

Componentes funcionales en Nanche (*Byrsonimacrassifolia*(L)Kunth)

Erick López, Amado Navarro, Noelia Manchón y Jorge Herrera

E. López, A. Navarro, N. Manchón y J. Herrera
Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma 168, Barrio Santiago Mihuacan,
Izúcar de Matamoros, Puebla, 74420, México.

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,
Guanajuato, 2014.

Abstract

The aim of this study was to determine the physicochemical properties of nance samples (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) dehydrated by convective and freeze-drying techniques, the analysis of the nutraceutical phenolic compounds in nance extracts and the obtainment of tablet and capsule forms to improve the antioxidant intake of vulnerable populations. Dehydrated and lyophilized samples were obtained at 60°C and 55°C, respectively and analyzed for moisture content, pH, titratable acidity, water activity and vitamin C. Tablets and capsules were evaluated for weight, diameter, height, hardness, friability and disintegration. Concerning phenolic compounds, high-performance liquid chromatography analysis with UV and mass spectrometric detection was performed. According to the physicochemical analysis, dehydrated and freeze-dried nance, turns out to be a good alternative as an ingredient in food formulations, showing no differences in vitamin C contents with in dehydration processes. The tablets meet quality control, except for the hardness. The starch proved to be a very effective diluent/binder; especially for tablets. Capsules of 90% dehydrated nance showed the better performance. Total phenols content of nance extracts was $291 \pm 25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, with about 50% of catechin and derivatives. A total of 23 compounds were identified for the first time in nance extracts.

2 Introducción

El fruto del nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), muy conocido en países de la América tropical y subtropical como México, Colombia, Venezuela y Brasil, es una pequeña drupa globosa, variable en tamaño, muy olorosa (aroma a queso rancio), con sabor agradable y variado (insípido, dulce, ácido o astringente), que posee valor nutritivo y posibilidades de industrialización y comercialización (Fernández, 2012). El mesocarpio que constituye hasta el 40% del fruto, es la parte comestible. La cosecha se lleva a cabo de agosto a septiembre (Velázquez de Klimo, 2006; Rezende y Fraga 2003). En México está distribuido en distintos estados del centro del país.

El fruto actualmente es limitado a la recolección y venta local por temporada, aunque posee un valor nutricional adecuado de carbohidratos solubles, fibra, minerales (como Calcio y Fósforo), vitaminas (como Vitamina C) y elementos funcionales como catequinas, taninos, carotenoides entre otros (Jiménez y cols., 2012). Debido a ello este fruto es una fuente importante de carbohidratos en el Estado de Morelos, Guerrero y Puebla donde la población rural lo consume de forma constante.

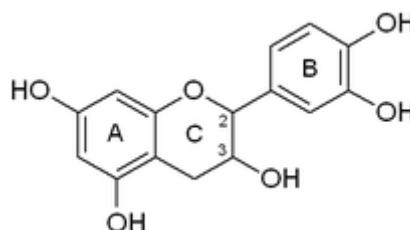
En México el nanche es consumido fresco y en diversos productos, algunos de ellos son en forma de jugos, néctares, licor, producto de humedad intermedia, congelados, pasteles y postres (mermeladas, ates, gelatinas, etc.) (Fuentes y Arana, 2008; Rosales, 2010; Caballero *et al.*, 2012). Los usos medicinales que se le adjudican; son en la infusión de vapores de la corteza usados como astringentes y para detener la diarrea, en algunas ocasiones para bajar la fiebre y como medicamento para contrarrestar úlceras.

Las propiedades nutraceuticas del nanche (en general de otras especies vegetales), se deben a los antioxidantes presentes en sus frutos, hojas y corteza.

Los sistemas de antioxidantes son la respuesta del organismo a la permanente producción de especies reactivas de oxígeno que dañan estructuras biológicas y comprenden fundamentalmente a los sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidada, así como a los sistemas no enzimáticos de sustancias como los carotenoides, las vitaminas C y E, los compuestos fenólicos, etc., muchos de ellos aportados por la dieta en la que se incluyen frutas y vegetales y otros suplementos (Silva *etal.*,2007).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que juegan un rol importante en la defensa y fisiología de las plantas y también algunos de ellos son sintetizados y acumulados en las células de las mismas como un mecanismo de defensa contra ciertos micro organismos. Por ejemplo, los flavonoides, una variada familia de estos compuestos, protegen a las plantas de la radiación en la región ultravioleta B (280 a 320 nm que afecta los ácidos nucleicos y las enzimas metabólicas. Los compuestos fenólicos se presentan primariamente como glucósidos. La glucosa es el principal grupo glicosídico, aunque también son comunes la arabinosa, la galactosa, la ramnosa y la xilosa. También se presentan conjugados con ácidos orgánico salifáticos, aminas, lípidos, oligosacáridos y otros sustituyentes (Iwashima,2003; Manach *et al.*, 2004;Linet *al.*, 2002).En específico, el nanche es rico en catequinas (Geissetal.,1995;Fernández,2012). El término de catequinas se utiliza para referirse a una de las familias de los flavonoides, específicamente los 3-flavanoles o simplemente los flavanoles:

Figura 2. Molécula de catequina



Las catequinas se encuentran en el té verde y otras especies de plantas, considerándose como compuestos de alto valor para la dieta humana y por supuesto como componentes esenciales en los alimentos funcionales. Esto se debe fundamentalmente a la capacidad de interactuar con los radicales libres formando compuestos intermedios de baja reactividad inhibiendo los procesos de oxidación (Crespy & Williamsom, 2004; Barret oet *al.*, 2009; Castillo *etal.*, 2009; Chanda & Dave, 2009; Rufino*etal.*, 2009; Hudthagos oiet *al.* ,2011). Es conveniente recordar que muchos procesos perniciosos o degenerativos a nivel celular, se originan precisamente en procesos de oxidación. Entre otros beneficios para la salud (con base en experimentos en animales y humanos) se han señalado: Acción anticancerígena e inhibición de procesos mutagénicos (Sartippouret *al.*, 2002; Kunduet *al.*,2003;CassiaR.,2006); Actividad anti microbiana, incluida la anti diarreica (Figuereidoet *al.*,2005;Michelin*etal.*,2008;Rivero*etal.*,2009); Actividad contra ulceraciones y daños de la piel (Sannomiya*etal.*,2005;Heinrich*etal.*,2006); Actividad anti espasmogénica Reducción de los efectos del colesterol, la hipertensión, la diabetes y la obesidad (Miuraet *al.*,2001;Löestet*al.*,2002;Wolfram*etal.*,2006;Maki*etal.*,2009;).

Las propiedades nutraceuticas y medicinales del nanche, conocidas por las culturas pre-hispanicas, se deben a la presencia de estos antioxidantes naturales, entre ellos, las catequinas (Martínez, 1999). Al convertir un alimento fresco o en uno procesado (deshidratado) se añade valor agregado a la materia prima utilizada. Además se reducen los costos de transporte, distribución y almacenaje debido a la reducción de peso y volumen del producto en fresco. Hoy en día, muchos alimentos deshidratados sirven de base para el desarrollo y formulación de nuevos productos, ya que estos al ser fuentes de proteínas, vitaminas, minerales, fibra dietética y antioxidantes; son considerados como componentes o ingredientes de alimentos funcionales, debido a su fácil incorporación en productos lácteos (leches, postres, yogurt, helados), galletas, pasteles, sopas instantáneas y en platos preparados (Mallap, 2012). La biodisponibilidad de extractos naturales y de sus componentes funcionales se ha investigado y publicado recientemente, las capsulas y tabletas, entre otras formas, resultan ser un vehículo adecuado para ingerir, de manera dosificada, los principios activos de extractos de frutos y plantas que se hayan sometido a un tipo de proceso de deshidratación.

El conocimiento de las características farmacocinéticas de los mayores componentes de los extractos en sus diferentes formulaciones deberán seguir la optimización de las dosis que den solución a las necesidades del consumidor (Agrosiét *al.*, 2000)

Existe una fuerte tendencia a nivel mundial en lograr una mayor calidad de vida, incrementándose el consumo de productos dietéticos, nutraceuticos y farmaceuticos obtenidos a partir de fuentes naturales. Este trabajo se enfocó a la caracterización físico-química del nanche deshidratado por secado convectivo y liofilización, su influencia en formulaciones farmaceuticas así como la determinación de los compuestos fenólicos en extractos de nanche.

2.1 Materiales y métodos

Materia prima. Se utilizó nanche fresco de segunda calidad adquirido en el mercado local, metabisulfito de Sodio, ácido ascórbico, ácido cítrico (grado alimenticio).

El fruto “nanche” se limpió utilizando una lavadora giratoria por aspersion (Marca JERSA) durante 10 min, posteriormente se desinfecto utilizando una solución de plata ionizable estable (Microdyn®). Sucesivamente, a la fruta se le retiro el hueso, de manera manual. Se pesó la pulpa y el hueso obtenido, con la finalidad de realizar los cálculos de ácidos a utilizar durante el escaldado. Dicho proceso, se realizó a 50°C por 20 min con una concentración de ácidos de 1.5%p/p (Reisycols., 2006). La pulpa se dejó escurrir por unos 5 min y se colocaron en las charolas para proceder a su deshidratación.

Proceso de secado. Las experiencias del deshidratado se llevaron acabo, a 60°C por 6h en un secador de charolas (Marca:MAPISA) con velocidad de aire constante (1.5 m/s), hasta un contenido de humedad de 15%(b.h.) y a promedio de 0.35.

Proceso de Liofilización. Se realizó en un Liofilizador industrial LabConco (LabConco Corp.KansasCity,USA) a una temperatura de -55°C y una presión de vacío de 5-10 micrones de Hg.

Análisis Físico-químicos. Se realizaron los análisis físico-químicos del contenido de humedad, pH, acidez titulable, A_w y °Brix en el tiempo 0 y al final del secado. La medición de los sólidos solubles (°Brix) fueron medidos en un refractómetro marca ATAGO, modelo MasterT; en base a la norma NMX-F436-1982. La acidez titulable (%) se midió de acuerdo a la norma mexicana NMX-FF-011-1982 y se reportó como porcentaje de ácido cítrico. La medición del pH se llevó a cabo utilizando un Potenciómetro HANNA HI991300 y teniendo como base la norma NMX-F-317-S-1978. La actividad de agua (A_w) fue medida en un Aqualab Serie4 TE.

Determinación de actividad de agua (A_w) en tabletas: Se utilizó el equipo AQUA-LAB modelo 4TE. Para la determinación, se calibró el equipo con soluciones estándar de NaCl ($A_w=0.76\pm 0.003$) y LiCl ($A_w=0.50\pm 0.003$) a una temperatura controlada de $25\pm 0.2^\circ\text{C}$. Se tomaron 2 muestras de cada formulación de las tabletas y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino, éste se colocó en los contenedores de manera que cubriera la superficie.

Medición de Ácido ascórbico: Para la determinación de la cantidad de ácido ascórbico se empleó el método 43.064 de la A.O.A.C.(1984). Para ello se utilizaron tres soluciones: solución estándar de ácidoascórbico, solución de 2,6-dicloro fenolindofenol y una solución extractora la cual es una mezcla de ácido metafosfórico, ácidoacético y agua.

Elaboración de tabletas: Para la obtención de tabletas, se trabajó sobre la base de una formulación de comprimidos por compresión directa (Remington,1987). Se evaluaron 4 formulaciones a diferentes concentraciones de nanche deshidratado y/o liofilizado (principio activo) y se varió el excipiente, que funciona como diluyente y/o glutinante (Lactosa/Almidón). Como desintegrante se utilizó el CMC (CarboximetilCelulosa) y el estearato de magnesio como lubricante. Las formulaciones se presentan en la Tabla 2. La molienda del principio activo se realizó utilizando un molino de martillo (SIEMENS), con la finalidad de disminuir el tamaño de las partículas de manera que adquiriera un tamaño de polvo fino y se pudiera mezclar con los excipientes sin dificultad alguna. Antes de mezclar se procedió a pesar todos los ingredientes. Para el mezclado se aconseja que no se viertan, todos los ingredientes, al mismo tiempo pues la agregación entre ellos no es la misma a distinto orden de mezclado. Los ingredientes se incorporaron de la siguiente manera: Primero se mezcló el principio activo junto con la Lactosa/Almidón, posteriormente se agregó el CMC y por último el Estearato de Magnesio. Es importante asegurar en cada etapa que se vaya homogenizando la mezcla adecuadamente. La mezcla homogénea obtenida se hizo pasar por el tamiz (Tyler) No.40 (0.425mm) de manera que el tamaño de partícula fuera el mismo para todo. Se procedió a pesar la mezcla en porciones de 400mg. El tableteado se realizó con una tableteadora de tornillo (Figura 2.1). Se elaboraron 10 a 12 tabletas de cada formulación y se envasaron en frascos de plástico.

Tabla2. Formulaciones de tabletas con diferentes diluyentes.

Clave Formulación	Nanche	Almidón	Lactosa	Carboximetil Celulosa	Estearato	Peso (mg)
F1D*	80%	10%		8%	2%	500
F2D	85%	8.75%		4.25%	2%	500
F3L*	80%	10%		8%	2%	500
F4L	85%	8.75%		4.25%	2%	500
F5D	80%		10%	8%	2%	500
F6D	85%		8.75%	4.25%	2%	500
F7L	80%		10%	8%	2%	500
F8L	85%		8.75%	4.25%	2%	500

Elaboración de capsulas: Para la obtención de encapsulados, se utilizaron cápsulas de gelatina dura de origen 100% bovino con una capacidad aproximada de 200 a 500 mg, las cuales se llenaron en una encapsuladora manual CAPSULINE de 60 posiciones en tamaño "0". Las cápsulas se llenaron con una capacidad aproximada de 400 a 500 mg de nanche (deshidratado y liofilizado) más maltodextrina (excipiente). Para F1 y F2 se utilizó nanche deshidratado y para F3 y F4 nanche liofilizado. El nanche liofilizado y deshidratado se pulverizaron, por separado, en un mortero con el objetivo de obtener un producto homogéneo, se pesó y mezcló con maltodextrina y posteriormente se pasó por el tamiz (Tyler) No.40 (0.425mm). Una vez obtenida la mezcla homogénea, se procedió al llenado de las cápsulas.

Tabla2.1 Formulaciones de cápsulas.

Clave de Formulación	Tratamiento a nanche	Nanche	Maltodextrina	Peso (mg)
F1C	Deshidratado	85%	15%	500
F2C	Deshidratado	90%	10%	500
F3C	Liofilizado	85%	15%	500
F4C	Liofilizado	90%	10%	500

Control de calidad en tabletas: Se determinó el peso promedio, diámetro, altura, friabilidad y tiempo de desintegración, de acuerdo a los métodos de la USP(1995). Para capsulas solo se determinó el contenido promedio y el tiempo de desintegración de acuerdo a los métodos de prueba descritos en USP(1995). Para las pruebas de desintegración, friabilidad y dureza se utilizó el equipo PJ-3 tablet four-usage tester (Tianjin Guoming Medicinal Equipment Co.Ltd.).

Determinación de compuestos fenólicos: Se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con detección ultravioleta-visible con detectores de longitud de onda variable (UV), de arreglo de diodos (DAD) y también acoplada a espectrometría de masas (EM).

Fenoles totales y catequinas.

Se obtuvieron extractos de nanche por dos técnicas:

Técnica 1: se tomaron cinco gramos de pulpa de nanche, se trituro en un mortero de agata, posteriormente se extrajo con volúmenes de 30mL de metanola cidificado al 15 con ácido fosfórico, en un agitador magnético por 30 minutos a temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), el extracto se concentró al 50% en un rotovapor a temperatura ambiente.

Técnica 2: se tomaron cinco gramos de pulpa de nanche previamente triturada y se extrajo en un agitador magnético por 30 minutos con metanol acidificado al 1% con ácido fosfórico, el residuo obtenido se extrajo con acetona en un baño ultrasónico por 20 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de los extractos se realizó en base a los polifenoles totales (espectrofotometría, método de Folin-Ciocalteau), así como a la concentración de catequinas totales, expresada como epigallocatequina, presentes (HPLC-A).

Determinación cualitativa de ácidos fenólicos y otros posibles flavonoides.

La extracción se le realizo a la muestra en fresco (nanche), liofilizado y secado en charolas a 50°C adicionando 50ml de metanol con agitación constante por 1h. Posteriormente se concentraron al 50% y se refrigeraron, para su posterior análisis por HPLC (HPLC-B).

Determinación de flavonoides por HPLC-DAD y HPLC-UV-EM.

A la muestra se le realizó un escaldado en presencia de ácido ascórbico y ácido cítrico (75:25) al 1.5%. Se escurrió y se sometió al secado en charolas. Una vez seca se molió en un molinillo de cizalla sin tamaño específico de grano. Se pesó dos gramos de esa muestra molida en un recipiente y se realizó la extracción por líquidos presurizados en un sistema ASE 200 de Dionex, utilizando las siguientes condiciones:

Peso de muestra: 2 gramos, Disolvente de extracción: MeOH:H₂O 80%(v/v), Número deciclos: 3, Tiempo de ciclo: 8 minutos, Temperatura: 80°C , Presión: 1500 psi

El extracto obtenido se llevó a sequedad con corriente de Nitrógeno y se redisolvió en 4mL de MeOH acuoso al 50%. Se filtró através de un filtro de nylon de $0.20\mu\text{m}$ y se inyectó en el HPLC-DAD (HPLC-C) y en el HPLC-UV-EM (HPLC-D)

Análisis cromatográfico.

HPLC-A: Se realizó en un cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer Series 200 conectado a un detector UV/VIS785A, usando una columna RP-18 de $250 \times 4.6\text{mm}$ i.d. $5\mu\text{m}$ C18 de la misma firma. Los extractos fueron analizados a 280 nm utilizando como: fase A metanol y fase B acetonitrilo, con un flujo de 0.5mL min^{-1} y un gradiente lineal de 100% de A a 100% de B en 5min, posteriormente 2min con 100% de B y finalmente de 100% de B a 100% de A en gradiente lineal durante 5min.

HPLC-B: Se realizó en un cromatógrafo de marca PERKIN ELMER modelo 200, visible 235c y arreglo de diodos. Se utilizó una columna C18 de longitudes 150x4.6 y con tamaño de partícula de 5 μ m. Como fases móviles se utilizó una solución acuosa de ácido fórmico (19:1v/v), como fase A y como fase B metanol al 100%. El flujo 1.0mL/min y 50 μ L de volumen de inyección con elución en gradiente.

La detección se realizó a 290nm y 340nm. Para la mezcla de 7 estándares posiblemente presentes en el extracto de nanche se utilizaron los siguientes: rutina, ácido cumárico, ácido sinápico, miricetina, Kaempferol, Apigenina y ácido cafeíco. Agregando 50 μ l de cada estándar. Inyectando 50 μ l de esta mezcla para su detección y establecerla como referencia. De la muestra (nanche liofilizado) a inyectarse tomó un volumen de 50 μ l.

HPLC-C: Se realizó en un sistema Waters (Waters Corp., Milford, Massachusetts), formado por un módulo de separación (2695), con un horno de columna integrado y un inyector de muestra automático, y un detector de foto diodoarra y (2998). La fase estacionaria fue C18, una columna Novapack®, de longitudes 3.9x300mm y de 4 μ m de poro. Como fases móviles se utilizaron agua acidificada al 2% ácido acético como fase A, como fase B una mezcla de agua, ácido acético 2% y acetonitrilo 20%; y como fase C acetonitrilo. La temperatura de trabajo fue temperatura ambiente, el flujo 0.7mL/min y 100 μ L de volumen de inyección. La detección se realizó entre 220 nm y 600nm.

HPLC-D: El análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta y espectrofotometría de masas (HPLC-UV-MS) se realizó en un sistema HewlettPackard 1100MS (Palo Alto, CA) con fuente API, usando una interfase ESI. Las condiciones cromatográficas son las mismas que para el análisis por HPLC-DAD., reportadas en el informe de la primera etapa. Las condiciones del ESI fueron las siguientes: modo negativo, Nitrógeno como gas de secado del nebulizador con una presión de 40psi, flujo de 10L/min a 340°C, voltaje a la entrada del capilar: 4000V, voltaje variable de fragmentación: 100V (m/z < 200), 200V (m/z 200–1000), 250V (m/z 1000–2500). Espectro de masas desde m/z 100 a m/z 2500. Los picos cromatográficos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención, espectros UV y los parámetros de los espectros UV de sus respectivos patrones y confirmado por HPLC-MS.

2.2 Resultados

Características físico-químicas del nanche fresco y deshidratado: En la tabla 2.2, se muestran los resultados promedio de las características físico-químicas del nanche fresco, escaldado, deshidratado y liofilizado. Los rendimientos obtenidos fueron del 12-15% para el nanche deshidratado.

Tabla 2.2 Resultados promedio de los análisis físico químicos del deshidratado de nanche.

Análisis	pH	Sólidos Solubles	Acidez titulable ¹	Aw	Ácido Ascórbico mg/100g
Nanche fresco	4.62± 0.02	14 ±1	2.6% ±0.14	0.982±0.03	40±0.10
Nanche escaldado	3.98± 0.05	7.5±2	2.2%±0.18	0.982±0.02	71.5± 0.15
Nanche deshidratado	4.7 ±0.1	4± 1	3.6%± 0.17	0.359±0.03	67.5± 0.19
Nanche liofilizado	3.47	4	0.8230%± 0.10	0.243±0.004	69.88±0.77

¹Como ácido cítrico.

La medición del pH durante el escaldado disminuye debido a la presencia de ácidos. Estos resultados corresponden a lo visto en los pretratamientos, en los cuales el nanche durante el proceso de acondicionamiento de materia prima se le sometió a una inmersión de solución de ácidos a 1.5%.

En cuanto a la acidez y sólidos solubles, se busca correspondencia entre estos dos valores, mientras la acidez disminuye los sólidos solubles aumentarían ofreciendo un fruto de buen sabor. En este caso nos encontramos con un fruto disminuido en sólidos solubles (°Brix), de 7.5 a 4.0, valores menores con respecto al fruto fresco (14°Brix) y una acidez titulable de 0.823 a 3.6; lo que hace corresponder aun “nanche agridulce”, según Bayuelo y colaboradores en el 2006 y al correspondiente pretratamiento de ácidos al que fue sometido el nanche durante su procesos de secado.

La acidez beneficia al producto contra el crecimiento de micro organismos aunado a los valores bajos de Aw (0.24 para polvo de nanche liofilizado y 0.36 para polvo de nanche deshidratado) pero muchas reacciones podrían presentarse como, reacciones de pardeamiento, oxidación y algunas reacciones enzimáticas.

El efecto de la temperatura, durante el secado de nanche influye directamente en el contenido del ácido ascórbico junto con la humedad que presenta la muestra. El contenido de ácido ascórbico (vitamina C), durante el secado, fue de 67.5±0.19/100g de muestra deshidratada y de 69.88±0.769 de muestra liofilizada con respecto al nanche fresco, que fue de 40±0.10. Esto nos indica que el tratamiento realizado durante el escaldado, propicia el aumento de contenido de dicha vitamina en el producto lo que indicaría a futuro, que tan disponibles es la vitamina C en el organismo, es decir cuanta de esta cantidad de vitamina C se podría absorber. Aún, con un valor bajo de Vitamina C, los tratamientos realizados al nanche; durante el escaldado, deshidratado y liofilizado, ayudan a preservar una cantidad adecuada de ácido ascórbico. En ensayos recientes, Almeida y cols. (2012), encontraron que el fruto Murici [*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth], también conocido como nanche, contiene un 11.8mg de ácido ascórbico por 100g de muestra fresca comestible. Este valor resulta ser menor frente al valor registrado en el presente ensayo (40mg/100g muestra fresca comestible). Debemos tomar en cuenta que, Almeida y colaboradores realizan su ensayo con frutos originarios de Brazil por lo que, las condiciones del fruto (periodo de crecimiento, humedad, etc.) y del mismo análisis pudieran estar influyendo sobre dicho valor. Por su parte, Castañeda y cols. (2010), en sus ensayos de deshidratación y liofilización del fruto Charalina (Zapote Blanco; *Casimiroa edulis* Llave) encontraron que, el contenido de vitamina C se afectaba más al deshidratarlo por método convectivo que por liofilización.

Por método convectivo, el valor de Vitamina C se redujo de 29.75mg/100g porción comestible en frutofresco a 7.052mg/100 de porción reconstituida; por el método de liofilización esta se redujo de 29.75 mg/100g a 23.634mg/100g. La vitamina C tiende a lixivarse al entrar en inmersión con líquidos como el agua. Según el tratamiento térmico que se aplique a los alimentos ricos en vitamina C, si al someterlos a algún tratamiento esta se preserva, se dice que los demás compuestos de interés nutricional o funcional prevalecerán(Castañeday cols.,2010).

Por lotanto, la liofilización resulta ser un método adecuado de deshidratación teniendo como objetivo la preservación de vitaminas y compuestos fenólicos.

Tabla2.3 Resultados promedio del control de calidad de tabletas.

Clave Formulación	Diametro (cm)	Altura (mm)	Dureza(N)	Peso(mg)	Desintegración (min)	Friabilidad (%)
F1D*	1.07± 0.11 ^a	6.12± 0.38 ^a	2 N ^b	489±15.93 ^a	1.82± 0.63 ^a	0.85 ^a
F2D	1.11± 0.11 ^a	6.24± 0.20 ^a	2 N ^b	484±9.85 ^a	0.97± 0.24 ^a	0.75 ^a
F3L*	1.08± 0.09 ^a	6.09± 0.08 ^a	10N±1.2 ^b	482±8.54 ^a	7.98± 0.051 ^a	0.72 ^a
F4L	1.10± 0.08 ^a	6.18± 0.08 ^a	15N±3.2 ^b	484±13.35 ^a	8.31± 0.27 ^a	0.68 ^a
F5D	1.16± 0.11 ^a	6.08± 0.10 ^a	2.4N±0.8 ^b	485±19.39 ^a	1.70± 0.29 ^a	1.21 ^b
F6D	1.15± 0.09 ^a	6.03± 0.30 ^a	3.4N±0.71 ^b	478±14.58 ^a	1.55±0.13 ^a	1.27 ^b
F7L	1.11± 0.09 ^a	5.87± 0.29 ^a	17.6N±1.7 ^b	470±20 ^b	40 ^b	0.55 ^a
F8L	1.11± 0.09 ^a	6.13± 0.23 ^a	19.2N±3.9 ^b	483±26.23 ^b	4.70± 1.26 ^a	0.53 ^a

D=deshidratado;L=Liofilizado;^a=cumple;^b=Nocumple

La tabla 2.3, muestra los resultados del control de calidad de tabletas según las formulaciones de la tabla 2. Para las tabletas con almidón, el peso promedio especificado (500mg±5%), las cuatro formulaciones cumplen. Para las tabletas con lactosa y nanche liofilizado no cumplen con lo especificado (USP,1995). En relación a las pruebas de dimensiones (Diámetro y Altura) todas las formulaciones cumplen. En la prueba de desintegración, solo F7L no cumple con lo especificado en las normas. Para la prueba de friabilidad, las formulaciones F5D y F6D sufrieron un desgaste mayor a 1%, por lo que no cumplen. El 100% de las tabletas no cumplió con la prueba de dureza. Podemos decir que las formulaciones con almidón son las que mayormente cumplen con el control de calidad y en específico aquellas elaboradas con nanche liofilizado(F3LyF4L).

Tabla2.4 Resultados promedio del control de calidad de capsulas.

Clave de Formulación	Tratamiento	Desintegración (min)	Peso(mg)
F1C	Deshidratado	1.97±0.23 ^a	440±19.27 ^a
F2C	Deshidratado	1.82±0.3 ^a	475±16.63 ^a
F3C	Liofilizado	2.42±0.95 ^a	267±29.26 ^b
F4C	Liofilizado	2.03±1.02 ^a	315±23.26 ^b

^a=cumple;^b=Nocumple

Los resultados a las pruebas de control de calidad de capsulas se muestran en la tabla2.3. En ella se aprecia que, el 100% de las formulaciones cumplen con lo estipulado para desintegración. Las formulaciones con liofilizado muestran una mayor agregación.

En el caso de la prueba de peso promedio, solo las formulaciones con deshidratado cumplen con ello; se cree que el liofilizado ocupa mayor volumen en las tabletas, por lo que se tendría que compactar.

Figura2.1 Diagramas de proceso de tabletas y capsulas a base de nanche deshidratado y liofilizado



Compuestosfenólicos

Fenoles totales: No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de fenoles totales de los extractos de nanche obtenidos por las técnicas 1 y 2, siendo el valor promedio de su concentración $291 \pm 25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. El extracto de nanche contiene un contenido significativo de estos compuestos si se compara con los valores obtenidos por Löestetal.,(2002) en frutos frescos como la fresa ($160,0 \pm 1,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), uva roja ($201,0 \pm 2,9 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) y frutos frescos de guayaba ($112,8 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). El contenido de polifenoles determinado también resulta superior a los reportados para nanche en Brasil (Silva et al., 2007; Souza et al., 2008).

Ácidos fenólicos y catequinas: Se identificaron inequívocamente los ácidos caféico, cumárico y sinápico. La concentración de catequinas total es en los diferentes extractos resultó de $146 \pm 20 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Esto indica que de los fenolestotales, alrededor de un 50% son catequinas.

Flavonoides: En la figura 2.2, se muestra el cromatograma HPLC-DAD de una de las muestras analizadas que muestra la complejidad de las mismas. Los compuestos identificados en el extracto obtenido semuestran en la tabla 2.5

Figura2.2 Cromatograma HPLC-DAD de una muestra de nanche secada por método convectivo.

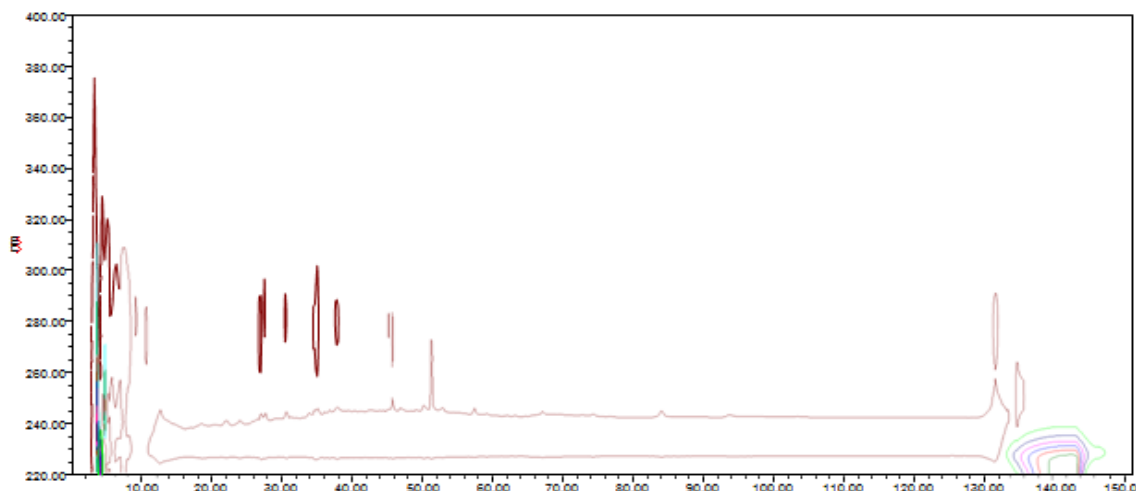
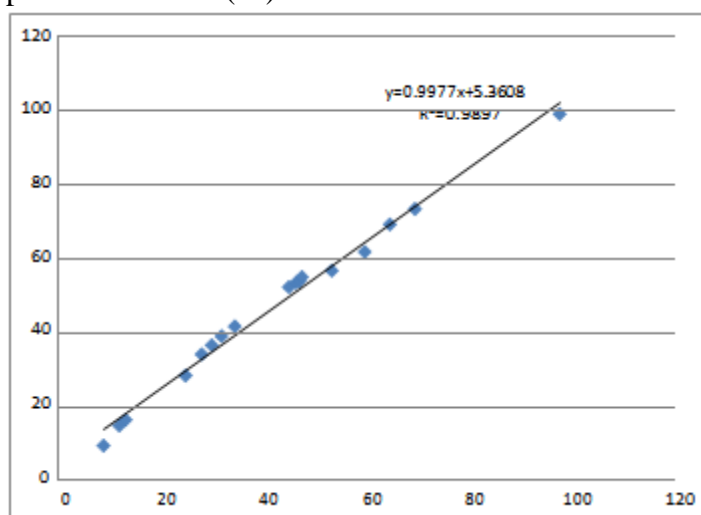


Tabla 2.5 Identificación de los compuestos en el extracto de nanche

N/O	tr(min)	IdentificaciónHPLC/DAD	tr(min)	IdentificaciónHPLC/EM
1	7.482	DerivadodelácidoGálico	8.316	ÁcidoGálico
2	10.532	Metilgalato	13.813	Metilgalato
3	11.815	derivadodelpOHbenzoico	15.330	ÁcidoProtocatéquico
4	18.365	Hamamelitannin		
5	23.498		27.393	Dímerodeprocianidina
6	23.982	Metilgalato		
7	25.348	Etilgalato		
8	26.648		33.172	Catequinglucosa
9	28.598		35.641	Dímerodeprocianidina
10	30.515	Catequina	38.122	Catequina
11	33.082		40.785	P2G1:Galatodedímerodeprocianidina
12	33.965	Ácidosirínquico		
13	34.682	Procianidina		
14	39.648	Epigalocatequinagallato		
15	43.632		51.437	Eriodictioldiglucósido
16	45.082	Epicatequinagallate	52.697	P2G1:Galatodedímerodeprocianidina
17	45.715		53.130	Quercetinadiglucósido
18	46.182	DerivadodeQuercetina	54.171	Quercetinarutinósido
19	51.998	DerivadodeQuercetina	55.891	Quercetinagalactósido
20	58.415	DerivadodeQuercetina	61.009	Quercetinaglucósido
21	63.332		68.560	Derivadoderesveratroltrans
22	68.215		72.763	Derivadoderesveratroltrans
23	96.465		98.514	Quercetina

La comparación de los tiempos de retención del análisis por HPLC/DAD y HPLC/UV/EM, permite concluir que fue correcta la identificación que se realizó por HPLC-DAA de los compuestos fenólicos de mayor interés, como se observa en la figura 2.3.

Figura 2.3 Tiempos de retención (Tr) en HPLC-UV-MS vs TRHPLC-DAD



La cuantificación de 17 de los 23 compuestos identificados se muestra en la tabla 2.6. Los resultados obtenidos se expresan en concentración del compuesto analizado y a falta del patrón del compuesto se ha cuantificado con la curva de calibración del compuesto patrón de la misma familia del compuesto analizado.

Los R2 de todas las rectas de calibrado resultaron superiores a 0,998. Los RSD de los resultados son menores del 5%.

Tabla 2.6 Cuantificación de fitoquímicos en el extracto de nanche.

tr	Compuesto	Cv(µg)	CM(µg/g)	Compuestosobreelqueseexpresa
8,316	ÁcidoGálico	5,82	116,39	ÁcidoGálico
13,813	Metilgalato	0,06	1,17	Metilgalato
15,33	ÁcidoProtocatéquico	0,86	17,20	ÁcidoProtocatéquico
27,393	Dímerodeprocianidina	0,04	0,76	Catequina
33,172	Catequinglucosa	0,29	5,72	Catequina
35,641	Dímerodeprocianidina	3,31	66,22	Catequina
38,122	Catequina	0,16	3,21	Catequina
40,785	P2G1:Galatodédímerode procianidina	0,23	4,52	Catequina
51,437	Eriodictioldiglucósido	0,34	6,73	Eriodictiol-7-O-glucósido
52,697	P2G1:Galatodédímerode procianidina	0,05	1,08	Catequina
53,13	Quercetinadiglucósido	0,30	6,06	Quercetina
54,171	Quercetinarutinósido	3,57	71,36	Quercetina-3-O-rutinósido
55,891	Quercetinagalactósido	1,13	22,56	Quercetina-7-O-galactósido
61,009	Quercetinaglucósido	1,25	24,99	Quercetina-3-O-glucósido
68,56	Derivadoderesveratroltrans	0,19	3,72	Resveratroltrans
72,763	Derivadoderesveratroltrans	0,21	4,26	Resveratroltrans
98,514	Quercetina	1,69	33,87	Quercetina

Asumiendo un coeficiente de respuesta similar para las procianidinas en el UV, la distribución porcentual de ellas sería: 45% de dímeros de procianidinas, 42% de catequina esterificada con glucosa, 8% de catequina, 6% de galato de epicatequina y 6% de galato de epigallocatequina.

2.3 Conclusiones

El nanche deshidratado y liofilizado, resulta ser una buena alternativa como ingrediente de formulaciones alimenticias. No hubo diferencias significativas en cuanto al contenido de vitamina C se refiere, pero debido a lo costoso de la liofilización se opta por emplear secado convectivo. Las tabletas a base de polvo de nanche, tanto deshidratado como liofilizado, cumplen, a excepción de la prueba de Dureza, con los controles de calidad (USP). El almidón resulto ser un diluyente/aglutinante muy efectivo; sobre todo al formular tabletas con polvo de nanche liofilizado. Las capsulas cumplen adecuadamente con el control de calidad. El contenido de fenoles totales en extractos de nanche fue superior al detectado por otros investigadores ($291 \pm 25 \text{mg } 100\text{g}^{-1}$), de esto se 150% corresponde a catequinas y sus derivados. Se identificaron un total de 23 compuestos de valor fitoquímico en el nanche. Estos resultados son científicamente novedosos puesto que no se encontraron referencias a estudios o resultados similares. Con base a los resultados se presentan alternativas adecuadas para el consumidor de nanche, en forma de tabletas y capsulas que los beneficie nutricional y funcionalmente.

2.4 Referencias

- Almeida B., M. M.; Machado de Sousa, P. E.; Arriaga, C. A. M.; Matías do Prado, G.; Carvalho, M. C. E.; Maia A. G. & Gomes L., T. L. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from north eastern Brazil. *Food Research International*, 44, 2155–2159
- Agrosí, M., Mischiatti, S., Harrasser, P. C., & Savio, D. (2000). Oral bioavailability of active principles from herbal products in humans. A study on *Hypericum perforatum* extracts using the soft gelatin capsule technology. *Phytomedicine*, 7(6), 455-462.
- Barreto G., Benassi M. & Mercadante A. (2009). Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis of free radicals scavenger activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(10), 1856-1861.
- Bayuelo, J. J. S., Lozano, R. J. C. y Ochoa, E. I. (2006). "Caracterización morfológica de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth nativa de Churumuco, Michoacán, México." *Rev. Fitotec. Mex.* 29(Número Especial 2), 31-36.
- Caballero, R. A., Vela, G., Pérez, J., Escobar, R. y Ballinas, J. (2012). Usos del Nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) en gelatina artesanal para niños. *Etnobiología*, (2). 50-55.
- Cassia R., (2006). Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzue *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae).
- Castañeda, J.; Arteaga, H.; Siche, R. y Rodríguez, G. 2010. Estudio comparativo de la pérdida de vitamina C en chalarina (*Casimiroa edulis*) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*, 1, 75 -80.
- Castillo M., García K., Peña L. (2009). Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidifolia*. *Nat. Prod. Comm.*, 4(1), 83-86.
- Chanda S. & Dave R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981-996.
- Crespy V. & Williamson G. (2004). A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in Vivo Animal Models. *The Journal of Nutrition*, 134, 3431S–3440S.
- Fernández M. C. (2012). "*Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K.: Estudio fitoquímico y farmacológico". (Tesis Inédita de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.

Figueiredo M., Michelin D., Sannomiya M., Silva M., dos Santos L., de Almeida L., Souza A., Salgado H. & Vilegas W. (2005). Chemical evaluation and antidiarrhoeal activity of leaves of *Byrsonima cinerea* DC. (Malpighiaceae). *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 41(1).

Fuentes, A.R. y Arana, E.R. (2008). "Elaboración de un alimento de humedad intermedia de nanche (*Byrsonima crassifolia*) utilizando el diseño de mezclas." *Industria Alimentaria*. 5(1).

Geiss F., Heinrich M., Hunkler D., Rimpler H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Journal of Phytochemistry*, 39(3), 635-643.

Heinrich M. *Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures. Current Topics in Medicinal Chemistry.* pp 29-42. 2003.

Heinrich U., Neukman K., Tronnier H., Sies H. & Stahl W. (2006). Long-Term Ingestion of High Flavanol Cocoa Provides Photoprotection against UV-Induced Erythema and Improves Skin Condition in Women. *J. Nutr.*, 136, 1565–1569.

Hudthagosol C., Haddad E., McCarthy K., Wang P., Oda K. & Sabaté J. (2011). Pecans Acutely Increase Plasma Postprandial Antioxidant Capacity and Catechins and Decrease LDL Oxidation in Humans. *J. Nutrition*, 141(1), 56-62.

Iwashina T., 2003. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*, 17, 24-44.

Jiménez A. H. D., Solís F.J.A., Vargas M. N., Muñoz G.I. E., Melo R. V. & Schettino B. B. (2012). Estudio etnobotánico de *Byrsonima crassifolia* L (K) y su composición nutricional. *Rev. Latinoamer. Quim.* 2012, 39, 196.

Kundu J., Na H., Chun K., Kim Y., Lee S., Lee O, Sim Y. & Surh Y. (2003). Inhibition of Phorbol Ester-Induced COX-2 Expression by Epigallocatechin Gallate in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells. *The journal of nutrition*, 133, 3805S–3810S.
Lin J.H., Chiou Y.N., Lin, Y.L. (2002). Phenolic glycosides from *Viscum angulatum*. *Journal of Natural Products*, 65, 638-640.

Löest H., Sang K. & Sung I. (2002). Green Tea Extract Inhibits the Lymphatic Absorption of Cholesterol and α -Tocopherol in Ovariectomized Rats. *The journal of nutrition*, 132, 1282–1288.

Martínez-Vázquez M., González-Esquinca, A.R., Cazares, L.L., Moreno, G.M.N. & García-Argáez, A.N. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol.*, (1), 79-82.

Maki K., Reeves M. & Farmer M. (2009). Green Tea Catechin Consumption Enhances Exercise-Induced Abdominal Fat Loss in Overweight and Obese Adults. *The journal of nutrition*, 139(2), 264-270.

Mállap, B.C.I. (2012). *Aplicación del método de superficie de respuesta en el estudio de efecto de la temperatura y la velocidad del aire de secado convectivo en la humedad y la pérdida del ácido fólico de los parragos previamente deshidratados*. (Tesis Inédita de Licenciatura). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. & Jiménez L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Michelin D., Sannomiya M., Figueiredo M., Rinaldo D., dos Santos L., Souza A., Vilegas W. & Salgado H. (2008). Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Rev. bras. farmacogn.* 18.

Miura Y., Chiba T., Tomita I., Koizumi H., Miura S., Umegaki K., Hara Y., Ikeda M. & Tomita T. (2001). Tea Catechins Prevent the Development of Atherosclerosis in Apoprotein E-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*, 131, 27-32.

Reis, R.C., Ramos, A.M., Regazzi, A. J., Minim, V.P.R. y Stringueta, P.C. (2006). "Almacenamiento de mango seco: análisis físico-químico, microbiológico, color y sensorial." *Cienc. Tecnol. Aliment.* 5(3), 214-225.

Remington. (1987). *Farmacología*. Buenos Aires, Argentina, Editorial Panamericana, 17ava ed., 27-23 pp.

Rezende, M.C. and Fraga, R.G.S. (2003). Chemical and Aroma Determination of the Pulp and Seed of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.). *J. Braz. Chem. Soc.*, 14(3), 425-428.

Rivero-Cruz J.F., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina A., & Rivero-Cruz, B. (2009). Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 37(2).

Rosales, B.A.C. (2010). *Estudio exploratorio de las plagas insectiles del follaje y fruto del nanche [Byrsonima crassifolia (L.) HBK] en la UAA-UANy Mecatán, Municipio de San Blas, Nayarit*. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Autónoma de Nayarit. Nayarit.

Rufino M., Fernandes F., Alves R. & de Brito E. (2009). Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, 114, 693-695.

Sannomiya M., Fonseca V., Silva M., Rocha L., dos Santos L., Hiruma C., Souza A. & Vilegas W. (2005). Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassifolia* leaves extracts. *J Ethnopharmacol.*, 97, 1-6.

Sartippour M., Shao Z., Heber D., Perrin B., Zhang L., Liu C., Ellis L., Liu W., Liang G. V. & Brooks M. (2002). Green Tea Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Induction in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Nutrition*, 132, 2307-2311.

Silva E., Souza J., Rogez H., Rees J., & Larandelle Y., (2007). Antioxidant activities and polyphenolic content of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *J. Food Chem.* Vol., 101(3), 1012-1018.

Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A., Rees, J.F., Rogez, H., Larandelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chem.* 106(1), 331-339.

USP (1995) The United States Pharmacopeia. "USP 23", The National Formulary "NF 18". United States Pharmacopeia Convention, Inc. U.S.A.

Velázquez de Klimo, I. (2006). *Guía Técnica Manejo Poscosecha de Nance (Byrsonima crassifolia (L.) HBK)*. Programa Nacional de Frutas del Salvador MAGFRUTAL ES. El Salvador: 1-15

Wolfram S., Raederstorff D., Preller M., Wang Y., Teixeira S., Riegger C. & Weber P. (2006). Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J. Nutr.*, 136, 2512-2518.