



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Aplicación de Descompresión Instantánea Controlada (DIC) para mejorar la biodisponibilidad de bioactivos de subproductos de mango y uva para el control de la obesidad y sus complicaciones**

**TESIS**

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

**Presenta**

M. en C. Yuridia Martínez Meza

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

**Co-dirigido por:**

Dra. Jara Pérez Jiménez

Querétaro, Qro. Noviembre del 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Aplicación de Descompresión Instantánea Controlada (DIC) para mejorar la biodisponibilidad de bioactivos de subproductos de mango y uva para el control de la obesidad y sus complicaciones**

**TESIS**

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

**Presenta**

M. en C. Yuridia Martínez Meza

**Dirigido por:**

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

**Co-dirigido por:**

Dra. Jara Pérez Jiménez

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Presidente

Dra. Jara Pérez Jiménez

Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Vocal

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Suplente

Dra. Minerva Ramos Gómez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre del 2021

México

## DEDICATORIA

*A Dios, que me ha bendecido con un inmenso amor a través de mi familia, amigos y todo lo bello que me rodea, por darme la fortaleza de nunca rendirme y enseñarme de manera constante que su amor es infinito.*

*A mi amado esposo, Carlos, que sin planearlo ni esperarlo, ha sido mi mejor elección de vida. Gracias por tu dedicación en nuestro matrimonio y, sobre todo, gracias por cada día motivarme por alcanzar las metas que me proponga.*

*A mis adorados padres, Jorge y Ana María, que siempre me han enseñado a no rendirme; a mis hermanos Eli, Geo y Jorge, que a pesar de la distancia siempre me ha apoyado y ha estado presente en los momentos más importantes de mi vida.*

*A mi nueva familia, Zacatenco Cruz, que me ha recibido con los brazos abiertos y día con día me muestran su cariño, aún en la distancia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y a la Dra. Jara Pérez Jiménez, por su apoyo y dirección.

A mis sinodales: el Dr. Eduardo Castaño Tostado, la Dra. Silvia Amaya y la Dra. Minerva Ramos Gómez por todas sus observaciones y propuestas para la mejora de este proyecto.

A mis amigos de laboratorio que siempre me han acompañado en mi jornada. Eli, Gloria, Ale, Alex, Anita, Karen, Fernando, Hugo, Joel, siempre los llevaré presente. Y a los estudiantes de licenciatura Jorge, Mariana, Joaquín y Rodo.

## ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Sobrepeso y obesidad .....	5
2.2. Expansión del tejido adiposo .....	5
2.3. Esteatosis hepática .....	6
2.4. Resistencia a la insulina .....	7
2.5. Compuestos fenólicos y carotenoides .....	8
2.6. Fibra dietaria antioxidante .....	11
2.7. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos .....	13
2.8. Subproductos agroindustriales .....	15
2.8.1. Subproducto de uva y sus propiedades .....	16
2.8.1.1. Composición química .....	16
2.8.1.2. Beneficios a la salud .....	17
2.8.1.3. Biodisponibilidad .....	18
2.8.2. Subproducto de mango y sus propiedades .....	19
2.8.2.1. Composición química .....	19
2.8.2.2. Beneficios a la salud .....	19
2.8.2.3. Biodisponibilidad .....	20
2.9. Tecnologías aplicadas a subproductos agroindustriales .....	20
2.10. Descompresión Instantánea Controlada (DIC) .....	21
III. JUSTIFICACIÓN .....	25
IV. HIPÓTESIS .....	26
V. OBJETIVOS .....	27
5.1. Objetivo general .....	27
5.2. Objetivos específicos .....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1. Recolección del subproducto de uva y mango .....	27
6.2. Tratamiento de los subproductos de uva y mango .....	28

<b>6.3.</b>	<b>Caracterización de las muestras tratadas con DIC</b> .....	29
6.3.1.	<b>Cuantificación de los polifenoles extraíbles (EPP)</b> .....	29
6.3.1.1.	<b>Determinación de fenoles totales</b> .....	30
6.3.1.2.	<b>Antocianinas monoméricas</b> .....	30
6.3.1.3.	<b>Proantocianidinas extraíbles (EPA)</b> .....	31
6.3.2.	<b>Antioxidantes macromoleculares o polifenoles no extraíbles (NEPP)</b> .	31
6.3.2.1.	<b>Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPA)</b> .....	31
6.3.2.2.	<b>Cuantificación de polifenoles hidrolizables (HPP)</b> .....	32
6.3.3.	<b>Carotenoides totales</b> .....	32
6.3.4.	<b>Caracterización fisicoquímica</b> .....	33
6.3.4.1.	<b>Capacidad de hinchamiento</b> .....	33
6.3.4.2.	<b>Capacidad de Retención de Agua (CRA)</b> .....	33
6.3.5.	<b>Análisis de las muestras seleccionadas</b> .....	33
6.3.5.1.	<b>Identificación de antocianinas monoméricas de orujo de uva mediante UHPLC-QqQ-ESI-MS</b> .....	33
6.3.5.2.	<b>Perfil de compuestos bioactivos de las muestras tratadas con DIC</b> . 34	
6.3.5.3.	<b>Determinación del grado medio de polimerización de las proantocianidinas</b> .....	35
6.3.5.4.	<b>Capacidades antioxidantes</b> .....	35
6.3.5.5.	<b>Determinación de fibra dietaria</b> .....	36
6.3.5.6.	<b>Análisis de subproductos sometidos a DIC por Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	36
6.3.5.7.	<b>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</b> .....	37
<b>6.4.</b>	<b>Evaluación del efecto de aplicación de DIC sobre las modificaciones en proantocianidinas no extraíbles</b> .....	37
6.4.1.	<b>Determinación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de los materiales de orujo de uva sometido a DIC</b> .....	38
6.4.2.	<b>Determinación del perfil de compuestos de los materiales de orujo sometidos a DIC por UPLC-ESI-Q-ToF MS</b> .....	39
6.4.3.	<b>Determinación de la capacidad antioxidante en los materiales de orujo de uva sometidos a DIC en matrices completas y extractos</b> .....	39
<b>6.5.</b>	<b>Evaluación de la suplementación de la dieta con orujo de uva Malbec modificado por DIC sobre obesidad y sus complicaciones</b> .....	40
6.5.1.	<b>Evaluación de la suplementación de la dieta con orujo de uva Malbec sometido a DIC en obesidad y sus complicaciones</b> .....	41
6.5.2.	<b>Evaluación del estado oxidativo en suero y heces</b> .....	42

6.6.	Análisis estadístico.....	43
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1	Efecto de la descompresión instantánea controlada en subproducto de mango 44	
7.1.1.	Compuestos fenólicos totales, polifenoles hidrolizables y carotenoides 44	
7.1.2.	Características fisicoquímicas .....	46
7.1.3.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	47
7.1.4.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de subproducto de mango	49
7.1.5.	Efecto de la descompresión instantánea controlada en subproducto de mango pre secado y con ciclos.....	50
7.1.6.	Compuestos fenólicos extraíbles.....	51
7.2	Efecto de la descompresión instantánea controlada sobre orujo de uva	52
7.2.1.	Compuestos fenólicos extraíbles.....	52
7.3.2	Proantocianidinas extraíbles y no extraíbles.....	54
7.3.3	Características fisicoquímicas.....	56
7.3.4	Análisis de las muestras seleccionadas .....	57
7.3.5	Identificación de antocianinas monoméricas .....	58
7.3.6	Perfil de compuestos bioactivos; ácidos fenólicos y flavonoides .....	60
7.3.7	Determinación del grado medio de polimerización de las proantocianidinas de orujo de uva sometido a DIC.....	62
7.3.8	Capacidad antioxidante.....	63
7.3.9	Contenido de fibra dietaria (FD).....	63
7.3.10	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	65
7.3.11	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de orujo de uva .....	67
7.4.	Efecto de DIC sobre las modificaciones en NEPA utilizando materiales con diferente contenido.....	69
7.4.1.	Efecto de DIC en los EPP de los diferentes materiales de orujo de uva ..	69
7.4.2.	Análisis de interacciones entre los factores de presión, ciclos y tipo de material en compuestos EPP y NEPP.....	73
7.4.3.	Efecto de DIC en las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de los diferentes materiales de orujo de uva .....	76
7.4.4.	Cambios en el perfil de compuestos por la aplicación de DIC a los diferentes materiales de orujo de uva .....	77
7.4.5.	Capacidades antioxidantes de diferentes variedades de orujo de uva tratados con DIC .....	81

7.5. Evaluación <i>in vivo</i> de la suplementación de la DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC .....	82
VIII. CONCLUSIONES.....	93
IX. REFERENCIAS .....	94

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## ÍNDICE DE CUADROS

## Páginas

<b>Cuadro 1.</b> Variables de proceso de DIC.....	28
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos fenólicos extraíbles y carotenoides en piel de mango sometida a la descompresión instantánea controlada.....	45
<b>Cuadro 3.</b> Capacidad de hinchamiento y retención de agua en piel de mango sometido a la descompresión instantánea controlada.....	47
<b>Cuadro 4.</b> Frecuencia de los grupos funcionales presentes en muestras de subproducto de mango sometidas a DIC .....	49
<b>Cuadro 5.</b> Concentración de fenoles en subproducto de mango sometido a DIC.....	51
<b>Cuadro 6.</b> Polifenoles extraíbles en orujo de uva sometido a la descompresión instantánea controlada.....	53
<b>Cuadro 7.</b> EPA, NEPA y NEPP en orujo de uva sometido a DIC .....	55
<b>Cuadro 8.</b> CRA y capacidad de hinchamiento en orujo de uva sometido a DIC .....	57
<b>Cuadro 9.</b> Identificación tentativa de antocianinas extraíbles en orujo de uva con diferentes tratamientos DIC, determinado por análisis UPLC-MS.....	59
<b>Cuadro 10.</b> Perfil de ácidos fenólicos y flavonoides de orujo de uva sometido a la descompresión instantánea controlada.....	61
<b>Cuadro 11.</b> Capacidad antioxidante de orujo de uva sometido a DIC.....	63
<b>Cuadro 12.</b> Contenido de fibra dietaria en muestras sometidas a DIC .....	64
<b>Cuadro 13.</b> Frecuencia de los grupos funcionales presentes en muestras de orujo de uva sometidas a DIC .....	67
<b>Cuadro 14.</b> Concentración de fenoles totales en diferentes materiales de orujo de uva sometido a DIC.....	72
<b>Cuadro 15.</b> Cambios en las fracciones de fibra, celulosa, hemicelulosa y lignina de orujo de uva de diferentes variedades sometidas a la descompresión instantánea controlada.	77
<b>Cuadro 16.</b> Perfil de compuestos de los materiales de orujo de uva sometidos a DIC por medio de UPLC-ESI-Q-ToF MS.....	80
<b>Cuadro 17.</b> Efecto sobre el tejido adiposo en ratas alimentadas con una DAGF y suplementadas con orujo de uva Malbec sometida a DIC.....	86
<b>Cuadro 18.</b> Concentración de fenoles totales en subproducto de mango sometido a la descompresión instantánea controlada.....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Páginas

<b>Figura 1.</b> Adquisición y eliminación de lípidos hepáticos (Adaptado de Ipsen y col., 2018)	6
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo con su análisis en alimentos (Adaptado de Pérez-Jiménez y Torres, 2011)	9
<b>Figura 3.</b> El catabolismo de microbiota intestinal de polifenoles no extraíbles conduce a metabolitos fenólicos biodisponibles de bajo peso molecular (Adaptado de De Bruyne y col., 2019)	10
<b>Figura 4.</b> Biodisponibilidad de carotenoides (Adaptado de Kopec y Failla, 2018)	11
<b>Figura 5.</b> Asociación de compuestos fenólicos con fibra dietaria (Adaptado de Howarth y col., 2001)	12
<b>Figura 6.</b> Transporte y metabolismo de compuestos fenólicos (Adaptado de Redan y col., 2016)	15
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de DIC (Adaptado de Romero-Cano y col., 2016)	22
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la determinación de polifenoles extraíbles en extractos y no extraíbles en los residuos de extracción	29
<b>Figura 9.</b> Espectro de FTIR de subproducto de mango sometido a DIC	48
<b>Figura 10.</b> Microscopía electrónica de barrido en subproducto de mango	50
<b>Figura 11.</b> Análisis ANOVA bidireccional para compuestos fenólicos totales, antocianinas, EPA, NEPA y HPP	56
<b>Figura 12.</b> Espectro FTIR de orujo de uva sometido a DIC (diferente presión y tiempo)	66
<b>Figura 13.</b> Microscopía electrónica de barrido de orujo de uva sometido a DIC	68
<b>Figura 14.</b> Contenido de EPP y NEPP de orujo de uva de diferentes variedades	70
<b>Figura 15.</b> Interacciones de factores evaluados en la aplicación de DIC a los diferentes materiales de orujo de uva	75
<b>Figura 16.</b> Capacidades antioxidantes. A) y B) en matriz completa. C y D) en extractos	82
<b>Figura 17.</b> Ganancia de peso en animales alimentados con una DAGF y suplementada con orujo de uva Malbec sometido a DIC	84
<b>Figura 18.</b> Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en homeóstasis de glucosa, A) Curva de tolerancia a la glucosa, B) Área bajo la curva. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s	87
<b>Figura 19.</b> Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en A) Glucosa plasmática, B) insulina y C) HOMA-IR. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s	88
<b>Figura 20.</b> Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en acumulación de triglicéridos en hígado. A) Histología, B) cuantificación de triglicéridos en hígado. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s	89

## RESUMEN

Los subproductos agroindustriales, ricos en polifenoles extraíbles y no extraíbles, se han asociado con la prevención de enfermedades relacionadas con la obesidad y sus complicaciones, como esteatosis hepática y resistencia a la insulina. Sin embargo, la biodisponibilidad de los polifenoles se ve afectada por factores como sus interacciones con la matriz y la diversidad en sus estructuras. Por lo tanto, se planteó utilizar la descompresión instantánea controlada (DIC) para modificar la estructura de los polifenoles de subproductos de uva y mango con objeto de mejorar su absorción y su efecto en el control de la obesidad, esteatosis hepática y resistencia a la insulina. Primero, se evaluaron los cambios causados por DIC en los polifenoles totales: fenoles, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas extraíbles (EPA), proantocianidinas no extraíbles (NEPA) y polifenoles hidrolizables, así como carotenoides totales. La aplicación de DIC en subproducto de mango no generó cambios importantes en la concentración de polifenoles, tampoco en material pre-secado y sometido a diferentes ciclos de DIC. En orujo de uva se seleccionaron 2 tratamientos: 0.2 MPa-60 s, donde se favoreció el incremento en antocianinas (25%) y EPA (11%). Y el segundo tratamiento de 0.4 MPa-120 s, donde se obtuvo una disminución de las NEPA (30%), un incremento de EPA (27%), y un descenso de antocianinas (30%) asociado a el incremento de la temperatura del sistema.

La evaluación *in vivo* de los cambios en el perfil de los compuestos de orujo de uva por DIC reveló que, a pesar de haber favorecido la formación de estructuras más sencillas o bien su liberación de la matriz, no potenciaron los efectos beneficiosos sobre la ganancia de peso. La resistencia a la insulina y los niveles de triglicéridos en hígado mejoraron en todos los tratamientos (orujo con y sin DIC). Por lo tanto, los cambios inducidos por DIC en compuestos fenólicos y la hidrólisis parcial de polímeros de flavan-3-oles, así como, en la degradación de antocianinas observados a 0.2 MPa-60 s y 0.4 MPa-120 s, no potenciaron los efectos biológicos observados en orujo de uva no tratados por DIC.

**Palabras clave:** polifenoles extraíbles, polifenoles no extraíbles, descompresión instantánea controlada (DIC), orujo de uva, subproducto de mango.

## ABSTRACT

Agro-industrial by-products, rich in extractable and non-extractable polyphenols, have been associated with the prevention of obesity-related diseases and their complications, such as hepatic steatosis and insulin resistance. However, the bioavailability of polyphenols is affected by factors such as their interactions with the matrix and the diversity in their structures. Therefore, the use of instant controlled pressure drop (DIC) was considered to modify the structure of the polyphenols of grape and mango by-products to improve their absorption and their effect on the control of obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance. First, the changes caused by DIC in total polyphenols were evaluated: phenols, flavonoids, anthocyanins, extractable proanthocyanidins (EPA), non-extractable proanthocyanidins (NEPA) and hydrolyzable polyphenols, as well as total carotenoids. The application of DIC in mango by-product did not generate important changes in the concentration of polyphenols, neither in material pre-dried nor subjected to different DIC cycles. In grape pomace, two treatments were selected: 0.2 MPa-60 s, where the increase in anthocyanins (25%) and EPA (11%) was favored. And the second treatment of 0.4 MPa-120 s, with a NEPA decrease (30%), an increase in EPA (27%), and a decrease in anthocyanins (30%) associated with the increase in temperature in the system.

The *in vivo* evaluation of the changes in the polyphenols profile of grape pomace by DIC revealed that, despite having favored the formation of simpler structures or their release from the matrix, they did not enhance the beneficial effects on the gain of weight. Insulin resistance and liver triglyceride levels improved in all treatments (pomace with and without DIC). Therefore, the changes induced by DIC in phenolic compounds and the partial hydrolysis of flavan-3-ols polymers, as well as, in the degradation of anthocyanins observed at 0.2 MPa-60 s and 0.4 MPa-120 s, did not potentiate the biological effects observed in grape pomace not treated by DIC.

**Keywords:** extractable polyphenols, non-extractable polyphenols, instant controlled pressure drop (DIC), grape pomace, mango by-product.

## I. INTRODUCCIÓN

El orujo de uva y el subproducto de mango son ricos en polifenoles extraíbles (EPP) presentes en las extracciones con solventes orgánicos; así como en, polifenoles no extraíbles (NEPP), compuestos asociados a macromoléculas como proteínas y carbohidratos (Saura-Calixto, 2012). El consumo de ambos subproductos se ha asociado con beneficios a la salud. En el caso del orujo de uva, sus polifenoles extraíbles se han asociado con la prevención de diabetes y esteatosis hepática (Hogan y col., 2010; Li y col., 2016). La ingesta de la matriz completa del orujo, la cual contiene EPP y NEPP, se ha relacionado con la mejora del peso corporal, la esteatosis hepática y la resistencia a insulina (Yu y col., 2017). En el caso del subproducto de mango, su consumo se ha asociado con una disminución en la resistencia a insulina y esteatosis hepática (Rodríguez-González y col., 2017). Estos beneficios dependen de que los compuestos bioactivos sean absorbidos y transportados a los diferentes órganos o tejidos diana, lo cual se le conoce como biodisponibilidad.

Se ha reportado que solo del 5-10% de los compuestos fenólicos se absorben en intestino delgado, el resto pasa a intestino grueso para ser fermentado por la microbiota colónica; sin embargo, solamente se han detectado concentraciones micromolares en plasma y orina (Chacar y col., 2018). Debido a la baja biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, se ha propuesto la búsqueda de alternativas que mejoren la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de bioactivos de matrices alimentarias (Ribas-Agustí y col., 2017).

La descompresión instantánea controlada (DIC) es una tecnología capaz de modificar la estructura de matrices alimentarias. El principio de la tecnología se basa en someter el alimento a altas presiones durante un tiempo determinado, y someterlo a una abrupta caída de presión que genera la autovaporización del agua dentro de la matriz, lo que resulta en la expansión de la misma, entendiéndose como un incremento en su porosidad (Allaf y col., 2012). DIC se ha usado como estrategia para el secado de alimentos (Peng y col., 2018), como proceso de texturización de

productos (Téllez-Pérez y col., 2014), así como pre-tratamiento en la extracción de compuestos (Rashidi y col., 2018). El incremento de la porosidad de la matriz alimentaria podría mejorar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos no extraíbles, y su posible fermentación en el colon (Alexandre y col., 2017) y así ejercer su efecto benéfico.

Por lo tanto, se propuso evaluar la aplicación de DIC en subproducto de uva y mango para incrementar la bioaccesibilidad de los compuestos y de esta manera potenciar su efecto benéfico *in vivo*.

Dirección General de Bibliotecas UAG

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad han sido el foco de interés de muchas investigaciones debido a su asociación con enfermedades como diabetes tipo 2, enfermedad de hígado graso, hipertensión, dislipidemia, problemas cardiovasculares, entre otras (Galic y col., 2010). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en México, el 75.2% de los adultos presentan sobrepeso u obesidad (ENSANUT 2018).

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza principalmente por un almacenamiento excesivo de triglicéridos en el tejido adiposo, como resultado de un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto energético.

### 2.2. Expansión del tejido adiposo

El tejido adiposo se considera un órgano importante encargado del almacenamiento de energía. Existen dos tipos de tejido adiposo, tejido adiposo marrón (BAT, por sus siglas en inglés brown adipose tissue) y el tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés white adipose tissue). WAT es el responsable del almacenamiento de energía en forma de triglicéridos más abundante e importante; mientras que, BAT es importante en la regulación de la energía a través de la termogénesis.

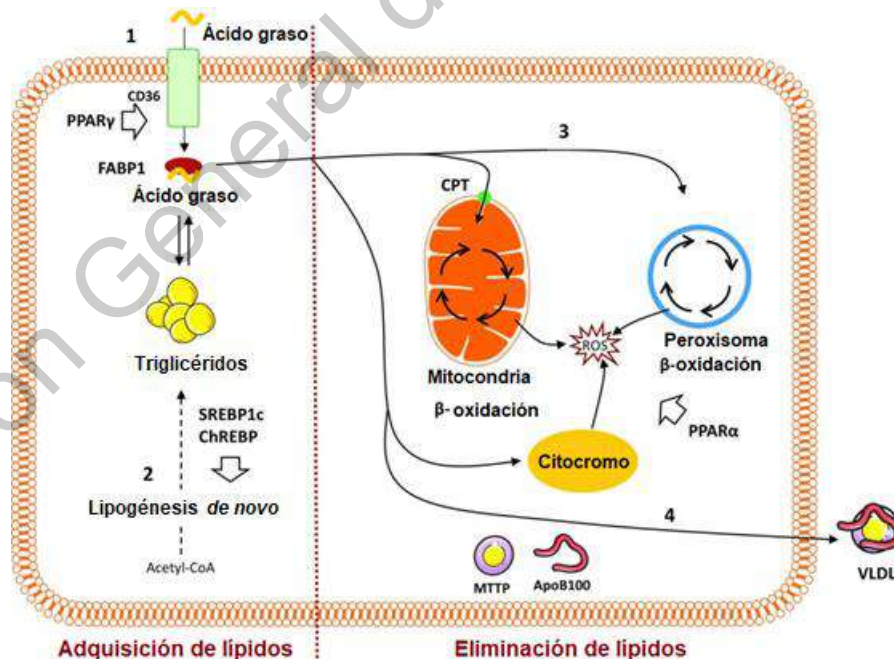
El incremento en WAT se ha asociado con mayor prevalencia de enfermedades metabólicas; sin embargo, algunos individuos obesos no muestran alteraciones metabólicas y se les conoce como obesos metabólicamente sanos (Phillips, 2017), lo que ha llevado a la propuesta de nuevas teorías que vinculan a la obesidad con enfermedades metabólicas. Una teoría sugiere que los trastornos metabólicos aparecen cuando se excede la capacidad de almacenamiento de WAT, lo que genera tejido adiposo disfuncional (Blüher, 2013). Cuando se tiene un exceso de consumo de energía y, además de manera constante, los adipocitos se vuelven hipertróficos (aumento del tamaño por la acumulación de lípidos) y/o hiperplásicos (aumento en el número de adipocitos, por adipogénesis) debido a la necesidad de

aumentar su capacidad de almacenamiento de lípidos. Se ha demostrado que el tamaño de los adipocitos es un predictor de enfermedades metabólicas, asociándose principalmente con la resistencia a la insulina (Lundgren y col., 2007) y dislipidemia, independientemente de la composición corporal y distribución de la grasa (Veilleux y col., 2011).

### 2.3. Esteatosis hepática

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) es actualmente la enfermedad hepática más común en el mundo, con una prevalencia global estimada en el 25% de la población mundial (Younossi y col., 2015).

La acumulación de grasa hepática se debe a un desequilibrio entre la adquisición y eliminación de lípidos, que se regulan a través de cuatro vías principales: captación de lípidos circulantes (1), lipogénesis *de novo* (DNL) (2), oxidación de ácidos grasos (3) y exportación de lípidos en proteínas de muy baja densidad (VLDL) (4) (Figura 1) (Ipsen y col., 2018).



**Figura 1.** Adquisición y eliminación de lípidos hepáticos (Adaptado de Ipsen y col., 2018)



Los ácidos grasos liberados del tejido adiposo son transportados hacia el hígado y captados mediante transportadores celulares específicos como el clúster de diferenciación (CD36), regulados por el proliferador de peroxisoma PPAR $\gamma$  y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) o por difusión pasiva. La lipogénesis *de novo* mediada por SREBP1c (proteína de unión al elemento regulador de estero) y ChREBP (proteína de unión al elemento sensible a los carbohidratos) es una característica clave de NAFLD que contribuye significativamente a la acumulación de lípidos. Por último, la exportación de lípidos aumenta con los niveles de triglicéridos hepáticos. En el entorno de NAFLD, los niveles de MTP (proteína microsómica transportadora de triglicéridos) y apoB100 pueden disminuir, lo que limita la exportación de VLDL y en su lugar facilita la acumulación de lípidos. El resultado neto es un círculo vicioso en aumento, impulsado por la dislipidemia crónica y la sobrecarga de lípidos hepáticos, lo que lleva a consecuencias perjudiciales para el metabolismo y la función del hígado y, en última instancia, promueve un daño hepático irreversible (Ipsen y col., 2018).

#### **2.4. Resistencia a la insulina**

Los ácidos grasos elevados crónicamente pueden alterar diversas vías metabólicas e inducir la resistencia a la insulina en muchos órganos, principalmente en hígado, músculo y tejido adiposo. Aunque cualquier alteración de los efectos de la insulina en los diferentes órganos podría etiquetarse como resistencia a la insulina, en la práctica clínica, esta última se define como una acción reducida de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa y los niveles plasmáticos (Barazzoni y col., 2018).

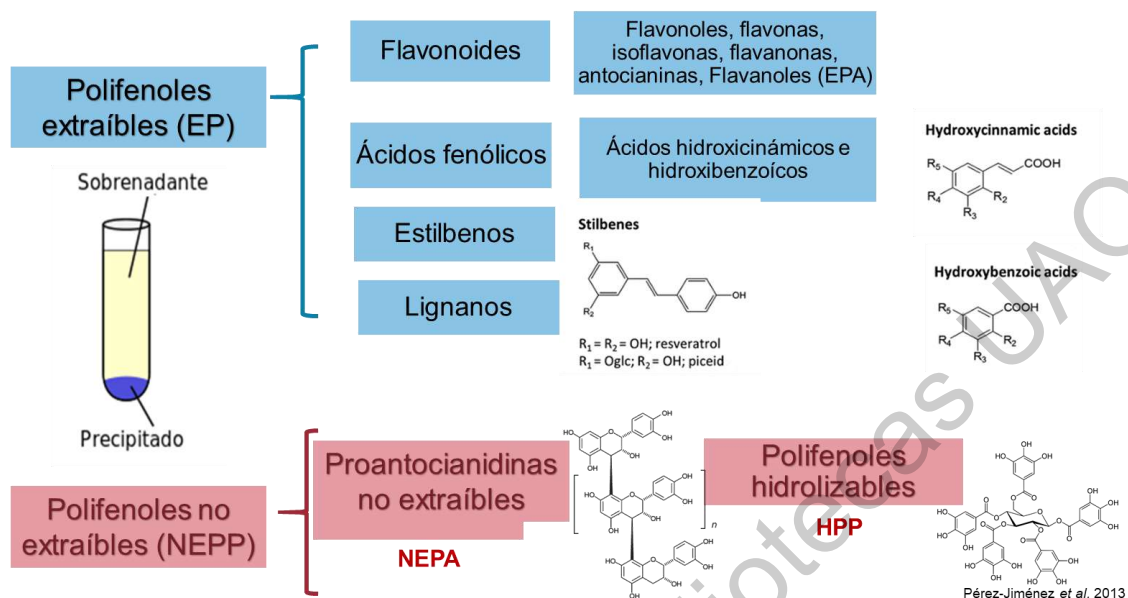
Desde hace varias décadas se ha relacionado la resistencia a la insulina con la adiposidad. La obesidad es, por tanto, un factor de riesgo fundamental para la aparición y desarrollo de la resistencia a la insulina. Entre las posibles causas de los trastornos metabólicos inducidos por la obesidad, la disfunción de los órganos adiposos y sus procesos metabólicos alterados juegan un papel fundamental (Hocking y col., 2013).

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo periférico aumenta la lipólisis y aumenta el suministro de ácidos grasos libres derivados del tejido adiposo al hígado. En particular, la obesidad aumenta la producción del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) en los adipocitos, facilita la resistencia a la insulina de los adipocitos y aumenta la tasa de lipólisis (Berlanga y col., 2014).

Por lo tanto, existe una necesidad inminente de diseñar regímenes dietéticos para disminuir o prevenir la disfunción metabólica en la obesidad. Entre las principales recomendaciones se encuentra el consumo de fibra dietaria (FD) y antioxidantes como los compuestos fenólicos (CF) y carotenoides, debido a su capacidad bioquímica de modular las vías de señalización del metabolismo de lípidos y de la glucosa

### **2.5. Compuestos fenólicos y carotenoides**

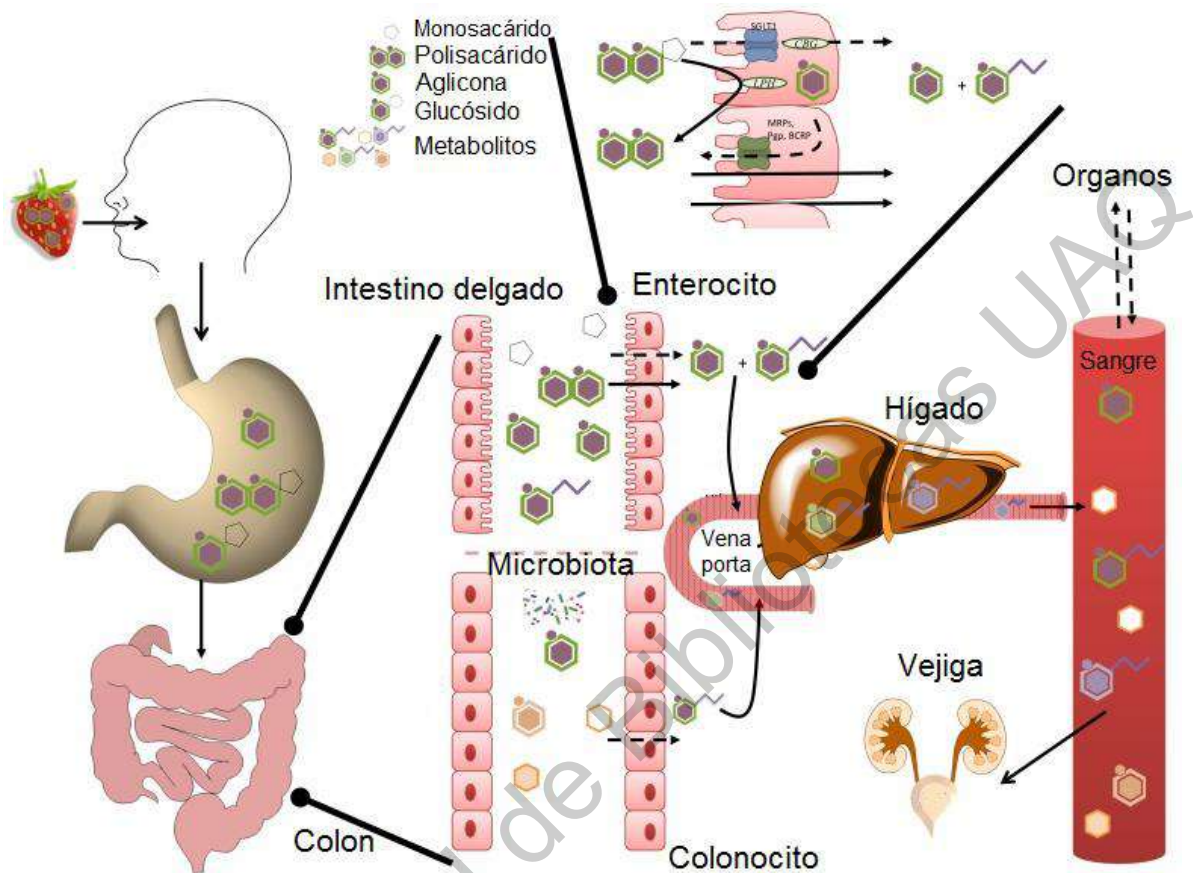
El grupo de los compuestos fenólicos incluye una amplia gama de compuestos que, de acuerdo con su tamaño molecular, se clasifican en compuestos simples como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como las proantocianidinas. Sin embargo, es más conveniente clasificarlos tanto por su solubilidad como por sus propiedades fisiológicas, en compuestos fenólicos extraíbles (EPP) y compuestos fenólicos no extraíbles (NEPP) como se muestra en la Figura 2 (Pérez-Jiménez y Torres, 2011).



**Figura 2.** Clasificación de los compuestos fenólicos de acuerdo con su análisis en alimentos (Adaptado de Pérez-Jiménez y Torres, 2011).

Los EPP comprenden aquellos compuestos de bajo peso molecular, solubles en disolventes orgánicos (metanol, acetona, etanol, acetato de etilo, entre otros). Estos compuestos tienen una amplia gama de estructuras químicas, incluyendo flavonoides, ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, estilbenos, proantocianidinas extraíbles (EPA) y otros. Los EPP son absorbidos en el estómago y el intestino delgado, al menos parcialmente a través de la mucosa del intestino delgado, en una proporción de un 5-10% de los compuestos (Chen y col., 2018).

Los NEPP son polímeros de alto peso molecular o polifenoles de bajo peso molecular que aparecen bien unidos a macromoléculas, atrapados en el núcleo de la matriz alimentaria. Los NEPP incluyen a las proantocianidinas no extraíbles (NEPA), y los polifenoles hidrolizables (HPP). Los NEPP no son bioaccesibles en el intestino delgado y viajan a través del tracto gastrointestinal como sustratos insolubles que alcanzan el colon, donde la microbiota colónica cataboliza estos polifenoles, lo que conduce a moléculas de tamaño pequeño que se absorben mucho mejor por su bajo peso molecular y que a menudo muestran efectos biológicos relevantes (Figura 3) (Saura-Calixto, 2012).

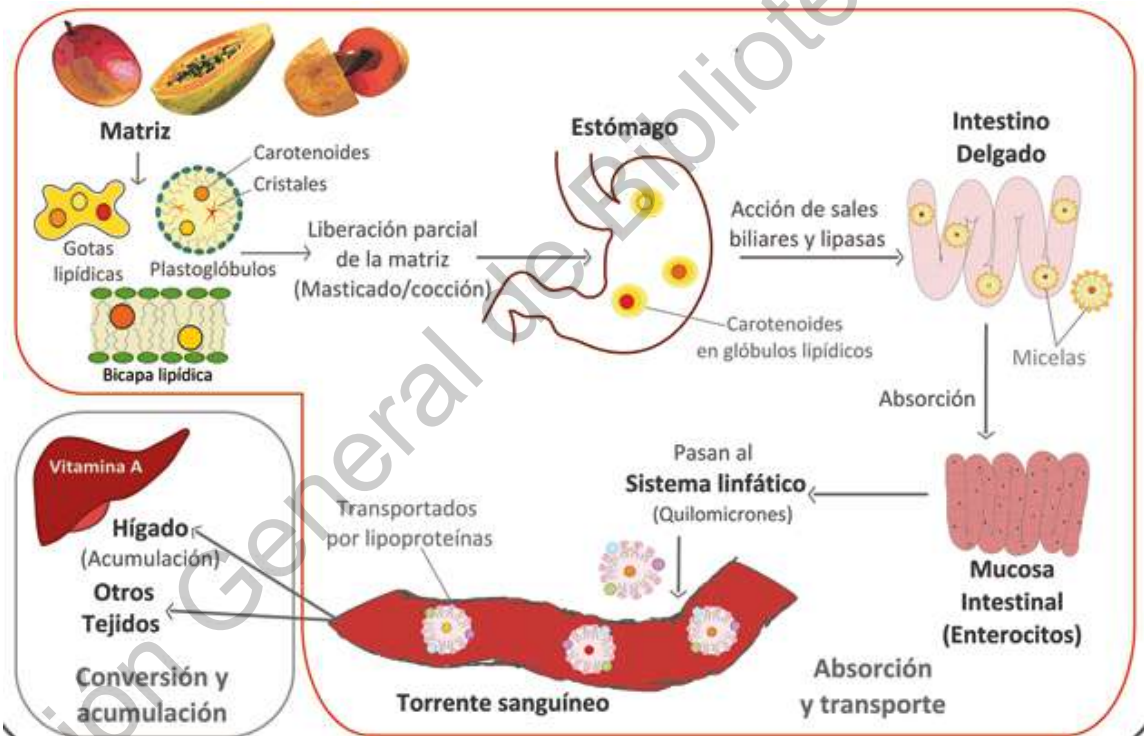


**Figura 3.** El catabolismo de microbiota intestinal de polifenoles no extraíbles conduce a metabolitos fenólicos biodisponibles de bajo peso molecular (Adaptado de De Bruyne y col., 2019).

Por otro lado, respecto a los carotenoides, estos son compuestos lipófilos que se clasifican en dos grupos: carotenos, que son cadenas de carbonos; mientras que, las xantofilas son derivados que contienen uno o más átomos de oxígeno en su estructura (Bhatt y Patel, 2020).

La bioaccesibilidad de los carotenoides es generalmente bastante baja y está limitada por diversos factores, en particular el grado de procesamiento de los alimentos y la composición de la matriz. Para su absorción, primero deben liberarse de la matriz alimenticia, seguido de una micelización. Esto se refiere a su incorporación en micelas, que son agregados moleculares que transportan material soluble en grasa, lo que lo hace potencialmente accesible por el epitelio intestinal

(Fernández-García y col., 2012). La parte principal del metabolismo de los carotenoides se produce en el intestino delgado, donde los lípidos de la dieta también deben solubilizarse y formar micelas antes de que puedan ser absorbidos. Los lípidos son capaces de unirse a los carotenoides debido a su carácter hidrofóbico, pero también pueden unirse a moléculas de agua que, junto con las sales biliares, dan como resultado la formación de micelas y carotenoides solubilizados en el sistema. Esto permite que los carotenoides se absorban pasivamente desde la fase micelar a través de la luz del intestino hasta el sistema circulatorio linfático y sanguíneo (Figura 4) (Palafox-Carlos y col., 2011).



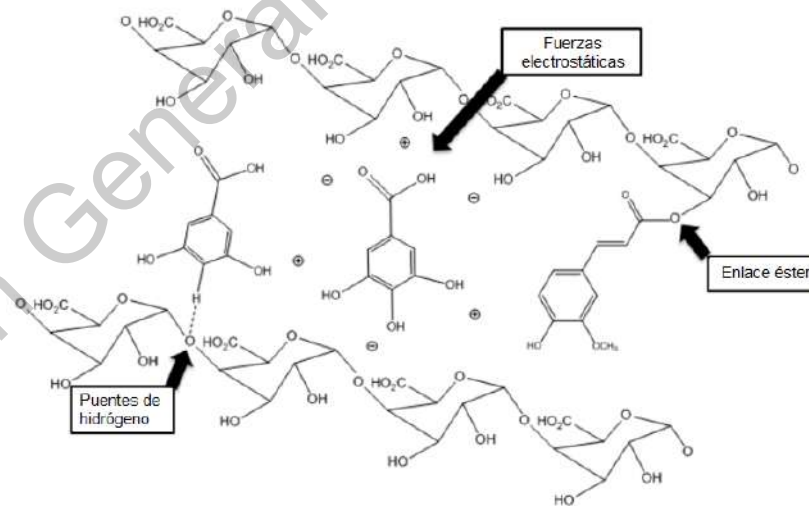
**Figura 4.** Biodisponibilidad de carotenoides (Adaptado de Kopec y Failla, 2018).

## 2.6. Fibra dietaria antioxidante

Uno de los principales componentes de estudio, que constituye la interacción entre los polifenoles y carbohidratos, es la fibra dietaria antioxidante. El término, propuesto por Saura-Calixto (1998), se refiere a una matriz que combina los efectos

beneficiosos de la FD y los de antioxidantes naturales asociados a la misma como los compuestos fenólicos. Reciente investigaciones sugieren que la fibra dietaria antioxidante brinda un mayor beneficio a la salud, debido a que la fibra es un medio por el cual los polifenoles pueden ser transportados a través del intestino humano, generando un mayor aprovechamiento de ambos compuestos. Su principal característica es que combinan los efectos fisiológicos de la FD y los antioxidantes en un solo material (Saura-Calixto y col., 2011).

Unidos a la matriz de la FD se encuentran alrededor del 50% de los NEPP asociados por fuerzas electrostáticas, enlace éster o puentes de hidrógeno, a polisacáridos como carbohidratos y proteínas principalmente (Figura 5), por lo que pasan al intestino grueso sin ser absorbidos. En intestino grueso, los NEPP son metabolizados y, por la acción de la microbiota colónica, son liberados de la matriz de fibra, produciendo metabolitos y un entorno antioxidante, por lo que una de las funciones de la FD también es el transporte de polifenoles y carotenoides a través del tracto gastrointestinal (Saura-Calixto, 2011).



**Figura 5.** Asociación de compuestos fenólicos con fibra dietaria (Adaptado de Howarth y col., 2001).

Se ha demostrado que la FD tiene un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico, ayudando a la prevención de enfermedades relacionadas con

la obesidad (Dikeman y Fahey, 2006). El efecto antiobesogénico de la FD se le atribuye principalmente a la fibra dietaria soluble (FDS), debido a que tiene la capacidad de retener agua y formar soluciones altamente viscosas lo que impide la digestión y absorción de lípidos y glucosa a través de la pared intestinal, y reduce la eficiencia de la conversión de grasa en energía, interfiriendo físicamente con las interacciones lipasa-grasa-sales biliares e inhibiendo a la enzima lipasa pancreática (Wanders y col., 2011).

Adicionalmente, recientes investigaciones se han centrado en entender cómo los polifenoles afectan al metabolismo de los carbohidratos, principalmente en relación con sus efectos sobre las enzimas digestivas, proteínas transportadoras de membrana y los mecanismos de señalización celular (Zhu, 2017). Así, se ha propuesto que las interacciones entre polifenoles no extraíbles y carbohidratos tienen un impacto directo sobre el perfil nutricional de estos compuestos (Amoako y Awika, 2016).

### **2.7. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos**

Si bien se ha reportado el efecto benéfico de los compuestos bioactivos, también es de suma importancia el análisis de la bioaccesibilidad de estos y su biodisponibilidad. Se ha reportado que la absorción de los compuestos fenólicos es baja debido a una serie de acciones dentro del tracto gastrointestinal que median su transformación y el flujo entérico para su eliminación a través de las heces u orina:

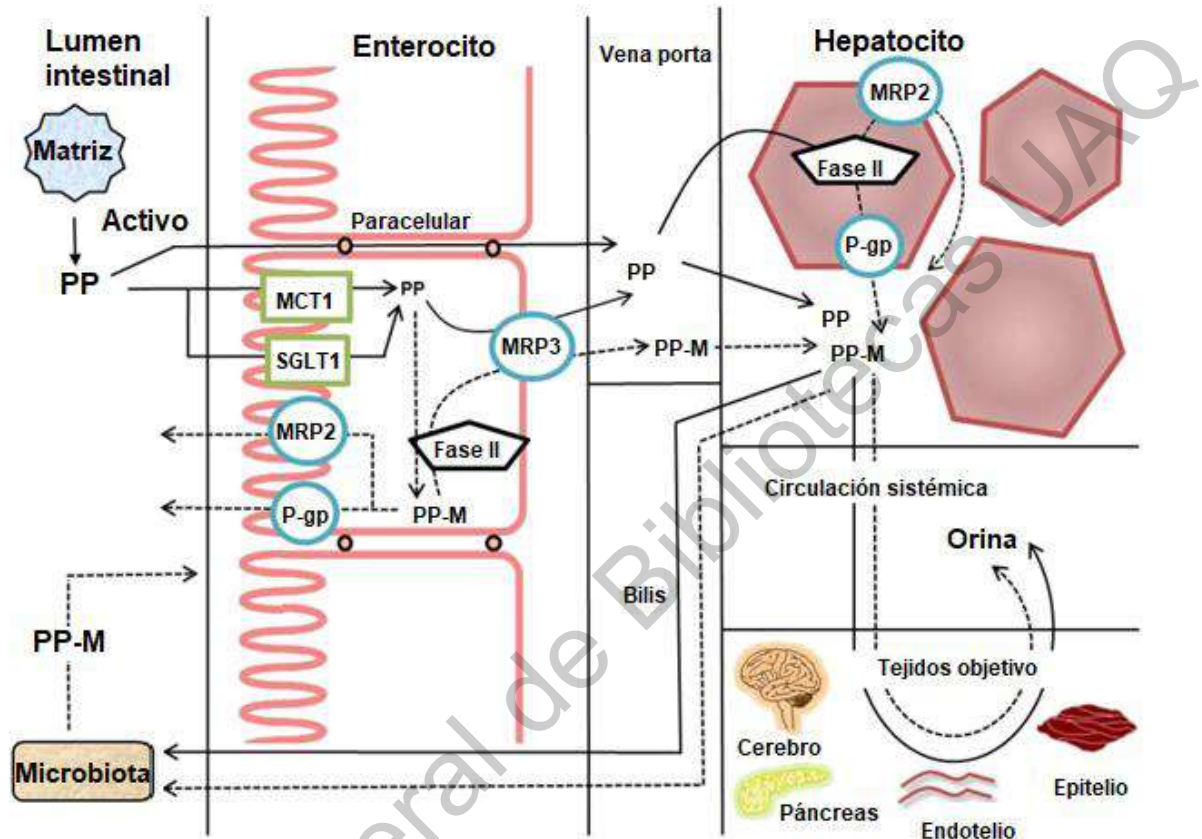
- En el caso de polifenoles glucosilados, primero es necesaria la eliminación del azúcar ligado por acción de enzimas glucosidasas para su difusión pasiva y absorción, en forma de agliconas libres (Scalbert y Williamson, 2000).
- Los ésteres de ácidos fenólicos ligados a azúcares requieren de enzimas específicas que no se encuentran de manera endógena en los tejidos humanos, por lo que el único lugar para su metabolismo es por acción de la microbiota colónica (Scalbert y Williamson, 2000).

- Las interacciones de la fibra con los polifenoles tienen una gran influencia para su absorción, ya que algunas fibras pueden secuestrar compuestos en la luz del intestino, ya sea por un fenómeno físico en un ambiente viscoso o una unión fisicoquímica que reduce su absorción en el intestino delgado, permitiendo así su biodisponibilidad para el proceso de fermentación por la microbiota colónica (Edwards y col. 2017).
- La absorción de polifenoles también depende del peso molecular, como es el caso de las proantocianidinas, que por su elevado peso molecular no son absorbidas tan fácilmente en el intestino delgado (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Se ha reportado que fracciones de proantocianidinas con un grado de polimerización  $<3$  pueden ser absorbidas en el intestino delgado; mientras que, fracciones con un grado de polimerización  $>3$  son fermentadas en el colon por la microbiota colónica (Monagas y col., 2010).
- La biodisponibilidad de estos compuestos también depende de las interacciones con carbohidratos de la pared celular. La afinidad de las proantocianidinas es mayor para pectinas, seguido de xiloglucanos, y con baja afinidad por la celulosa. Asimismo, la interacción entre proantocianidinas y fibra es mayor cuando la matriz es más flexible y porosa (Le Bourvellec y col., 2005; Renard y col., 2017).
- Finalmente, la biodisponibilidad de los compuestos depende en gran medida de su transformación por componentes específicos de la microbiota intestinal por la actividad de esterasa, glucosidasa, desmetilasa, deshidroxilasa y descarboxilasa (Possemiers y col., 2011).

Después de que las interacciones discutidas anteriormente tengan lugar en el lumen gastrointestinal, los compuestos fenólicos (PP) deben pasar a través del epitelio intestinal antes de llegar al torrente sanguíneo y/o al sistema linfático, así como los metabolitos generados por su fermentación por la microbiota colónica (PP-M). Una vez liberados, se transportan mediante mecanismos transcelulares como el



transporte por difusión pasiva, el transporte mediado por portador activo y facilitado y el transporte paracelular en uniones estrechas de los enterocitos (Figura 6).



**Figura 6.** Transporte y metabolismo de compuestos fenólicos (Adaptado de Redan y col., 2016)

Donde PP (polifenoles), MCT1 (transportador de monocarboxilatos), SGLT1 (transportador de glucosa dependiente de sodio), MRP (proteína asociada a multiresistencia), P-gp (P-glicoproteína), PP-M (metabolito fenólico).

## 2.8. Subproductos agroindustriales

Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de las propiedades de los subproductos agroindustriales, generando así una alternativa de aprovechamiento y valor agregado de estos subproductos. Los subproductos agroindustriales son obtenidos de los procesos de transformación de alimentos y representan una gran proporción de desperdicio. Sin embargo, se caracterizan por ser una fuente

prometedora de fibra antioxidante y, por ende, una fuente de nutrición y compuestos nutricional y funcionalmente importantes (Tejada-Ortigoza y col., 2016).

## **2.8.1. Subproducto de uva y sus propiedades**

### **2.8.1.1. Composición química**

El orujo de uva es un subproducto originado durante la producción de vino. Este subproducto incluye partes sólidas de la uva (piel, pulpa y semillas), cuya composición incluye goma, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, como polifenoles y fibra dietética (Deng y col., 2011; Sousa y col., 2014).

En cuanto a los compuestos fenólicos, el orujo de uva contiene ácidos fenólicos simples del tipo hidroxicinámicos (ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinapínico) e hidroxibenzoicos (ácidos protocatecuico, gálico, siringico y gentílico); flavonoides de las subclases de los flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina), flavanoles (catequina, epicatequina, epigallocatequina y galocatequina), antocianinas (malvidina, delfinidina y cianidina); estilbenos (resveratrol); polifenoles poiméricos (proantocianidinas, galotaninos y elagitaninos) (Beres y col., 2017). Estos compuestos pueden presentarse en forma de EPP y NEPP, pero la mayor parte aparecen como NEPP, específicamente como proantocianidinas no extraíbles (NEPA) siendo el orujo una de las fuentes descritas más ricas en estos compuestos (Pérez-Jiménez, Arranz and Saura-Calixto, 2009).

De manera general, el orujo de uva representa del 20-25% de las uvas trituradas en la elaboración del vino, y puede contener hasta un 60% de fibra dietética, la cual está compuesta por pectina, celulosa, lignina y polifenoles, dependiendo de la variedad de la uva y parte de la uva que conforman el orujo (Deng y col., 2011; Yu y Ahmedna, 2013).

### 2.8.1.2. Beneficios a la salud

Se ha reportado que este subproducto es una fuente de fibra antioxidante y que su consumo puede contribuir a la reducción de absorción de grasa (Pérez-Jiménez y col., 2008; Lachman y col., 2013; Sousa y col., 2014).

La suplementación con un extracto de orujo de uva (liofilizado y añadido a la dieta) a ratas durante 10 semanas disminuyó la expresión hepática de genes lipogénicos relacionados con la síntesis de triacilglicerol como la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd2), que sintetiza glicerol-3-fosfato, y glicerol-3-fosfato aciltransferasa (Gpam), que sintetiza glicerolípidos a partir de glicerol -3-fosfato (Yunoki y col., 2008). Estos beneficios solamente se han asociado con la inhibición de enzimas hepáticas lipogénicas como la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la acetil-coA carboxilasa (ACC) (Yu y col., 2017).

Pocos estudios han reportado los mecanismos de acción del subproducto de uva como matriz completa. La suplementación de harina de semillas de uva Chardonnay, en la dieta de hámsters durante 3 semanas redujo significativamente las concentraciones de colesterol total, VLDL y LDL en plasma en comparación con el control (dieta estándar). La mejora del colesterol en plasma se correlacionó con la regulación de la expresión génica relacionada con la síntesis de colesterol (CYP51), ácidos biliares (CYP7A1) y metabolismo de lípidos en hígado y tejido adiposo. Una reducción del contenido de lípidos hepáticos se asoció con el incremento en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (Kim y col., 2014). Estos hallazgos sugieren que la harina de semilla de uva rica en flavonoides indujo beneficios para la reducción de colesterol y atenuación de esteatosis hepática mediante la regulación de la expresión génica relacionada con el metabolismo de los lípidos, ácidos biliares y lípidos en el hígado y el tejido adiposo. En humanos (hombres con al menos un criterio diagnóstico de síndrome metabólico), la suplementación de orujo de uva (20 g) durante 16 semanas mejoró la presión arterial, la glucemia e insulina posprandial, además se observó un

incremento de  $\gamma$ -tocoferol y el  $\delta$ -tocoferol plasmáticos que se relacionaron con la disminución del daño de proteínas oxidativas (Urquiaga y col., 2015).

### **2.8.1.3. Biodisponibilidad**

Con relación a la biodisponibilidad del orujo de uva, estudios de digestibilidad *in vitro* demostraron que el 50% de los polifenoles del orujo de uva, incluyendo piel y semillas, no son biodisponibles en el intestino delgado (Goñi y col., 2005). En ratas sanas alimentadas con fibra dietaria antioxidante de uva se detectaron en orina por un lado mono, di y tri conjugados de los monómeros de epicatequina, con metilos, sulfatos y glucorónidos, indicando una despolimerización parcial de las proantocianidinas y, por otro, ácidos fenólicos libres o conjugados causados por la acción de la microbiota (Tourinho y col., 2009). La primera evidencia directa de la transformación de las proantocianidinas no extraíbles por la microbiota fue reportada por Mateos-Martín y col. (2012), se demostró que las NEPA son una fuente de compuestos fenólicos que se liberan progresivamente y liberan especies fenólicas que entran en contacto con las paredes intestinales y están biodisponibles durante al menos 24 h después de la ingestión. Lo cual sustenta la evidencia de que el incremento retardado (8 h) en la capacidad antioxidante de plasma tras la ingesta de orujo de uva (10 g) en adultos sanos se atribuye a la biodisponibilidad de los NEPP, ya que el incremento de la capacidad antioxidante en las primeras horas (1-2) corresponde a los polifenoles extraíbles (Pérez-Jiménez y col., 2009).

En adultos sanos se evaluó el efecto de una bebida que contenía orujo de uva y se identificaron metabolitos en la orina de los individuos como ácido cafeico, ácido cafeico 3- y 4-sulfato, ácido ferúlico 4-sulfato, ácido isoferúlico 3-sulfato y p ácido – cumárico, derivados de ácidos hidroxicinámicos. En cuanto a los derivados de catequina y epicatequina se identificaron epigalocatequina, sulfato de catequina y epicatequina, sulfato de glucurónido de catequina y epicatequina, catequina O-sulfato, O-metil-(epi) catequina O-glucurónido, epigalocatequina 3-O-glucurónido,

epigallocatequina 3'-O glucurónido y epigallocatequina 7-O-glucurónido, 4'-O-metil-epigallocatequina-O-glucurónido (Sasot y col., 2017).

## **2.8.2. Subproducto de mango y sus propiedades**

### **2.8.2.1. Composición química**

El subproducto de mango está constituido de la piel del mango y remanentes de pulpa, el cual representa cerca del 40 al 60% del peso total de la fruta. El contenido total de fibra dietaria varía de 40% al 72%, constituida principalmente por glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, ácido urónico, manosa y ramnosa, de la cual la fibra soluble es aproximadamente un 30% y la fibra insoluble un 70 % (Alija y col., 2007).

Los componentes fenólicos de la cáscara de mango incluyen compuestos específicos del mango, como es la mangiferina, y otros más ampliamente distribuidos, como glucósidos de quercetina, ácido elágico y kaempferol; los dos más abundantes son la mangiferina y la quercetina 3-O-galactósido (Berardini y col., 2004). En cultivares de color amarillo se reportaron los niveles más altos de carotenoides, siendo  $\beta$ -caroteno y violaxantina los compuestos principales. Además de que los carotenoides incrementan durante la maduración de la fruta llegando a concentraciones de hasta 31,18  $\mu\text{g} / \text{g}$  (Ranganath y col., 2018).

### **2.8.2.2. Beneficios a la salud**

La fibra soluble se ha asociado con el efecto hipoglucémico del subproducto de mango, ya que podría estar relacionada con la inhibición o retraso de la absorción intestinal de glucosa debido que puede aumentar la viscosidad intestinal, promoviendo el atrapamiento de glucosa y lípidos por su alta capacidad de retención de agua y poder gelificante (Lattimer y Haub, 2010).

Ulla y col. (2016), alimentaron a ratas con dieta suplementada con el polvo de cáscara de mango (con polifenoles como quercetina, catequina, epicatequina, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico y ácido sirínico), la cual tuvo propiedades benéficas contra el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Además, la suplementación con cáscara de mango normalizó la ingesta de alimento en ratas,

reduciendo la actividad de enzimas hepáticas ALT (alanina aminotransferasa), AST (aspartato aminotransferasa) y ALP (fosfatasa alcalina), las cuales están asociadas con la infiltración de células inflamatorias, apoptosis y muerte celular. Finalmente, la suplementación disminuyó los niveles de MDA (malondialdehído), uno de los principales marcadores de estrés oxidativo. Las propiedades antioxidantes y anti-peroxidación lipídica del polvo de cáscara de mango podrían atribuirse a sus flavonoides y otros polifenoles (Yang y col., 2010).

En un estudio *in vivo* realizado con ratas alimentadas con una dieta hipercalórica y suplementada con subproducto de mango, los animales no presentaron una reducción de peso corporal, pero se observó una disminución de glucosa sérica y del grado de esteatosis hepática (Amaya-Cruz y col., 2015). Animales diabéticos tratados con cáscara de mango presentaron una regulación en los niveles de glucosa, y el extracto etanólico de la cáscara mejoró la sensibilidad a la insulina (Gondi y col., 2015).

### **2.8.2.3. Biodisponibilidad**

Se ha reportado una bioaccesibilidad *in vitro* del 38-40% de los polifenoles del subproducto de mango (Blancas-Benitez y col., 2015). Los principales polifenoles liberados durante la digestión de la cáscara fueron los ácidos hidroxicinámicos y el ácido vanílico. En relación con los carotenoides, se ha reportado una baja biodisponibilidad para  $\beta$ -caroteno del mango (10%) y esto se asoció con su baja liberación de la matriz alimentaria. Esto podría ser mejorado con tratamiento térmico, debido a que facilita la degradación de complejos caroteno-proteína (Bohn y col., 2015). Por otro lado, se ha reportado que la fibra inhibe la formación micelar de los carotenoides debido a su alta viscosidad, por lo tanto, disminuye su biodisponibilidad (Velderrain-Rodríguez y col., 2016).

## **2.9. Tecnologías aplicadas a subproductos agroindustriales**

Debido a que los subproductos agroindustriales son matrices ricas en compuestos bioactivos, la aplicación de tecnologías como campos eléctricos pulsados, microondas, ultrasonido y altas presiones hidrostáticas se propone como una

alternativa para generar cambios en su estructura para favorecer la extracción de dichos compuestos (Alexandre y col., 2017). La mayoría de dichas tecnologías utilizan agua como conductor, de modo que el residuo sigue existiendo, siendo la matriz sólida deficiente de dichos bioactivos y, en el contexto de la economía circular, no se resuelve el problema del aprovechamiento integral de los subproductos agroalimentarios. Además, para la obtención de matrices alimentarias ricas en compuestos bioactivos y fibra dietaria, se deben considerar dos puntos importantes: a) mínima degradación de compuestos fenólicos inducida por el procesamiento y b) cambios en la estructura de la matriz alimentaria, ya que ello implica una mayor liberación de compuestos fenólicos durante el procesamiento (Ribas-Agusti y col., 2017).

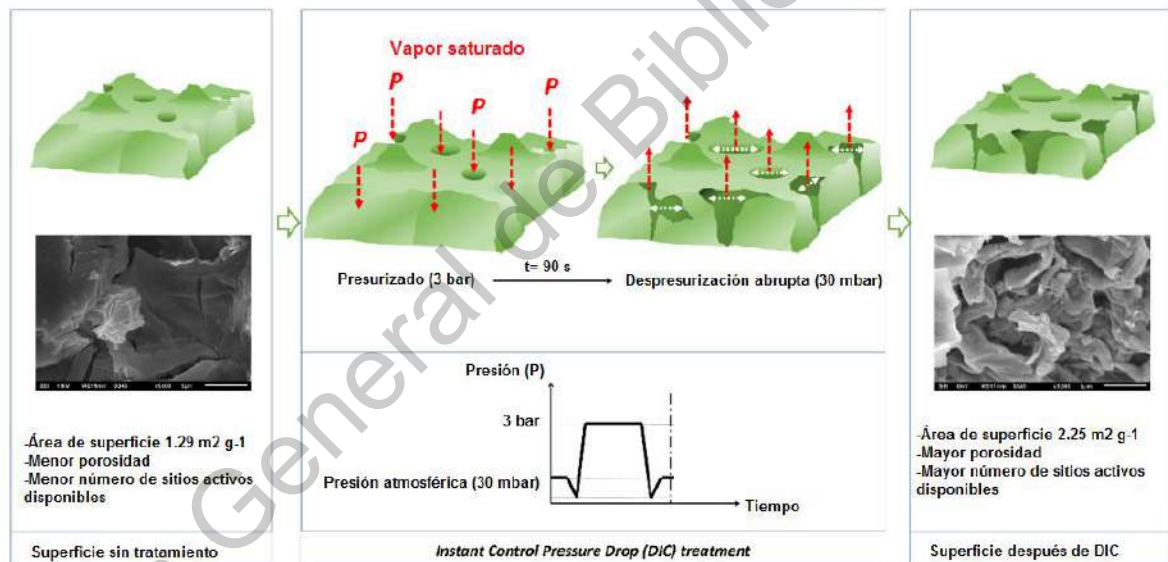
Por ello, surge la necesidad de aplicar una tecnología capaz de generar cambios en la composición y estructura de las matrices de los subproductos con las mínimas pérdidas posibles de sus compuestos bioactivos durante su proceso y manteniendo la matriz íntegra, sin generar una fase líquida y un nuevo residuo sólido. En el caso de la descompresión instantánea controlada (DIC), durante el procesamiento de la muestra se emplea vapor saturado y, por lo tanto, esto disminuye la liberación de bioactivos al medio, lo que podría permitir obtener una matriz completa con una modificación estructural que implicará una mayor bioaccesibilidad de los NEPP.

## **2.10. Descompresión Instantánea Controlada (DIC)**

DIC es una tecnología que produce modificaciones estructurales en la matriz alimentaria. Se basa en efectos termomecánicos que son inducidos cuando la materia prima es sometida durante un periodo de tiempo corto a vapor saturado (0.1-0.6 MPa), seguido de una abrupta caída de presión hacia un vacío (aproximadamente de 5 kPa). Esta abrupta caída de presión provoca la autovaporización simultánea del agua que se encuentra en el interior de la matriz y enfriamiento instantáneo de los productos. Este último detiene inmediatamente la degradación térmica; mientras que, el primero induce la hinchazón y posiblemente

la ruptura de las paredes celulares (Figura 7) (Ben Amor y col., 2008; Allaf y col., 2012; Romero-Cano y col., 2016).

De manera general, DIC consta de tres componentes principales: 1) cámara de tratamiento, que es una autoclave con una camisa de calefacción donde se coloca la muestra y la presión es proporcionada por la inyección de vapor saturado (generador de vapor); 2) sistema de vacío, que consta de la cámara de vacío y la bomba de vacío, y 3) sistema de descompresión, donde la cámara de tratamiento está conectada con la cámara de vacío por medio de una válvula que se acciona neumáticamente, por medio de la cual se somete la muestra a la abrupta caída de presión (Chemat y col., 2017).



**Figura 7.** Representación esquemática de DIC (Adaptado de Romero-Cano y col., 2016)

El proceso de DIC se ha utilizado para expandir matrices alimentarias con la finalidad de disminuir tiempo de secado, extracción de compuestos y esterilización. Así, el grano de café se ha sometido a este proceso para disminuir su tiempo de tostado y mejorar los procesos de extracción de cafeína (Kamal y col., 2008). La presión de vapor tuvo un efecto positivo en relación con la expansión y se observó que cuanto mayor era la presión de vapor se generaba más autovaporización y, por



lo tanto, mayor expansión. Dicha expansión también dependía del comportamiento reológico del material, como la viscosidad. Los componentes principales de las paredes celulares de los granos de café son los polisacáridos, como el manano, el arabinogalactano y la celulosa, los cuales se ablandaban y se fundían parcialmente durante el período de calentamiento, proceso esencial para lograr las características viscoelásticas. Para ello se requiere que la temperatura de calentamiento sea uniforme en el material, igual a la temperatura del vapor (Kamal y col., 2008).

En la actualidad, DIC se usa ampliamente para procesos de extracción de compuestos bioactivos de matrices alimentarias. Ben Amor y Allaf (2009) emplearon DIC como pretratamiento en la extracción acuosa de antocianinas de cálices de jamaica; mediante este proceso, DIC incrementó tanto la cinética como el porcentaje de extracción de antocianinas de la flor de jamaica en un 135%, debido a que se favoreció la formación de una estructura porosa que intensificó los fenómenos de transferencia de masa al mejorar la difusividad y la permeabilidad dentro de la matriz y por ende la extracción de antocianinas.

En cáscara de granada se utilizó DIC como pretratamiento para texturizar la cáscara e incrementar su porosidad. Esto permitió una mayor extracción de compuestos fenólicos (20% de mayor eficacia), donde la presión de vapor saturado fue la variable de mayor impacto en la extracción de compuestos, seguida del tiempo de proceso. Los resultados mostraron que la aplicación de DIC no tiene un efecto negativo sobre la actividad antioxidante (Ranjbar y col., 2016). En polvo de tallo de uva aumentó el contenido de compuestos fenólicos hasta en un 50% con un tratamiento de 0.3 MPa y 50 s (Sánchez-Valdepeñas y col., 2015). Estas tecnologías también permiten que la molienda sea más fácil con polvos de gránulos expandidos (Mounir y col., 2014). Así, cuando DIC se aplicó a la cáscara de tuna se observó que parte de la pared celular presentaba carbohidratos más hidrosolubles, y esto se relacionó con cambios en el grado de esterificación de la pectina y en su polimerización, también se mejoró la disponibilidad de compuestos fenólicos (83%) y carotenoides (552%) (Namir y col., 2017).

En el presente proyecto se utilizó DIC para realizar modificaciones estructurales a subproductos agroindustriales (matrices completas) de uva y mango, los cuales contienen tanto fibra, como compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles. Dichos cambios se relacionaron con la capacidad antioxidante en suero como medida indirecta de la absorción de compuestos fenólicos y, por último, se asociaron con los beneficios a la salud descritos para estos subproductos, tales como control del peso corporal, esteatosis hepática y resistencia a insulina.

Dirección General de Bibliotecas UFG

### III. JUSTIFICACIÓN

Los subproductos provenientes de la industrialización de frutos como uva y mango son una fuente rica en compuestos bioactivos, a los cuales se les ha relacionado con diferentes efectos beneficiosos a la salud, como el control de la obesidad y sus complicaciones. Sin embargo, la actividad biológica de dichos compuestos está en función de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, las cuales a su vez dependen de factores como su estructura química (peso molecular) e interacciones con la matriz alimentaria. Para los polifenoles de peso molecular relativamente pequeño, como el ácido gálico, se ha reportado una baja biodisponibilidad en el intestino delgado (5-10%), seguida de una transformación adicional y absorción en el intestino grueso: Mientras que, los polifenoles más grandes como las proantocianidinas no se absorben fácilmente en el intestino delgado. En su lugar, este tipo de estructuras son transportadas al colon y ahí son transformadas por la microbiota colónica.

La descompresión instantánea controlada, bajo el principio de la autovaporización, puede generar cambios estructurales que permitan la liberación de compuestos, o bien la hidrólisis de estructuras complejas que faciliten la absorción de polifenoles o bien una mayor transformación de los compuestos por la microbiota colónica.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Dentro de la matriz alimentaria, los polifenoles extraíbles como las antocianinas tienden a acumularse en las vacuolas; mientras que, los flavonoides pueden permanecer en el citosol. Por otro lado, los polifenoles no extraíbles (NEPA y polifenoles hidrolizables) generalmente están unidos covalentemente a los polisacáridos en la pared celular, lo que dificulta su bioaccesibilidad. Por lo tanto, para mejorar la biodisponibilidad se requiere hidrolizar las paredes celulares, los compartimentos celulares y la escisión de los carbohidratos.

La tecnología DIC, bajo el principio de la autovaporización instantánea, genera un fenómeno de expansión de las matrices alimentarias que provoca la ruptura de paredes celulares y la escisión de carbohidratos, lo cual podría favorecer la liberación de compuestos no extraíbles. Además, podría generar la hidrólisis de macromoléculas de alto peso molecular como las proantocianidinas, generando estructuras más sencillas, lo cual puede potenciar su absorción o facilitar su fermentación por la microbiota colónica al estar más expuestas en la matriz alimentaria. La mayor biodisponibilidad de compuestos bioactivos y sus metabolitos microbianos podrían mejorar el control del peso corporal, la esteatosis hepática y la resistencia a insulina.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Incrementar la bioaccesibilidad y absorción de compuestos fenólicos y carotenoides de subproductos de uva y mango mediante la aplicación de la descompresión instantánea controlada para mejorar su efecto en el control de la obesidad, esteatosis hepática y resistencia a insulina.

### 5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de DIC en subproductos de mango sobre los cambios en la cantidad de los compuestos fenólicos totales y carotenoides.
- Analizar los cambios de los compuestos fenólicos en el subproducto de uva sometidos a DIC:
  - Contenido de compuestos fenólicos extraíbles y no extraíbles
  - Grado medio de polimerización de las proantocianidinas extraíbles y modificación en las proantocianidinas no extraíbles.
- Determinar las modificaciones de la estructura de la matriz y composición de carbohidratos de los subproductos tratados con DIC.
- Determinar *in vivo* el efecto de orujo de uva modificado por DIC sobre el control de la obesidad y esteatosis hepática.
- Determinar la absorción de los compuestos de orujo de uva tratado con DIC mediante el análisis de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en suero y heces de ratas obesas.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Recolección del subproducto de uva y mango

Se recolectó el orujo de uva Malbec de viñedos la Redonda, Syrah de viñedo Azteca y Merlot del viñedo Magal ubicados en Querétaro, México. El orujo de uva está constituido por piel, tallos y semillas.

El subproducto de mango se obtuvo de la Sociedad Cooperativa de Trabajadores de Pascual, S.C.L ubicada en San Juan del Río, Querétaro, México. Este se encuentra constituido de la piel del mango y remanentes de pulpa.

Ambos subproductos se congelaron (-20 °C) en recipientes herméticos y protegidos de la luz hasta su análisis.

### 6.2. Tratamiento de los subproductos de uva y mango

Para el análisis del efecto de la aplicación de DIC en subproducto de uva y mango se utilizó un diseño factorial completo en parcelas divididas; donde el factor que representa las parcelas fue la presión (0.20-0.40 MPa) y con diferentes tiempos de procesamiento (60-120 s) (Cuadro 1).

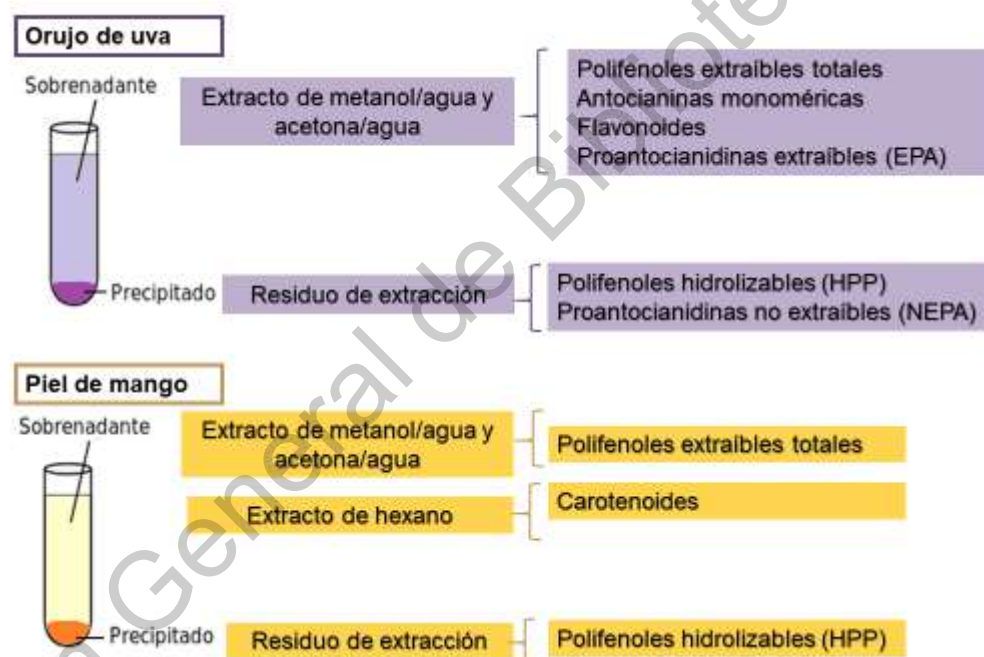
Posteriormente, los subproductos se secaron a 45 °C en un horno con aire forzado (humedad <6%), y se molieron a un tamaño de partícula (<400 µm). Se utilizó como control los subproductos sometidos únicamente al tratamiento térmico (45 °C, humedad < 4%).

**Cuadro 1.** Variables de proceso de DIC

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)
Control	0	0
DIC-1	0.2	60
DIC-2	0.2	90
DIC-3	0.2	120
DIC-4	0.3	60
DIC-5	0.3	90
DIC-6	0.3	120
DIC-7	0.4	60
DIC-8	0.4	90
DIC-9	0.4	120

### 6.3. Caracterización de las muestras tratadas con DIC

Los subproductos se analizaron para evaluar los cambios en la estructura de la matriz alimentaria, donde las variables de respuesta para seleccionar los mejores tratamientos fueron el contenido de polifenoles extraíbles (EPP), antocianinas, flavonoides, carotenoides totales y proantocianidinas extraíbles (EPA), determinados en extractos y polifenoles no extraíbles, proantocianidinas no extraíbles (NEPA) y polifenoles hidrolizables (HPP) como se ilustra en la Figura 8. Además, se realizó la determinación de propiedades fisicoquímicas como capacidad de hinchamiento y capacidad de retención de agua.



**Figura 8.** Representación esquemática de la determinación de polifenoles extraíbles en extractos y no extraíbles en los residuos de extracción.

A continuación, se detalla los procesos de extracción y cuantificación de las diferentes variables respuesta.

#### 6.3.1. Cuantificación de los polifenoles extraíbles (EPP)

Para la obtención de la fracción de EPP se empleó la metodología descrita por Jiménez-Escrig y col. (2001) en ambos subproductos. Se pesaron 0.5 g de muestra,

se le 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 3000 g 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/ 3000 g y se recuperó el sobrenadante (extracto B).

Se mezclaron ambos extractos A y B, se ajustó el volumen final a 50 mL con agua destilada para realizar la determinación de fenoles totales y antocianinas. El residuo se guardó para las determinaciones de NEPP.

#### **6.3.1.1. Determinación de fenoles totales**

Para la determinación de polifenoles totales extraíbles se utilizó el método de Folin y Ciocalteu. Se tomó 6  $\mu$ L del extracto de cada una de las muestras obtenido en el punto anterior (EPP), se colocó en una microplaca y se ajustó el volumen a 50  $\mu$ L con agua destilada. Se adicionó 25  $\mu$ L del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N (diluido 1:1 con agua destilada); se agitó durante 5 min, y luego se agregó 125  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%; se reposó durante 30 min en la oscuridad y, finalmente, la absorbancia se leyó a 760 nm.

La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico, y se expresaron los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) (Singleton y col., 1999).

#### **6.3.1.2. Antocianinas monoméricas**

Las antocianinas totales se cuantificaron en el subproducto de uva. 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 antocianinas totales se expresó como mg equivalentes de malvidina-3 glucósido por gramo de muestra (mg EM3G/g), se emplearon las siguientes ecuaciones:

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



$$\text{Antocianinas monoméricas} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot \text{factor de dilución}}{\epsilon \cdot \text{distancia}}$$

Donde:

Abs= Absorbancia total

PM= Peso molecular: 463.3 g/mol de la malvidina-3-glucósido

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar: 28000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> para malvidina-3-glucósido

Distancia= 1 cm

### **6.3.1.3. Proantocianidinas extraíbles (EPA)**

Para la determinación de las EPA se realizó una primera extracción (0.5 g de muestra, orujo de uva) con 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 g a 4 °C y se desechó el sobrenadante. 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 g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se tomaron 5 mL del segundo sobrenadante para la determinación de las EPA. Para lo cual se siguió la misma metodología que para las NEPA.

### **6.3.2. Antioxidantes macromoleculares o polifenoles no extraíbles (NEPP)**

El residuo de la extracción de la cuantificación de polifenoles extraíbles se sometió a dos tratamientos ácidos para la liberación de los NEPP (Pérez-Jiménez y col., 2008).

#### **6.3.2.1. Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (NEPA)**

La cuantificación de NEPA se realizó mediante la hidrólisis ácida con n-butanol, en muestras de orujo de uva. Los residuos secos se mezclaron con 10 mL de HCl/butanol (5:95, v/v) que contiene 0.7 g de FeCl<sub>3</sub>/L y se incubaron a 100 °C por 3 h. Los tubos se centrifugaron a 2500 g por 10 min, y se recuperaron los sobrenadantes. Posteriormente, se realizaron dos lavados del precipitado con 5 mL de HCl/butanol/FeCl<sub>3</sub>, se aforó a un volumen final de 25 mL. Las absorbancias se

leyeron a las longitudes de onda de 450 y 555 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de proantocianidinas por 100 g de muestra (mg EPA/g) (Zurita y col., 2012).

#### **6.3.2.2. Cuantificación de polifenoles hidrolizables (HPP)**

Para el análisis de HPP, se realizó una hidrólisis ácida para cuantificar los compuestos asociados a fibra por medio de enlaces glucosídicos principalmente. El residuo se mezcló con 2 mL de metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10) y se incubó a 85 °C durante 20 h. Después de este tiempo, la muestra se centrifugó a 5000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. Después de dos lavados con agua destilada, el volumen final se ajustó a 50 mL (Hartzfeld y col., 2002). Se cuantificaron los polifenoles hidrolizables con el método de Folin Ciocalteau. Los resultados se expresaron como mg EAG/g.

#### **6.3.3. Carotenoides totales**

El contenido de carotenoides se llevó a cabo para el subproducto de mango. Para el procedimiento de extracción de carotenoides se usó la metodología propuesta por Barba y col. (2006), con algunas modificaciones. La extracción se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad. Se pesaron 0.5 g de muestra seca y, se añadió 20 mL de solución de extracción de hexano-acetona-etanol (2:1:1 v/v/v). Se agitó durante 30 min y se agregó 3 mL de agua destilada, posteriormente se dejó en reposo para permitir la separación de fases. Se obtuvo la fase orgánica (superior) y se guardó protegida de la luz. El procedimiento se repitió una vez más. Las fases orgánicas se mezclaron y se leyó la absorbancia a 446 nm (Barba y col., 2006). La concentración de β-carotenoides se calculó con la ley Lambert-Beer:

$$\text{Concentración de } \beta \text{ caroteno} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{PM} \cdot \text{factor de dilución}}{\epsilon \cdot \text{distancia}}$$

Dónde:

Abs= Absorbancia a 446 nm

PM= Peso molecular (536.8726 g/mol)

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar para  $\beta$  caroteno ( $24686 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Distancia = 1 cm

#### **6.3.4. Caracterización fisicoquímica**

Por otro lado, se realizó la evaluación de las propiedades fisicoquímicas; capacidad de hinchamiento y capacidad de retención de agua.

##### **6.3.4.1. Capacidad de hinchamiento**

En una probeta graduada de 10 mL se agregó 0.5 g de muestra, posteriormente se le agregó 5 mL de agua destilada. Se agitó ligeramente para eliminar las burbujas de aire atrapadas. Se dejó reposar 18 h a temperatura ambiente con la finalidad que la muestra precipite. Finalmente, se midió el volumen ocupado por la muestra (mL). La capacidad de hinchamiento se expresó como mL/g de muestra seca (Mateos-Aparicio y col., 2010).

##### **6.3.4.2. Capacidad de Retención de Agua (CRA)**

Se realizó de acuerdo con el método propuesto por Robertson y col. (2000). A 1 g de muestra se le añadió 10 mL de agua destilada y se dejó hidratar durante 18 h. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 3000 g por 20 min y el precipitado se secó a peso constante. La CRA se expresó como la cantidad de agua retenida por g de muestra seca.

#### **6.3.5. Análisis de las muestras seleccionadas**

Con los resultados obtenidos, se seleccionaron los tratamientos de acuerdo con la concentración de compuestos y características fisicoquímicas. Se realizó el perfil de compuestos bioactivos por medio de HPLC, análisis de fibra dietaria y microscopía electrónica de barrido.

##### **6.3.5.1. Identificación de antocianinas monoméricas de orujo de uva mediante UHPLC-QqQ-ESI-MS**

Para la extracción de antocianinas, 25 mg de muestra seca se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de acetona/agua (70:30, v/v), y homogenizada a 6000 g durante 1 min,

posteriormente se centrifugó a 2000 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 inicial.

Para la identificación tentativa de antocianinas, se usaron las siguientes condiciones de elución y ionización. La fase móvil consistió en 0,5% (v/v) de ácido fórmico/agua (A) y 0,5% (v/v) de ácido fórmico/metanol (B). La ionización por electropulverización (ESI) en condiciones positivas fue la siguiente: voltaje capilar de 3,5 kV, temperatura de desolvatación de 450 °C, temperatura de la fuente de 120 °C, flujo de gas de desolvatación de 800 L/h y flujo de gas de cono de 150 L/h, el flujo de gas de colisión fue de 0,13 mL/min, energía de colisión en modo MS 5.0 y energía de colisión en modo MS/MS 20.0 (Lambert y col., 2015). Se registró el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) para muestras (Díaz-Rivas y col., 2018). Los resultados se expresan en áreas de picos identificados.

#### **6.3.5.2. Perfil de compuestos bioactivos de las muestras tratadas con DIC**

Para la extracción de compuestos fenólicos, se utilizó el extracto obtenido para la identificación de antocianinas, descrito en el punto anterior. Los compuestos fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) acoplada a un espectrómetro de masas de tándem de ionización por electropulverización (ESI-MS / MS), se utilizó un sistema Xevo-TQS (Waters Co, Milford, USA).

Las muestras se inyectaron en una columna Acquity BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm). El equipo se operó a 34 °C con un flujo de 0.5 mL/min. La fase móvil utilizada fue el solvente A: acetonitrilo: agua (10:90 v/v) con 1% ácido fórmico y el solvente B: acetonitrilo.

Las condiciones de espectrometría de masas fueron las siguientes, la temperatura de la fuente se ajustó a 150 °C y se utilizó nitrógeno como gas de desolvatación

(800 L h<sup>-1</sup>) a 500 °C. Los voltajes del cono de muestreo y del capilar fueron de 50 V y 1.5 kV, respectivamente. La identificación se realizó mediante el monitoreo programado de reacción múltiple (MRM) en modo negativo (ES<sup>-</sup>). La cuantificación se llevó a cabo con estándares de ácidos fenólicos y flavonoides. Los resultados se expresan como µg/g.

#### **6.3.5.3. Determinación del grado medio de polimerización de las proantocianidinas**

El grado de polimerización de las proantocianidinas se midió después de la catálisis ácida en presencia de floroglucinol, según Kennedy y Jones (2001), con algunas modificaciones. La extracción de proantocianidinas se realizó con acetona/agua/ácido acético (70/28/2). Después, el extracto de proantocianidinas se mezcló con HCl 0.1 N en MeOH, que contenía 50 g/L de floroglucinol y 10 g/L de ácido ascórbico, a 50 °C durante 20 min. Finalmente, la reacción se detuvo con acetato de sodio acuoso 40 mM. Los aductos de floroglucinol se analizaron mediante UPLC de fase inversa. El método utilizado fue un sistema solvente binario compuesto por ácido acético acuoso al 2.5% v/v (A) y acetonitrilo (B). Los monómeros de flavan-3-ol y aductos de floroglucinol se identificaron por su orden de elución, su espectro UV y su patrón de MS. La cuantificación se realizó a 280 nm con la curva de calibración de (+)-catequina. Para calcular el grado medio aparente de polimerización (mDP), la suma de los monómeros de flavan-3-ol y aductos de floroglucinol (en moles) se dividió por la suma de los monómeros (en moles).

#### **6.3.5.4. Capacidades antioxidantes**

La capacidad antioxidante del extracto de EPP se determinó mediante los ensayos DPPH (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995) y ABTS (Re y col., 1999). La absorbancia se midió a 510 y 734 nm respectivamente. El porcentaje de inhibición se calculó con una curva de calibración con el estándar Trolox y los resultados se expresaron como µmol de Trolox/g. Se añadió 200 µL de DPPH o 230 µL de ABTS al extracto de metanol/acetona. La mezcla se incubó durante 6 min y se midieron las absorbancias a 517 y 734 nm, respectivamente.

#### **6.3.5.5. Determinación de fibra dietaria**

El contenido de fibra dietaria total, soluble e insoluble, se determinó por el método enzimático-gravimétrico (AOAC 985.29, 2002) con el kit comercial Total Dietary Fiber Assay Kit (Sigma-aldrich, Saint Louis, USA). Se utilizó 1 g por muestra desgrasada, se agregó 50 mL de regulador de fosfatos pH 6.0 y 0.1 mL de alfa amilasa termoestable. Posteriormente, las muestras se incubaron por 15 min a 100 °C con agitación, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7.5 con 10 mL de NaOH 0.275 N. Se adicionó 0.1 mL de una solución de proteasa (50 mg/mL de regulador de fosfatos) y se incubó durante 30 min a 60 °C con agitación constante. Una vez concluido lo anterior, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.5 con HCl 0.0325 M. Se agregó 0.1 mL de amilogucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación constante. Se filtró para separar la fibra soluble de la fibra insoluble.

A la porción líquida donde se encuentra la fibra soluble se agregó cuatro volúmenes de etanol 99%, con el objetivo de precipitar la fibra soluble, posteriormente se dejó reposar las muestras toda la noche. Las muestras se filtraron y se realizaron lavados en el residuo con etanol 78%, etanol 95% y acetona. Se dejó secar a 100 °C toda la noche y se registró el peso. Se determinó cenizas y proteína total por el método de Kjeldahl en los residuos. Se calculó el porcentaje de fibra soluble e insoluble, con la suma de ambas se determinó la fibra dietaria total.

#### **6.3.5.6. Análisis de subproductos sometidos a DIC por Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

La espectroscopía infrarroja se utilizó para estudiar los estados vibracionales de orujo de uva y cáscara de mago con y sin proceso de lavado, sometidos a descompresión instantánea controlada para diferentes presiones y tiempos. Los espectros se llevaron a cabo en un PerkinElmer Spectrum Two equipado con un accesorio ATR (reflectancia total atenuada) con un cristal de diamante en el rango espectral de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **6.3.5.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Los análisis morfológicos de las muestras de orujo de uva y mango se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060 LV (SEM). Las mediciones se realizaron con un voltaje de aceleración de electrones de 20 kV. Antes del análisis, cada muestra se fijó en un portamuestras de cobre con cinta de carbono y se cubrió con una película fina dorada para que fueran conductivas antes de la prueba.

De manera adicional, debido a que en las pruebas anteriores no se observaron cambios relevantes de subproducto de mango y debido a que el efecto de DIC en matrices alimentarias está en función del contenido de humedad, como segunda alternativa para la aplicación de DIC en mango el material se sometió a un lavado y presecado (hasta un 30% de humedad) con tres niveles cada uno (60, 90 y 120 s; 1, 2 y 3 ciclos respectivamente).

#### **6.4. Evaluación del efecto de aplicación de DIC sobre las modificaciones en proantocianidinas no extraíbles**

Dadas las modificaciones de DIC en las proantocianidinas de orujo de uva Malbec, se seleccionaron 3 materiales con contenido contrastante de dicha fracción. Orujo de uva Syrah, Merlot y Malbec. Cada material se sometió a DIC en un diseño con tres factores (presión, tiempo y ciclos) con diferentes niveles (0.2 y 0.4 MPa; 60 y 120 seg; con y sin ciclos, respectivamente).

De manera adicional, debido a que en las pruebas anteriores no se observaron cambios relevantes en subproducto de mango y debido a que el efecto de DIC en matrices alimentarias está en función del contenido de humedad, como segunda alternativa para la aplicación de DIC en mango el material se sometió a un lavado y presecado (hasta un 30% de humedad). Posteriormente se utilizó un diseño factorial  $2^3$ : dos factores (tiempo y ciclos) con tres niveles cada uno (60,90 y 120 seg; 1, 2 y 3 ciclos, respectivamente).

Finalmente, los subproductos se secaron a 45 ° C en un horno con aire forzado (humedad <6%) y se molieron a un tamaño de partícula (<400 µm). Se utilizaron como control los subproductos sometidos únicamente al tratamiento térmico (45 ° C, humedad < 6%). Se llevó a cabo el análisis de compuestos totales de acuerdo con las metodologías antes descritas.

#### **6.4.1. Determinación de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de los materiales de orujo de uva sometido a DIC**

Se realizó una caracterización de la fibra en orujo de uva para evaluar el efecto de DIC en la matriz. La determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina se realizó con el cálculo de las fracciones de fibra detergente neutra (NDF = celulosa + hemicelulosa + lignina + ceniza) y fibra detergente ácida (ADF = celulosa + lignina + ceniza). La NDF se cuantificó mediante el método de Van Soest y Wine (1967), añadiendo la enzima  $\alpha$ -amilasa termoestable (Sigma Aldrich, A3306). Las muestras (Syrah, Malbec y Merlot) se pesaron (0.5 g) en bolsas de filtro y se colocaron en vasos de precipitados de vidrio Berzelius de 500 mL con 50 mL de solución ND (dodecil sulfato de sodio, EDTA, pH 7,0). Los vasos de precipitados se colocaron en un aparato de reflujo. Cuando la solución empezó a hervir, se añadieron 50 µL de  $\alpha$ -amilasa termoestable y se hirvió durante una hora. La solución de ND se descartó y las bolsas de filtro se enjuagaron con agua destilada hirviendo y acetona. Finalmente, las bolsas se secaron a 105 °C durante la noche y se pesaron, la fracción de NDF se calculó por diferencia de peso.

Las bolsas de filtro que contenían NDF se colocaron en un vaso de precipitados para calentarlas a reflujo. El procedimiento para el cálculo de ADF fue similar a la cuantificación de NDF, excepto que las muestras se hirvieron en 50 mL de solución de AD (bromuro de cetiltrimetil amonio en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N). Las bolsas de filtro se enjuagaron como se mencionó anteriormente, se secaron y se pesaron. Finalmente, al residuo se le adicionaron 20 mL de solución de ácido sulfúrico (72%) (bolsas filtrantes con ADF) y se realizó la extracción de celulosa por tres horas. La muestra se lavó y pesó, se recuperó la fracción de lignina + cenizas. La cantidad de ceniza



en la muestra se determinó en un horno de mufla durante 4 h a 550 °C. La celulosa y la hemicelulosa se calcularon restando lignina y ceniza de ADF y ADF de NDF, respectivamente.

#### **6.4.2. Determinación del perfil de compuestos de los materiales de orujo sometidos a DIC por UPLC-ESI-Q-ToF MS**

El perfil de polifenoles se evaluó en un cromatógrafo UPLC-MS-Q-ToF con una interface ESI. El extracto obtenido para EPP (1 mL) se secó al vacío (Speedvac, Savant, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y se resuspendió en 200 µL de metanol. Se filtró (0.45 µm) y las muestras se inyectaron en una columna BEH Acquity C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) a 35 ° C.

El gradiente de elución se realizó con un sistema binario que constaba de (A) agua con ácido fórmico al 0.1% y (B) acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% a 0.5 ml/min. Se aplicó el siguiente gradiente: 0 min al 0% B, 2.5 min al 15% B, 10 min al 21% B, 12 min al 90% B, 13 min al 95% B, 15 min al 0% B y 17 min al 0% B. Se utilizaron las condiciones de MS: voltaje capilar, 2.0 kV (ESI-) y 3.5 kV (ESI +); voltaje de cono, 40 eV; baja energía de colisión, 6 V; alta energía de colisión, 15–45 V; temperatura de la fuente, 120 ° C; gas de desolvatación, N<sub>2</sub> a 450 °C y 800 L/h; flujo de gas de cono, 50 L/h. Los datos se adquirieron en modo de ionización negativo y positivo (ESI- y ESI +, respectivamente) dentro de un rango de masa de 100-1800 Da. Los polifenoles se identificaron con el análisis de su masa exacta (error de masa <5 ppm), distribución de isótopos y patrón de fragmentación. Las curvas de calibración se construyeron con ácido gálico (ácidos hidroxibenzoicos), (-)-epicatequina (flavanoles), naringenina (flavanonas), quercetina (flavonoles) y cloruro de cianuro (antocianinas) (Reynoso-Camacho y col., 2021).

#### **6.4.3. Determinación de la capacidad antioxidante en los materiales de orujo de uva sometidos a DIC en matrices completas y extractos**

Se aplicaron procedimientos Q-DPPH y Q-ABTS (Del Pino-García y col., 2015) en orujos de uva en polvo después del tratamiento DIC para evaluar la capacidad antioxidante derivada de matrices completas que incluyen fracciones de EPP y

NEPP. En el caso de Q-DPPH, se colocó 1 mg de muestra en un tubo cubierto de la luz, se agregaron 10 mL de DPPH y la mezcla se agitó durante 30 min. La absorbancia se leyó a 517 nm. Para evaluar la capacidad antioxidante por el método Q-ABTS, se colocó 1 mg de la muestra en un tubo cubierto de la luz, se agregaron 10 mL de ABTS acuoso y la mezcla se agitó durante 30 min. La absorbancia se leyó a 734 nm, en ambos casos. Los resultados se expresaron como equivalentes de  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ g de muestra.

Para observar el efecto de la aplicación de DIC en la liberación de los compuestos se determinó la capacidad antioxidante en los extractos de los diferentes materiales de orujo de uva mediante ensayos de DPPH (Brand-Williams y col., 1995) y ABTS (Re y col., 1999). Los extractos (EPP) se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 6.3.1. Se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  de extractos de metanol /acetona y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de DPPH o 230  $\mu\text{L}$  de ABTS. La mezcla se incubó durante 6 min y se midieron las absorbancias a 517 y 734 nm, respectivamente. Los resultados se expresaron como equivalentes  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ g de muestra.

#### **6.5. Evaluación de la suplementación de la dieta con orujo de uva Malbec modificado por DIC sobre obesidad y sus complicaciones.**

Se utilizaron ratas Wistar de 160-180 g,  $n=40$ , 8 ratas por grupo. Después de una semana de aclimatación, los animales se clasificaron en dieta estándar (grupo control sano), grupo control obeso (DAGF), grupo obeso + subproducto de uva control sin la aplicación de DIC (DAGF+GP), grupo obeso + DIC-1 ((DAGF+DIC1, 0.2 MPa-60 s), grupo obeso + DIC-9 (DAGF+DIC9, 0.4 MPa-120 s).

Los animales sanos se alimentaron con dieta estándar (proteína 28.5%, lípidos 13.4%, carbohidratos 57.9%) y los animales obesos con una dieta alta en grasa saturada y fructosa (DAGF) [croqueta comercial o dieta estándar (60%), manteca de cerdo (20%), fructosa (20%), vitaminas y minerales (1 g x 3 kg de alimento)]. La administración de las dietas y los tratamientos se realizó *ad libitum* durante 18 semanas y, el consumo de alimento se registró cada semana. Las dietas de los

grupos DAGF+DIC1 y DAGF+DIC9 se suplementaron con orujo de uva en una relación de 1 g/kg de peso de rata.

#### **6.5.1. Evaluación de la suplementación de la dieta con orujo de uva Malbec sometido a DIC en obesidad y sus complicaciones**

La evaluación de obesidad se realizó por medio de un monitoreo quincenal del peso corporal. Una semana antes del sacrificio se les realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa. Las ratas de todos los grupos recibieron una dosis de glucosa (2 g/kg) después de un ayuno de 12 h. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en la sangre obtenida de la cola de los animales mediante un analizador de glucosa (ACCU-CHEK, Roche); estas medidas se tomaron a tiempos 0 (antes de la glucosa oral), 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de glucosa oral y se determinó el área bajo la curva por medio del método del trapecio.

Al final de las 16 semanas de experimentación, los animales tuvieron un ayuno de 8-12 h antes del sacrificio, el cual se realizó por decapitación, recogiendo la sangre en tubos vacutainer. La sangre se centrifugó a 2. 500 g durante 10 min para obtener suero, el cual se almacenó a -80 °C. Los órganos recolectados fueron hígado, tejidos adiposo mesentérico, epididimal y retroperitoneal.

La cuantificación de glucosa en suero se realizó por medio del kit colorimétrico/enzimático, Spinreact (Santa Coloma, ESP) y los resultados se expresaron como mg/dL de suero. La cuantificación de insulina se realizó mediante un kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de insulina de rata de la marca Millipore (MA, USA). Con los datos obtenidos se realizó el cálculo del índice de HOMA-IR con la siguiente ecuación.

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{Glucosa en ayunas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) * \text{insulina en suero en ayunas}\left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right)}{2430}$$

El tejido hepático se fijó en formalina al 10%, se seccionó (3 µm) y se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E). Se tomaron imágenes representativas de secciones de hígado de cada grupo. El contenido de triglicéridos hepáticos se determinó según

Norris y col. (2003). Después de la reacción de digestión con KOH, se recolectaron los sobrenadantes de las muestras de hígado para cuantificar el contenido de TAG en el hígado con el kit enzimático TAG GPO-POD de la marca Spinreact (Santa Coloma, ESP).

#### **6.5.2. Evaluación del estado oxidativo en suero y heces**

Los compuestos fenólicos generalmente actúan como antioxidantes *in vitro*, pero se ha visto que en sistemas biológicos lo que hacen es actuar como pro oxidantes bajo algunas condiciones promoviendo el aumento de los sistemas antioxidantes endógenos. Por lo que, el estado oxidativo se evaluó en suero y heces a través del contenido total de polifenoles mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Roura y col., 2006); mientras que, las capacidades antioxidantes se estimaron mediante el ensayo ABTS (Re y col., 1999). Las muestras de suero se desproteinizaron con un volumen igual de acetonitrilo (1:1), después de un período de incubación de 2 min a 25 °C. El suero desproteinizado se centrifugó (10 min, 9500 g, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el contenido total de polifenoles y medir la capacidad antioxidante (Chrzczanowicz y col., 2008).

Para las muestras de heces, 50 mg de muestras se mezclaron con 1 mL de metanol: agua (50:50 v/v) durante 60 min, después la muestra se centrifugó (15 min, 3000 g) y se recuperó el sobrenadante. Al residuo obtenido se añadió 1 mL de acetona: agua (70:30 v/v) durante 60 min, se centrifugó nuevamente (15 min, 3000 g) y se recuperó el sobrenadante. Los sobrenadantes se combinaron y se utilizaron para determinar el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante. El contenido de polifenoles se midió con el ensayo de Folin Ciocalteu. Brevemente, se mezclaron 10 µL de suero desproteinizado o extracto de polifenol de heces con 40 µL de agua destilada ultrapura y 25 µL de reactivo de Folin (1:1 v/v). Se adicionaron 125 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5% m / v) a la mezcla, se incubó durante 30 min y se midió la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente/mL para muestras de suero.

El ABTS se midió en suero desproteinizado y extracto de polifenoles de heces. El radical ABTS se preparó al mezclar ABTS con persulfato de potasio 2.45 mM y se dejó incubar durante toda la noche en la oscuridad. Se diluyó en tampón fosfato 5 mM con NaCl 0.145 M ajustado a pH 7.4, para obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 730 nm. Las muestras (10  $\mu$ L de extractos) se mezclaron con 200  $\mu$ L del radical ABTS y se midió la absorbancia después de 6 min a 734 nm y los resultados se expresaron como mmol TE/mL (Re y col., 1999).

#### **6.6. Análisis estadístico**

Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución normal de los datos. Las medias se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se realizó un análisis de ANOVA bidireccional (Presión, tiempo y compuestos fenólicos) para comparar la interacción. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software JMP (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.).

## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo con el principio de DIC, la evaporación automática del agua dentro del producto permite su expansión, generando cambios fisicoquímicos en la matriz alimentaria que podría favorecer la liberación de compuestos bioactivos (Hamoud-Agha & Allaf, 2019). A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de DIC en los subproductos de mango y uva.

### **7.1 Efecto de la descompresión instantánea controlada en subproducto de mango**

#### **7.1.1. Compuestos fenólicos totales, polifenoles hidrolizables y carotenoides**

En cuanto a la aplicación de DIC en subproducto de mango, en el Cuadro 2 se muestra los contenidos de EPP: fenoles totales y carotenoides, y NEPP del tipo HPP.

Para fenoles totales, la muestra sometida al tratamiento de mayor presión y mayor tiempo, 0.4 MPa y 120 s, dio lugar a un contenido de fenoles totales estadísticamente mayor al resto de los tratamientos ( $191.6 \pm 3.7$  mg AG/g muestra). En comparación con la muestra control sin lavado (116.042 mg AG/g muestra) el incremento fue del 65%; mientras que, para la muestra control lavada ( $149.2 \pm 3.5$  mg AG/g muestra) fue del 28%. Similar al efecto en orujo de uva, el incremento de fenoles totales se podría atribuir al rompimiento de la estructura celular de la matriz, generando liberación de compuestos extraíbles o facilitando la difusión de los solventes de extracción utilizados.

También se observó que durante el lavado se presenta un incremento en la concentración de compuestos fenólicos. Esto puede atribuirse a un efecto de concentración, ya que durante el lavado se eliminó parte de la pulpa que contenía el subproducto de mango y, por lo tanto, algunos azúcares simples

**Cuadro 2.** Compuestos fenólicos extraíbles y carotenoides en piel de mango sometida a la descompresión instantánea controlada

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)	Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>	HPP <sup>1</sup>	Carotenoides <sup>2</sup>
Control lavado			149.2±3.5 <sup>g</sup>	20.2±0.3 <sup>ab</sup>	162.1±0.6 <sup>abcde</sup>
Control sin lavar			116.0±1.7 <sup>h</sup>	15.7±0.4 <sup>b</sup>	129.2±3.4 <sup>g</sup>
DIC-1	0.2	60	146.5±2.9 <sup>g</sup>	24.0±2.1 <sup>a</sup>	151.4±0.1 <sup>ef</sup>
DIC-2	0.2	90	149.6±4.2 <sup>g</sup>	23.7±1.0 <sup>a</sup>	147.6±0.3 <sup>f</sup>
DIC-3	0.2	120	150.1±4.9 <sup>g</sup>	22.2±1.7 <sup>a</sup>	163.0±3.1 <sup>bcd</sup>
DIC-4	0.3	60	158.4±5.0 <sup>ef</sup>	22.4±2.1 <sup>a</sup>	172.9±0.3 <sup>a</sup>
DIC-5	0.3	90	169.3±5.3 <sup>cd</sup>	21.8±0.8 <sup>a</sup>	156.2±3.0 <sup>cdef</sup>
DIC-6	0.3	120	177.1±4.9 <sup>bc</sup>	22.6±1.3 <sup>a</sup>	163.8±1.0 <sup>abc</sup>
DIC-7	0.4	60	162.5±3.1 <sup>de</sup>	23.1±1.2 <sup>a</sup>	170.3±0.4 <sup>ab</sup>
DIC-8	0.4	90	180.7±4.8 <sup>b</sup>	22.0±1.8 <sup>a</sup>	161.8±4.3 <sup>bcd</sup>
DIC-9	0.4	120	191.6±3.7 <sup>a</sup>	21.2±1.9 <sup>ab</sup>	153.6±0.7 <sup>def</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. HPP, polifenoles hidrolizables. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>mg EAG/g (EAG, equivalentes de ácido gálico). <sup>2</sup>mg β-caroteno/g.

En cuanto a los carotenoides, la aplicación de DIC no produjo un efecto significativo, solamente se presentó una disminución del 10% respecto al tiempo para 0.4 MPa. El efecto más claro en el contenido de carotenoides se presentó para el proceso del lavado del subproducto, ya que se observó un incremento de hasta un 36% comparando con la muestra control sin lavado. Estos resultados no son acordes a lo reportado por Sánchez y col. (2014), quienes demostraron que los carotenoides son altamente estables a alta presión combinados con temperaturas desde moderadas a altas (625 MPa; 5 min; 20, 70 y 117 °C).

Namir y col., (2017) reportaron un incremento en la concentración de carotenoides, lo cual lo atribuyeron a la expansión de la estructura y posible ruptura de pared celular. Sin embargo, no se ha deducido de manera clara como DIC puede afectar también la estructura de los cromoplastos, donde se encuentran incluidos los carotenoides.

En cuanto a los polifenoles hidrolizables, el tratamiento con DIC produjo poco efecto, y de nuevo el efecto más importante se presentó nuevamente durante el proceso de lavado del subproducto de mango con un aumento del 28%.

#### **7.1.2. Características fisicoquímicas**

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas del subproducto de mango sometido a DIC, los resultados de la CRA y capacidad de hinchamiento se presentan en el Cuadro 3. La descompresión instantánea controlada generó un mayor efecto en el subproducto de piel de mango comparado con el orujo de uva. En concreto, un incremento del 20% en la capacidad de hinchamiento y hasta un 11% de incremento en la capacidad de retención de agua, en matrices sometidas a lavado. De manera general se puede decir que la CRA es alta cuando se somete a una presión mayor a 0.2 MPa y un tiempo de 90 y 120 s, ya que de acuerdo con Leterme y col., (1998) ésta debe oscilar en el rango de 10-12 g de agua/g de fibra.

Un aspecto importante para entender estos resultados es que, en el subproducto de mango, la relación de fibra soluble: fibra insoluble es diferente a la de orujo de uva, siendo mayor la cantidad de fibra soluble en subproducto de mango hasta de un 30% del total de la fibra. La CRA está influenciada por la fibra soluble, pues al atrapar agua forma soluciones viscosas e interactúa con colesterol, grasas y azúcares disminuyendo de esta manera su absorción intestinal y por lo tanto su concentración en sangre (Blackwood y col., 2000).

En cuanto a la capacidad de hinchamiento, ésta fue mayor a la reportada por el orujo de uva. El incremento fue de hasta un 20% (7.73 mL/g) comparado con la muestra control sin lavado (6.39 mL/g) (Cuadro 3). Incluso la capacidad de



hinchamiento fue mayor a lo reportado en otros trabajos, 6.81 mL/g (Noor y col., 2015), 6.4 mL/g (Martínez y col., 2012).

**Cuadro 3.** Capacidad de hinchamiento y retención de agua en piel de mango sometido a la descompresión instantánea controlada

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)	CRA <sup>1</sup>	Hinchamiento <sup>2</sup>
Control	Control lavado		9.38±0.21 <sup>bcd</sup>	6.39±0.01 <sup>d</sup>
DIC-1	0.2	60	9.23±0.25 <sup>d</sup>	6.58±0.01 <sup>c</sup>
DIC-2	0.2	90	9.42±0.27 <sup>cd</sup>	7.07±0.07 <sup>bc</sup>
DIC-3	0.2	120	9.86±0.04 <sup>abcd</sup>	7.26±0.14 <sup>bc</sup>
DIC-4	0.3	60	9.81±0.17 <sup>abcd</sup>	7.33±0.01 <sup>bc</sup>
DIC-5	0.3	90	10.10±0.12 <sup>abc</sup>	7.33±0.07 <sup>bc</sup>
DIC-6	0.3	120	10.41±0.65 <sup>a</sup>	7.73±0.08 <sup>a</sup>
DIC-7	0.4	60	9.94±0.46 <sup>abcd</sup>	7.43±0.13 <sup>ab</sup>
DIC-8	0.4	90	10.05±0.14 <sup>abc</sup>	7.33±0.07 <sup>bc</sup>
DIC-9	0.4	120	10.32±0.09 <sup>ab</sup>	7.39±0.14 <sup>bc</sup>

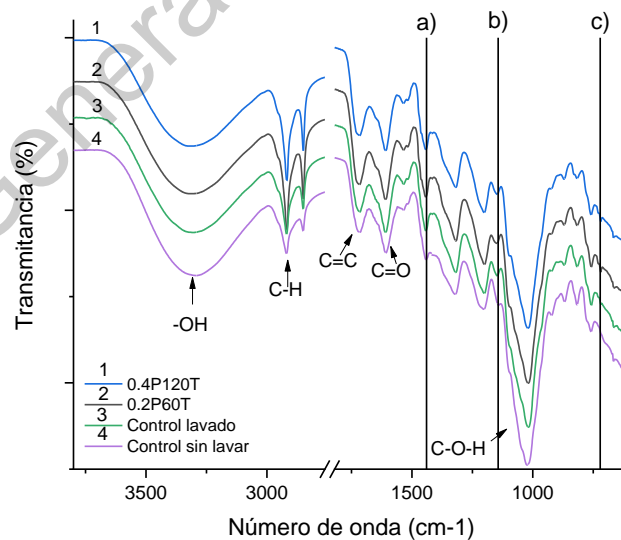
Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer).

<sup>1</sup>Capacidad de Retención de Agua (g/g). <sup>2</sup>Hinchamiento (mL/g).

### 7.1.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Integrando los resultados, los principales cambios en compuestos fenólicos totales, polifenoles hidrolizables y propiedades fisicoquímicas por la aplicación de DIC fueron con las condiciones de 0.4 MPa a 120 s, ya que con este tratamiento se incrementó la concentración de compuestos fenólicos totales, lo que sugiere una hidrólisis de compuestos más complejos. También se incluyó el tratamiento de 0.2 MPa durante 60 s, debido a que con esta condición se incrementó la concentración de HPP.

La espectroscopía infrarroja se aplicó para observar posibles cambios vibracionales de las moléculas presentes en las muestras seleccionadas de subproducto de mango. En la Figura 9 se muestra el espectro FTIR del subproducto de mango, donde cada pico en el espectro representa un tipo de vibración de enlaces específicos que presentó la muestra analizada. Las asignaciones de picos se realizaron con lo reportado en trabajos previos para subproducto de mango (Cuadro 4). Los resultados mostraron que no se produjeron nuevos picos en el subproducto de mango sometidos a DIC, por lo que se descarta la posibilidad de formación de nuevos grupos funcionales. Sin embargo, se puede observar la definición de picos como (a)1442, (b)1146 y (c)719  $\text{cm}^{-1}$ . La formación de dichos picos pudiera deberse al efecto de lavado de las muestras, debido a que únicamente en las muestras control sin lavado (línea 4) es donde la intensidad de los picos es menor. En cuanto a la aplicación de DIC (línea 1 y 2) y muestra control (3), no se observa la formación ni eliminación de picos, por lo que en el análisis de espectroscopía en subproducto de mango no se observa un efecto de modificación de enlaces o formación de nuevos grupos por la aplicación de DIC.



**Figura 9.** Espectro de FTIR de subproducto de mango sometido a DIC

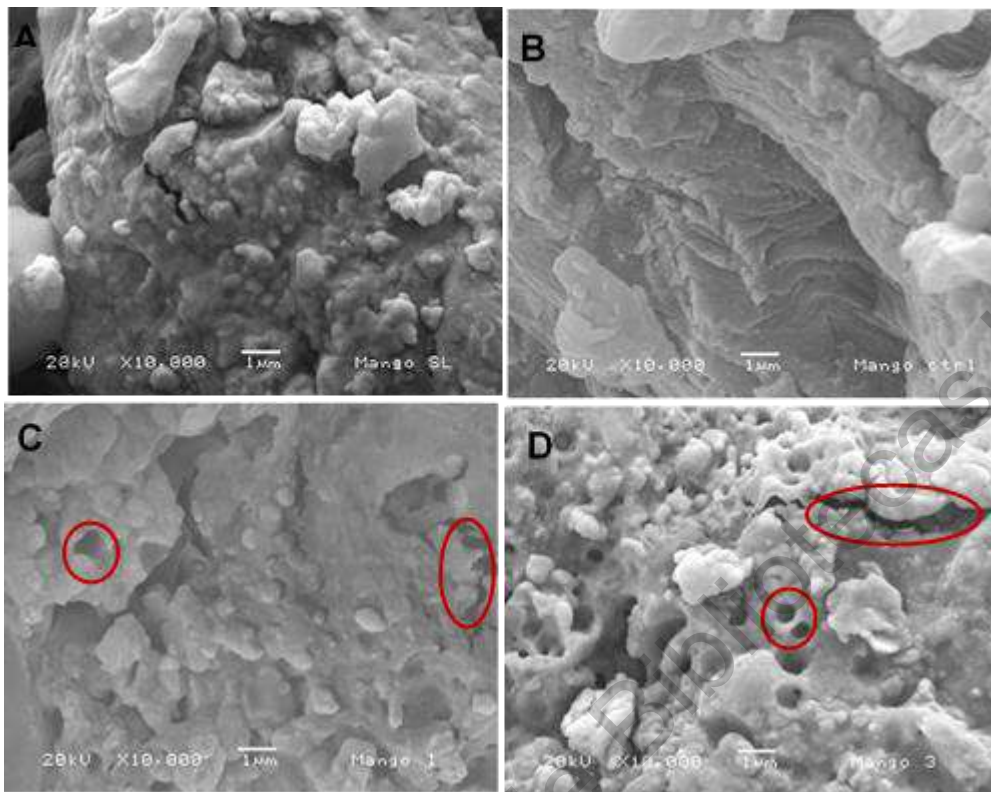
Donde 0.4P120T, la muestra expuesta a una presión de 0.4 MPa durante 120 s y 0.2P60T, la muestra sometida a 0.2 MPa durante 60 s.

**Cuadro 4.** Frecuencia de los grupos funcionales presentes en muestras de subproducto de mango sometidas a DIC

Grupo funcional	Numero de onda (cm-1)	Número de onda (cm-1)	Referencia
3290	-OH stretching	3418 3292	Iqbal y col., (2009) Sánchez-Orozco y col., (2014)
2918	C-H stretching	2925 2920	Iqbal y col., (2009) Sánchez-Orozco y col., (2014)
2849	C-H stretching	2853	Iqbal y col., (2009)
1716	C = O stretching	1732 1717	Iqbal y col., (2009) Sánchez-Orozco y col., (2014)
1608	C = O stretching	1612 1619	Sánchez-Orozco y col., (2014) Iqbal y col., (2009)
1535 1517	C = C stretching	1520	Iqbal y col., (2009)
1442	-CH <sub>3</sub> bending	1448	Sampaio y col., (2019)
1320	-CH <sub>3</sub> bending	1328	Sánchez-Orozco y col., (2014)
1146	C=O stretching	1150	Sampaio y col., (2019)
1020	C-O stretching	1016 1024	Sánchez-Orozco y col., (2014) Sampaio y col., (2019)

#### 7.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de subproducto de mango

La Figura 10 muestra los cambios en la morfología del subproducto de mango sin lavado (A), lavado (B) y con aplicación de DIC (C y D). En los resultados se puede observar que durante el lavado se produjo la remoción de pequeñas partículas, posiblemente parte de fibra soluble o azúcares simples. La aplicación de DIC en el subproducto de mango generó un cambio morfológico en el subproducto de mango, C) a una presión de 0.2 MPa-60 s (DIC-1), de manera que se formaron poros y se produjo una ruptura de la estructura. Dicho fenómeno se incrementa con la aplicación de 0.4 MPa-120 s (DIC-9) (D).



**Figura 10.** Microscopía electrónica de barrido en subproducto de mango

A) Muestra control sin lavado, B) Muestra control con lavado; C) Muestra sometida a DIC-1; D) Muestra sometida a DIC-9.

#### **7.1.5. Efecto de la descompresión instantánea controlada en subproducto de mango pre secado y con ciclos**

En la primera etapa del proyecto, con la aplicación de DIC, solo se observó un incremento en la concentración de los compuestos fenólicos, sin cambios en los compuestos no extraíbles, ni en carotenoides. Lo anterior puede relacionarse con el exceso de agua que contenía el material (70%) y, debido a que el efecto de DIC está relacionado con la autovaporización del agua que se encuentra en el interior de la matriz (Ben Amor y col., 2008; Allaf y col., 2012), la energía administrada en el sistema, posiblemente permitió eliminar el agua contenida en la superficie de la matriz, evitando así que la energía administrada fuera suficiente para autovaporizar la que se encontraba en el interior, por lo tanto, se realizó un presecado (hasta un

30% de humedad) en el material para evaluar el efecto de DIC y se aplicaron ciclos en los tratamientos.

### 7.1.6. Compuestos fenólicos extraíbles

En cuanto a la aplicación de DIC en subproducto de mango con diferentes ciclos, el contenido de compuestos fenólicos se presenta en el Cuadro 5. Los resultados son muy similares en cada uno de los tratamientos. Sin embargo, el mayor incremento en compuestos fenólicos totales fue del 10% en el tratamiento de 0.4 MPa-90 s (165.73 mg EAG/g muestra) y del 9% con tratamiento con 3 ciclos de 90 s cada uno a 0.4 MPa (164.50 mg EAG/g muestra).

**Cuadro 5.** Concentración de fenoles en subproducto de mango sometido a DIC

Presión MPa	Tiempo (s)	Número de ciclos	Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>
Muestra control lavada			150.45±5.78 <sup>a</sup>
0.4	60	1	163.22±0.71 <sup>a</sup>
0.4	90	1	165.73±1.57 <sup>ab</sup>
0.4	120	1	154.96±5.67 <sup>b</sup>
0.4	60	2	141.87±8.28 <sup>ab</sup>
0.4	90	2	155.28±2.75 <sup>ab</sup>
0.4	120	2	149.44±12.79 <sup>ab</sup>
0.4	60	3	157.48±7.91 <sup>a</sup>
0.4	90	3	164.50±4.55 <sup>ab</sup>
0.4	120	3	157.48±4.89 <sup>ab</sup>

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

Por lo tanto, la aplicación de DIC en subproducto de mango generó cambios poco relevantes en el contenido de compuestos fenólicos totales. Esto se relaciona con la composición del material que, de acuerdo con lo reportado por Maldonado-Celis y col. (2019), el subproducto de mango es un material rico en pectina y celulosa, lo

que sugiere que, para generar cambios en su solubilidad, la disminución en el contenido de humedad y energía administrada no es suficiente para romper la estructura de este tipo de matrices.

## **7.2 Efecto de la descompresión instantánea controlada sobre orujo de uva**

### **7.2.1. Compuestos fenólicos extraíbles**

En el Cuadro 6 se puede observar el efecto de la aplicación de DIC sobre los compuestos extraíbles, fenoles totales y antocianinas monoméricas de orujo de uva. Se observó un incremento en el contenido de fenoles totales conforme se incrementa el tiempo y la presión de procesamiento, hasta un 21% (0.4 MPa-120 s, 75.69 mg AG/g) (Cuadro 6) comparadas con su muestra control (62.59 mg AG/g).

El incremento observado en la determinación de fenoles totales durante la aplicación del DIC pudiera atribuirse al rompimiento de la estructura celular de la matriz alimentaria, lo que favorece la liberación de compuestos fenólicos que se encuentran dentro de vacuolas o liberación de compuestos atrapados en la misma matriz (Ben Amor y Allaf, 2009). De acuerdo con Wang y col. (2014) el incremento en la extracción de compuestos se debe a que los cambios microestructurales permiten o facilitan el contacto de estos con los solventes utilizados durante su extracción. Por otro lado, Hamoud-Agha y Allaf (2019) indican que el esfuerzo de extensión dentro del producto generado durante la aplicación de la descompresión crea una nueva estructura expandida y porosa, la cual aumenta la superficie específica y la difusividad de la transferencia de masa, así como la accesibilidad del producto, lo que mejora el proceso de extracción con solventes y muchas otras propiedades funcionales de los alimentos.

En cuanto a la cuantificación de antocianinas monoméricas se observó que, en los primeros tratamientos (DIC-1 y DIC-2), la combinación de una presión de 0.2 MPa con tiempo de 60 y 90 s, incrementó el contenido de antocianinas monoméricas hasta un 25% comparando con la de la muestra control. Sin embargo, conforme se

incrementó el tiempo a 120 s y la presión a 0.3 y 0.4 MPa, la concentración de antocianinas disminuyó hasta un 30%, comparado con el valor de la muestra control.

**Cuadro 6.** Polifenoles extraíbles en orujo de uva sometido a la descompresión instantánea controlada.

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)	Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>	Antocianinas <sup>2</sup>
Control	0	0	62.59 ± 1.2 <sup>f</sup>	5.15 ± 0.02 <sup>bc</sup>
DIC-1	0.2	60	63.31 ± 2.0 <sup>f</sup>	6.45 ± 0.07 <sup>a</sup>
DIC-2	0.2	90	65.71 ± 1.2 <sup>ef</sup>	6.48 ± 0.09 <sup>a</sup>
DIC-3	0.2	120	67.51 ± 1.1 <sup>de</sup>	5.39 ± 0.07 <sup>bc</sup>
DIC-4	0.3	60	70.88 ± 1.9 <sup>bcd</sup>	5.77 ± 0.10 <sup>ab</sup>
DIC-5	0.3	90	71.29 ± 1.4 <sup>bc</sup>	4.79 ± 0.07 <sup>c</sup>
DIC-6	0.3	120	69.18 ± 1.4 <sup>cde</sup>	4.63 ± 0.19 <sup>c</sup>
DIC-7	0.4	60	75.69 ± 1.8 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.20 <sup>c</sup>
DIC-8	0.4	90	73.93 ± 1.4 <sup>ab</sup>	4.94 ± 0.18 <sup>bc</sup>
DIC-9	0.4	120	72.64 ± 2.4 <sup>abc</sup>	3.60 ± 0.04 <sup>fd</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>mg EAG/g (EAG, equivalentes de ácido gálico). <sup>2</sup>mg EM3G/g (EM3G, equivalentes de malvidina-3-glucósido).

Se ha reportado que la temperatura y la presión son factores involucrados en la degradación de las antocianinas. A temperatura constante, las antocianinas se degradaron más rápidamente a medida que aumentaba la presión (Buckow y col., 2010). Aunque el equipo no cuenta con termosensor, teóricamente el comportamiento de la temperatura puede ser descrita con la ecuación de Antoine, la cual establece que a 0.2 MPa la temperatura es de 120.2 °C, a 0.3 MPa es de 133.54 °C y a 0.4 MPa es 143,63 °C. En otros productos alimenticios como el *Roselle* de Malasia, se aplicó DIC antes de la extracción de antocianinas con

solventes. A baja presión (0.09-0.18 MPa) y en poco tiempo (5-30 s), se incrementó el rendimiento de extracción (Ben Amor & Allaf, 2009). Por lo tanto, se sugiere que conforme se incrementa la presión y tiempo de procesamiento, compuestos como las antocianinas se van a ver afectadas al disminuir su concentración, y que presiones bajas con tiempos cortos pueden ser utilizados en las matrices para potenciar la extracción de las antocianinas.

### **7.3.2 Proantocianidinas extraíbles y no extraíbles**

Actualmente, existe una creciente evidencia científica de la existencia de una relación entre las dietas ricas en antioxidantes naturales y la prevención de varias enfermedades crónicas. Sin embargo, la investigación actual se centra solamente en una fracción de los polifenoles de la dieta, correspondientes a los que se pueden extraer de los alimentos con disolventes acuosos y orgánicos. Así, comúnmente los EPP se consideran como el contenido total de polifenoles y se utilizan como base para los cálculos de ingesta dietética, estudios de biodisponibilidad y para el diseño de estudios de intervención u observación. Mientras que, los NEPP, que permanecen en los residuos correspondientes después de la extracción de los extraíbles, no han sido considerados en el contenido total de fenoles en diversas matrices. Sin embargo, los NEPP tras su transformación por la microbiota colónica generan metabolitos absorbibles para los que se han descrito distintas actividades biológicas (Pérez-Jiménez y col., 2013).

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del efecto de DIC en los NEPP: NEPA y HPP. Aunado a ello se determinaron las EPA, ya que la disminución observada en las NEPA pudiera deberse a su hidrólisis, generando un incremento en las EPA. Así, en el tratamiento de mayor presión y mayor tiempo (DIC-9, 0.4 MPa-120 s), se observó una disminución en la concentración de las proantocianidinas no extraíbles (30%) y un incremento en la cuantificación de las proantocianidinas extraíbles (27%).



**Cuadro 7.** EPA, NEPA y NEPP en orujo de uva sometido a DIC

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)	EPA <sup>1</sup>	NEPA <sup>1</sup>	HPP <sup>2</sup>
Control	0	0	454.2±13.0 <sup>c</sup>	7805 ±163 <sup>a</sup>	21.4±1.5 <sup>ab</sup>
DIC-1	0.2	60	517.2±1.2 <sup>b</sup>	7405 ±173 <sup>a</sup>	25.1±1.3 <sup>a</sup>
DIC-2	0.2	90	516.1±4.8 <sup>bc</sup>	7432 ±83 <sup>a</sup>	23.3±1.0 <sup>ab</sup>
DIC-3	0.2	120	503.5±2.2 <sup>bc</sup>	7098 ±128.4 <sup>ab</sup>	24.0±2.1 <sup>ab</sup>
DIC-4	0.3	60	528.0±12.5 <sup>ab</sup>	6377 ±167 <sup>ab</sup>	22.7±1.0 <sup>ab</sup>
DIC-5	0.3	90	523.1±12.7 <sup>b</sup>	6329 ±98 <sup>ab</sup>	21.8±1.3 <sup>ab</sup>
DIC-6	0.3	120	513.7±11.3 <sup>bc</sup>	6747 ±127 <sup>ab</sup>	21.4±1.4 <sup>ab</sup>
DIC-7	0.4	60	504.2±12.8 <sup>bc</sup>	6348 ±179 <sup>ab</sup>	20.3±1.0 <sup>b</sup>
DIC-8	0.4	90	537.7±12.8 <sup>ab</sup>	5908 ±94 <sup>ab</sup>	20.6±1.9 <sup>ab</sup>
DIC-9	0.4	120	578.2±18.4 <sup>a</sup>	5470 ±170 <sup>b</sup>	22.9±0.4 <sup>ab</sup>

Datos expresados como media ± DE. EPA, proantocianidinas extraíbles; NEPA, proantocianidinas no extraíbles; HPP, polifenoles hidrolizables. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>mg EPA/g. <sup>2</sup>mg EAG/g (EAG, equivalentes de ácido gálico).

De acuerdo con Pérez-Jiménez y col. (2013), los NEPP interactúan con la matriz alimentaria a través de diferentes mecanismos: a) enlaces de hidrógeno, b) interacciones hidrófobas, incluida la posible encapsulación en bolsas hidrófobas con proantocianidinas no extraíbles, (c) enlaces covalentes (para formar ésteres y enlaces éter), en el caso de ácidos fenólicos, y posiblemente de NEPA y taninos hidrolizables. Hasta el momento, no hay estudios del efecto de DIC en los NEPP, por lo que la disminución en la concentración de NEPA se asoció con el rompimiento de las interacciones débiles como los puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas por efecto de DIC, debido a que el sistema aporta la energía necesaria para romper dichos enlaces.

De acuerdo al análisis ANOVA (Figura 11), el factor más crítico para la expansión de la matriz es la diferencia de presión en el sistema, y esta modificación de la matriz

está relacionada con el aumento de la concentración total de compuestos fenólicos. En cuanto a las antocianinas, el tiempo y la presión fueron significativos; la degradación de estos compuestos fue mayor en tiempos más largos y presiones más altas. Esto podría explicarse porque al aumentar la presión aumenta la temperatura dentro del sistema, disminuyendo la estabilidad de las antocianinas.

Compuestos fenólicos totales						NEPA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Factor pressure	2	222.43	111.22	30.548	0.0001 ***	Factor pressure	2	5965105	2982553	3.049	0.098
Factor time	2	0.88	0.44	0.121	0.8880	Factor time	2	223224	111612	0.114	0.8930
Factor pressure*time	4	31.21	7.80	2.143	0.1570	Factor pressure*time	4	895199	223800	0.229	0.9150
Residual	9	32.77	3.64			Residual	9	8802998	978111		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Antocianinas monoméricas						HPP					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Factor pressure	2	85616	42808	25.093	0.0002 ***	Factor pressure	2	5.24	2.621	0.713	0.516
Factor time	2	44053	22027	12.911	0.0023 **	Factor time	2	4.11	2.055	0.559	0.590
Factor pressure*time	4	5542	1385	0.812	0.5481	Factor pressure*time	4	3.98	0.994	0.271	0.890
Residual	9	15354	1706			Residual	9	33.07	3.674		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1						Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

EPA					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Factor pressure	2	2393	1196.5	1.216	0.341
Factor time	2	712	355.9	0.362	0.706
Factor pressure*time	4	5222	1305.5	1.327	0.331
Residual	9	8854	983.7		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

**Figura 11.** Análisis ANOVA bidireccional para compuestos fenólicos totales, antocianinas, EPA, NEPA y HPP

### 7.3.3 Características fisicoquímicas

Debido a que el orujo de uva tiene un alto contenido de fibra (40-60%) y que muchos de los beneficios a la salud son reportados por la fibra dietaria se determinó algunas de sus propiedades fisicoquímicas. En el Cuadro 8 se muestran los resultados de sus propiedades de hidratación: CRA y capacidad de hinchamiento del orujo de uva sometido a DIC. En cuanto a la CRA se observó que a 0.4 MPa, 120 s (DIC-9) se incrementa hasta un 20%, y la capacidad de hinchamiento en un 15%.

De manera general, se puede decir que la CRA es baja, ya que ésta debe oscilar entre 10 y 12 g de agua/g de fibra. Sin embargo, la baja CRA se puede deber a que el orujo de uva es un subproducto con baja concentración de fibra soluble (3% del total de la fibra). La CRA está influenciada por la fibra soluble, pues al atrapar agua forma soluciones viscosas, esto le da también la propiedad de atrapar colesterol,

grasas y azúcares disminuyendo de esta manera su absorción intestinal y por lo tanto su concentración en sangre (Blackwood y col., 2000).

**Cuadro 8.** CRA y capacidad de hinchamiento en orujo de uva sometido a DIC

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (s)	CRA <sup>1</sup>	Hinchamiento <sup>2</sup>
Control	0	0	4.10 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-1	0.2	60	4.00 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-2	0.2	90	4.28 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-3	0.2	120	4.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.01 <sup>ab</sup>
DIC-4	0.3	60	4.03 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-5	0.3	90	4.24 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-6	0.3	120	4.25 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.14 ± 0.07 <sup>ab</sup>
DIC-7	0.4	60	4.26 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.01 <sup>b</sup>
DIC-8	0.4	90	4.68 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.08 <sup>ab</sup>
DIC-9	0.4	120	4.67 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.07 <sup>ab</sup>

Datos expresados como media ± DE. Experimentos con tres réplicas cada uno. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) (Prueba de Tukey-Kramer). <sup>1</sup>CRA, capacidad de retención de agua (g/g). <sup>2</sup>Hinchamiento (mL/g).

En el Cuadro 8 se presentan 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 la fuerza 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 o formas dipolo (Chen y col., 1984).

No se observaron diferencias estadísticas significativas en la capacidad de hinchamiento, posiblemente porque el orujo de uva es rico en fibra insoluble, la cual no fue afectada por la aplicación de DIC.

#### 7.3.4 Análisis de las muestras seleccionadas

Integrando los resultados anteriores, los principales cambios por aplicación de DIC se obtuvieron con las condiciones de 0.4 MPa a 120 s (DIC-9). Este tratamiento

disminuyó la concentración de compuestos fenólicos no extraíbles, el cual fue uno de los objetivos del proyecto, ya que podría potenciar su absorción o favorecer su fermentación por la microbiota colónica al estar más expuesta en la matriz alimentaria. Sin embargo, esta condición disminuye de manera importante el contenido de antocianinas. Por ello, también se incluyó el tratamiento de 0.2 MPa durante 60 s (DIC-1), ya que se mantiene la concentración de compuestos fenólicos, pero se incrementa las antocianinas. A continuación, se presentan la determinación del perfil de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides, la determinación del grado medio de polimerización de las proantocianidinas, el análisis de sus carbohidratos y efecto en la morfología de la matriz de orujo.

#### **7.3.5 Identificación de antocianinas monoméricas**

Se realizó la identificación de las antocianinas presentes en ambas matrices después de los tratamientos (DIC-1 y DIC-9). Se observó que la muestra DIC-9 se degradaron las siguientes antocianinas: malvidina con sus diferentes conjugaciones, peonidina-3-cumaroil-hexósido y petunidina-3-cumaroil-hexósido (Cuadro 9). El hecho de que se observaran tendencias opuestas para el contenido de antocianinas dependiendo de las condiciones de DIC muestra que, aunque este proceso tiene un efecto general en la matriz alimentaria, liberando ciertos compuestos fenólicos, sus condiciones específicas pueden afectar sustancialmente a las características finales de la muestra con respecto al contenido de antocianinas. Además, esto explica por qué en nuestro estudio, algunas condiciones condujeron a una disminución en el contenido de antocianinas; mientras que, otros estudios publicados, con diferentes condiciones, no observaron esta reducción (Ben Amor y Allaf, 2009).

**Cuadro 9.** Identificación tentativa de antocianinas extraíbles en orujo de uva con diferentes tratamientos DIC, determinado por análisis UPLC-MS

Compuesto	TR	$\lambda_{max}$	Transición MRM	Control	DIC-1	DIC-9
Pelargonidina glucósido	01.76	240, 273, 525	447.1 > 271.1	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>
Cianidina 3-O-hexósido	13.98	240, 280, 511	449.2 > 287.1	0.31 ± 0.02 <sup>ab</sup>	13.42 ± 0.98 <sup>a</sup>	10.70 ± 0.00 <sup>b</sup>
Cianidina 3,5-di hexósido	14.21	240, 279, 538	611.2 > 287.2	0.89 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>a</sup>
Cianidina 3-O-acetil hexósido	14.16	240, 278, 517	491.2 > 287.1	11.44 ± 0.54 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>b</sup>
Cianidina 3-O-rutinósido	13.94	240, 280, 519	595.2 > 287.1	8.31 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.99 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.02 <sup>b</sup>
Cianidina 3-O-coumaroil hexósido	13.96	240, 280, 514	595.2 > 287.1	0.80 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.05 <sup>b</sup>
Delfinidina 3-O-hexósido	13.50	240, 278, 525	645.2 > 303.1	1.94 ± 0.09 <sup>a</sup>	21.36 ± 1.60 <sup>b</sup>	21.20 ± 0.77 <sup>b</sup>
Delfinidina 3-O-acetil hexósido	13.95	240, 278, 520	507.2 > 303.0	1.88 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.02 ± 0.08 <sup>b</sup>
Delfinidina 3-O-coumaroil hexósido	13.47	240, 278, 533	611.2 > 303.1	4.80 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.35 ± 0.39 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.14 <sup>a</sup>
Malvidina 3-O-hexósido	11.11	240, 277, 517	493.2 > 331.2	1.37 ± 0.10 <sup>a</sup>	7.11 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.10 <sup>c</sup>
Malvidina 3,5-di hexósido	13.88	240, 278, 525	655.2 > 331.2	26.80 ± 0.44 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.13 <sup>b</sup>
Malvidina 3-O-acetil hexósido	13.81	240, 277, 517	535.2 > 331.2	41.57 ± 2.50 <sup>a</sup>	6.33 ± 0.60 <sup>b</sup>	4.42 ± 0.03 <sup>b</sup>
Malvidina 3-O-coumaroil hexósido	14.06	20, 280, 511	639.2 > 331.2	84.01 ± 7.09 <sup>a</sup>	40.12 ± 2.17 <sup>b</sup>	25.41 ± 0.92 <sup>b</sup>
Pirano-malvidina 3-O-hexósido	13.07	240, 278, 512	517.2 > 355.1	11.85 ± 0.71 <sup>a</sup>	24.79 ± 0.08 <sup>b</sup>	7.24 ± 0.21 <sup>c</sup>
Petunidina 3-O-hexósido	14.01	240, 270, 510	479.2 > 317.2	5.22 ± 0.41 <sup>ab</sup>	9.96 ± 0.82 <sup>a</sup>	7.74 ± 0.16 <sup>b</sup>
Petunidina 3-O-coumaroil hexósido	13.97	240, 280, 525	625.2 > 317.2	7.84 ± 0.75 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.05 <sup>b</sup>
Peonidina 3-O-hexósido	13.95	240, 278, 511	463.2 > 301.2	6.78 ± 0.80 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.04 <sup>a</sup>
Peonidina 3-O-acetil hexósido	13.76	240, 278, 532	505.2 > 301.2	22.74 ± 1.20 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>
Peonidina 3-O-rutinósido	14.06	240, 280, 515	609.2 > 463.2	9.28 ± 0.61 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.65 ± 0.08 <sup>c</sup>
Peonidina 3-O-coumaroil hexósido	14.00	240, 281, 519	609.2 > 301.2	6.78 ± 0.80 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.17 ± 0.06 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Los resultados se expresan en área del pico dividida entre 1000. Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ). TR; tiempo de retención

### 7.3.6 Perfil de compuestos bioactivos; ácidos fenólicos y flavonoides

La conversión microestructural tiene una gran influencia en la conversión química dentro de las matrices (Wang y col., 2014). En el Cuadro 10 se muestran los cambios en el perfil de ácidos fenólicos y flavonoides de orujo de uva bajo DIC. Como se puede observar, conforme se incrementan la presión y el tiempo, cambió la concentración de los compuestos, lo cual generó modificaciones en el perfil de compuestos fenólicos extraíbles, posiblemente por la liberación de dichos compuestos atrapados en la matriz alimentaria o por la hidrólisis de polifenoles de alto peso molecular. Hasta el momento, el incremento en la concentración de compuestos extraíbles por efecto del tratamiento con DIC se ha relacionado con el aumento en gran medida de la porosidad, haciendo que la estructura fuera más accesible para los solventes y de esta manera la mayor liberación de los compuestos de la matriz (Kamal y col., 2008).

En cuanto a ácidos fenólicos, los ácidos caftárico, elágico, gálico vanílico y shikímico aumentaron más del 50% en comparación con la muestra control, desde 1212.66  $\mu\text{g/g}$  (muestra control) hasta 2874.54  $\mu\text{g/g}$  para el ácido caftárico y de 55.44  $\mu\text{g/g}$  hasta 150.11  $\mu\text{g/g}$  para el ácido gálico. Meyer y col. (1998) determinaron que los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido caftárico, presentaron altas actividades antioxidantes *in vitro*, dichos autores usaron un ensayo de oxidación de LDL. Por otra parte, Harnafi y col. (2013) reportaron que el ácido caftárico redujo los triglicéridos en hígado en un 58%.

El incremento en la concentración de ácidos fenólicos puede atribuirse también a la formación de productos de degradación de las antocianinas, las cuales disminuyeron conforme se incrementó la presión y el tiempo de procesamiento. De acuerdo con Zhao y col. (2013), la degradación de las antocianinas puede dar lugar a ciertos ácidos fenólicos, como es el caso del ácido siríngico de malvidina-3-O-glucósido, el ácido vanílico de la peonidina-3-glucósido, el ácido protocatecuico de la pelargonidina-3-glucósido y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico del catión flavilio.

**Cuadro 10.** Perfil de ácidos fenólicos y flavonoides de orujo de uva sometido a la descompresión instantánea controlada

Compuesto	TR	MRM	Control*	DIC-1*	DIC-9*
<i>Ácidos fenólicos</i>					
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>					
Ácido benzoico	9.84	121.10 > 77.06	1.28 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.18 <sup>b</sup>
4-hidroxibenzoico	6.29	137.04 > 93.05	2.28 ± 0.44 <sup>b</sup>	4.48 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.65 ± 0.44 <sup>ab</sup>
Trans-cinámico	11.96	147.17 > 103.08	0.57 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.26 <sup>a</sup>
2,4-dihidroxibenzoico	5.85	153.15 > 108.92	7.06 ± 1.35 <sup>b</sup>	10.87 ± 0.06 <sup>b</sup>	20.85 ± 1.50 <sup>a</sup>
2,4,6-trihidroxibenzaldehído	8.29	153.15 > 153.52	2.04 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.87 ± 0.67 <sup>a</sup>
Protocatecuico	5.08	153.15 > 109.05	6.75 ± 0.95 <sup>b</sup>	11.08 ± 0.39 <sup>b</sup>	19.75 ± 2.73 <sup>a</sup>
Vanílico	7.00	167.18 > 123.09	12.43 ± 2.90 <sup>b</sup>	29.84 ± 0.69 <sup>a</sup>	27.21 ± 5.62 <sup>ab</sup>
Gálico	3.59	169.15 > 125.05	55.44 ± 10.24 <sup>b</sup>	136.54 ± 2.56 <sup>a</sup>	150.11 ± 15.47 <sup>a</sup>
Siríngico	7.28	197.21 > 153.11	24.79 ± 1.80 <sup>b</sup>	55.07 ± 0.74 <sup>a</sup>	58.44 ± 8.49 <sup>a</sup>
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>					
Cafeico	7.06	179.19 > 135.08	4.19 ± 0.45 <sup>b</sup>	7.69 ± 0.02 <sup>ab</sup>	8.44 ± 1.50 <sup>a</sup>
Caftárico	4.92	311.27 > 149.05	1212.66 ± 92.05 <sup>b</sup>	2771.60 ± 151.41 <sup>a</sup>	2874.54 ± 382.58 <sup>a</sup>
Cumárico	8.36	163.24 > 119.08	5.15 ± 0.37 <sup>c</sup>	11.98 ± 0.46 <sup>a</sup>	8.60 ± 0.70 <sup>b</sup>
Elágico	8.35	301.00 > 229.00	89.98 ± 6.80 <sup>b</sup>	167.69 ± 21.09 <sup>a</sup>	116.13 ± 4.49 <sup>ab</sup>
Shikímico	1.67	173.18 > 111.07	55.77 ± 7.90 <sup>b</sup>	95.58 ± 12.19 <sup>a</sup>	103.04 ± 1.53 <sup>a</sup>
Sinápico	8.80	223.24 > 149.04	3.81 ± 0.64 <sup>a</sup>	4.06 ± 0.69 <sup>a</sup>	4.44 ± 0.75 <sup>a</sup>
<i>Flavonoides</i>					
Catequina	5.96	289.02 > 245.04	78.97 ± 4.70 <sup>b</sup>	197.40 ± 6.48 <sup>a</sup>	182.91 ± 7.14 <sup>a</sup>
Epicatequina	7.39	289.02 > 245.04	87.75 ± 3.70 <sup>c</sup>	201.46 ± 6.23 <sup>a</sup>	170.84 ± 1.96 <sup>b</sup>
Epicatequina galato	8.14	441.05 > 168.92	11.24 ± 0.40 <sup>c</sup>	28.19 ± 7.37 <sup>b</sup>	81.83 ± 9.31 <sup>a</sup>
Kaempferol	11.74	285.22 > 151.02	24.40 ± 2.22 <sup>a</sup>	16.40 ± 1.03 <sup>b</sup>	17.83 ± 0.67 <sup>b</sup>
Kaempferol 3-O-glucósido	8.61	447.30 > 284.24	24.51 ± 2.12 <sup>a</sup>	12.35 ± 0.77 <sup>b</sup>	12.25 ± 0.76 <sup>b</sup>
Luteolina	10.49	285.21 > 133.04	9.05 ± 1.21 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.78 <sup>a</sup>	8.64 ± 0.08 <sup>a</sup>
Procianidina B2	6.42	577.44 > 289.18	64.26 ± 5.67 <sup>c</sup>	172.24 ± 3.97 <sup>a</sup>	119.65 ± 3.03 <sup>b</sup>
Quercetina	10.57	301.20 > 151.02	33.17 ± 3.63 <sup>b</sup>	49.86 ± 6.55 <sup>ab</sup>	67.33 ± 2.34 <sup>a</sup>
Quercetina 3-O-glucósido	8.02	463.36 > 300.42	15.14 ± 0.08 <sup>b</sup>	38.59 ± 3.40 <sup>a</sup>	30.38 ± 1.26 <sup>a</sup>
Rutina	7.75	609.28 > 300.24	14.34 ± 0.31 <sup>a</sup>	13.52 ± 0.55 <sup>a</sup>	13.64 ± 0.85 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ). TR; tiempo de retención. \* $\mu\text{g/g}$

Con respecto a los flavonoides, se observó un aumento de catequina (hasta 33 veces), epicatequina (hasta 27 veces) y galato de epicatequina (hasta 10 veces). Estos flavonoides son las unidades estructurales más comunes de las proantocianidinas, que forman parte de los principales compuestos del orujo de uva (Khanal y col., 2009), implicando estos resultados una despolimerización parcial de proantocianidinas.

La quercetina 3-O-glucósido también se vio incrementada. De acuerdo con Hollman y col. (1995), los glucósidos de la quercetina se absorben más eficazmente que la propia quercetina. Por lo que la aplicación de DIC presentaría una oportunidad para incrementar la bioaccesibilidad y, por ende, la biodisponibilidad de compuestos como la quercetina 3-O-glucósido.

### **7.3.7 Determinación del grado medio de polimerización de las proantocianidinas de orujo de uva sometido a DIC**

De acuerdo con el análisis del grado de polimerización de las proantocianidinas, se respalda el supuesto de la hidrólisis de proantocianidinas, debido a que el grado medio de polimerización disminuyó de 2.43 (muestra de control) a 2.3 y 1.89 con DIC-1 y DIC-9, respectivamente. Esto sugiere que DIC realizó una hidrólisis parcial de NEPA; un hecho que, hasta donde sabemos, no se había informado previamente. Esto es fisiológicamente relevante ya que, según Monagas y col. (2010), el grado de polimerización es uno de los principales factores que afectan su biodisponibilidad. Fracciones de las proantocianidinas con grado de polimerización <3 se pueden absorber en el intestino delgado; mientras que, las proantocianidinas con grado de polimerización >3 son fermentadas por la microbiota colónica, generando metabolitos microbianos (3-4 dihidroxifenil acético, 3-4 dihidroxifenilpropiónico, valerolactonas, entre otros) los cuales se han asociado con efectos beneficiosos a la salud. Por lo tanto, la liberación e hidrólisis de las proantocianidinas en orujo de uva por DIC puede favorecer su absorción o su fermentación por la microbiota colónica.



### 7.3.8 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las matrices alimentarias tiene una relación directa con el contenido de sus compuestos fenólicos. Debido a que estos compuestos aumentaron en las muestras tratadas con DIC, las capacidades antioxidantes se determinaron usando ensayos ABTS y DPPH (Cuadro 11). En el ensayo DPPH, el tratamiento de DIC-9 fue significativamente mayor en comparación con la muestra de orujo de uva sin DIC; mientras que, en el ensayo ABTS, ambos tratamientos DIC-1 y DIC-9 fueron mayor comparado con la muestra de orujo de uva control. El mecanismo de neutralización del radical ABTS es por transferencia de electrones; mientras que, para el radical DPPH se trata de un mecanismo de transferencia de hidrógeno. Por otro lado, el ensayo ABTS determina compuestos antioxidantes hidrófilos y lipófilos; mientras que, el ensayo DPPH utiliza un radical disuelto en medios orgánicos y, por lo tanto, es aplicable a compuestos con baja polaridad (Kim y col., 2002). Según estos resultados, se sugiere que DIC genera la liberación principalmente de compuestos polares.

**Cuadro 11.** Capacidad antioxidante de orujo de uva sometido a DIC

Método	Control	DIC-1	DIC-9
ABTS	21.25 ± 3.44 <sup>c</sup>	52.73 ± 1.99 <sup>b</sup>	95.35 ± 6.57 <sup>a</sup>
DPPH	24.13 ± 1.26 <sup>b</sup>	26.39 ± 1.90 <sup>b</sup>	32.58 ± 2.15 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ). ABTS y DPPH se expresan como  $\mu\text{mol Trolox/g}$  DPPH (2,2-difenil1-picrylhidrazyl), ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)].

### 7.3.9 Contenido de fibra dietaria (FD)

Además de la modificación de compuestos bioactivos por DIC, también se observaron cambios en el contenido de FD. La FD es el principal componente del orujo de uva (60-70%), por lo que cabe esperar que los procesos que se le aplican modifiquen el contenido, la composición, las propiedades fisicoquímicas, funcionales y nutricionales de este componente (Yu y Ahmedna, 2013).

Los resultados del efecto de DIC en FD se muestran en el Cuadro 12. Ambos tratamientos con DIC condujeron a una disminución leve, aunque significativa (p

<0.05), en el contenido de fibra dietaria total, de 68.3% en la muestra de control a 64.9% en DIC-1 y 63.4% en DIC-9.

Esto se atribuye principalmente a una disminución en la fibra dietaria insoluble ya que, de hecho, hubo un aumento significativo en el contenido de fibra soluble. Es bien sabido que DIC genera hidrólisis de la pared celular (Peng y col., 2019), explicando, por lo tanto, los resultados observados. Tal efecto se confirmó con las determinaciones de azúcares simples como equivalentes de dextrosa, ya que su contenido aumentó hasta un 70.6% para DIC-9 en comparación con el control. Al mismo tiempo, el aumento de fibra soluble podría estar relacionado con la degradación de la fracción insoluble de la fibra. En particular, si se producen irregularidades en la estructura ordenada en los polisacáridos (cadena principal o ramificación), estos enlaces serán más débiles y la estructura ordenada se disociará más fácilmente (Lovegrove y col., 2017). Además, la temperatura aumenta la solubilidad de los polisacáridos al romper los enlaces débiles y, por lo tanto, la estructura ordenada se ve afectada (Garau y col., 2007)

**Cuadro 12.** Contenido de fibra dietaria en muestras sometidas a DIC

Contenido	Control	DIC-1	DIC-9
Fibra dietaria total (%)	68.3 ± 1.47 <sup>a</sup>	64.9 ± 0.89 <sup>b</sup>	63.4 ± 0.32 <sup>b</sup>
Fibra dietaria insoluble (%)	58.3 ± 1.75 <sup>a</sup>	53.4 ± 0.65 <sup>b</sup>	51.1 ± 0.15 <sup>c</sup>
Fibra dietaria soluble (%)	10.0 ± 0.54 <sup>c</sup>	11.5 ± 0.24 <sup>b</sup>	12.3 ± 0.27 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Valores con diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).

Ambas fracciones de fibra, soluble e insoluble, tienen efectos beneficiosos asociados a la prevención de enfermedades relacionadas con la obesidad. FDS aumenta la viscosidad y la capacidad de retención de agua de la digesta e induce la formación de geles en el estómago; dichas propiedades pueden retrasar el vaciado gástrico y al mismo tiempo aumentar la distensión estomacal, la cual se considera como un factor causal en la cadena de eventos que conducen a la saciedad (Tan y col., 2017). La fibra insoluble, con constituyentes como la celulosa y la hemicelulosa, benefician la salud metabólica e intestinal al acelerar el tránsito

intestinal, aumentando el volumen fecal; mientras que, también influye en la absorción de macronutrientes presentes en la dieta. En conjunto, el consumo de alimentos ricos en DF puede mejorar la salud de muchas maneras, tales como limitar la reabsorción de bilis, proporcionar metabolitos bioactivos ventajosos, a través de la fermentación microbiana, y fortalecer la barrera intestinal, lo que a su vez protege contra una serie de desafíos inflamatorios mediados por microbiota (Singh y Vijay-Kumar, 2020).

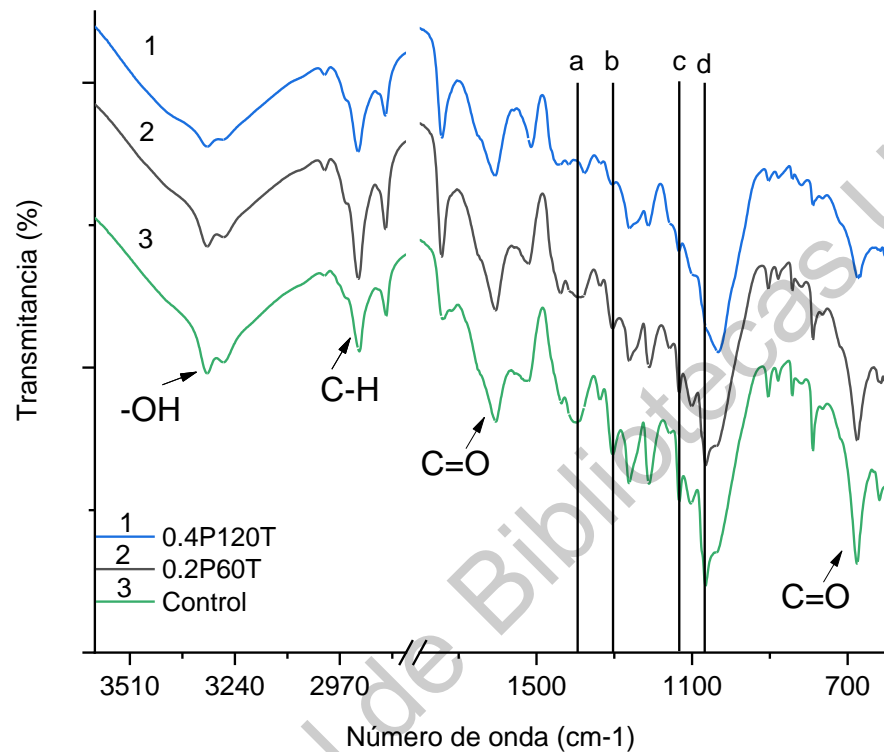
### **7.3.10 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

Debido al cambio en las concentraciones de fibra y compuestos bioactivos, se procedió a realizar el análisis por espectroscopía infrarroja para determinar los posibles cambios vibracionales que tienen lugar en las moléculas presentes en la estructura del orujo de uva debido al procesamiento de la descompresión instantánea controlada (DIC). En la Figura 12 se presenta los espectros que muestra los cambios en el estado vibracional del orujo de uva control (línea 3) y las muestras sometidas a DIC (línea 2, muestra sometida a 0.2 MPa-60 s; línea 1, muestra sometida a 0.4 MPa-120 s) en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

Las asignaciones de picos se realizaron con lo ya reportado en trabajos previos para orujo de uva (Cuadro 13). De acuerdo con los resultados mostrados, no se produjeron nuevas bandas de grupos químicos en el orujo de uva sometidos a DIC. Por lo que se descarta la posibilidad de formación de nuevos grupos funcionales; sin embargo, se puede observar la eliminación de picos como (a)1397, (b)1304, (c)1100 y (d)1065  $\text{cm}^{-1}$ .

De acuerdo con Gnanasambandam y Proctor (2000), los picos entre 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  (b, c y d) corresponden a la “huella digital de la pectina”. Los cambios en los picos b, c y d por DIC se relacionó con el rompimiento de enlaces éster C=O de pectina, lo cual generó más grupos funcionales capaces de absorber más energía y por ende la disminución de la intensidad de los picos conforme se incrementa la presión y tiempo de procesamiento. También se relacionó con la hidrólisis de enlaces éster

entre polisacáridos y compuestos fenólicos, asociado también a el incremento en compuestos fenólicos totales.



**Figura 12.** Espectro FTIR de orujo de uva sometido a DIC (diferente presión y tiempo)

Donde 0.4P120T, la muestra expuesta a una presión de 0.4 MPa durante 120 s y 0.2P60T, la muestra sometida a 0.2 MPa durante 60 s.

**Cuadro 13.** Frecuencia de los grupos funcionales presentes en muestras de orujo de uva sometidas a DIC

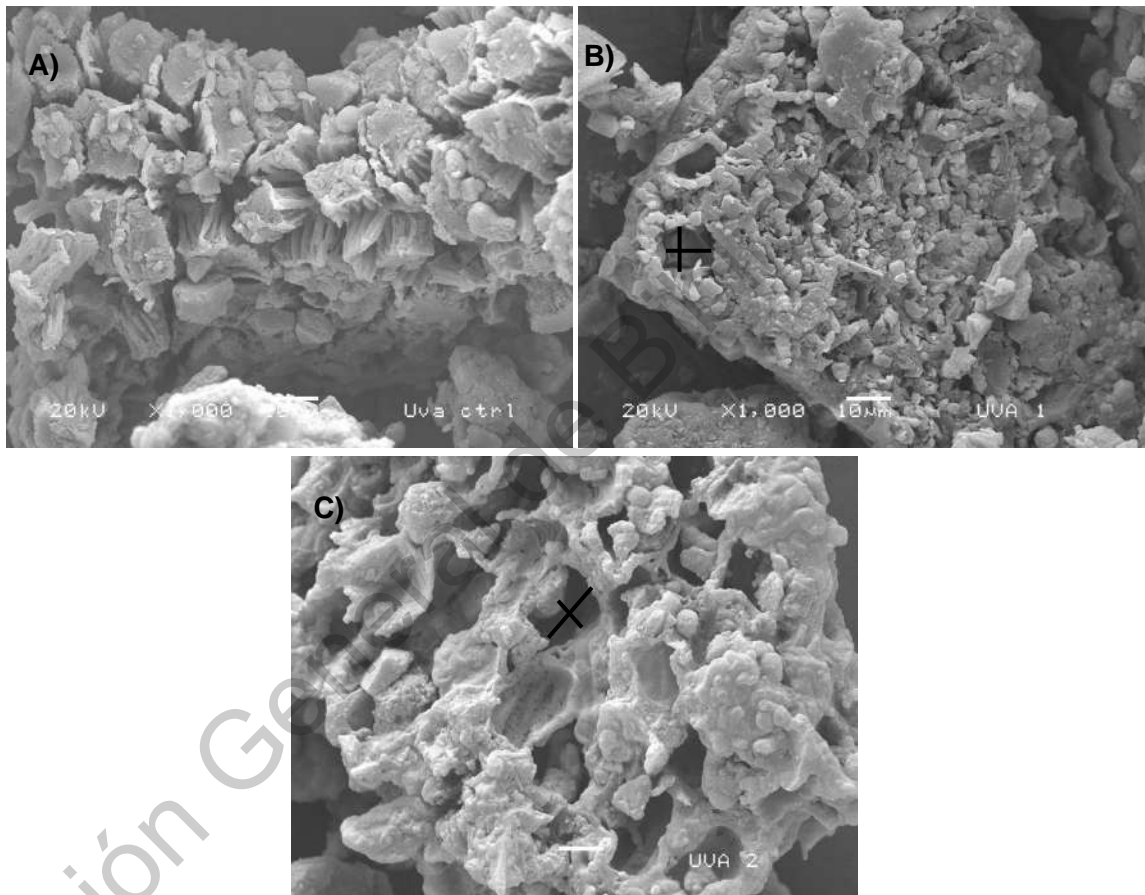
Grupo funcional	Frecuencia (Numero de onda cm-1)	Número de onda (cm-1)	Referencia
3311-3269	-OH stretching	3322 3650-3000	Zhao y col., (2015) Lu y Hsieh, (2012)
2920	C-H stretching	2925 2924	Zhao y col., (2015) Nayak y col., (2018)
2851	C-H stretching	2854	Nayak y col., (2018)
1741	C = O stretching	1741 1740	Lu y Hsieh, (2012) Gowman y col., (2019)
1606	C = O stretching	1627 1616	Zhao y col., (2015) Gowman y col., (2019)
1520	C = C stretching	1519 1530	Zhao y col., (2015) Lu y Hsieh, (2012)
1438	-CH <sub>3</sub> bending	1444 1430	Zhao y col., (2015) Lu y Hsieh, (2012)
1377	-CH <sub>3</sub> bending	1377 1366	Zhao y col., (2015) Lu y Hsieh, (2012)
1300-1000	C=O stretching	1306-1030	Gnanasambandam y Proctor (2000)

### 7.3.11 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de orujo de uva

La microscopía electrónica de barrido es una técnica utilizada para el estudio de la morfología de los materiales. En la Figura 13 se observa la micrografía tomada a las muestras de orujo seleccionadas; A) muestra control, B) muestra sometida a DIC a 0.2 MPa-60 s (DIC-1) y C) muestra a 0.4 MPa-120 s (DIC-9). Como se puede observar, la aplicación de DIC generó la modificación de la estructura de la matriz de orujo de uva; de manera que, conforme se incrementa el tiempo y la presión, la formación de poros es mayor.

En la Figura 13A se presenta la muestra control con una estructura definida, B) se empieza a observar la formación de poros de hasta 10  $\mu\text{m}$  de tamaño y C) se observa un incremento en número y tamaño de poro de hasta de 20  $\mu\text{m}$  de tamaño. La formación de poros se debe a que la autovaporización del agua en la matriz generó la expansión de esta, y también posiblemente la liberación de compuestos fenólicos. De acuerdo con Mounir y col. (2012), la expansión del producto depende

del estrés que se genera por la cantidad de agua autovaporizada. La cantidad de vapor generado depende de la diferencia de temperatura del material antes y después de la caída de presión. Cuanto mayor es la presión de vapor, más vapor se genera por vaporización y mayor es la relación de expansión.



**Figura 13.** Microscopía electrónica de barrido de orujo de uva sometido a DIC.

A) Muestra control, B) Muestra sometida a DIC-1, 0.2 MPa-60 s; C) Muestra sometida a DIC-9, 0.4 MPa-120 s.

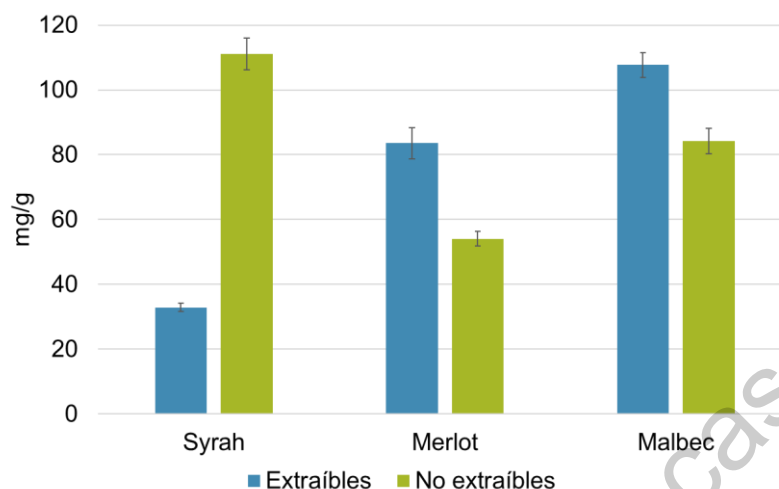
#### **7.4. Efecto de DIC sobre las modificaciones en NEPA utilizando materiales con diferente contenido**

A continuación, se presentan experimentos adicionales realizados con el orujo de uva. De manera conjunta los resultados expuestos previamente demuestran que la aplicación de DIC generó cambios en la composición de compuestos fenólicos de orujo de uva Malbec, incrementando el contenido de los EPP y disminuyendo los NEPP; esto sugiere que hay rompimientos de enlaces o liberación de compuestos de la matriz. El comportamiento de ambas fracciones (EPP y NEPP) en este material nos lleva a plantear la posibilidad de que la aplicación de DIC libera compuestos más simples a partir de NEPP, es decir, que con la aplicación de DIC se podría incrementar la bioaccesibilidad de compuestos simples, a partir de orujos con altas concentraciones de NEPP. En base a los resultados anteriores se planteó el análisis del efecto de DIC con las condiciones seleccionadas (0.2 MPa-60 s y 0.4 MPa-120 s) de la primera fase experimental sobre diferentes materiales de orujo de uva con contenido de compuestos (EPP y NEPP) contrastantes.

##### **7.4.1. Efecto de DIC en los EPP de los diferentes materiales de orujo de uva**

Una vez determinado que el orujo de uva es modificado cuando se somete al tratamiento con DIC, se consideró la composición de 3 variedades de orujo de uva provenientes de diferentes vitivinícolas. Considerando los datos reportados por Copado-Romero (2020) de 10 muestras analizadas, se seleccionaron 3 materiales con composiciones contrastantes y a continuación se describen.

Malbec es el material que se trabajó en la primera parte experimental, y éste se caracteriza por ser un material muy abundante en ambas fracciones de compuestos fenólicos. Así, los EPP (polifenoles totales, antocianinas, y EPA) suponen el 56% de sus polifenoles; mientras que, los NEPP (NEPA y HPP) son un 44%. El orujo de la variedad Syrah es un material abundante en NEPP (77%) y con menor contenido de EPP (23%). Mientras que, el orujo de la variedad Merlot tiene mayor contenido de EPP (61%) comparado con el de NEPP (39%) (Figura 14).



**Figura 14.** Contenido de EPP y NEPP de orujo de uva de diferentes variedades.

Los orujos de los materiales de Merlot y Malbec presentan concentraciones muy similares de compuestos fenólicos totales, pero el orujo de la variedad de Merlot tiene menor concentración de flavonoides totales (35.58 mg EC/g) y NEPA (34.64 mg EPA/g), comparada con las concentraciones del orujo de la variedad de Malbec (49.78 mg EC/g y 49.42 mg EPA/g respectivamente). Estas diferencias en la composición de polifenoles son esperadas por diferentes variedades de uva y también están asociadas con el clima, las condiciones de crecimiento, la madurez y la vinificación (Yu y Ahmedna, 2013).

El efecto sobre los compuestos fenólicos totales de orujos de uva Malbec (MAC), Merlot (MER) y Syrah (SYR) por el proceso DIC se muestra en el Cuadro 14. Si bien los orujos de las variedades Malbec y Merlot fueron los materiales con mayor contenido de EPP y flavonoides, la aplicación de DIC generó un mayor porcentaje de incremento en estos compuestos en el material Syrah a alta presión (0.4 MPa) en comparación con su respectivo control (sin la aplicación DIC MAC, MER y SYR). En particular, cuando los materiales se sometieron a una presión de 0.4 MPa y 4 ciclos, en el caso de SYR4, el incremento fue de 97.71 y 138.79%, respectivamente en cada fracción; mientras que, estos valores en MAC4 fueron de 64.77 y 40.64%, y el incremento en MER4 fue de 54,31 y 37,45%. Por lo tanto, cuando la presión y



los ciclos aumentaron, se observó una liberación más significativa de compuestos fenólicos extraíbles totales y flavonoides extraíbles totales.

También se observó un aumento en la fracción de EPA. El mayor porcentaje de incremento se observó en MAC4 (42,97%), seguido de MER4 (34,95%) y SYR4 (31,14%), cada uno en comparación con su respectiva muestra que no fue sometida al proceso DIC. En el orujo de uva de la variedad de Malbec, el aumento en el contenido de EPA por la aplicación de DIC se asoció con la disminución de NEPA y se atribuyó tanto a una liberación parcial de NEPA como a la despolimerización parcial de todas las proantocianidinas (Martínez-Meza y col., 2021). Aquí, la disminución en NEPP fue más notable cuando se aumentó la presión a 0.4 MPa con 4 ciclos en los tres materiales. El mayor porcentaje en su disminución, en comparación con la muestra no sometida a DIC, se observó en MER4 (46%), seguido de MAC4 (41%) y SYR4 (33%).

En cuanto a las antocianinas extraíbles totales, se observó una disminución debido al tratamiento con DIC. Syrah fue el material más susceptible a la pérdida de antocianinas, con una disminución de 59.18%; mientras que, la reducción en Malbec y Merlot fue de 45.45 y 41.17%, respectivamente. La pérdida de antocianinas es el resultado del incremento en la temperatura del sistema. La disminución fue más significativa a medida que aumentaron la presión y los ciclos de procesamiento, lo que concuerda con el estudio anterior que realizamos (Martínez-Meza y col., 2021).

**Cuadro 14.** Concentración de fenoles totales en diferentes materiales de orujo de uva sometido a DIC.

Muestra	Presión (MPa)	Ciclos (#)	Fenoles extraíbles <sup>1</sup>	Flavonoides <sup>2</sup>	Antocianinas monoméricas <sup>3</sup>	EPA <sup>4</sup>	NEPA <sup>5</sup>
MAC	0	0	45.87 ± 0.41 <sup>dF</sup>	43.62 ± 3.76 <sup>cCD</sup>	2.86 ± 0.11 <sup>aA</sup>	7.33 ± 0.22 <sup>dDE</sup>	68.80 ± 1.20 <sup>bC</sup>
MAC1	0.2	2	62.36 ± 1.57 <sup>cC</sup>	48.45 ± 0.70 <sup>bB</sup>	2.25 ± 0.12 <sup>bB</sup>	7.77 ± 0.14 <sup>dB</sup>	73.68 ± 3.46 <sup>aAB</sup>
MAC2	0.2	4	61.66 ± 1.07 <sup>cC</sup>	49.03 ± 2.26 <sup>bB</sup>	2.26 ± 0.11 <sup>bB</sup>	8.54 ± 0.16 <sup>cC</sup>	70.94 ± 4.08 <sup>abBC</sup>
MAC3	0.4	2	65.35 ± 2.16 <sup>bB</sup>	45.96 ± 2.68 <sup>bBC</sup>	1.99 ± 0.09 <sup>cC</sup>	9.48 ± 0.58 <sup>bD</sup>	50.45 ± 1.54 <sup>cE</sup>
MAC4	0.4	4	75.58 ± 1.39 <sup>aA</sup>	61.35 ± 2.50 <sup>aA</sup>	1.56 ± 0.23 <sup>dD</sup>	10.48 ± 0.29 <sup>aA</sup>	40.49 ± 1.06 <sup>dF</sup>
MER	0	0	43.84 ± 2.12 <sup>dF</sup>	35.14 ± 2.15 <sup>cE</sup>	0.68 ± 0.04 <sup>aE</sup>	5.41 ± 0.08 <sup>cGH</sup>	47.20 ± 1.20 <sup>aE</sup>
MER1	0.2	2	41.19 ± 2.17 <sup>dG</sup>	41.85 ± 1.64 <sup>bD</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>bEF</sup>	4.98 ± 0.15 <sup>dH</sup>	39.10 ± 1.07 <sup>bF</sup>
MER2	0.2	4	50.47 ± 0.56 <sup>cE</sup>	43.37 ± 1.18 <sup>bCD</sup>	0.54 ± 0.00 <sup>bcEF</sup>	5.53 ± 0.32 <sup>cG</sup>	41.32 ± 1.35 <sup>bF</sup>
MER3	0.4	2	55.78 ± 1.34 <sup>bD</sup>	43.66 ± 1.14 <sup>bCD</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>cF</sup>	6.33 ± 0.19 <sup>bF</sup>	28.91 ± 1.65 <sup>cG</sup>
MER4	0.4	4	67.65 ± 1.09 <sup>aB</sup>	48.30 ± 2.58 <sup>aB</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>dFG</sup>	7.30 ± 0.26 <sup>aE</sup>	25.47 ± 1.47 <sup>dG</sup>
SYR	0	0	16.20 ± 0.39 <sup>dJ</sup>	7.94 ± 0.28 <sup>dH</sup>	0.49 ± 0.02 <sup>aF</sup>	3.05 ± 0.02 <sup>bJ</sup>	71.11 ± 2.49 <sup>bC</sup>
SYR1	0.2	2	16.30 ± 0.53 <sup>dJ</sup>	8.06 ± 0.31 <sup>dH</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>bGH</sup>	2.36 ± 0.14 <sup>dK</sup>	77.34 ± 2.65 <sup>aA</sup>
SYR2	0.2	4	18.08 ± 0.14 <sup>cJ</sup>	9.14 ± 0.28 <sup>cH</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>bGH</sup>	2.71 ± 0.06 <sup>cJK</sup>	70.78 ± 1.56 <sup>bBC</sup>
SYR3	0.4	2	24.45 ± 0.66 <sup>bI</sup>	14.41 ± 1.08 <sup>bG</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>bGH</sup>	3.66 ± 0.06 <sup>aI</sup>	63.35 ± 2.49 <sup>cD</sup>
SYR4	0.4	4	32.03 ± 0.65 <sup>aH</sup>	18.96 ± 1.11 <sup>aF</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>cH</sup>	4.00 ± 0.03 <sup>aI</sup>	47.19 ± 1.60 <sup>dE</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). En cada columna, diferentes letras minúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre las condiciones para el mismo material; mientras que, diferentes letras mayúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos, en ambos casos según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). 1GAE mg / g, 2CE mg / g, 3M3GE mg / g, 4EPAs mg / g, 5NEPAs mg / g. GAE, equivalentes de ácido gálico; CE, equivalente de catequina; M3GE, malvidin-3-glucósido; EPA, proantocianidinas extraíbles; NEPA, proantocianidinas no extraíbles. MAC, orujo de la variedad Malbec; MER, orujo de la variedad Merlot; SYR, orujo de la variedad Syrah.

#### **7.4.2. Análisis de interacciones entre los factores de presión, ciclos y tipo de material en compuestos EPP y NEPP**

Dado que en el estudio se modificaron diferentes factores (presión, ciclos y material), se realizó un análisis de interacción para evaluar el impacto de cada uno de ellos y poder valorar su significancia en los cambios observados en el perfil de los compuestos por la aplicación de DIC.

En general, se observó una interacción de tres factores en los compuestos fenólicos extraíbles totales, los flavonoides extraíbles y las antocianinas (valor de  $p = 5.52e-07$ ,  $2.90e-08$ ,  $0.000468$  respectivamente). El efecto de la presión en la modificación estructural dependió de material evaluado y del número de ciclos. Por ejemplo, en la Figura 15A se pueden ver los diferentes efectos en los compuestos fenólicos extraíbles totales: en el orujo de la variedad Malbec el cambio de 2 a 4 ciclos a una presión de 0.2 MPa no fue significativo, pero a 0.4 MPa el cambio de ciclos generó un incremento importante. El comportamiento del orujo de la variedad Syrah fue similar. Sin embargo, en el orujo de la variedad Merlot a 0.2 MPa se observó un aumento notable al cambio de ciclos, que fue similar a 0.4 MPa.

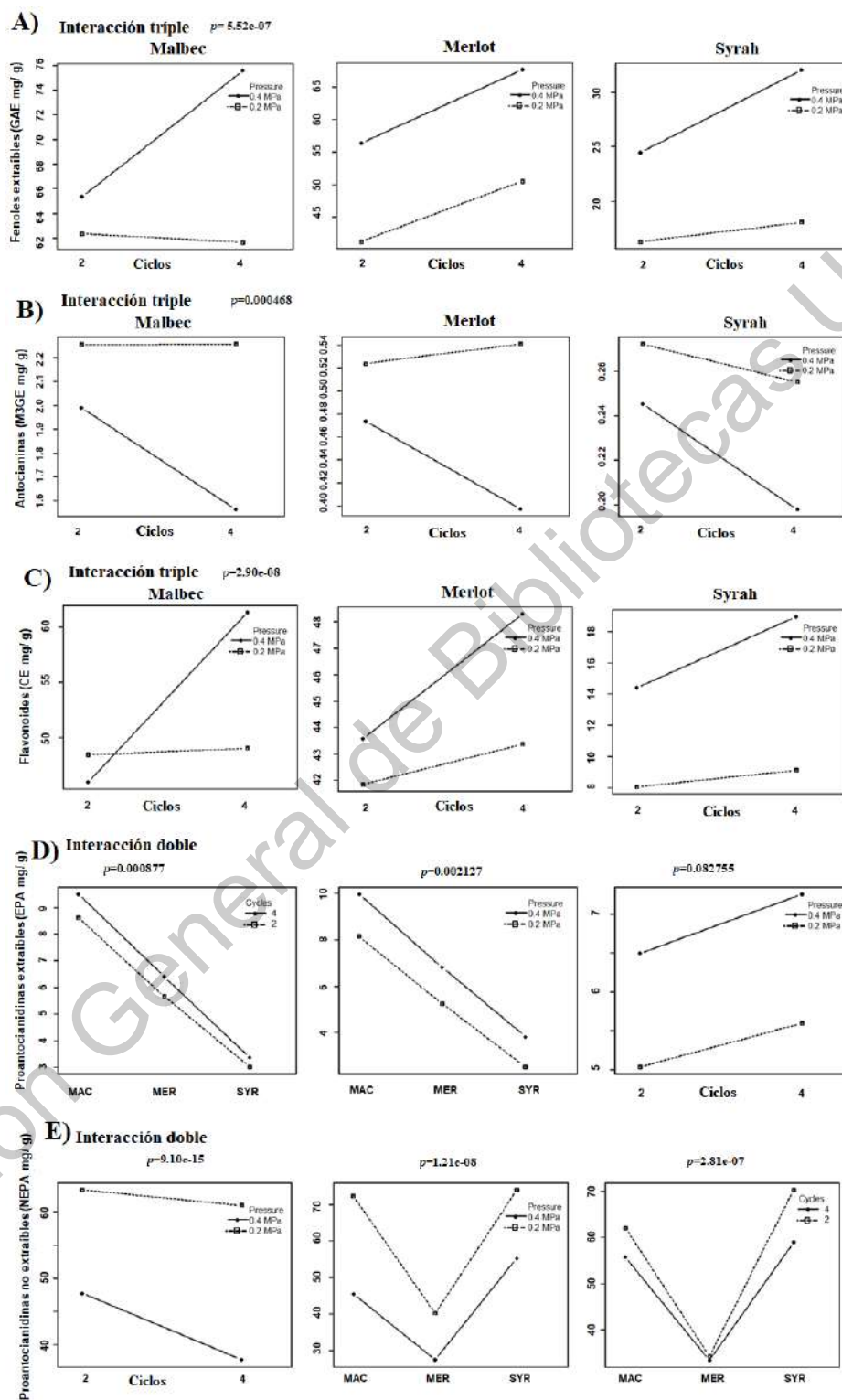
Este efecto fue similar al observado en la variable de respuesta de flavonoides totales (Figura 15B). En el caso de los flavonoides totales, a una presión de 0.2 MPa el cambio de ciclos generó un aumento de contenido en la variedad de Merlot, lo que no sucedió con los demás materiales. Pero a 0.4 MPa, el cambio de ciclos generó un aumento en los tres materiales, principalmente en el material de Malbec, seguido por Merlot y Syrah.

Con respecto a las antocianinas totales, (Figura 15C) fueron más susceptibles al cambio en el material de Syrah a 0.2 MPa, dependiendo del número de ciclos. Mientras que, a 0.4 MPa el cambio de ciclos generó una disminución en todas las muestras (Malbec, Merlot y Syrah).

En el caso de EPA y NEPA se observó una interacción de dos factores (Figura 15D, 15E). Es decir, los efectos de interacción simple entre dos factores son los mismos

en todos los niveles del tercer factor. Para los EPA, la interacción de ciclos\*material fue la más significativa (valor de  $p = 0,00087$ ). El cambio de ciclos de 2 a 4 fue más importante en el material del orujo de uva Malbec, seguido por el orujo de la variedad Merlot y finalmente, el orujo de la variedad Syrah.

Con respecto a los NEPA, la interacción ciclo\*presión ( $9.10 \text{ e-}15$ ) fue más significativa que presión\*material ( $1.21\text{e-}08$ ) y ciclo\*material (valor de  $p = 2.81\text{e-}07$ ). Esto significa que, para cualquier material, la disminución de NEPA se observó significativamente por un cambio en los ciclos de 2 a 4 a una presión de 0.4 MPa, en comparación con lo observado a 0.2 MPa. Considerando el material, el orujo de uva Malbec fue más susceptible a la disminución de NEPA cuando se generan cambios de presión de 0.2 a 0.4 MPa. En el caso de los ciclos, Syrah fue el material donde se observó una mayor disminución de NEPA al pasar de 2 a 4 ciclos. Mientras que, para el orujo de la variedad Merlot, el cambio de ciclos no fue significativo. La composición del material y la interacción de las proantocianidinas con otros compuestos podrían estar relacionadas con el impacto de DIC. De acuerdo con Bautista-Ortín y col. (2016), las antocianinas pueden competir con las proantocianidinas por los sitios de adsorción de la pared celular. Así, los presentes resultados sugieren que la presencia de antocianinas en el material Malbec redujo la adsorción de proantocianidinas, facilitando así su liberación.



**Figura 15.** Interacciones de factores evaluados en la aplicación de DIC a los diferentes materiales de orujo de uva.

### **7.4.3. Efecto de DIC en las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de los diferentes materiales de orujo de uva**

Se sabe que, en células intactas, las proantocianidinas se localizan en vacuolas de piel y células de las semillas. Estos compuestos se liberan durante el proceso de trituración a medida que se rompen las vacuolas de las células. La mayoría de las proantocianidinas se liberan al vino durante el proceso de maceración, aunque también pueden adsorberse e interactuar con los sólidos de la pared celular del orujo de uva (Bindon y col., 2010). Por tanto, el efecto de DIC sobre los diferentes materiales del orujo de uva podría estar asociado con la ruptura de estas interacciones. Los polisacáridos de la pared celular (celulosa, pectina y hemicelulosas) pueden formar enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas con las proantocianidinas, debido a sus grupos hidroxilo como átomos de oxígeno aromáticos y glicosídicos (Bautista-Ortín y col., 2014).

Para este análisis se seleccionaron las muestras sometidas a 4 ciclos y a diferente presión, 0.2 y 0.4 MPa, ya que, en algunos de los parámetros descritos anteriormente, no se observó diferencia significativa entre las muestras que no se sometieron a DIC y las que se sometieron a 2 ciclos y a 0.2 MPa. En el caso de los flavonoides y antocianinas extraíbles totales, los resultados no mostraron diferencias significativas entre las muestras que se sometieron a 0.2 MPa con 4 ciclos y 0.4 MPa con 2 ciclos. Por tanto, se fijó la aplicación de 4 ciclos a diferente presión para poder evaluar los cambios en las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (Cuadro 15).

De acuerdo con el Cuadro 15, el material Syrah presentó mayor contenido de fracción de hemicelulosa y el orujo de la variedad Malbec de fracción de celulosa. Por tanto, el menor porcentaje observado en la liberación de proantocianidinas podría estar asociado a su interacción con esas fracciones de la pared celular. Según el resultado, el tratamiento DIC genera una degradación parcial de celulosa (disminución del 12,7% en la muestra de Syrah, 37,5% en la de Malbec y del 14,5% en el orujo de la variedad de Merlot) y lignina (6,5% en Syrah, 16,8% en Malbec y

12,2% en Merlot). El aumento observado de hemicelulosa puede estar asociado a una expansión de la matriz; por ejemplo, Kocabaş, Köle y Yağcı (2020) reportaron que la extracción de hemicelulosa de tallos de amapola de opio (*Papaver somniferum* L.) se mejoró mediante el pretratamiento DIC a 0.5 MPa y 540 s de tratamiento.

**Cuadro 15.** Cambios en las fracciones de fibra, celulosa, hemicelulosa y lignina de orujo de uva de diferentes variedades sometidas a la descompresión instantánea controlada.

Muestra	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
SYR	11.8±1.8 <sup>AB</sup>	30.9±1.0 <sup>cABC</sup>	21.3±1.0 <sup>ABC</sup>
SYR2	10.7±0.3 <sup>B</sup>	35.1±0.0 <sup>bAB</sup>	19.7±0.2 <sup>C</sup>
SYR4	10.3±0.4 <sup>B</sup>	39.6±0.4 <sup>aA</sup>	19.9±0.5 <sup>C</sup>
MAC	16.8±1.8 <sup>A</sup>	19.6±2.5 <sup>bD</sup>	23.2±0.7 <sup>AB</sup>
MAC2	14.6±1.5 <sup>AB</sup>	26.6±2.1 <sup>abBCD</sup>	20.3±0.6 <sup>BC</sup>
MAC4	10.5±1.1 <sup>B</sup>	35.0±2.0 <sup>aAB</sup>	19.3±1.8 <sup>C</sup>
MER	13.8±0.2 <sup>AB</sup>	24.5±0.1 <sup>CD</sup>	23.6±0.0 <sup>aA</sup>
MER2	11.8±1.5 <sup>AB</sup>	29.6±3.4 <sup>ABCD</sup>	20.8±0.0 <sup>bABC</sup>
MER4	11.8±1.1 <sup>AB</sup>	30.1±2.8 <sup>ABC</sup>	20.7±0.3 <sup>bABC</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). En cada columna, diferentes letras mayúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre condiciones para un mismo material; mientras que, diferentes letras minúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos, en ambos casos según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los resultados se expresan como porcentaje. MAC, orujo de la variedad Malbec; MER, el orujo de la variedad Merlot; SYR, orujo de la variedad de Syrah.

#### 7.4.4. Cambios en el perfil de compuestos por la aplicación de DIC a los diferentes materiales de orujo de uva

El efecto de DIC sobre el perfil de polifenoles (excluyendo antocianinas) de la fracción EPP, medido por UPLC Q-ToF MS, se muestra en el Cuadro 16. Este análisis se realizó en las muestras seleccionadas para la caracterización de las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. Los compuestos más abundantes fueron (+)-catequina, (-)-epicatequina y el dímero procianidina B2, lo que concuerda

con estudios previos que analizan el perfil fenólico de diferentes partes de la uva (Monagas y col., 2003).

Se observó un aumento en flavonoides, principalmente en catequina, epicatequina y galato de epicatequina, que son unidades estructurales de las proantocianidinas del orujo de uva. De acuerdo con Martínez-Meza y col. (2021), el aumento de estas estructuras podría asociarse a una despolimerización parcial de proantocianidinas. Esta observación coincide con los resultados aquí mostrados, ya que el material originalmente más rico en NEPA, Syrah, presentó el mayor porcentaje en el aumento de estos flavanoles, principalmente en catequina la cual aumentó hasta 229 veces. A diferencia de los materiales Malbec y Merlot, la presencia de trímeros como el de procianidina C (cinanamtanina A1) isómero I, trímero de procianidina C (cinanamtanina A1) isómero II y un tetrámero, el tetrámero de prodelfinidina (cinanamtanina A2) se identificaron después de la aplicación de DIC en Syrah y especialmente en SYR4, lo que indica una despolimerización parcial de NEPA y concuerda con los resultados previamente proporcionados para el contenido de NEPA en este material (Cuadro 14).

El aumento de compuestos como la (+)-catequina podría estar asociado con la modificación estructural en las fracciones de lignocelulosa por DIC o con la ruptura de las interacciones (+)-catequina con dicha fracción. En particular, se ha informado que un alto contenido de lignina aumenta la adsorción de (+)-catequina a través de la interacción de las órbitas  $\pi$  y la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos nucleofílicos de la lignina y los grupos hidroxilo de las catequinas (Ye y col., 2009). Aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la fracción de lignina (Cuadro 15), se ha reportado que la hemicelulosa permite la asociación entre lignina y celulosa (Berglund y col., 2020) y puede afectar la interacción de compuestos como la catequina con lignina, por lo que esto podría estar involucrado en los resultados observados.

Con respecto a los flavonoles, en el material Syrah la quercetina fue el flavonol más abundante, en Malbec y Merlot fue el (iso)-rhamnetina hexósido. Sin embargo, el



aumento de presión y ciclos generó un aumento solo de quercetina y se observó una disminución en el hexósido de (iso)-ramnetina. Aunque el aumento de ciertos flavonoles puede estar asociado con la expansión de la matriz debido al efecto DIC, la disminución puede estar asociada con la temperatura dentro del sistema. Según Tomaz y col. (2018), los flavonoles más inestables de extractos polifenólicos de pieles de uva tinta después de los tratamientos térmicos fue la isorhamnetina-3-O-glucósido.

Dirección General de Bibliotecas UFR

**Cuadro 16.** Perfil de compuestos de los materiales de orujo de uva sometidos a DIC por medio de UPLC-ESI-Q-ToF MS.

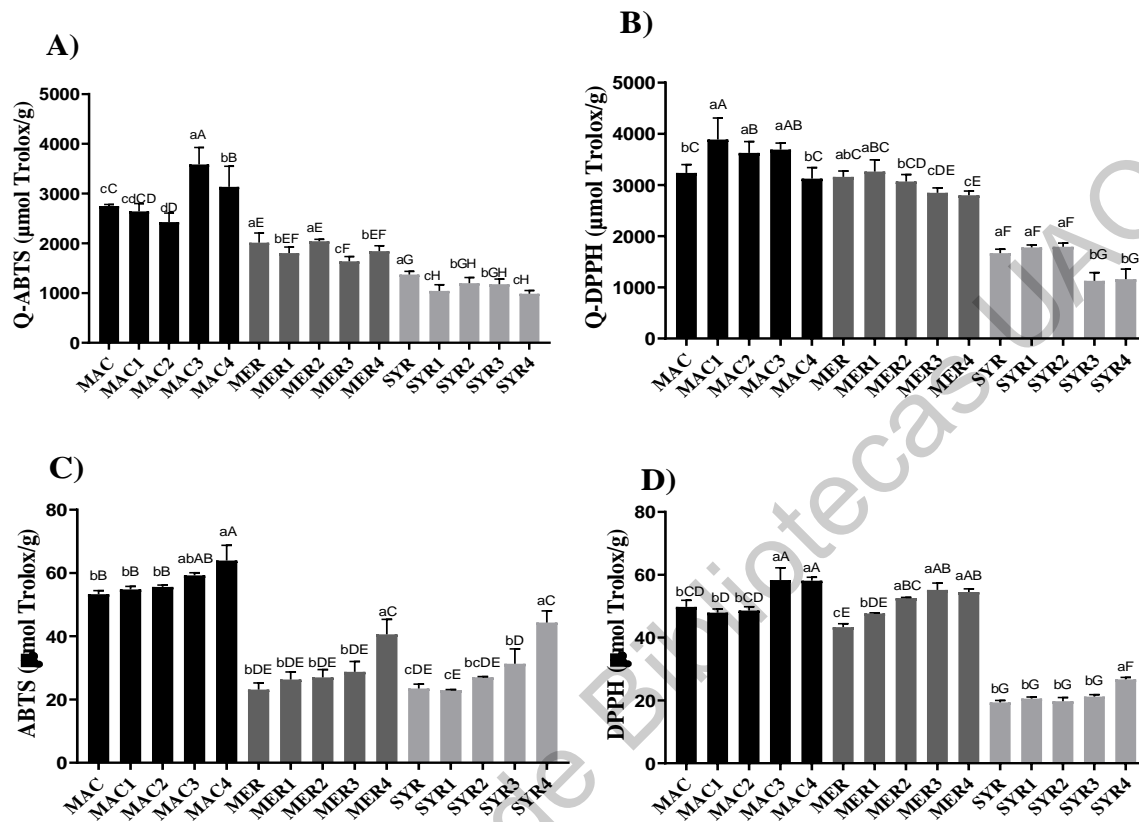
Componente	SYR	SYR2	SYR4	MAC	MAC2	MAC4	MER	MER2	MER4
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>									
Ácido gálico	1.31±0.0 <sup>D</sup>	2.61±0.3 <sup>D</sup>	4.61±1.5 <sup>CD</sup>	58.7±3.9 <sup>B</sup>	112±0 <sup>A</sup>	61.3±0.0 <sup>B</sup>	20.3±3.2 <sup>C</sup>	13.6±0.3 <sup>CD</sup>	18.1±6.9 <sup>CD</sup>
<i>Flavanoles</i>									
(+)-Catequina*	0.25±0.1 <sup>bc</sup>	6.12±0.1 <sup>bc</sup>	57.3±5.6 <sup>abc</sup>	156±1 <sup>bb</sup>	346±3 <sup>aA</sup>	332±42 <sup>aA</sup>	131±12 <sup>bb</sup>	293±0.5 <sup>abA</sup>	308±70 <sup>aA</sup>
(-)-Epicatequina*	0.63±0.07 <sup>cc</sup>	13.3±0.7 <sup>bc</sup>	70.1±4.1 <sup>abc</sup>	98.4±1.2 <sup>bb</sup>	233±8 <sup>aA</sup>	188±33 <sup>aA</sup>	98±9 <sup>bb</sup>	215±0.7 <sup>aA</sup>	201±45 <sup>abA</sup>
Galato de epicatequina	0.09±0 <sup>BC</sup>	0.51±0.01 <sup>C</sup>	12.8±2.2 <sup>BC</sup>	7.2±0.2 <sup>BC</sup>	19.6±1.1 <sup>BC</sup>	41.7±14 <sup>AB</sup>	19.6±2.2 <sup>bbc</sup>	36.6±0.7 <sup>abB</sup>	72.5±19.0 <sup>aA</sup>
Epicatequina hexósido I	ND	ND	ND	0.26±0.1 <sup>B</sup>	0.83±0.1 <sup>A</sup>	0.53±0.2 <sup>AB</sup>	0.21±0.1 <sup>B</sup>	0.16±0.0 <sup>B</sup>	0.16±0.06 <sup>B</sup>
Epicatequina hexósido II	0.10±0.1 <sup>bd</sup>	0.42±0 <sup>abCD</sup>	1.39±0.4 <sup>aCD</sup>	4.73±0.1 <sup>B</sup>	9.91±0.42 <sup>A</sup>	5.03±2.13 <sup>B</sup>	3.30±0.5 <sup>BC</sup>	2.44±0.1 <sup>BCD</sup>	2.30±0.7 <sup>BCD</sup>
Dímero de procianidina BI	0.07±0.00 <sup>D</sup>	0.35±0.04 <sup>D</sup>	10.4±4.1 <sup>D</sup>	47.7±1.9 <sup>bCD</sup>	132±4 <sup>aAB</sup>	167±26 <sup>aA</sup>	55.1±7.2 <sup>bCD</sup>	98±0.2 <sup>abBC</sup>	157±33 <sup>aAB</sup>
Dímero de procianidina BII	0.17±0.00 <sup>EF</sup>	1.10±0.07 <sup>F</sup>	29.4±8.0 <sup>EF</sup>	62.4±3.4 <sup>bDE</sup>	134±1 <sup>abABC</sup>	193±31 <sup>aA</sup>	71.5±8 <sup>bCDE</sup>	108±0 <sup>abBCD</sup>	152±30 <sup>aAB</sup>
Trímero procianidina CI	ND	0.12±0.0 <sup>D</sup>	1.22±0.2 <sup>D</sup>	6.97±0.5 <sup>bCD</sup>	30.5±1 <sup>aABC</sup>	37.1±8.1 <sup>aA</sup>	11.1±1.8 <sup>BCD</sup>	20±0.2 <sup>ABCD</sup>	31±13.0 <sup>AB</sup>
Cinnamtanina A1 II	ND	ND	1.34±0.0 <sup>D</sup>	6.15±0.61 <sup>bc</sup>	26.0±1.9 <sup>aA</sup>	23.2±6.2 <sup>aA</sup>	12.5±1.6 <sup>B</sup>	23.0±0.7 <sup>A</sup>	25.8±12.1 <sup>A</sup>
Cinnamtanina A1 III	0.06±0.0 <sup>CD</sup>	0.26±0.01 <sup>D</sup>	4.32±1.2 <sup>CD</sup>	19.5±1 <sup>bBCD</sup>	56.0±1.8 <sup>aA</sup>	53.1±8.5 <sup>aA</sup>	26.4±4.1 <sup>BC</sup>	42.7±0.5 <sup>AB</sup>	51.4±13.7 <sup>A</sup>
Cinnamtanina A2	ND	ND	0.25±0.02 <sup>C</sup>	1.31±0.0 <sup>BC</sup>	5.77±0.40 <sup>A</sup>	3.61±1.9 <sup>AB</sup>	2.70±0.3 <sup>ABC</sup>	3.25±0.0 <sup>ABC</sup>	3.37±0.6 <sup>ABC</sup>
Cinnamtanina A3	ND	ND	ND	0.16±0.01 <sup>cb</sup>	0.72±0.01 <sup>aA</sup>	0.46±0.0 <sup>bAB</sup>	0.40±0.1 <sup>AB</sup>	0.34±0.1 <sup>AB</sup>	0.38±0.1 <sup>AB</sup>
<i>Flavonoles</i>									
Quercetina*	90±1 <sup>bd</sup>	318±8 <sup>aA</sup>	346±18 <sup>aA</sup>	110±2 <sup>cd</sup>	199±7 <sup>bBC</sup>	302±10 <sup>aA</sup>	141±11 <sup>bCD</sup>	317±7 <sup>aA</sup>	253±71 <sup>abAB</sup>
Quercetina hexósido	8.38±1.41 <sup>F</sup>	6.59±0.43 <sup>F</sup>	6.76±2.28 <sup>F</sup>	528±10 <sup>aA</sup>	315±7 <sup>bb</sup>	134±6 <sup>cc</sup>	73.6±4.6 <sup>aE</sup>	105±11 <sup>aD</sup>	20.7±4.8 <sup>bF</sup>
Kaempferol*	18.8±2.7 <sup>bc</sup>	36.1±0.7 <sup>aB</sup>	38.8±0.1 <sup>abc</sup>	31.1±0.2 <sup>bBC</sup>	33.2±0.7 <sup>bBC</sup>	45.4±2.6 <sup>aB</sup>	40.6±1.3 <sup>BC</sup>	75.2±1.0 <sup>A</sup>	50.9±17.8 <sup>B</sup>
Kaempferol hexósido	ND	ND	ND	47.0±1.3 <sup>aA</sup>	29.0±0.6 <sup>bb</sup>	17.9±0.7 <sup>cd</sup>	25.7±2.2 <sup>bBC</sup>	47.7±3.6 <sup>aA</sup>	14.4±4.5 <sup>bd</sup>
(Iso)-rhamnetin*	44.7±6.2 <sup>bc</sup>	111±4 <sup>aA</sup>	123±0.4 <sup>aA</sup>	12.8±0.4 <sup>cd</sup>	17.6±0.4 <sup>bd</sup>	26.0±0.4 <sup>aCD</sup>	25.0±2.6 <sup>bCD</sup>	58.7±2.2 <sup>ab</sup>	39.2±13 <sup>abBC</sup>
(Iso)-rhamnetin hexósido	31.7±5.6 <sup>F</sup>	21.7±1.4 <sup>F</sup>	24.7±6.5 <sup>F</sup>	1084±2 <sup>aA</sup>	757±17 <sup>bb</sup>	419±14 <sup>cc</sup>	1461±12 <sup>aE</sup>	199±3 <sup>aD</sup>	53.4±19.0 <sup>bF</sup>
(Iso)-rhamnetin rhamnósido	3.5±0.0 <sup>D</sup>	ND	ND	79.7±9.0 <sup>aA</sup>	43.0±2.1 <sup>bb</sup>	26.2±0.2 <sup>bc</sup>	10.1±0.8 <sup>bCD</sup>	15.9±1.9 <sup>aCD</sup>	4.55±0.85 <sup>cd</sup>
Kaempferol acetyl-hexósido	ND	ND	ND	7.66±0.40 <sup>aC</sup>	5.47±0.13 <sup>bc</sup>	4.48±0.34 <sup>bc</sup>	14.2±1.0 <sup>abB</sup>	22.0±2.1 <sup>aA</sup>	7.70±2.33 <sup>bc</sup>

Los resultados se expresan como media ( $\mu\text{g} / \text{g}$ )  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). ND: no detectado. MAC, orujo de la variedad Malbec; MER, el orujo de la variedad Merlot; SYR, orujo de la variedad de Syrah.

#### **7.4.5. Capacidades antioxidantes de diferentes variedades de orujo de uva tratados con DIC**

Se midió la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en el material de orujo de uva antes y después del tratamiento con DIC (Figura 16). En primer lugar, cabe señalar que la capacidad antioxidante en la matriz completa (Q-DPPH y Q-ABTS) es mayor que la reportada en los extractos (DPPH y ABTS) ya que, al analizar toda la matriz, se considera el aporte de NEPP; mientras que, en los extractos solo se determina la capacidad antioxidante de EPP.

En cuanto al efecto de DIC, si bien originó un aumento significativo de la capacidad antioxidante en todas las fracciones de EPP, no se observó la misma tendencia en la evaluación de la capacidad antioxidante en la matriz completa. Esta observación concuerda con los resultados presentados anteriormente sobre las modificaciones en el perfil de polifenoles. Así, los compuestos liberados y transferidos a la fracción EPP provocarían el aumento de la capacidad antioxidante observado en esos extractos, especialmente a 0.4 MPa y utilizando 4 ciclos. De hecho, la capacidad antioxidante de los orujos de uva se ha relacionado con los niveles totales de fenoles y EPA (De la Cerda-Carrasco y col., 2014).



**Figura 16.** Capacidades antioxidantes. A) y B) en matriz completa. C y D) en extractos

Los resultados se expresan como media ( $\mu\text{g} / \text{g}$ )  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). Las medias con diferentes letras minúsculas en superíndice difieren significativamente entre los grupos, y las diferentes letras mayúsculas en superíndice difieren significativamente entre todas las muestras según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). MAC, orujo de la variedad Malbec; MER, el orujo de la variedad Merlot; SYR, orujo de la variedad de Syrah.

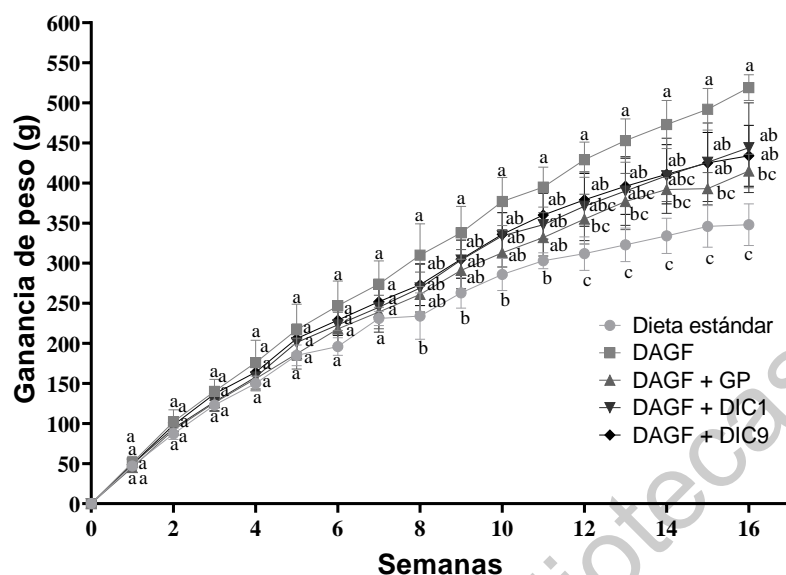
### 7.5. Evaluación *in vivo* de la suplementación de la DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC

Para la evaluación *in vivo* de las matrices modificadas por DIC, se realizó la selección de las matrices caracterizadas por UPLC. El propósito fue corroborar si la modificación fisicoquímica en orujo de uva Malbec generada por DIC mejoró los efectos beneficiosos asociados al consumo de orujo de uva.

La ganancia de peso corporal entre los grupos de control obesos (DAGF) y sanos (Dieta estándar) fue estadísticamente significativa después de ocho semanas. El incremento de peso corporal fue de  $519 \pm 16 \text{ g}$  para el grupo DAGF y  $348 \pm 26 \text{ g}$

para el grupo alimentado con la dieta estándar al final del período experimental. El grupo de animales alimentados con DAGF y suplementada con orujo de uva Malbec sin la aplicación de DIC (DAGF+GP) mostró una disminución del 20% de la ganancia de peso, el grupo alimentado con la DAGF y suplementado con orujo de uva sometido a 0.2 MPa-60 s (DAGF+DIC1) disminuyó 14% su peso corporal y finalmente el grupo alimentado con la DAGF y suplementado con orujo de uva Malbec sometido a 0.4 MPa-120 s (DAGF+DIC9) disminuyó un 16% (Figura 17). Según Ryan y Yockey (2017), una disminución del peso corporal (5-10%) se ha asociado con la prevención de alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad. Sin embargo, estadísticamente, la ganancia de peso de los grupos DAGF+DIC1 y DAGF+DIC9 fue similar al grupo DAGF. DAGF+GP fue el único tratamiento cuya ganancia de peso fue estadísticamente menor en comparación con el grupo alimentado con DAGF durante las últimas cuatro semanas del experimento.

El efecto de la suplementación de orujo de uva Malbec sobre el peso corporal fue muy similar entre todos los grupos, lo que sugiere que los cambios de las matrices alimentarias por DIC no fueron suficientes para generar cambios estadísticamente importantes. Se ha reportado que la suplementación de una dieta alta en grasas con un extracto etanólico-acuoso y uno etanólico de compuestos fenólicos de orujo de uva, no disminuyeron el peso corporal de ratones (Van Hul y Col., 2018). Estos resultados demuestran que la concentración de compuestos fenólicos no está directamente relacionada con el control del peso corporal. Por otro lado, el contenido de fibra dietaria total fue diferente estadísticamente, la muestra sin la aplicación de DIC (GP) tenía la mayor cantidad de fibra (69%); mientras que, las muestras sometidas a DIC (DIC1 y DIC9) tenían una menor cantidad (64 y 63 % respectivamente) (Martínez-Meza y col., 2021).



**Figura 17.** Ganancia de peso en animales alimentados con una DAGF y suplementada con orujo de uva Malbec sometido a DIC.

DAGF, animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa. DAGF+GP, animales alimentados con una DAGF y suplementada con orujo de uva sin la aplicación de DIC. DAGF+DIC1, animales alimentados con una DAGF y suplementada con orujo de uva sometido a 0.2 MPa-60 s. DAGF+DIC9, animales alimentados con DAGF y suplementada con orujo de uva sometido a 0.4 MPa-120 s.

En cuanto al peso del tejido adiposo blanco, conformado por el tejido epididimal, retroperitoneal y mesentérico, éste fue mayor en los animales alimentados con DAGF comparado con el tejido adiposo blanco del grupo alimentado con la dieta estándar. En los animales alimentados con orujo de uva Malbec (con o sin DIC) se observó una disminución de tejido retroperitoneal y mesentérico principalmente (Cuadro 17). La disminución comparada con el grupo alimentado con DAGF fue del 28% en el grupo DAGF+GP, del 5% en DAGF+DIC1 y del 37% en el grupo DAGF+DIC9.

En el grupo DAGF+DIC1, se observó un efecto menor en la disminución del tejido adiposo en comparación con el grupo DAGF+GP. La aplicación de DIC en el orujo de uva que se utilizó para la alimentación del grupo DAGF+DIC1 no indujo la despolimerización de proantocianidinas; sólo se detectó una expansión de la matriz y liberación de antocianinas, con una concentración mayor del 25% respecto a la

del orujo control. Esto sugiere que las antocianinas podrían no estar relacionadas a la disminución del tejido adiposo, y esto podría atribuirse a su baja biodisponibilidad (Shivashankara y Acharya, 2010).

Diferentes autores han reportado que la disminución en el contenido de tejido adiposo puede estar relacionado con la inhibición de la lipasa pancreática inducida por el consumo de las proantocianidinas del orujo de uva. Estas proantocianidinas tienen la capacidad para unirse, formar complejos y precipitar proteínas, siendo este mecanismo propuesto para la inhibición de la lipasa pancreática (Buchholz y Melzig, 2015). Sin embargo, en este estudio el contenido de EPA en las muestras de orujo que se usaron para alimentar a los animales del grupo DGAF+DIC1 y DAGF+DIC9 tenían 13% y 27% más que la muestra de orujo control (DAGF+GP) y el contenido de tejido adiposo en el grupo DAGF+GP1 fue el mayor. El consumo de EPA fue de 2.18, 2.41 y 2.74 mg/rata/día en los grupos DAGF+GP, DAGF+DIC1 y DAGF+DIC9 respectivamente. Por lo tanto, los beneficios sobre el peso corporal del tejido adiposo tampoco estarían relacionados al contenido de proantocianidinas.

En el caso del grupo DAGF+DIC9, la aplicación de DIC en la muestra de orujo que se utilizó para su suplementación generó estructuras más sencillas como productos de la despolimerización de las proantocianidinas (catequina y epicatequina, unidades estructurales de proantocianidinas), las cuales se han reportado como el componente principal del extracto de semilla de uva y responsables de suprimir el aumento de peso y el aumento de tejido adiposo. Dicho estudio se llevó a cabo en ratones C57BL/6J, los animales se alimentaron con una dieta alta en grasa y suplementada con extracto de semilla de uva rico en catequina y epicatequina. El peso de los animales alimentados con la dieta alta en grasa fue de 41.76 g; mientras que, el peso de los animales cuya dieta se suplemento con el extracto fue de 35.95 g, muy similar a los animales alimentados con dieta estándar (33.17 g). En cuanto al peso del tejido adiposo, fue de 4.41 g para los animales alimentados con la dieta alta en grasa, 2.47 g para los animales que se les dio el extracto y de 2.04 g para los animales alimentados con la dieta estándar (Ohyama y col., 2011).

**Cuadro 17.** Efecto sobre el tejido adiposo en ratas alimentadas con una DAGF y suplementadas con orujo de uva Malbec sometida a DIC

	Dieta estándar	DAGF	DAGF+GP	DAGF+DIC1	DAGF+DIC9
Tejido epididimal (%)	1.51±0.07 <sup>b</sup>	3.70±0.28 <sup>a</sup>	3.11±0.37 <sup>a</sup>	3.37±0.40 <sup>a</sup>	3.15±0.30 <sup>a</sup>
Tejido retroperitoneal (%)	1.21±0.36 <sup>b</sup>	4.41±0.16 <sup>a</sup>	3.27±0.48 <sup>b</sup>	4.27±0.29 <sup>a</sup>	3.15±0.22 <sup>b</sup>
Tejido mesentérico (%)	0.80±0.04 <sup>c</sup>	2.01±0.20 <sup>a</sup>	1.44±0.02 <sup>b</sup>	1.91±0.13 <sup>a</sup>	1.26±0.10 <sup>b</sup>
Índice de adiposidad	4.08±0.12 <sup>c</sup>	10.74±0.80 <sup>a</sup>	8.86±0.60 <sup>b</sup>	9.31±0.71 <sup>b</sup>	8.32±0.43 <sup>b</sup>

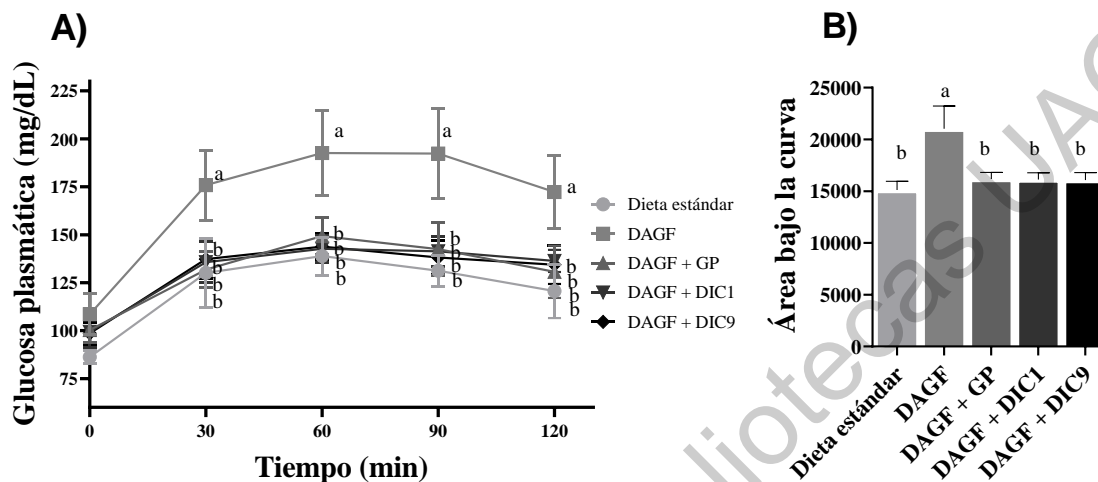
Los resultados se presentan como el promedio ± DE, n = 8. Valores con diferentes letras en misma línea indican diferencia significativa (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ). GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s.

El extracto de orujo de uva se ha asociado con un efecto beneficioso sobre la homeostasis de la glucosa mediante una mejor tolerancia a la glucosa y un menor valor de resistencia a la insulina (Van Hul y col., 2018). Los resultados de los niveles de glucosa durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa se muestran en la Figura 18A. La glucosa en ayunas y posprandial durante los diferentes tiempos de muestreo fue mayor para el grupo de obesos (DAGF) y se observaron resultados similares entre los grupos sanos y tratados. Los grupos tratados (DAGF+GP, DAGF+DIC1, DAGF+DIC9) mostraron valores significativamente más bajos de AUC y estos fueron similares a los del grupo alimentado con dieta estándar (Figura 18B), lo cual indica que GP tratados o no tratados con DIC mejora la intolerancia a la glucosa.

Cabe señalar que los animales alimentados con orujo de uva control presentaron concentraciones de glucosa en sangre similares a los grupos de animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva tratado con DIC. Posiblemente, las tres muestras tienen la mínima concentración de compuesto(s) necesaria para ejercer la máxima actividad sobre la regulación de glucosa exógena;



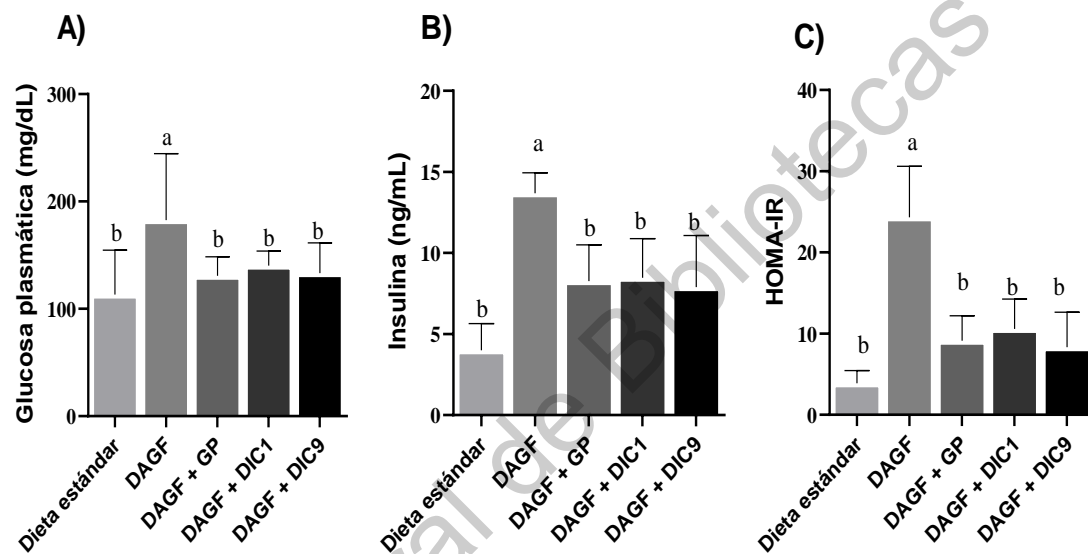
ya que todos los valores de glucosa de los animales tratados fueron estadísticamente similares a los del grupo control sano.



**Figura 18.** Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en homeóstasis de glucosa, A) Curva de tolerancia a la glucosa, B) Área bajo la curva. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s.

En cuanto a la determinación de insulina, glucosa e índice HOMA-IR (Figura 19), el grupo alimentado con DAGF mostró 6,2 veces más valor de HOMA-IR en comparación con el grupo alimentado con la dieta estándar. En los animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva con y sin DIC también se observó una disminución en el valor del índice HOMA-IR. Todos los grupos en donde se suplementó la DAGF con orujo de uva con o sin la aplicación de DIC, fueron estadísticamente similares al grupo alimentado con una dieta estándar. La mejora de la señalización de la insulina se ha asociado a las proantocianidinas de la semilla de uva a través de la activación de la vía PI3K, al reducir la activación de la quinasa de serina y la señalización de las citocinas (Yogalakshmi y col., 2014). El valor de HOMA-IR presentado por todos los grupos tratados con orujo fue estadísticamente similar al sano. Por lo tanto, la concentración de proantocianidinas en el orujo control (454 mg EPA/g), que es el que contiene menos de estos compuestos, podría ser la necesaria para su máxima eficacia.

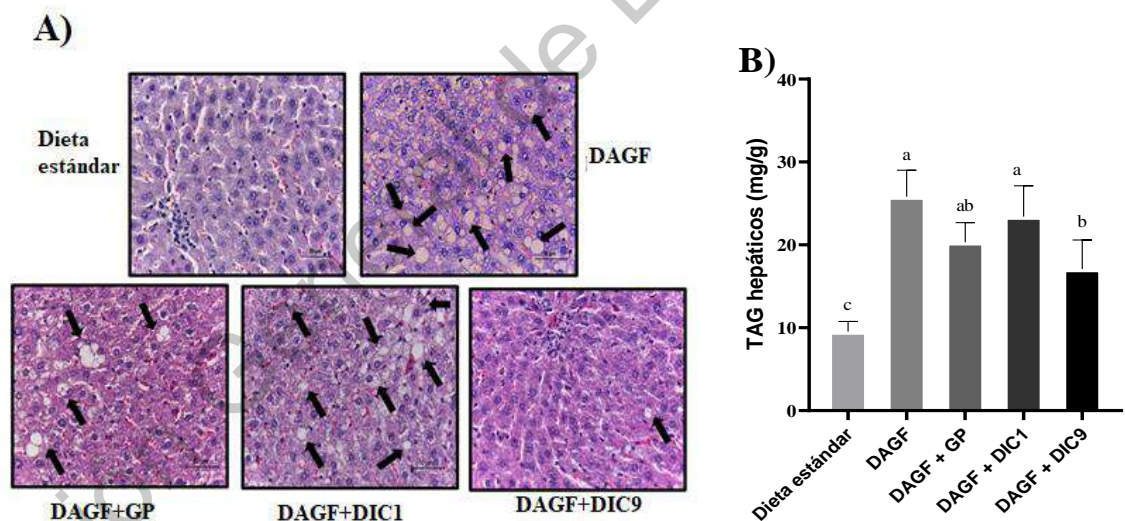
También se ha reportado que el orujo de uva y un extracto obtenido de este mejoran la resistencia a insulina en ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa y este efecto lo relacionaron con el contenido de catequina, epicatequina y quercetina (Rodríguez-Lanzi y col., 2016). Las muestras DIC1 y DIC9, que se utilizaron para la suplementación de la DAGF tenían una mayor cantidad de catequina, epicatequina y quercetina, hasta 2.5, 2.3 y 2.0 veces más comparado con el orujo de uva control.



**Figura 19.** Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en A) Glucosa plasmática, B) insulina y C) HOMA-IR. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s.

Adicionalmente se ha sugerido que la protección de orujo de uva para el desarrollo de diabetes podría estar relacionada con el contenido de fibra dietaria y no con los compuestos fenólicos, los cuales no presentaron diferencias en suero respecto a individuos que no consumieron orujo (Cuadro 18). Esta fibra podría tener la función de atrapar la glucosa en el intestino o generar ácidos grasos de cadena corta, asociados a una disminución de glucosa (Gil-Sánchez y col., 2018). En este estudio el consumo de fibra dietaria total fue de 319 mg/rata/día en el grupo DAGF+GP, 304 mg/rata/día en el grupo DAGF+DIC1 y de 295 mg/rata/día en el grupo DAGF+DIC9 y esto podría explicar la similitud del efecto observado en los valores de HOMA-IR.

Finalmente, en cuanto a esteatosis hepática, que es la acumulación de triglicéridos en el hígado, se reconoce como una complicación común asociada con la obesidad. La Figura 20A muestra el análisis histológico de animales alimentados con DAGF, DAGF suplementada con orujo de uva con y sin DIC, y animales alimentados con una dieta estándar. De acuerdo con las imágenes de histología, el grupo alimentado con DAGF muestra una mayor presencia de vacuolas lipídicas en comparación con el grupo alimentado con la dieta estándar. El análisis morfológico del tejido hepático también indicó que la suplementación de DAGF con DIC9 disminuyó notablemente la acumulación de lípidos, mostrada por la disminución de las gotas lipídicas en comparación con el grupo alimentado con DAGF. La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se muestra en la Figura 20B. Los resultados mostraron que en el grupo DAGF+DIC9 la acumulación de triglicéridos hepáticos fue 54% menor comparado con el grupo alimentado con la DAGF.



**Figura 20.** Efecto de la suplementación de una DAGF con orujo de uva Malbec sometido a DIC en acumulación de triglicéridos en hígado. A) Histología, B) cuantificación de triglicéridos en hígado. GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s.

Se ha reportado que el beneficio de protección de esteatosis hepática está relacionado a su contenido de flavonoides, principalmente catequina, epicatequina y epigallocatequina. Los flavonoides reportados por Martínez-Meza y col. (2021)

fueron más elevados en las muestras de orujo de uva DIC1 y DIC9 comparado con la muestra que no se sometió a DIC, pero los dos primeros mostraron un perfil muy similar; sin embargo, los animales alimentados con DAGF y suplementada con DIC 9 mostró la mayor protección hepática.

Se ha reportado que los principales compuestos detectados en plasma después del consumo de orujo de uva son los ácidos fenólicos, estos además han sido asociados con una capacidad antioxidante plasmática elevada y con una alta prevención de la peroxidación lipídica y la biodisponibilidad de óxido nítrico en ratas (Gerardi y col., 2020). Se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante en heces y suero (Cuadro 18). Esta es una forma indirecta de medir la absorción de los compuestos de la dieta. En ambas muestras biológicas (heces y suero) de los grupos sanos y obesos, no se observó diferencia estadística en CFT (compuestos fenólicos totales) y actividad antioxidante (ABTS). Respecto a los grupos tratados, las muestras de heces de los animales alimentados dietas suplementadas con orujo de uva sometido o no con DIC produjo un aumento del contenido de CFT y de la actividad antioxidante. Los grupos DAGF+DIC1 y DAGF+DIC9 mostraron los mayores valores sin diferencias estadísticas entre ellos. En las muestras de suero, DAGF+DIC9 fue el único grupo con mayor contenido de compuestos fenólicos totales (16%), respecto al grupo obeso.

Los cambios en la capacidad antioxidante proporcionan información sobre la biodisponibilidad de todos los antioxidantes presentes en la matriz alimentaria. Según Pérez-Jiménez y col. (2009), las proantocianidinas asociadas con la estructura de la matriz (NEPA) tienen una menor biodisponibilidad, pero están relacionadas con el aumento de la capacidad antioxidante en el plasma, dicho efecto es atribuido, a una mayor generación de metabolitos en el colon, los cuales se absorben y producen este beneficio. De acuerdo con los resultados, en los animales alimentados con DAGF y suplementada con orujo de uva sometido a DIC (DIC9) se mostró un valor alto de compuestos fenólicos totales y ABTS, por lo que la formación de estructuras más simples debido a la despolimerización de proantocianidinas y

degradación de antocianinas por DIC podría estar relacionada con este efecto. La muestra de orujo de uva que se utilizó para la alimentación del grupo DAGF+GP, tiene principalmente proantocianidinas asociadas a la matriz en comparación con la muestra de DIC9, y la capacidad antioxidante reportada (Cuadro 18) fue menor que los grupos de tratamiento.

Asimismo, el grado de polimerización de las proantocianidinas parece ser un factor importante en su despolimerización. De acuerdo con Rzeppa y col. (2012), a mayor DP, menor cantidad de dímeros y trímeros de proantocianidinas se encuentran en la orina de cerdos alimentados con extractos de proantocianidinas. En este estudio, la muestra de orujo de uva tratada a 0.4 MPa y 120 s (DIC9) las proantocianidinas tenían un grado de polimerización de 1.89 (menor que lo reportado en orujo de uva sin DIC de 2.43 y que lo reportado para la muestra DIC1 de 2.30) y por lo tanto podría estar relacionado con una mayor absorción de compuestos fenólicos más simples.

**Cuadro 18.** Concentración de fenoles totales en subproducto de mango sometido a la descompresión instantánea controlada

	Dieta estándar	DAGF	DAGF+GP	DAGF+DIC1	DAGF+DIC9
<b>Heces</b>					
<b>CFT<sup>1</sup></b>	6.50 ± 0.80 <sup>c</sup>	6.08 ± 1.13 <sup>c</sup>	8.52 ± 0.46 <sup>b</sup>	9.59 ± 0.60 <sup>a</sup>	9.33 ± 0.34 <sup>a</sup>
<b>ABTS<sup>3</sup></b>	25.27 ± 2.91 <sup>c</sup>	25.20 ± 1.52 <sup>c</sup>	30.38 ± 5.51 <sup>b</sup>	40.61 ± 1.82 <sup>a</sup>	40.22 ± 2.61 <sup>a</sup>
<b>Suero</b>					
<b>CFT<sup>2</sup></b>	51.91 ± 7.70 <sup>b</sup>	56.78 ± 4.50 <sup>ab</sup>	54.76 ± 6.68 <sup>ab</sup>	58.15 ± 4.70 <sup>ab</sup>	66.24 ± 7.75 <sup>a</sup>
<b>ABTS<sup>3</sup></b>	31.26 ± 4.41 <sup>c</sup>	32.65 ± 5.36 <sup>bc</sup>	40.82 ± 3.25 <sup>a</sup>	40.14 ± 1.73 <sup>ab</sup>	43.27 ± 2.56 <sup>a</sup>

Los resultados se presentan como el promedio de ocho determinaciones independientes ± EE. Valores con diferentes letras en misma línea indican diferencia significativa (Tukey,  $\alpha < 0.05$ ). <sup>1</sup>GAE mg / 100 g, <sup>2</sup>GAE mg / mL, <sup>3</sup> mmol TE / mL. CFT, compuestos fenólicos totales; GP, orujo de uva sin DIC; DIC1, orujo de uva a 0.2 MPa-60 s; DIC9, orujo de uva a 0.4 MPa-120 s

En resumen, los cambios en la capacidad antioxidante y el contenido de CFT en las muestras, principalmente en los animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva sometido a 0.4 MPa-120 s (DAGF+DIC9), no se asociaron con una mejora en los beneficios a la salud, observándose solamente una ligera mayor

protección en esteatosis hepática, lo que supone que el efecto de DIC en los compuestos bioactivos de orujo de uva no fueron significativos a nivel biológico.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## VIII. CONCLUSIONES

La aplicación de DIC en el subproducto de mango no generó cambios relevantes en la liberación de sus compuestos, lo que podría estar relacionado con la estructura de carbohidratos de la pared celular.

La DIC en orujo de uva favorece la formación de compuestos fenólicos con estructuras más sencillas, por medio de la degradación de antocianinas o bien la hidrólisis de estructuras complejas como las proantocianidinas. Esta tecnología también tiene un efecto en los carbohidratos de la matriz ya que se presenta una expansión de está, asociada a una disminución de fibra insoluble e incremento de la fibra soluble y azúcares simples, sugiriendo una degradación de estas macromoléculas, principalmente en orujo de uva.

El orujo de uva mostró efectos beneficiosos sobre la ganancia de peso, mejoró la intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina, así como la acumulación de triglicéridos en hígado en un estudio en un modelo animal de obesidad. La aplicación de DIC, aunque dio lugar un mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en plasma de los animales tratados, no potenció dichos beneficios. Por lo tanto, los cambios en la liberación de compuestos fenólicos y la hidrólisis parcial de polímeros de flavan-3-oles, así como, la degradación de antocianinas no fue significativos para potenciar estos efectos biológicos. Esto parece indicar que los beneficios del orujo de uva podrían estar relacionados con los compuestos fenólicos, pero también la fibra dietaria, componente mayoritario, podría tener un efecto en el control de la obesidad y sus complicaciones.

El orujo de uva es una alternativa económica con beneficios importantes relacionada con enfermedades metabólicas, principalmente, la prevención de la resistencia a insulina, y la aplicación de DIC no potencia sus beneficios.

## IX. REFERENCIAS

- Alexandre, E. M. C., Moreira, S. A., Castro, L. M. G., Pintado, M., & Saraiva, J. A. (2017). Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: Sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. *Food Reviews International*, 9129, 1–32.
- Allaf, T., Mounir, S., Tomao, V., & Chemat, F. (2012). Instant controlled pressure drop combined to ultrasounds as innovative extraction process combination: fundamental aspects. *Procedia Engineering*, 42(4), 1061–1078.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Rao, U. P. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102, 1006–1011.
- Amaya-Cruz, D. M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I. F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., gallegos-Corona, M. A., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods*, 17, 93–102.
- Amoako, D., & Awika, J. M. (2016). Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Current Opinion in Food Science*, 8, 14–18.
- Barazzoni, R., Cappellari, G. G., Ragni, M., & Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders-studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 23(2), 149–157.
- Barba, A. O., Hurtado, M. C., Mata, M. S., Ruiz, V. F., & De Tejada, M. L. S. (2006). Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328–336.
- Bhatt, T., & Patel, K. (2020). Carotenoids: potent to prevent diseases review. *Natural Products and Bioprospecting*, 10(3), 109–117.
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, 152, 558–565.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin–cell wall interactions. *Food Chemistry*, 206, 239–248.



Ben Amor, B., & Allaf, K. (2009). Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Food Chemistry*, 115(3), 820–825.

Ben Amor, B., Lamy, C., Andre, P., & Allaf, K. (2008). Effect of instant controlled pressure drop treatments on the oligosaccharide's extractability and microstructure of Tephrosia purpurea seeds. *Journal of Chromatography A*, 1213, 118–124.

Berardini, N., Carle, R., & Schierber 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 Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2208–2216.

Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594.

Berglund, J., Mikkelsen, D., Flanagan, B. M., Dhital, S., Gaunitz, S., Henriksson, G. Lindström, M. E., Yakubov, G. E., Gidley, M. J., & Vilaplana, F. (2020). Wood hemicelluloses exert distinct biomechanical contributions to cellulose fibrillar networks. *Nature Communications*, 11(1), 1–16.

Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J. A., & Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 221–239.

Bindon, K. A., Bacic, A., & Kennedy, J. A. (2012). Tissue-specific and developmental modifications of grape cell walls influence the adsorption of proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9249–9260.

Blackwood, A. D., Salter, J., Dettmar, P. W., & Chaplin, M. F. (2000). Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 120(4), 242–247.

Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and *in vitro* kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) by-products. *Food & Function*, 6, 859–868.

Blüher, M. (2013). Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best practice & research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 163–177.

- Bohn, T., Mcdougall, G. J., Alegría, A., Alminger, M., Arrigoni, E., Aura, A. M., & Santos, C. N. (2015). Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 1307–1323.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Buchholz, T., & Melzig, M. F. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, 81(10), 771–783.
- Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N. S., & Versteeg, C. (2010). Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10076–10084.
- Chacar, S., Tarighi, M., Fares, N., Faivre, J. F., Louka, N., & Maroun, R. G. (2018). Identification of phenolic compounds-rich grape pomace extracts urine metabolites and correlation with gut microbiota modulation. *Antioxidants*, 7(6), 75.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chen, L., Cao, H., & Xiao, J. (2018). Polyphenols: Absorption, bioavailability, and metabolomics. In *Polyphenols: properties, recovery, and applications* (pp. 45-67). Woodhead Publishing.
- Chen, J. Y., Piva, M., & Labuza, T. P. (1984). Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. *Journal of Food Science*, 49(1), 59–63.
- Copado-Romero, J. L. (2020). Identificación de orujo de uva de diferentes vinícolas de la región de Querétaro con potencial para el control de riesgo cardiovascular (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro.
- De Bruyne, T., Steenput, B., Roth, L., De Meyer, G. R., Santos, C. N. D., Valentová, K., Dambrova, M., & Hermans, N. (2019). Dietary Polyphenols Targeting Arterial Stiffness: Interplay of Contributing Mechanisms and Gut Microbiome-Related Metabolism. *Nutrients*, 11(3), 578.
- De la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., & Obrequé-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces

from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1521-1527.

Del Pino-García, R., García-Lomillo, J., Rivero-Pérez, M. D., González-SanJosé, M. L., & Muñiz, P. (2015). Adaptation and validation of QUick, easy, new, CHEap, and reproducible (QUENCHER) antioxidant capacity assays in model products obtained from residual wine pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6922–6931.

Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44, 2712–2720.

Díaz-Rivas, J. O., González-Laredo, R. F., Chávez-Simental, J. A., Montoya-Ayón, J. B., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., & Rocha-Guzmán, N. E. (2018). Comprehensive Characterization of Extractable Phenolic Compounds by UPLC-PDA-ESI-QqQ of *Buddleja scordioides* Plants Elicited with Salicylic Acid. *Journal of Chemistry*, 1, 1-10.

Dikeman, C. L., & Fahey, G. C. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 649–663.

Edwards, C. A., Havlik, J., Cong, W., Mullen, W., Preston, T., Morrison, D. J., & Combet, E. (2017). Polyphenols and health: Interactions between fibre, plant polyphenols and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*, 42, 356–360.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438–450.

Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316, 129–139.

Garau, M. C., Simal, S., Rossello, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014–1024.

Gerardi, G., Cavia-Saiz, M., Rivero-Pérez, M. D., González-SanJosé, M. L., & Muñiz, P. (2020). The dose–response effect on polyphenol bioavailability after intake of white and red wine pomace products by Wistar rats. *Food & Function*, 11(2), 1661–1671.

Gil-Sánchez, I., Esteban-Fernández, A., de Llano, D. G., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrana, A., Salazar, N., Moreno-Arribas, M. V. (2018). Supplementation with

grape pomace in healthy women: Changes in biochemical parameters, gut microbiota and related metabolic biomarkers. *Journal of Functional Foods*, 45, 34–46.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (1), F1-2.

Gnanasambandam, R., & Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68(3), 327–332.

Gondi, M., Basha, S. A., Bhaskar, J. J., Salimath, P. V., & Prasada Rao, U. J. S. (2015). Anti-diabetic effect of dietary mango (*Mangifera indica* L.) peel in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 991–999.

Goñi, I., Martín, N., & Saura-Calixto, F. (2005). *In vitro* digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chemistry*, 90, 281–286.

Gowman, A. C., Picard, M. C., Rodriguez-Urbe, A., Misra, M., Khalil, H., Thimmanagari, M., & Mohanty, A. K. (2019). Physicochemical Analysis of Apple and Grape Pomaces. *BioResources*, 14(2), 3210–3230.

Hamoud-Agha, M. M., & Allaf, K. (2019). Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Technology in Food Preservation: Fundamental and Industrial Applications (pp 1-17). In *Food Preservation-From Basics to Advanced Technologies*. IntechOpen.

Han, H. J., Jung, U. J., Kim, H. J., Cho, S. J., Kim, A. H., Han, Y., & Choi, M. S. (2016). Combined supplementation with grape pomace and omija fruit ethanol extracts dose-dependently improves body composition, plasma lipid profiles, inflammatory status, and antioxidant capacity in overweight and obese subjects. *Journal of Medicinal Food*, 19(2), 170–180.

Harnafi, H., Ramchoun, M., Tits, M., Wauters, J. N., Frederich, M., Angenot, L., Aziz, M., Alem, C., & Amrani, S. (2013). Phenolic acid-rich extract of sweet basil restores cholesterol and triglycerides metabolism in high fat diet-fed mice: A comparison with fenofibrate. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(4), 393–397.

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

Hocking, S., Samocha-Bonet, D., Milner, K. L., Greenfield, J. R., & Chisholm, D. J. (2013). Adiposity and insulin resistance in humans: the role of the different tissue and cellular lipid depots. *Endocrine Reviews*, 34(4), 463–500.

- Hogan, S., Canning, C., Sun, S., Sun, X., & Zhou, K. (2010). Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11250–11256.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1276–1282.
- Howarth, N. C., Saltzman E., & Roberts, S. B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition Reviews*, 59, 129-139.
- Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327.
- Iqbal, M., Saeed, A., & Zafar, S. I. (2009). FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> removal by mango peel waste. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 161–171.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489–5493.
- Kamal, I. M., Sobolik, V., Kristiawan, M., Mounir, S. M., & Allaf, K. (2008). Structure expansion of green coffee beans using instantaneous controlled pressure drop process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 534–541.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740–1746.
- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2009). Procyanidin Content of Grape Seed and Pomace, and Total Anthocyanin Content of Grape Pomace as Affected by Extrusion Processing. *Journal of Food Science*, 74(6), H174–H182.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713–3717.
- Kim, H., Bartley, G. E., Arvik, T., Lipson, R., Nah, S. Y., Seo, K., & Yokoyama, W. (2014). Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1919–1925.

Kocabaş, D. S., Köle, M., & Yağcı, S. (2020). Development and optimization of hemicellulose extraction bioprocess from poppy (*Papaver somniferum* L.) stalks assisted by instant controlled pressure drop (DIC) pretreatment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 1-9.

Kopec, R. E., & Failla, M. L. (2018). Recent advances in the bioaccessibility and bioavailability of carotenoids and effects of other dietary lipophiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 16–30.

Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K., Horníčková, Š, Pivec, V., Skala, O., & Přebyl, J. (2013). Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Industrial Crops and Products*, 49, 445–453.

Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2015). A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules*, 20(5), 7890–7914.

Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2, 1266–1289.

Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 10–18.

Leterme, P., Froidmont, E., Rossi, F., & Théwis, A. (1998). The high water-holding capacity of pea inner fibers affects the ileal flow of endogenous amino acids in pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1927–1934.

Li, H., Parry, J., Weeda, S., Ren, S., Castonguay, T. W., & Guo, T. L. (2016). Grape pomace aqueous extract (GPE) prevents high fat diet-induced diabetes and attenuates systemic inflammation. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 647–660.

Lovegrove, A., Edwards, C. H., De Noni, I., Patel, H., El, S. N., Grassby, T., Zielke, C., Ulmius, M., Nilsson, L., Butterworth, P. J., Ellis, P. R., & Sherwy, P. R. (2017). Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 237–253.

Lu, P., & Hsieh, Y. L. (2012). Cellulose isolation and core-shell nanostructures of cellulose nanocrystals from chardonnay grape skins. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2546–2553.

Lundgren, M., Svensson, M., Lindmark, S., Renström, F., Ruge, T., & Eriksson, J. W. (2007). Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and 'hyperleptinaemia'. *Diabetologia*, 50(3), 625–633.

- Maldonado-Celis, M. E., Yahia, E. M., Bedoya, R., Landázuri, P., Loango, N., Aguillón, J., & Ospina, J. C. G. (2019). Chemical composition of mango (*Mangifera indica* L.) fruit: nutritional and phytochemical compounds. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1073-1086.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3), 1520–1526.
- Martínez-Meza, Y., Pérez-Jiménez, J., Nuria, E. R. G., Mario, E. R. G., Alonzo-Macías, M., & Reynoso-Camacho, R. (2021). Modification on the polyphenols and dietary fiber content of grape pomace by Instant Controlled Pressure Drop. *Food Chemistry*, 360, 1–8.
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., & Rupérez, P. (2010). High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 445–450.
- Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., & Frankel, E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1783–1787.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & Ricardo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6475–6481.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1(3), 233–253.
- Mounir, S., Allaf, T., Berka, B., Hassani, A., & Allaf, K. (2014). Instant Controlled Pressure Drop technology: From a new fundamental approach of instantaneous transitory thermodynamics to large industrial applications on high performance-high controlled quality unit operations. *Comptes Rendus Chimie*, 17, 261–267.
- Mounir, S., Allaf, T., Mujumdar, A. S., & Allaf, K. (2012). Swell drying: Coupling instant controlled pressure drop DIC to standard convection drying processes to intensify transfer phenomena and improve quality—An overview. *Drying Technology*, 30(14), 1508–1531.
- Namir, M., Elzahar, K., Ramadan, M. F., & Allaf, K. (2017). Cactus pear peel snacks prepared by instant pressure drop texturing: Effect of process variables on bioactive compounds and functional properties. *Food Measure*, 11, 388–400.

Nayak, A., Bhushan, B., & Rodriguez-Turienzo, L. (2018). Recovery of polyphenols onto porous carbons developed from exhausted grape pomace: A sustainable approach for the treatment of wine wastewaters. *Water Research*, 145, 741–756.

Noor, S. A. A., Siti, N. M., & Mahmud, N. J. (2015). Chemical Composition, Antioxidant Activity and Functional Properties of Mango (*Mangifera indica* L. var Perlis Sunshine) Peel Flour (MPF). *Applied Mechanics and Materials*, 754, 1065–1070.

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., & Kahn, C. R. (2003). Muscle-specific PPAR $\gamma$ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(4), 608–618.

Ohyama, K., Furuta, C., Nogusa, Y., Nomura, K., Miwa, T., & Suzuki, K. (2011). Catechin-rich grape seed extract supplementation attenuates diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(3), 250–258.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76, 6–15.

Peng, J., Yi, J., Bi, J., Chen, Q., Wu, X., Zhou, M., & Liu, J. (2018). Freezing as pretreatment in instant controlled pressure drop (DIC) texturing of dried carrot chips: Impact of freezing temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 365–373.

Peng, J., Bi, J., Yi, J., Wu, X., Zhou, M., & Zhao, Y. (2019). Characteristics of cell wall pectic polysaccharides affect textural properties of instant controlled pressure drop dried carrot chips derived from different tissue zone. *Food Chemistry*, 293, 358–367.

Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: The current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12713–12724.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., & Saura-Calixto, F. (2009). Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: an approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International*, 42(10), 1381–1388.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274–285.



Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26, 118–129.

Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Taberner, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2009). Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 102–107.

Phillips, C. M. (2017). Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1), 85–100.

Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82, 53–66.

Ranganath, K. G., Shivashankara, K. S., Roy, T. K., Dinesh, M. R., Geetha, G. A., Pavithra, K. C., & Ravishankar, K. V. (2018). Profiling of anthocyanins and carotenoids in fruit peel of different colored mango cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, 55(11), 4566–4577.

Ranjbar, N., Eikani, M. H., Javanmard, M., & Golmohammad, F. (2016). Impact of instant controlled pressure drop on phenolic compound's extraction from pomegranate peel. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. XXXX

Rashidi, S., Eikani, M. H., & Ardjmand, M. (2018). Extraction of *Hyssopus officinalis* L. essential oil using instant controlled pressure drop process. *Journal of Chromatography A*, 1579, 9–19.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

Renard, C. M. G. C., Watrelot, A. A., & Le Bourvellec, C. (2017). Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science and Technology*, 60, 43–51.

Reynoso-Camacho, R., Sotelo-González, A. M., Patiño-Ortiz, P., Rocha-Guzmán, N. E., & Pérez-Ramírez, I. F. (2021). Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low-and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols. *Food and Bioproducts Processing*, 127, 371–387.

Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2017). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and

bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531-2548.

Robertson, J. A., De Monredon, F. D., Dysseleer, P., Guillon, F., Amadò, R., & Thibault, J. F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *LWT - Food Science and Technology*, 33, 72–79.

Rodríguez-González, S., Gutiérrez-Ruiz, I. M., Pérez-Ramírez, I. F., Mora, O., Ramos-Gomez, M., & Reynoso-Camacho, R. (2017). Mechanisms related to the anti-diabetic properties of mango (*Mangifera indica* L.) juice by-product. *Journal of Functional Foods*, 37, 190–199.

Rodriguez-Lanzi, C. R., Perdicaro, D. J., Antonioli, A., Fontana, A. R., Miatello, R. M., Bottini, R., & Prieto, M. A. V. (2016). Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food & Function*, 7(3), 1544–1553.

Romero-Cano, L. A., Gonzalez-Gutierrez, L. V., Baldenegro-Perez, L. A., & Medina-Montes, M. I. (2016). Preparation of orange peels by instant controlled pressure drop and chemical modification for its use as biosorbent of organic pollutants. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 481–491.

Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2006). Total polyphenol intake estimated by a modified Folin–Ciocalteu assay of urine. *Clinical chemistry*, 52(4), 749–752.

Ryan, D. H., & Yockey, S. R. (2017). Weight loss and improvement in comorbidity: differences at 5%, 10%, 15%, and over. *Current Obesity Reports*, 6(2), 187–194.

Rzeppa, S., Bittner, K., Döll, S., Dänicke, S., & Humpf, H. U. (2012). Urinary excretion and metabolism of procyanidins in pigs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(4), 653–665.

Sampaio, C. D. G., Silva, J. G. A. E., De Brito, E. S., Becker, H., Trevisan, M. T. S., & Owen, R. W. (2019). Chromium (VI) remediation in aqueous solution by waste products (peel and seed) of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6), 5588–5600.

Sánchez-Orozco, R., Hernández, P. B., Morales, G. R., Núñez, F. U., Villafuerte, J. O., Lugo, V. L., Ramírez, N. F., Díaz, C. E. B., & Vázquez, P. C. (2014). Characterization of lignocellulosic fruit waste as an alternative feedstock for bioethanol production. *BioResources*, 9(2), 1873–1885.

Sánchez, C., Baranda, A. B., & de Maraón, I. M. (2014). The effect of high pressure and high temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables. *Food Chemistry*, 163, 37–45.

Sánchez-Valdepeñas, V., Barrajon, E., Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Valero, M., & Saura, D. (2015). Effect of instant controlled pressure drop (DIC) pre-treatment on conventional solvent extraction of phenolic compounds from grape stalk powder. *Industrial Crops and Products*, 76, 545–549.

Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094–1117.

Sasot, G., Martínez-Huélamo, M., Vallverdú-Queralt, A., Mercader-Martí, M., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach. *Food Research International*, 100, 435–444.

Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303–4306.

Saura-Calixto, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 43–49.

Saura-calixto, F. (2012). Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11195–11200.

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073–2085.

Shivashankara, K. S., & Acharya, S. N. (2010). Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1), 227–241.

Singh, V., & Vijay-Kumar, M. (2020). Beneficial and detrimental effects of processed dietary fibers on intestinal and liver health: health benefits of refined dietary fibers need to be redefined!. *Gastroenterology Report*, 8(2), 85–89.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., de Moraes, S. M., de Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. N., & Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*, 34, 135–142.

- Tan, C., Wei, H., Zhao, X., Xu, C., & Peng, J. (2017). Effects of dietary fibers with high water-binding capacity and swelling capacity on gastrointestinal functions, food intake and body weight in male rats. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1308118.
- Tejada-Ortigoza, V., Garcia-Amezquita, L. E., Serna-Saldívar, S. O., & Welti-Chanes, J. (2016). Advances in the functional characterization and extraction processes of dietary fiber. *Food Engineering Reviews*, 8, 251–271.
- Téllez-Pérez, C., Cardador-Martínez, A., Mounir, S., Montejano-Gaitán, J. G., Sobolik, V., & Allaf, K. (2013). Effect of Instant Controlled Pressure Drop Process Coupled to Drying and Freezing on Antioxidant Activity of Green “Poblano” Pepper (*Capsicum annum* L.). *Food and Nutrition Sciences*, 4(3), 321–334.
- Tomaz, I., Šikuten, I., Preiner, D., Andabaka, Ž., Huzanić, N., Lesković, M., Kontić, J. K., & Ašperger, D. (2019). Stability of polyphenolic extracts from red grape skins after thermal treatments. *Chemical Papers*, 73(1), 195–203.
- Touriño, S., Fuguet, E., Vinardelu, M. P., Cascante, M., & Torres, J. L. (2009). Phenolic metabolites of grape antioxidant dietary fiber in rat urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11418–11426.
- Ulla, A., Rahman, M. T., Habib, Z. F., Rahman, M. M., Subhan, N., Sikder, B., & Alam, M. A. (2016). Mango peel powder supplementation prevents oxidative stress, inflammation, and fibrosis in carbon tetrachloride induced hepatic dysfunction in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 41, 1–9.
- Urquiaga, I., D’Acuña, S., Pérez, D., Dicenta, S., Echeverría, G., Rigotti, A., & Leighton, F. (2015). Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: A randomized controlled trial. *Biological Research*, 48(1), 1-10.
- Van Hul, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., & Cani, P. D. (2018). Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(4), E334–E352.
- Veilleux, A., Caron-Jobin, M., Noël, S., Laberge, P. Y., & Tchernof, A. (2011). Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. *Diabetes*, 60(5), 1504–1511.
- Velderrain-Rodríguez, G., Quirós-Sauceda, A., Mercado-Mercado, G., Ayala-Zavala, J. F., Astiazarán-García, H., Robles-Sánchez, R. M., & González-Aguilar, G. A. (2016). Effect of dietary fiber on the bioaccessibility of phenolic compounds of mango, papaya and pineapple fruits by an *in vitro* digestion model. *Food Science and Technology*, 36, 188–194.

Wanders, A. J., van den Borne, J. J. G. C., de Graaf, C., Hulshof, T., Jonathan, M. C., Kristensen, M., & Feskens, E. J. M. (2011). Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*, 12, 724–739.

Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101–111.

Yang, J., Li, Y., Wang, F., & Wu, C. (2010). Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6525–6531.

Ye, J. H., Jin, J., Liang, H. L., Lu, J. L., Du, Y. Y., Zheng, X. Q., & Liang, Y. R. (2009). Using tea stalk lignocellulose as an adsorbent for separating decaffeinated tea catechins. *Bioresource Technology*, 100(2), 622–628.

Yogalakshmi, B., Bhuvanewari, S., Sreeja, S., & Anuradha, C. V. (2014). Grape seed proanthocyanidins and metformin act by different mechanisms to promote insulin signaling in rats fed high calorie diet. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8(1), 13–22.

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.

Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 221–237.

Yu, J., Bansode, R. R., Smith, I. N., & 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 Functional*, 8, 2731–2738.

Yunoki, K., Sasaki, G., Tokuji, Y., Kinoshita, M., Naito, A., Aida, K., & Ohnishi, M. (2008). Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12052–12058.

Zhao, M., Luo, Y., Li, Y., Liu, X., Wu, J., Liao, X., & Chen, F. (2013). The identification of degradation products and degradation pathway of malvidin-3-glucoside and malvidin-3, 5-diglucoside under microwave treatment. *Food Chemistry*, 141(3), 3260–3267.

Zhao, X., Zhu, H., Zhang, G., & Tang, W. (2015). Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders. *Powder Technology*, 286, 838–844.

Zhu, F. (2017). Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398, 1–24.

Zurita, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2012). Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 936–939.

Dirección General de Bibliotecas UAQ