

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS



Tesis:

Identificación y caracterización de compuestos bioactivos obtenidos de cáscara de rambután por una tecnología emergente y evaluación de sus propiedades nutracéuticas

Presenta:

I. C. T. A. Cristian Hernández Hernández

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Saltillo, Coahuila, México



The postgraduate program in Food Science and Technology of the School of Chemistry of the Autonomous University of Coahuila through the thesis committee, states that the thesis entitled: **Identification and characterization of bioactive compounds obtained from rambutan peel by an emerging technology and evaluation of their nutraceutical properties**, presented by the **I.C.T.A. Cristian Hernández Hernández**, has been accepted as a partial requirement to obtain the degree of:

Master's in food science and Technology

The work has been directed by the following committee:

Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés
Director (UA deC)

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Co-Director (UAdeC)

Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Asesor (UAdeC)

Dra. Adriana Carolina Flores Gallegos
Asesor (UAdeC)

Dr. Jesús Antonio Morlett Chávez
Asesor (UAdeC)

Dra. Mayela Govea Salas
Asesor (UAdeC)



ABSTRACT

The rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) is an exotic fruit native to Southeast Asia and cultivated in different tropical areas, including southern Mexico. In previous reports were observed nutritional and nutraceutical properties in benefit of human health and is characterized by its marketing and acceptance in different countries and Mexico represents one of the main producers and exporters of rambutan in the world. Thus, given the importance of rambutan production in Soconusco, Chiapas and other states of the Mexican republic, it is a main economic source in the region and the state with a production of 8,730.27 tons, with a value of more than 1 million dollars per year, also some studies have shown the importance of the use of the residue of this fruit with the peel and seed for its functional and nutraceutical value, it is also worth mentioning that this fruit is also consumed in different products such as juices, wines, ice cream, syrup, jam, etc. It has been demonstrated that rambutan peel extracts have phytochemical compounds with antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, antiviral, anti-inflammatory, antihyperglycemic and antiproliferative effects in various *in vitro* and *in vivo* tests. The total polyphenol content of the rambutan peel (RP) was performed using an emerging Ultrasound-assisted Extraction/Microwave (U/M-AE) technology. They were carried out using five extraction conditions with mass/volume and water/ethanol ratios, 1:16-0, 1:16-70, 1:8-0, 1:8-70, 1:12-30, whose 1:16-0 condition was considered the best extraction condition with a 0% ethanol percentage (water). The total content of soluble polyphenols was 307.57 mg/g and the total content of bound polyphenols was 26.53 mg/g. Several bioactive compounds, mainly polyphenols, were recovered through the macroporous resins of the chromatographic filler Amberlite XAD-16. A second purification was performed using a preparative HPLC equipment obtained a fraction with 3 compounds: Geraniin, Ellagic acid and Ellagic acid pentoside. The main compound isolated in the two purifications was geraniin according to HPLC/ESI/MS analysis. The results indicated that the Mexican variety rambutan peel is an important source for the recovery of polyphenolic compounds, such as ellagitannins (mainly geraniin). Trials were also conducted to evaluate biological activities such as antioxidant activity, antimicrobial activity, the effect of polyphenols on probiotic bacteria, cytotoxicity, cell viability and antiviral activity of rambutan peel extract against free radicals, liver cancer cell lines. The highest antioxidant



activity was found in the mass/volume ratio 1:16-0 for all antioxidant activity assays, the highest radical elimination capacity was through the DPPH assay with a value of 83.2%, the ABTS assay with 70.3%, the highest ferric ion reduction activity by FRAP was obtained with a value of 181.7% milliequivalent of Trolox and the lipid peroxidation inhibition test was 89.4%. The mass/volume ratio of 1:16-0 showed an increase in antioxidant activity using all four assays. In the antimicrobial activity, the results showed a bacteriostatic effect in a dose-dependent manner against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Listeria monocytogenes*. In addition, the inhibition percentages of the three concentrations that most inhibited pathogenic strains in all extraction conditions were 2500, 3750 and 5000 ppm. The polyphenols (ellagitannins) of rambutan peel showed an adequate effect of the growth of probiotic bacteria on polyphenols tested with *L. plantarum*, *L. paracasei*, *B. bifidum* and *B. longum*. Moreover, with toxicity assays such as hemolytic activity and artemia saline assay they demonstrated that rambutan peel extracts were non-toxic as they did not present a percentage of hemolysis and percentage of mortality in rambutan peel extracts in both assays. Also, by antiproliferative activity was measured the cell viability of Huh7 parental cells and Huh7 HCV replicon performed with the MTT assay with the best extraction condition, 1:16-0 showed that concentrations of 4000 and 5000 ppm had a higher inhibition against Huh7 parental cells and Huh7-HCV replicon at 72 hours. The inhibition values were 68.3% with 4000 ppm and 76.8% with 5000 ppm for Huh7 parental cells. While for replicon cells Huh7-HCV a lower cell inhibition was obtained with a value of 31.6% with 4000 ppm and 38.4% with 5000 ppm. In this work the bioactive compounds present in the rambutan peel are highlighted, together with the biological properties, the peel has a high content of antioxidants that are of interest in the food, cosmetics and pharmaceutical industries.



RESUMEN

El rambután (*Nephelium lappaceum* L.) es una fruta exótica nativa del sudeste asiático y se cultiva en diferentes áreas tropicales, incluyendo el sur de México. En informes anteriores se observaron propiedades nutricionales y nutraceuticas en beneficio de la salud humana y se caracteriza por su comercialización y aceptación en diferentes países y México representa uno de los principales productores y exportadores de rambután en el mundo. De esta manera, dada la importancia que ha cobrado la producción de rambután en el Soconusco, Chiapas y en otros estados de la República Mexicana, es una principal fuente económica en la región y el estado con una producción de 8,730.27 toneladas, con un valor de más de 1 millón de dólares anuales, también algunos estudios han demostrado la importancia del aprovechamiento del residuo de este fruto como la cáscara y semilla por su valor funcional y nutraceutico, además cabe mencionar que este fruto también es consumido en diferentes productos como jugos, vinos, helados, almibar, mermelada, etc. Se ha demostrado que los extractos de cáscara de rambután, poseen compuestos fitoquímicos que presentan efectos antioxidantes, antimicrobianos, antidiabéticos, antivirales, antiinflamatorios, antihipoglucémicos y antiproliferativos en diversas pruebas *in vitro* e *in vivo*. El contenido total de polifenoles de la cáscara de rambután (RP) se realizó usando una tecnología emergente de Extracción Asistida por Ultrasonido/Microondas (U/M-AE). Se llevaron a cabo mediante cinco condiciones de extracción con las relaciones masa/volumen y agua/etanol, 1:16-0, 1:16-70, 1:8-0, 1:8-70, 1:12-30, cuya condición 1:16-0 se consideró la mejor condición de extracción con un porcentaje de etanol del 0% (agua). El contenido total de polifenoles solubles fue de 307.57 mg/g y el contenido total de polifenoles ligados fue de 26.53 mg/g. A través de las resinas macroporosas del relleno cromatográfico Amberlita XAD-16 se recuperaron varios compuestos bioactivos, principalmente polifenoles. Se realizó una segunda purificación utilizando un equipo HPLC preparativo obteniendo una fracción con 3 compuestos: geraniina, elágeno, ácido y ácido elágeno pentoside. El principal compuesto aislado en las dos purificaciones fue la geraniina según el análisis HPLC/ESI/MS. Los resultados indicaron que la variedad mexicana rambutan peel es una fuente importante para la recuperación de compuestos polifenólicos, como elagitaninos (principalmente geraniina). También se realizaron ensayos para evaluar las actividades biológicas como la actividad antioxidante, la



actividad antimicrobiana, el efecto de los polifenoles sobre bacterias prebióticas, la citotoxicidad, la viabilidad celular y la actividad antiviral del extracto de cáscara de rambutan contra radicales libres, líneas celulares de cancer de hígado. La mayor actividad antioxidante se encontró en la relación masa/volumen 1:16-0 para todos los ensayos de actividad antioxidante, la mayor capacidad de eliminación de radicales fue a través del ensayo DPPH con un valor de 83.2%, el ensayo ABTS con 70.3%, la mayor actividad de reducción de iones férricos por FRAP se obtuvo con un valor de 181.7% miliequivalente de Trolox y la prueba de inhibición de peroxidación de lípidos fue de 89.4%. La relación masa/volumen de 1:16-0 mostró un aumento en la actividad antioxidante usando los cuatro ensayos. En la actividad antimicrobiana, los resultados mostraron un efecto bacteriostático de una manera dosis dependiente de las relaciones masa/volumen contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*. Además, los porcentajes de inhibición de las tres concentraciones que más inhibieron las cepas patógenas en todas las condiciones de extracción fueron de 2500, 3750 y 5000 ppm. Los polifenoles (elagitaninos) de cáscara de rambután mostraron un adecuado efecto del crecimiento de bacterias probióticas sobre polifenoles probadas con *L. plantarum*, *L. paracasei*, *B. bifidum* y *B. longum*. Además, con los ensayos de toxicidad como actividad hemolítica y ensayo de artemia salina demostraron que los extractos de cáscara de rambutan no eran tóxicos al no presentar un porcentaje de hemólisis y porcentaje de mortalidad en los extractos de cáscara de rambutan en ambos ensayos. También, mediante la actividad antiproliferativa se midió la viabilidad celular de las células Huh7 parental y Huh7 replicón del VHC realizada con el ensayo MTT con la mejor condición de extracción 1:16-0. La condición 1:16-0 exhibió que a concentraciones de 4000 y 5000 ppm tuvieron una mayor inhibición contra las células Huh7 parental y Huh7 replicón a las 72 horas. Los valores de inhibición fueron 68.3% con 4000 ppm y 76.8% con 5000 ppm para células parentales Huh7. Mientras que para las células replicón Huh7 HCV se obtuvo una menor inhibición celular con un valor de 31.6% con 4000 ppm y 38.4% con 5000 ppm. En este trabajo se resaltan los compuestos bioactivos presentes en la cáscara de rambután, junto con las propiedades nutraceuticas, la cáscara tiene un alto contenido de antioxidantes que son de interés en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.