 16–22.
- Threapleton, D.E., Greenwood, D.C., Evans, C.E.L., Cleghorn, C.L., Nykjaer, C., Woodhead, C., Cade, J.E., Gale, C.P., and Burley, V.J. 2013. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ Br. Med. J.* **347**: 1–12. [Online] Available: <http://www.bmj.com/content/347/bmj.f6879.abstract>.
- Tomás-Barberán, F., and Espín, J. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. food Agric.* **81**: 853–876.
- Tseng, A., and Zhao, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem.* **138**: 356–65. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.148.
- Tseng, A., and Zhao, Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem.* **138**: 356–365. Elsevier. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2012.09.148.
- Vallverd, A., Meudec, E., Eder, M., and Lamuela, R.M. 2017. The hidden face of wine polyphenol polymerization highlighted by high-resolution mass spectrometry. *Chem. Open* **6**: 336–339. doi:10.1002/open.201700044.
- Vargas y Vargas, M. de L., Sauri Duch, E., Tamayo Canul, E., González Novelo, S.A., and Tamayo Cortez, J. 2015. Chicozapote fresco y cortado (*Achras sapota*) con actividad antioxidante; una demanda actual del consumo de frutas. *Rev. Mex. Agronegocios* **36**: 1315–1324. [Online] Available: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/200282/2/16>. Chicozapote ITM.pdf [2017 Jun. 19].
- Vasantha Rupasinghe, H.P., Sekhon-Loodu, S., Mantso, T., and Panayiotidis, M.I. 2016. Phytochemicals in regulating fatty acid  $\beta$ -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacol. Ther.*: 1–11.
- Venkataramanamma, D., Aruna, P., and Singh, R.P. 2016. Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel. *J. Food Sci. Technol.* **53**: 2497–2503. doi:10.1007/s13197-016-2222-z.
- Wang, P., Fang, J., Gao, Z., Zhang, C., and Xie, S. 2016. Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *J.*



- Diabetes Investig. **7**: 56–69. Wiley Online Library. doi:10.1111/jdi.12376.
- Weickert, M.O., and Pfeiffer, A.F.H. 2018. Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. *J. Nutr.* **148**: 7–12. United States. doi:10.1093/jn/nxx008.
- Wightman, J.D., and Heuberger, R.A. 2015. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *J. Sci. Food Agric.* **95**: 1584–1597. England. doi:10.1002/jsfa.6890.
- Williamson, G. 2013. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**: 48–57. Germany. doi:10.1002/mnfr.201200511.
- Wolfram, R.M., Kritz, H., Efthimiou, Y., Stomatopoulos, J., and Sinzinger, H. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia--a pilot study. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**: 840–846. Austria.
- Yadav, M., Jain, S., Bhardwaj, A., Nagpal, R., Puniya, M., Tomar, R., Singh, V., Parkash, O., Prasad, G.B.K.S., Marotta, F., and Yadav, H. 2009. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *J. Med. Food* **12**: 473–484. United States. doi:10.1089/jmf.2008.0096.
- Yang, M.-Y., Peng, C.-H., Chan, K.-C., Yang, Y.-S., Huang, C.-N., and Wang, C.-J. 2010. The hypolipidemic effect of *Hibiscus sabdariffa* polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 850–859. United States. doi:10.1021/jf903209w.
- Yu, J., and Ahmedna, M. 2012. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**: 221–237.
- Yu, J., Bansode, R.R., Smith, I.N., and Hurley, S.L. 2017. Impact of grape pomace consumption on the blood lipid profile and liver genes associated with lipid metabolism of young rats. *Food Funct.* **8**: 2731–2738. The Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/C7FO00542C.
- Zhao, X., Yang, Z., Gai, G., and Yang, Y. Effect of superfine grinding on properties of ginger powder. *J. Food Eng.* **91**: 217–222. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.024.
- Zunft, H.J.F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H.J., Koebnick, C., and Grünwald, J. 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr.* **42**: 235–242. doi:10.1007/s00394-003-0438-y.
- Zurita, J., Díaz-Rubio, M.E., and Saura-Calixto, F. 2012. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**: 936–939. England.

- Zunft, H., Luder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H., Koebnick, C. and Grunwald, J. 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur J Nutr.* 42: 235–242.
- Zurita, J., Díaz-Rubio, M., Saura-Calixto, F. 2012. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *Int J Food Sci Nutr.* 63: 936-939.