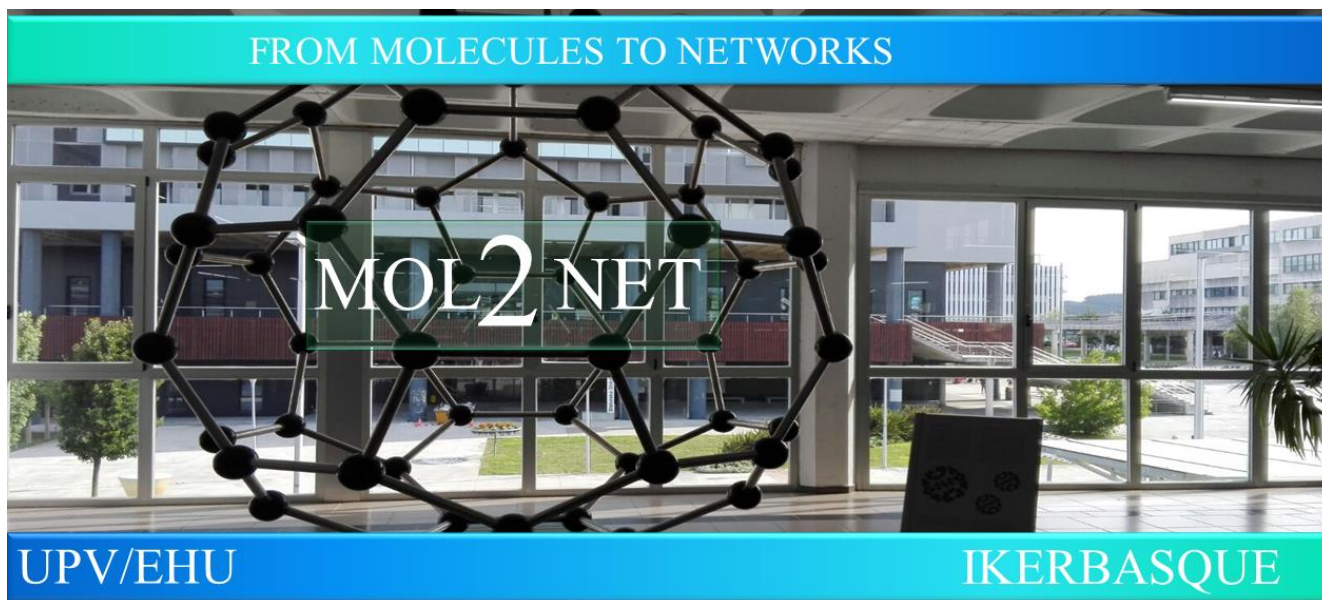




MOL2NET'23, Conference on Molecular, Biomedical, Computational, & Network Science and Engineering, 8th ed.



Purificación parcial de polifenoles de cáscara de nuez pecanera [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] con potencial biológico.

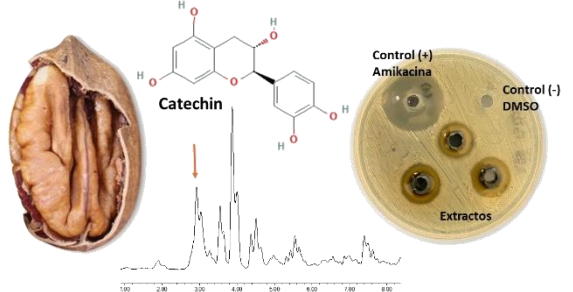
Morales-Landa Juan Luis^a, Camacho-Corona María del Rayo^b, Rodríguez-Buenfil Ingrid Mayanín^c, Martínez-Olivo Isaí Eduardo^b, Reyes-Vázquez Nohemí del Carmen^{a*}

^a Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Subsele Noreste. Vía de la Innovación 404. Autopista Mty-Aeropuerto Km 10, Parque PIIT. C.P. 66629. Apodaca, Nuevo León, México

^b Facultad de Ciencias Químicas-UANL, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, CP 66451 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

^c Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Subsele Sureste. Tablaje Catastral 31264 Km 55 Carr. Sierra Papacal-Chuburná Puerto C.P. 97302 Mérida, Yucatán, México.

* nreyes@ciatej.mx

Graphical Abstract	Resumen
<p>PECAN NUTSHELL</p>  <p>The graphical abstract includes a photograph of a pecan nut shell, chemical structures of catechins, an HPLC chromatogram with peaks labeled 'Catechin', and a petri dish showing antimicrobial assay results with wells labeled 'Control (+) Amikacina', 'Control (-) DMSO', and 'Extractos'.</p>	<p>Resumen</p> <p>La cáscara de nuez pecanera representa el 50 % del fruto [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) C. Koch], y son fuente de fitocompuestos polares como taninos, polifenoles y flavonoides con actividad antimicrobiana y antioxidante, entre otras. En este trabajo se obtuvo un extracto alcohólico de cáscara de nuez cosechada en Bustamante, Nuevo León, México. El extracto crudo presentó un rendimiento de 7.7% y en su purificación parcial por cromatografía líquida en columna se obtuvieron 6 fracciones con compuestos mayoritarios determinados por UHPLC, mismos que están siendo evaluadas en sus actividades biológicas, particularmente antioxidante y antimicrobiana.</p>

Introducción

Uno de los residuos agroindustriales más importantes y con potencial aplicación son los de la nuez pecanera [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. La producción de esta oleaginosa es liderada a nivel mundial por México y Estados Unidos, que en 2019 produjeron 171,132 y 116,042 ton respectivamente. Durante la cosecha y descascarado de este fruto se generan diversos subproductos como hojas, ramas, ruzno y especialmente enormes volúmenes de cáscara, ya que representa el 50% del peso total del fruto (Reyes-Vázquez, et al. 2022). La cáscara de nuez se utiliza como relleno para caminos y abrasivos (Lim, 2012) y más recientemente como biomaterial (Cabrera-Álvarez et al. 2023), pero escasamente como fuente de fitocompuestos con potencial biológico. Dentro de sus cualidades químicas, la cáscara de nuez pecanera tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, como lo son flavonoides, lignanos, ácidos fenólicos, taninos condensados e hidrolizados, entre otros (do Prado et al. 2014). A pesar de su alta gama de compuestos presentes en este subproducto, son pocas las investigaciones que planteen el fraccionamiento y purificación de compuestos como el ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido clorogénico, ácido vainílico, ácido caféico, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina y ácido elágico (Kureck, 2018). A lo largo de los últimos años la cáscara de nuez y sus compuestos activos han sido objeto de estudio en el área de salud, donde se han encontrado múltiples actividades biológicas por parte de sus extractos orgánicos y/o pre purificaciones como capacidad antioxidante, antihipercolesterolemica, anti edematogénico, anti hiperglicémica, efecto hepatoprotector, ansiolítico, antituberculoso, actividad citotóxica frente a células cancerígenas y antimicrobiana (Reyes-Vázquez, et al. 2022).

De esta manera, en nuestro laboratorio, se han iniciado estudios en la obtención de extractos etanólicos de cáscara de nuez pecanera de la variedad Bustamante que demostró actividad antioxidante *in vitro* (datos no mostrados). En el presente trabajo, se pretende realizar la purificación parcial de los compuestos fenólicos mayoritarios, como una prospección de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Materiales y Métodos

1. Material biológico.

20 Kg de nuez pecanera criolla [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] fueron adquiridas de una huerta nogalera del municipio de Bustamante, Nuevo León, México (26°32'00" N 100°30'00" O). La cáscara se separó con la ayuda de un descascarador manual. La cáscara libre de corazones de nuez se pulverizó en un molino pulverizador marca Micron modelo K20AI con una criba de 0.5 mm hasta la textura de polvo. El polvo pulverizado de cascara de nuez se conservó en bolsas con sello hermético, a temperatura ambiente y en un lugar seco apartado de la luz, hasta su posterior extracción de fitocompuestos.

2. *Obtención de extracto etanólico de cáscara de nuez pecanera.*

Se pesaron 500 g. de cáscara de nuez pulverizada, y se colocaron en maceración dinámica con 1.5 L de etanol 98% durante 24 horas. Al finalizar la maceración, se separó el sobrenadante por filtración a vacío con papel filtro de celulosa poro medio. El filtrado se concentró por rotaevaporación a presión reducida a 180 rpm a 45°C hasta sequedad en un rotoevaporador marca Büchi® R-210. El extracto crudo sólido y seco fue recuperado y almacenado en viales ámbar a temperatura ambiente hasta su uso.

3. *Fraccionamiento por cromatografía en columna.*

Para la cromatografía en columna se preparó una columna de 70 X 2.6 cm con 200 g de sílica gel [Alta pureza, tamaño de poro medio 60 Å (52-73 Å), malla 70-230, 63-200 µm marca Sigma-Aldrich]. 10 g de extracto crudo pulverizado se colocaron en la superficie de la columna. Con la columna preparada se inició la elución con fase reversa con Acetato de etilo y se determinó el volumen muerto de 160 ml (9 fracciones de 18 ml). El cambio de la fase móvil fue en incrementos del 5 y 10% con metanol. En cada cambio de polaridad, se realizó una cromatografía en capa fina con gel de sílice (TLC) marca Sigma-Aldrich, con la finalidad de observar los compuestos o mezclas de compuestos eluidos.

4. *Cuantificación e identificación de los polifenoles presentes en las fracciones.*

La cuantificación e identificación de polifenoles de las fracciones se realizó utilizando un sistema Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, EE. UU.) con un detector de matriz de diodos (DAD) y una columna Acquity UPLC HSS C18 (Waters, Milford, MA, EE. UU.), siguiendo el procedimiento informado por Avilés-Betanzos, et al. 2023.

Resultados y Discusión

Los procesos de extracción de productos naturales a partir de plantas y subproductos agroindustriales, permite la implementación del aprovechamiento con nuevas técnicas amigables con el ambiente en relación con las técnicas convencionales. Por citar un ejemplo, 1) La extracción asistida por microondas utiliza energía de microondas para liberar compuestos químicos de una matriz al disolvente. A la par que la energía de microondas es absorbida, la humedad contenida se evapora y genera presión dentro de las células que eventualmente conduce al rompimiento de la membrana celular, con un menor uso de disolventes y mayor rendimiento de extracción; 2) La extracción asistida por enzimas, se basa en el uso de carbohidrasas y proteasas con el fin de romper la pared celular y liberar el bioactivo deseado; esta tecnología es amigable con el ambiente ya que no es tóxica y elimina el uso de disolvente, además presenta alto rendimiento de extracción y conserva la bioactividad de los compuestos; 3) La extracción asistida por ultrasonido, utiliza ondas ultrasónicas para generar burbujas de cavitación en el disolvente de extracción, el colapso de éstas proporciona una mayor penetración de los disolventes en la penetración de la planta. Permite extracciones rápidas y fiables con un consumo reducido tanto de energía como de disolventes; 4) La extracción con líquido presurizado, el solvente utilizado, generalmente etanol o metanol, es llevado a altas temperaturas y presión con la finalidad de mantenerlo en estado líquido sin llegar al punto crítico, generando un aumento de solubilidad y la tasa de transferencia de masa. Por su parte la extracción convencional con el uso de solventes orgánicos, permite obtención de numerosos compuestos químicos, que dependen directamente de la naturaleza propia del material vegetal, humedad, tamaño de pulverización, tiempo de procesamiento, foto y termosensibilidad de los compuestos químicos, solubilidad, así como del tipo, proceso, tiempo de extracción, capacidad de saturación y polaridad del solvente. En este trabajo, se abordó la extracción etanólica y su purificación parcial por cromatografía en columna con incremento de polaridad (Acetato de etilo:Metanol), como se describe a continuación.

1. *Descarado y pulverización de nuez pecanera variedad Bustamante.*

Del proceso de descascarado (Figura 1) se obtuvo un rendimiento de 45.3 ± 1.63 % de cascara (Cuadro 1), lo que representa una proporción 1:1 w/w en relación con el corazón de nuez pecanera.

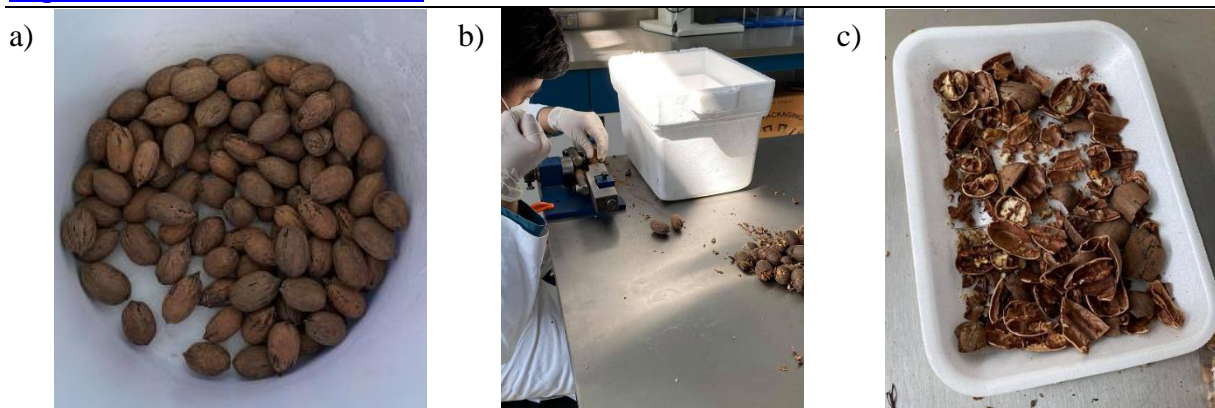


Figura 1. Proceso de descascado de nuez pecanera variedad Bustamente. a) Nuez pecanera entera; b) proceso de descascado manual; c) Cáscara de nuez pecanera.

Cuadro 1. Porcentaje de los componentes que constituyen la nuez pecanera

Componente:	Lote				Promedio (\pm DS)	Rendimiento [%] (\pm DS)
	2020:1	2020:2	2020:3	2020:4		
No. de piezas	113	108	117	108	111.5 \pm 4.36	-
Corazón (g)	540	529	571.7	541	545.4 \pm 18.3	54.54 \pm 1.83
Cáscara (g)	460	463	428.3	459	452.6 \pm 16.3	45.26 \pm 1.63

Después del proceso de descascarado, la cáscara se pulverizó en molino de martillos Micron modelo K20AI, de 7.2 Kg de cascara triturada se obtuvieron 6.3 Kg con textura de polvo muy fino. El proceso de pulverizado se presentaron pérdidas en merma del 12.6%.

2. Preparación de extracto etanólico a partir de la cáscara de nuez pecanera

La extracción de fitocompuestos a partir de cascara de nuez pecanera pulverizado se realizó mediante maceración dinámica w/v con etanol 98% (Figura 2). El sobrenadante recuperado se concentró por roto evaporación a presión reducida (Figura 3). Finalmente, de 500g de polvo de cáscara de nuez, se obtuvieron 38.7g de extracto seco, con una coloración rojo marrón con un rendimiento de 7.7%.



Figura 2. Obtención de extracto crudo por maceración de pulverizado de cascara de nuez pecanera en etanol.



Figura 3. Rotoevaporación de extracto crudo de cascara de nuez hasta sequedad.

3. Fraccionamiento parcial por cromatografía en columna de componentes mayoritarios del extracto etanólico de cáscara de nuez pecanera.

El fraccionamiento parcial de los fitocompuestos presentes en el extracto crudo etanólico de cáscara de nuez pecanera, inició con eluciones de fracciones con coloración verde amarillenta, seguida de fracciones amarillas, fracciones con tonalidades marrón y finalmente en tonos naranja. Esto de acuerdo con el incremento de la polaridad (Acetato de etilo:Metanol) y la correspondiente elución de los compuestos. Al finalizar la elución de la cromatografía en columna, se obtuvieron 90 fracciones, las cuales se agruparon de acuerdo con la similitud de elución, verificadas por corrimiento en cromatoplaqa. Según lo observado en la TLC, las eluciones se agruparon en 6 fracciones distintas (figura 4).

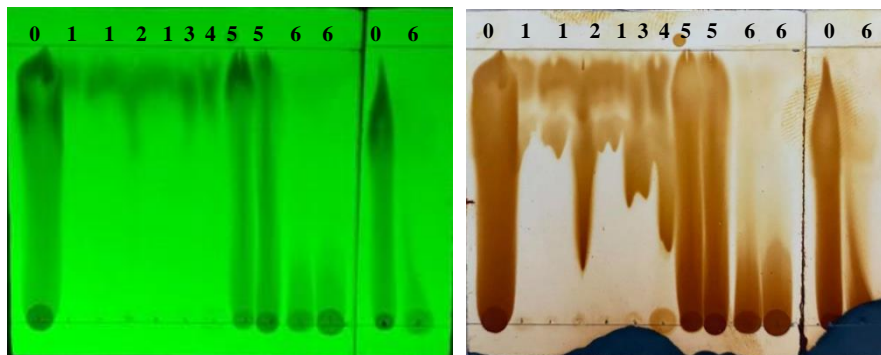


Figura 4. Cromatografía en capa fina (TLC) de fracciones totales reunidas con fase móvil Acetato de etilo/Metanol 30:70 revelado con: a) Lámpara de luz UV, b) cámara reveladora con gases de yodo. Referencias: 0= Extracto completo; 1) Fracciones 1-14 y Fracciones 19-27; 2) Fracciones 15-18; 3) Fracciones 28-36; 4) Fracciones 37-45; 5) Fracciones 46-63; 6) Fracciones 64-90

En el cuadro 2 se muestran la agrupación de fracciones con respecto a las fracciones eluidas durante la purificación parcial por cromatografía en columna con fase móvil Acetato de etilo/Metanol 30:70.

Cuadro 2. Relación y agrupación de fracciones orgánicas eluidas en relación con la polaridad del solvente

No.	Fracciones	Polaridad de elución
1	1-14 y 19-27	Acetato de etilo 100% y Acetato de etilo/Metanol 95:5
2	15-18	AcOEt 100%
3	28-36	AcOEt/MeOH 90:10
4	37-45	AcOEt/MeOH 70:30
5	46-54 y 55-63	AcOEt/MeOH 70:30 y AcOEt/MeOH 50:50
6	64-72 y 73-90	AcOEt/MeOH 30:70 y MeOH 100%

Cuantificación e identificación de los polifenoles presentes en las fracciones.

En la tabla 3 se muestran el contenido en cada fracción de los principales polifenoles encontrados, que en función de su polaridad, destaca la elución en las primeras cuatro fracciones compuesta fundamentalmente por ácidos fenólicos, mientras que los flavonoides estuvieron presentes aún en las fracciones 5 y 6. En el grupo de ácidos fenólicos predominan con una mayor cantidad: catequina (20-690 $\mu\text{g/ml}$), ácido clorogénico (5-189 $\mu\text{g/ml}$), seguido de 8 a 23 $\mu\text{g/ml}$ de ácidos fenólicos: ferúlico, gálico, cumárico, cinámico y vainillínico. También se encontraron flavonoides en niveles de 1 a 38 $\mu\text{g/ml}$ como: rutina, luteolina, quercetina, kaempferol, naringenina, diosmetina, diosina y hesperidina entre los principales. Este resultado concuerda con lo reportado por reciente revisión realizada específicamente en cáscara de nuez por Reyes-Vázquez et al. (2022). Cabe destacar que la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides en residuos de cáscara de nuez han sido relacionados con la actividad antioxidante *in vitro* por (Hilbig, et al. 2018; Carson, et al. 2021) asociada con una neutralización *in vitro* de los radicales DPPH \cdot y ABTS \cdot . Asimismo, los extractos de cáscaras de nuez pecanera han mostrado actividad antimicrobiana. En investigación realizada por (Do Prado et al. 2014) utilizando extractos con contenido elevado de compuestos polifenólicos y taninos condensados, que exhibieron actividad antioxidante (DPPH \cdot , ABTS \cdot) demostraron también actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus* y *Bacillus cerus*; estos extractos mostraron actividad bactericida contra estos microorganismos relacionados con enfermedades causadas por alimentos. En otro estudio, Flores-Estrada, et al. (2020) demostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), usando el método de difusión en disco y micro dilución, con un diámetro de

zonas de inhibición de 13.3 ± 1.5 mm y concentración mínima inhibitoria (CMI= 0.9 ± 0.13 mg/ml). Esta actividad antimicrobiana fue atribuida a la presencia de proantocianidinas tipo B mediante la alteración de la morfología bacteriana, con evidencia de destrucción de la pared celular y membranas. Por lo que, los residuos de cáscara de nuez constituyen un agro residuo potencial de compuestos bioactivos con elevada actividad antioxidante, e inhibitoria contra bacterias Gram positivas. Se espera que las fracciones antes descritas, tengan alguna actividad igual o mayor con relación al extracto crudo en posteriores modelos biológicos, ya sea contra bacterias, virus o parásitos que ocasionan enfermedades o infecciones microbiológicas, o contra líneas celulares para determinar su actividad citotóxica o anticancerígena. Por tanto, la cáscara de nuez pecanera como subproducto agroindustrial, es una fuente potencial para el estudio fitoquímico y de búsqueda de nuevas moléculas de gran calidad para ser utilizadas en aplicación en salud.

Cuadro 3. Cuantificación polifenoles ($\mu\text{g/ml}$) en fracciones obtenidas del extracto alcohólico de cáscara de nuez pecanera

Polifenoles ($\mu\text{g/ml}$)	Número de Fracción					
	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
Ac. Ferúlico	8.8 ± 0.4	-	-	-	-	-
Ac. Gálico	12.1 ± 0.2	-	-	11.8 ± 0.15	-	-
Catequina	690.9 ± 208	100.7 ± 40.3	20.9 ± 40.3	-	-	-
Ac. Clorogénico	189.1 ± 0.8	-	-	15.9 ± 27.5	112.4 ± 61	-
Ac. Cumárico	15.2 ± 0.06	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	7.2 ± 0.2	5.2 ± 0.8	-
Ac. Cinámico	23.6 ± 0.08	-	6.1 ± 0.0	11.8 ± 0.6	-	-
Rutina	41.1 ± 0.25	6.1 ± 0.1	134.2 ± 0.1	252.2 ± 1.7	2.2 ± 3.8	-
Luteolina + Quercetina	13.9 ± 0.08	13.1 ± 0.2	31.4 ± 0.2	15.7 ± 0.2	-	12.6 ± 1.9
Kaempferol	7.2 ± 0.09	-	13.4 ± 0	28.8 ± 1.9	-	-
Vainillina	38.8 ± 0.4	0.5 ± 0.03	14.1 ± 0.03	5.5 ± 0.2	0.16 ± 0	-
Diosmina + Hesperidina	17.2 ± 1.02	4.5 ± 0.04	18.1 ± 0.04	51.2 ± 3.6	3.3 ± 0	-
Naringenina	7.0 ± 0.09	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	6.4 ± 1.6	-	1.5 ± 0.3
Diosmetina	10.6 ± 0.6	3.7 ± 0.2	16.4 ± 0.2	14.0 ± 2.8	-	-

(-): No detectado

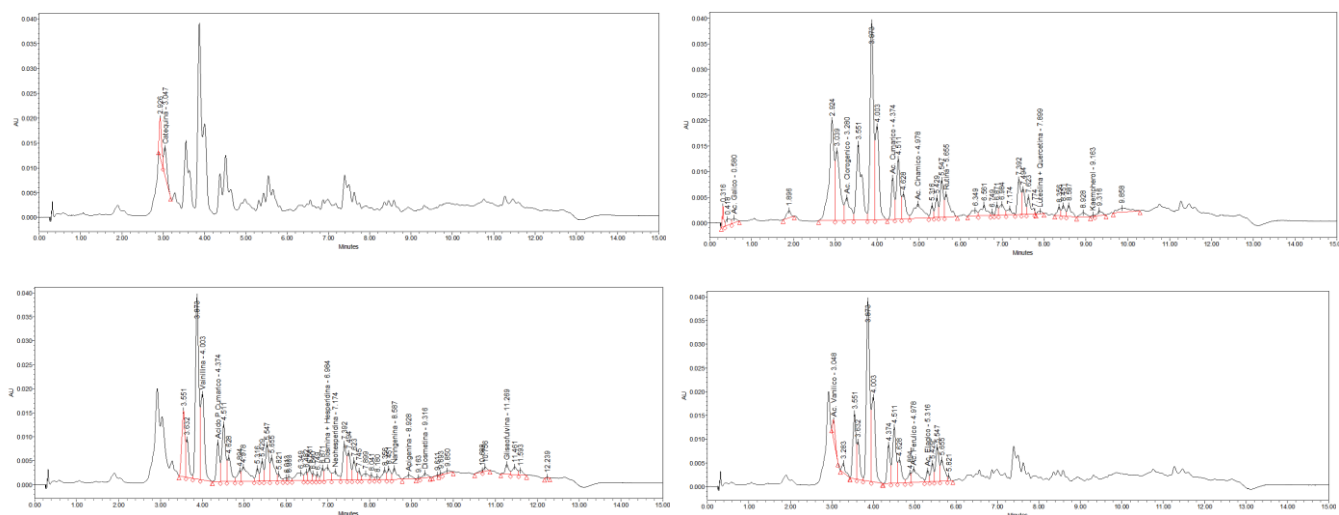


Figura 5. Representación gráfica de los cromatogramas para la cuantificación de polifenoles en la fracción 1 de la separación parcial a) Cromatograma de los picos identificados con la curva de calibración de la catequina; b) Cromatograma de los picos identificados con la curva de calibración (Ac. Gálico, Ac. Protocatequico, Ac. Clorogénico, Ac. Cumárico, Ac. Cinámico, Rutina, Luteolina + Quercetina y Kaempferol); c) Cromatograma de los picos identificados con la curva de calibración (Vainillina, Diosmina + Hesperidina, Neohesperidina, Naringenina, Apigenina y Diosmetina); d) Cromatograma de los picos identificados con la curva de calibración (Ac. Vanílico, Ac. Ferúlico y Ac. Eláxico).

Conclusiones

Dado el potencial de aplicación de los fitocompuestos con actividad biológica que contiene la nuez pecanera, se muestran estudios iniciales de un método de obtención, fraccionamiento, pre purificación e identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mayoritarios, siendo la catequina el compuesto con mayor concentración con $690.9 \pm 208 \mu\text{g/ml}$ en la fracción 1 con la mezcla de acetato de etilo 100% y Acetato de etilo/Metanol 95:5 de baja polaridad, como una prospección de búsqueda de nuevos compuestos con potencial aplicación como anitoxidantes y antimicrobianos, entre otros.

Referencias

Avilés-Betanzos, K.A., Cauich-Rodríguez, J.V., González-Avila, M., Scampicchio, M., Morozva, K., Ramírez-Sucre, O. M. and Rodríguez-Buenfil I.M. Natural Deep Eutectic Solvent Optimization to Obtain an Extract Rich in Polyphenols from Capsicum chinense Leaves Using an Ultrasonic Probe. *Processes* 2023, 11, 1729. <https://doi.org/10.3390/pr11061729>.

Cabrera-Álvarez, E.N., Hernández-Gámez, J.F., Ramos-deValle, L.F., Sánchez-Valdés, S., Reyes-Vázquez, N. C. de León. A., Córdova, T. and Díaz de León-Gómez, R.E. Polypropylene/pecan nutshell/ammonium polyphosphate biocomposites: a flame-retardant behavior. *Iranian Polymer Journal. Iran Polym J* 32, 353–363 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13726-022-01128-7>

Cason, C.; Yemmireddy, V. K.; Moreira, J.; Adhikari, A. Antioxidant Properties of Pecan Shell Bioactive Components of Different Cultivars and Extraction Methods. *Foods* 2021, 10 (4). <https://doi.org/10.3390/foods10040713>.

do Prado, A. C. P.; da Silva, H. S.; da Silveira, S. M.; Barreto, P. L. M.; Vieira, C. R. W.; Maraschin, M.; Ferreira, S. R. S.; Block, J. M. Effect of the Extraction Process on the Phenolic Compounds Profile and the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Extracts of Pecan Nut [*Carya Illinoensis* (Wangenh) C. Koch] Shell. *Ind. Crops Prod.* 2014, 52, 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>.

Flores-Estrada, R. A.; Gámez-Meza, N.; Medina-Juárez, L. A.; Castellón-Campaña, L. G.; Molina-Domínguez, C. C.; Rascón-Valenzuela, L. A.; García-Galaz, A. Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Wastes from Pecan Nut [*Carya Illinoensis* (Wagenh) K. Koch]. *Waste and Biomass Valorization* 2020, 11 (7), 3419–3432. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00681-2>.

Hilbig, J.; Policarpi, P. de B.; Grinevicius, V. M. A. de S.; Mota, N. S. R. S.; Toaldo, I. M.; Luiz, M. T. B.; Pedrosa, R. C.; Block, J. M. Aqueous Extract from Pecan Nut [*Carya Illinoensis* (Wangenh) C. Koch] Shell Show Activity against Breast Cancer Cell Line MCF-7 and Ehrlich Ascites Tumor in Balb-C Mice. *J. Ethnopharmacol.* 2018, 211, 256–266.

Kureck, I. et al. (2018). Chemical Characterization and Release of Polyphenols from Pecan Nut Shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] in Zein Microparticles for Bioactive Applications. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 137–145. doi:10.1007/s11130-018-0667-0

Lim, T. K. *Carya Illinoensis*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*; Springer Science+Business Media B.V., 2012; pp 51–57. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2534-8_3.

Reyes-Vázquez, Nohemí del C., de la Rosa Laura A., Morales-Landa, Juan L., García-Fajardo, J. A., García-Cruz, Miguel A. Phytochemical content and potential health applications of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] nutshell. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 22(2): 150-167.2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34986772/>.