



Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología Alimentaria



“Efecto de la adición de aceite vegetal y nanocápsulas de un extracto polifenólico de corteza de *Quercus crassifolia* a un yogurt medidos en hámsteres dislipidémicos”

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

M.C.A. Eréndira Valencia Avilés

ASESOR DE TESIS:

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Morelia, Michoacán

Mayo, 2019

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca de Manutención otorgada para poder realizar el presente trabajo, así como el Apoyo Complementario para Mujeres Indígenas Tipo 2 para gastos de operación del proyecto de investigación para optar por el grado.

Agradezco también a mi director de Tesis, Dr. Héctor Martínez Flores, quien confió en mi capacidad para la realización de este trabajo de investigación, además de siempre apoyarme y guiarme durante el desarrollo del proyecto.

A mis sinodales la Dra. Martha Estrella García Pérez, Dra. Guadalupe Garnica Romo, Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas, Dr. Rafael Salgado Garciglia, quienes siempre pusieron a mi disposición sus laboratorios, además de colaborar asesorando y aportando para la mejora del trabajo.

Al Dr. Manuel García Pérez, por aceptarme para la realización de la caracterización química del extracto, además de su apoyo durante la estancia de investigación en su laboratorio en la Washington State University en Pullman, WA, USA.

Al Dr. Joel Edmundo López Meza y a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, ambos me brindaron su apoyo para la utilización de los equipos de su laboratorio en la determinación de capacidad antioxidante.

A la Dra. Esperanza Meléndez Herrera, quien me ha instruido y facilitado su laboratorio para llevar a cabo el proceso de las muestras para el análisis histopatológico.

Al Dr. Abel Avilés Viveros y la Patóloga Marcela Almaguer por su colaboración en el análisis de las muestras histopatológicas.

Dr. Héctor Guillén Andrade, Dr. Pedro Antonio García Saucedo y al M.C. Atahualpa Guzmán de Casa, por darme la facilidad de usar los equipos que se encuentran en sus respectivos laboratorios

en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, como fueron el molino, evaporadores y los liofilizadores.

Dr. Pablo Cuevas Reyes y el M.C Javier Madrigal por la identificación botánica de *Q. laurina* y *Q. scytophylla*.

Al Sr. David Ramirez Alonso y Margarita Tadeo por la donación de la corteza de *Q. crassifolia*.

Dr. Emmanuel Pérez Calix, por la identificación botánica de *Q. crassifolia*.

A mis compañeros de laboratorio y amigos que se han sumado durante este tiempo, haciendo más amenas las horas de trabajo, quienes siempre colaboraron para la realización de este trabajo: Alejandra Campa, Anamaria Paiva, Arián Orozco, Ayca Seker, Evan Terrell, Cristina Martínez, Edel Juárez, Erika Sosa, Escarlette Barajas, Esther Tadeo, Eunice Tranquilino, Gabriela Ochoa, Irene Cornelio, Ivan Ignacio, Ivan Rendón, Janet Arenas, Jazmín Duarte, José Martínez, Julio César Camarena, Kalidas Mainali, Maryam Davaritouchae, Marwan Gagaa, Mercedes Urquiza, Michael Apasiku, Miguel Peña, Osvaldo Álvarez, Osvaldo Barrera, Rafael Chávez, Roberto Esquivel, Sohrab Haghghi, Xitlally Covarrubias y Yinglei Han.

A Alejandro, a mis papás y hermanos, por su apoyo y paciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Alimentos funcionales	5
3.2. Desarrollo de alimentos funcionales	6
3.2.1. Clasificación de los alimentos funcionales	7
3.3. Yogurt: un alimento funcional	8
3.3.1. Probióticos en yogurt	9
A. Streptococcus thermophilus	9
B. Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus.....	10
3.3.2. Mecanismos de acción probiótica	10
3.4. Probióticos y polifenoles	11
3.5. Aceites y grasas	11
3.5.1. Ácidos grasos	11
3.5.2. Efecto funcional de los ácidos grasos	13
3.5.3. Mecanismos de acción de los ácidos grasos insaturados en dislipidemias	13
3.6. Estrés oxidativo	15
3.7. Polifenoles como antioxidantes.....	16
3.8. Compuestos fenólicos	16
3.8.1. Clasificación de los compuestos fenólicos.....	17
A. Fenoles simples, aldehídos fenólicos y ácidos fenólicos	18
B. Estilbenos	19
C. Los lignanos y neolignanos.....	19
D. Flavonoides.....	20

E.	Taninos.....	21
3.8.2.	Efecto funcional de los polifenoles	23
3.8.3.	Mecanismos de acción de los polifenoles en dislipidemias	24
3.8.4.	Alimentos funcionales con polifenoles	25
A.	Alimentos funcionales que contienen polifenoles de encino	26
3.9.	El género <i>Quercus</i>	26
3.9.1.	Distribución del género <i>Quercus</i> en México.....	27
3.9.2.	Polifenoles identificados dentro del género <i>Quercus</i>	28
3.9.3.	Toxicidad del género <i>Quercus</i>	31
3.10.	Pruebas de toxicidad oral	31
3.10.1.	Estudios de toxicidad aguda.....	33
3.10.2.	Estudios de toxicidad a dosis repetida.....	33
3.11.	Nanoencapsulación.....	34
3.12.	Métodos de nanoencapsulación.....	35
3.12.1.	Secado por aspersión.....	35
3.12.2.	Encapsulación de compuestos polifenólicos	36
4.	JUSTIFICACIÓN.....	37
5.	HIPÓTESIS	38
6.	OBJETIVO GENERAL	39
6.1.	Objetivos particulares.....	39
7.	Metodología	40
7.1.	Colecta de cortezas.....	40
7.2.	Extracción de compuestos fenólicos	40
7.2.1.	Extracción por maceración.....	40
7.2.2.	Extracción al agua caliente.....	40
7.2.3.	Purificación del extracto de encino	41
7.3.	Evaluación de la composición polifenólica de los extractos.....	41
7.3.1.	Contenido de fenoles totales	41
7.3.2.	Contenido de ácidos fenólicos tipo hidroxicinámicos.....	41

7.3.3.	Contenido de proantocianidinas	42
7.3.4.	Contenido de flavonoides totales	42
7.4.	Capacidad antioxidante	42
7.4.1.	Capacidad de atrapar radicales peroxilo (ROO•).....	42
7.4.2.	Capacidad para eliminar el anión superóxido (•O ₂ -).....	43
7.4.3.	Capacidad para eliminar el radical hidroxilo (OH•)	44
7.4.4.	Capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	44
7.4.5.	Capacidad de captar óxido nítrico (NO•).....	45
7.4.6.	Capacidad para inhibir el ácido hipocloroso (HClO).....	45
7.5.	Caracterización química del extracto	46
7.5.1.	Análisis elemental	46
7.5.2.	Análisis proximal	46
7.5.3.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	47
7.5.4.	Pirocromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Pyro- GC-MS).....	47
7.5.5.	UV de Fluorescencia	47
7.6.	Prueba de toxicidad oral aguda	48
7.7.	Prueba de toxicidad oral a dosis repetida	49
7.8.	Secado por aspersión del extracto de <i>Q. crassifolia</i>	52
7.9.	Nanoencapsulación por secado por aspersión.....	52
7.9.1.	Estandarización de las formulaciones de material de pared.....	52
A.	Carga electrostática.....	52
B.	Punto isoelectrico del caseinato de calcio.....	53
C.	Carga electrostática de la mezcla de soluciones de maltodextrina-caseinato de calcio y extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	53
7.9.2.	Nanoencapsulación.....	53
A.	Eficiencia de encapsulación.....	55
B.	Rendimiento de encapsulación	56
C.	Tamaño de partícula.....	57

D.	Morfología de las nanocápsulas visualizadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.....	57
E.	Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las nanocápsulas.....	58
7.10.	Elaboración de yogurt	58
7.10.1.	Análisis proximal del yogurt.....	59
A.	Determinación de humedad	59
B.	Determinación de extracto etéreo	59
C.	Determinación de proteína.....	60
D.	Determinación de cenizas	60
E.	Cuatificación de fibra dietética soluble e insoluble	60
7.10.2.	Análisis fisicoquímicos	60
A.	Determinación de acidez titulable.....	60
B.	Determinación de pH	60
C.	Determinación del grado sinéresis	60
D.	Determinación de viscosidad	61
E.	Análisis microbiológico	61
7.10.3.	Análisis sensorial del yogurt plurifuncional.....	61
A.	Selección de jueces sensoriales.....	61
B.	Perfil sensorial del yogurt.....	63
7.11.	Estudio del efecto de un extracto acuoso purificado de <i>Quercus crassifolia</i> administrado a hámsteres dislipidémicos (21 días).....	63
7.12.	Análisis estadístico.....	66
8.	RESULTADOS.....	68
8.1.	Colecta y acondicionamiento de cortezas	68
8.1.1.	Identificación botánica de especies de encino.....	68
8.1.2.	Rendimientos de extracción	69
8.1.3.	Composición polifenólica de los extractos crudos de especies de encino michoacano obtenidas por maceración y por agua caliente	69

8.1.4.	Capacidad antioxidante de los extractos crudos de especies de encino michoacano obtenidos por maceración y por agua caliente.....	71
8.1.5.	Rendimiento de extracción del extracto purificado.....	75
8.1.6.	Determinación de la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de <i>Q. crassifolia</i> crudo y purificado.	75
8.2.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>Q. crassifolia</i> crudo y purificado obtenido por agua caliente.....	77
8.3.	Caracterización química del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	78
8.3.1.	Análisis elemental	78
8.3.2.	Análisis proximal	78
8.3.3.	GC-MS	79
8.3.4.	Pyro- GC-MS	85
8.3.5.	UV de Fluorescencia	100
8.4.	Prueba de toxicidad oral aguda	101
8.4.1.	Registro de alimento consumido y pesos de las ratas	101
8.4.2.	Registro de signos de toxicidad.....	103
8.4.3.	Necropsia.....	103
A.	Pesos de los órganos de las ratas Wistar.....	104
8.4.4.	Análisis hematológico y bioquímico.....	106
8.4.5.	Análisis histopatológico	110
8.5.	Prueba de toxicidad a dosis repetida	112
8.5.1.	Registro de alimento consumido y pesos de las ratas	112
8.5.2.	Signos de toxicidad	114
8.5.3.	Necropsia.....	115
8.5.4.	Análisis hematológico y bioquímico.....	117
A.	Biometría hemática	117
B.	Química sanguínea.....	121
C.	Perfil hepático	122
D.	Electrolitos séricos	126
8.5.5.	Análisis histopatológico	127

8.6.	Estandarización del proceso de nanoencapsulación del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	129
8.6.1.	Potencial ζ	129
8.6.2.	Punto isoeléctrico del caseinato de calcio	129
8.6.3.	Carga electrostática de los materiales de pared en solución	130
8.6.4.	Carga electrostática de los materiales de pared en solución con el extracto de <i>Q. crassifolia</i>	131
8.7.	Producción de nanocápsulas usando secado por aspersión	132
8.7.1.	Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i> secado por aspersión y nanoencapsulado	132
8.7.2.	Eficiencia de encapsulación	133
8.7.3.	Tamaño de partícula	134
8.7.4.	Morfología de las nanocápsulas	135
A.	Microscopía óptica	135
B.	Microscopía electrónica de barrido	138
8.7.5.	Cuantificación de compuestos fenólicos en extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i> secado por aspersión y nanoencapsulado	143
8.7.6.	Capacidad antioxidante del extracto de <i>Q. crassifolia</i> secado por aspersión y nanoencapsulado	144
8.7.7.	Tamaño de partícula	145
8.8.	Estandarización de la formulación del yogurt con nanocápsulas de extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	145
8.8.1.	Análisis proximal	146
8.8.2.	Análisis microbiológico	147
8.8.3.	Análisis fisicoquímicos	147
8.8.4.	Evaluación sensorial	148
A.	Selección y entrenamiento de jueces sensoriales	148
8.9.	Efecto de la administración del yogurt plurifuncional en hámsteres dislipidémicos	157
8.9.1.	Consumo de alimento y peso corporal de los hámsteres	157
8.9.2.	Necropsia	158

A.	Pesos absolutos y relativos de los órganos de los hámsteres	158
B.	Determinación de lípidos en hígado y heces.....	161
C.	Análisis bioquímico en suero e hígado	162
9.	DISCUSIÓN GENERAL	168
10.	CONCLUSIONES	171
11.	PRODUCTOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	173
11.1.	Artículo de divulgación “El encino y su uso en envejecimiento de vinos”.....	173
11.2.	Artículo de divulgación “Polifenoles: Tesoros naturales a explorar para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares”	176
11.3.	Artículo de revisión “Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas”	181
11.1.	Artículo de investigación “Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from <i>Quercus laurina</i> , <i>Quercus crassifolia</i> , and <i>Quercus scytophylla</i> Bark”	196
11.2.	Artículo de investigación “Investigation of the Antibacterial Activity and Subacute Toxicity of <i>Quercus crassifolia</i> Polyphenolic Bark Extract for its Potential Use in Functional Foods”	207
12.	REFERENCIAS	208
13.	ANEXOS.....	239

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica del fenol.	17
Figura 2. Estructura de ácidos fenólicos o fenoles simples.	18
Figura 3. Flavonoides más comunes.....	21
Figura 4. Estructuras de nanocápsulas: (a) Núcleo líquido, (b) Matriz polimérica, (c) Sustancia activa.....	35
Figura 5. Equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 Horiba®.....	53
Figura 6. Nano-Spray Dryer B-90 BÜCHI®.....	55
Figura 7. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F.	58
Figura 8. Proceso de fermentación.	59
Figura 9. Jueces sensoriales catando yogurt.	63
Figura 10. Hámsteres durante la prueba con el yogurt plurifuncional.	66
Figura 11. Corteza de a) <i>Q. crassifolia</i> , b) <i>Q. laurina</i> y c) <i>Q. scytophylla</i>	68
Figura 12. Cromatograma del extracto purificado de corteza de <i>Q. crassifolia</i> (EP).	80
Figura 13. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo (EF).....	80
Figura 14. Cromatograma de la fracción de agua (WF).	81
Figura 15. Cromatograma de la fracción de diclorometano (DF).	81
Figura 16. Pirograma del extracto purificado de corteza de <i>Q. crassifolia</i> (EP).....	86
Figura 17. Pirograma de la fracción de acetato de etilo (EF).	87
Figura 18. Pirograma de la fracción de agua (WF).	87
Figura 19. Pirograma de la fracción de diclorometano (DF).....	88
Figura 20. Espectro de Fluorescencia del extracto purificado de corteza de <i>Q. crassifolia</i> ..	101
Figura 21. Pesos corporales de las ratas Wistar de la prueba de toxicidad oral aguda.....	102
Figura 22. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad oral aguda.....	103
Figura 23. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	111
Figura 24. Análisis histopatológico a nivel encéfalo después de la administración oral del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	112
Figura 25. Pesos corporales de ratas Wistar (hembras y machos) durante prueba de toxicidad oral a dosis repetida con el extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	113
Figura 26. Cantidad de alimento consumido (g) por las ratas Wistar durante la exposición a dosis repetida del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	114
Figura 27. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	128

Figura 28. Potencial ζ del caseinato de calcio.	130
Figura 29. Potencial ζ de la mezcla de caseinato de calcio y maltodextrina.	131
Figura 30. Potencial ζ de la mezcla de los materiales de pared y el extracto de encino.....	132
Figura 31. Micrografías con microscopio óptico de las formulaciones CCMDE 50-50.	136
Figura 32. Micrografías con microscopio óptico de las formulaciones CCMDE 25-75.	137
Figura 33. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 50-50. ..	139
Figura 34. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 50-50. ..	140
Figura 35. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 25-75. ..	141
Figura 36. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 25-75. ..	142
Figura 37. Extracto de <i>Q. crassifolia</i> a) secado por aspersion, b) nanocápsulas.....	143
Figura 38. Atributos sensoriales de cada formulación de yogurt.	151
Figura 39. Coordenadas principales con descriptores de la escala hedónica.	153
Figura 40. Perfil sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.....	155
Figura 41. Mapa sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.....	156
Figura 42. Hígados de hámsteres de los diferentes grupos.....	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Polifenoles identificados dentro del género <i>Quercus</i>	30
Tabla 2. Concentración de extracto fenólico administrado a cada grupo de ratas.....	50
Tabla 3. Formulaciones preliminares para nanoencapsulación.	54
Tabla 4. Concentraciones para prueba de sabores básicos.	62
Tabla 5. Dietas y tratamientos administrados a los diferentes grupos de hámsteres.	64
Tabla 6. Nombres comunes de encinos y especies identificadas.....	68
Tabla 7. Rendimientos de extracción de los extractos crudos de especies de encino mexicanas obtenidas por maceración y con agua caliente.....	69
Tabla 8. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas de los extractos crudos.	70
Tabla 9. Actividad antioxidante de extractos crudos de especies de encino michoacano.	73
Tabla 10. Rendimiento de extracción del extracto de <i>Q. crassifolia</i> crudo y purificado/ 50 g de corteza seca.....	75
Tabla 11. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas del extracto de <i>Q. crassifolia</i> crudo y purificado.	76
Tabla 12. Actividad antioxidante del extracto de <i>Q. crassifolia</i> purificado.	77
Tabla 13. Análisis elemental del extracto de encino y sus fracciones.....	78
Tabla 14. Análisis proximal del Extracto de encino y sus fracciones.	79
Tabla 15. Compuestos identificados en el extracto de encino por Cromatografía de Gases...83	
Tabla 16. Compuestos identificados en el extracto de encino utilizando Pirólisis y Cromatografía de Gases.....	89
Tabla 17. Medidas de los órganos de las ratas.....	104
Tabla 18. Pesos relativos de los órganos de las ratas (%)......	105
Tabla 19. Biometría hemática completa de los grupos de ratas control y de prueba.....	107
Tabla 20. Química sanguínea de los grupos de ratas control y de prueba.	108
Tabla 21. Perfil hepático de los grupos de ratas control y de prueba.	109
Tabla 22. Registro de signos de toxicidad.	114
Tabla 23. Pesos relativos de los órganos de las ratas hembras.	116
Tabla 24. Pesos relativos de los órganos de las ratas machos.	117
Tabla 25. Biometría hemática completa de los grupos de ratas hembra control y de prueba.	118
Tabla 26. Biometría hemática completa de los grupos de machos control y de prueba.	119
Tabla 27. Química sanguínea de los grupos de ratas hembras control y de prueba.	121
Tabla 28. Química sanguínea de los grupos de ratas machos control y de prueba.....	122
Tabla 29. Perfil hepático de los grupos de ratas hembras control y de prueba.....	123

Tabla 30. Perfil hepático de los grupos de ratas machos control y de prueba.	125
Tabla 31. Electrolitos séricos de los grupos de ratas hembras control y de prueba.....	126
Tabla 32. Electrolitos séricos de los grupos de ratas macho control y de prueba.....	126
Tabla 33. Contenido de fenoles totales del extracto purificado y de las nanocapsulas de <i>Q. crassifolia</i>	133
Tabla 34. Eficiencia y rendimiento de encapsulación del extracto de <i>Q. crassifolia</i>	133
Tabla 35. Tamaño de partícula de las nanocápsulas.	134
Tabla 36. Concentración de fenoles del extracto de corteza de <i>Q. crassifolia</i> sin encapsular y nanoencapsulado.....	144
Tabla 37. Actividad antioxidante del extracto de <i>Q. crassifolia</i> secado por aspersión y nanoencapsulado.....	144
Tabla 38. Tamaño de las nanocápsulas.....	145
Tabla 39. Análisis proximal del yogur; sin aceite vegetal (F1), con aceite vegetal (F2) y con nanocápsulas (F3).	146
Tabla 40. Microorganismos detectados en las diferentes formulaciones de yogurt.	147
Tabla 41. Análisis fisicoquímicos de las diferentes formulaciones de yogurt.....	148
Tabla 42. Frecuencia en que los jueces sensoriales mencionaron los descriptores.	149
Tabla 43. Valores p y proporciones de los atributos asociados a las pruebas Q de Cochran tomando a F1 como producto ideal.....	150
Tabla 44. Mapa sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.	152
Tabla 45. Análisis de Varianza de la escala hedónica de las diferentes muestras de yogurt.	154
Tabla 46. Datos de peso de los hámsteres y consumo de alimento de los hámsteres de los diferentes grupos.....	157
Tabla 47. Medidas absolutas de los órganos de los hámsteres.	159
Tabla 48. Pesos relativos de los órganos de los hámsteres (%).	160
Tabla 49. Extracto etéreo de hígado y heces de los hámsteres.	162
Tabla 50. Análisis bioquímico en suero e hígado de los hámsteres.....	164

1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en México y el mundo, siendo un factor predisponente la dislipidemia. Una forma de prevención es la inclusión de alimentos funcionales en la dieta. A los compuestos fenólicos y a los ácidos grasos insaturados se les ha atribuido la capacidad de mejorar las concentraciones de lípidos en sujetos con dislipidemias. Una buena fuente de polifenoles son las cortezas de encino, consideradas como desechos de la industria forestal. El objetivo del proyecto fue elaborar un yogurt plurifuncional enriquecido con aceite vegetal modificado, alto en omega 6 (ácido linoleico) y en menor medida omega 3 (ácido linolénico), libre de colesterol, que sustituye la grasa de la leche con el fin de evaluar el efecto hipolipidémico e hipocolesterolémico en un modelo biológico. Se analizó la composición de diversas clases de polifenoles, además de la actividad antioxidante de extractos polifenólicos de tres especies de encinos que habitan en el Estado de Michoacán, *Q. crassifolia*, *Quercus laurina* y *Quercus scytophylla*, obtenidos de la corteza de encino con dos métodos de extracción, agua caliente en recirculación y maceración con etanol al 90%. De éstos, se eligió el extracto al agua caliente de *Quercus crassifolia*, que mostró un mayor rendimiento de extracción (21.03%), mayor contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales, 746.54 mg EAG/g; flavonoides totales, 25.42 mg EQ/g; ácidos hidroxicinámicos, 234.67 mg EACI/g; proantocianidinas, mg ECIC/g), así como una mejor capacidad antioxidante en general (EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$): $\text{OH}\cdot$, 918.19; $\text{O}_2\cdot^-$, 80.45; $\text{ROO}\cdot$, 577.01; H_2O_2 , 596.92; HClO , 740.37), el que fue purificado para mejorar su composición y la capacidad de captar especies reactivas de oxígeno. Con éste, se evaluó la toxicidad oral aguda y a dosis repetida en ratas Wistar, estableciendo como dosis segura 11 mg/kg de peso/día. Se caracterizó químicamente el extracto, encontrando compuestos de importancia biológica como el tyrosol, siringol, scylo inositol, resorcinol, *p*-cresol, entre otros. Se nanoencapsuló el extracto purificado, usando como materiales de pared maltodextrina y caseinato de calcio, adicionando las nanocápsulas al yogurt (24.5%), al cual también se le adicionó aceite vegetal (2.3%) producto al que se le realizaron los análisis proximal, microbiológico, fisicoquímico y sensorial, obteniendo como resultado que el producto cumple con las características de calida deseables para el yogurt, con un conteo de bacterias lácticas de 3.01×10^6 , destacando que las nanocápsulas no fueron perceptibles sensorialmente. La evaluación funcional del yogurt se realizó usando un modelo de hamsters, a los que se les adicionó en la dieta 2% de colesterol y 10% de aceite de coco para inducir

dislipidemia. El yogurt plurifuncional fue capaz de mantener el índice aterogénico (G3YGN=2.06) a pesar de la dieta hipercolesterolémica e hiperlipidémica, el extracto de encino evitó el almacenamiento de lípidos (G5EQ=22.79%), colesterol (G5EQ=56.04 mg/dl) y triglicéridos en hígado (G5EQ=142.16 mg/dl), además de mantener los niveles de glucosa (G5EQ=381.52 mg/dl), las nanocápsulas disminuyeron la concentración de lípidos (G7N=23%) y colesterol en hígado (G7N=17.7 mg/dl), similar al efecto mostrado cuando se administran medicamentos (lovastatina y bezafibrato), mientras que todos los tratamientos, mostraron un aumento en la concentración de HLD (C1Y=104.384, G3YGN=183.46, G4YG=172.18, G5EQ=203.00, G6Y=203.663, G7N=195.89), incluso por arriba del tratamiento con medicamento (G2M=117.625). Por lo tanto, aunque la administración del yogurt plurifuncional mostró resultados contundentes en disminución de colesterol y triglicéridos en plasma, el índice aterogénico se mantuvo. Los grupos a los que se les administró el extracto purificado de corteza de *Q. crassifolia* y las nanocápsulas disminuyeron la concentración de lípidos y colesterol en hígado.

Palabras clave: polifenoles, encino, yogurt, toxicidad, dislipidemias.

2. ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the main cause of death in Mexico and the world, dyslipidemia being a predisposing factor. A way of prevention is inclusion of functional foods in diet. Phenolic compounds and unsaturated fatty acids have been attributed the ability to improve lipid concentrations in subjects with dyslipidemias. Oak bark is considered a good source of polyphenols, considered as waste by the forest industry. The objective of the project was to develop a multi-functional yogurt enriched with modified vegetable oil, high in omega 6 (linoleic acid) and omega 3 (linolenic acid), free of cholesterol, which replaces milk fat in order to evaluate the hypolipidemic and hypocholesterolemic effect in a biological model. Composition of different polyphenols classes was analyzed, as well as the antioxidant activity of polyphenolic extracts of three species of oak that live in the State of Michoacán, *Quercus crassifolia*, *Quercus laurina* and *Quercus scytophylla*, obtained from the oak bark with two methods of extraction, hot water in recirculation and maceration with 90% ethanol. *Quercus crassifolia* bark extract by hot water was chosen, it showed a higher extraction yield (21.03%), higher content of phenolic compounds (total phenols, 746.54 mg EAG/g, total flavonoids, 25.42 mg EQ/g; hydroxycinnamic acids, 234.67 mg EACI/g, proanthocyanidins, mg ECIC/g), as well as a better antioxidant capacity in general (EC50 ($\mu\text{g/mL}$): OH \cdot , 918.19, O2 \cdot^- , 80.45, ROO \cdot , 577.01, H2O2, 596.92; HClO, 740.37), which was purified to improve its composition and the ability to capture reactive oxygen species. With this purified extract, acute and repeated dose oral toxicity was evaluated in Wistar rats, establishing as a safe dose 11 mg/kg of weight/day. The extract was chemically characterized, detecting compounds of biological importance such as tyrosol, siringol, scylo inositol, resorcinol, p-cresol, among others. The purified extract was nanoencapsulated, using maltodextrin and calcium caseinate as wall materials, then, nanocapsules were added to the yogurt (24.5%), which was also added with vegetable oil (2.3%). Proximal and microbiological analysis were done. Physicochemical and sensorial analyses, getting as a result that the product complies with the characteristics of desirable quality for yogurt, with a lactic bacteria count of 3.01×10^6 , highlighting that the nanocapsules were not sensory perceptible. The functional evaluation of yogurt was carried out using a model of hamsters, to which 2% of cholesterol and 10% of coconut oil were added in diet to induce dyslipidemia. The plurifunctional yogurt was able to maintain the atherogenic index (G3YGN = 2.06) despite the hypercholesterolemic and hyperlipidemic diet, the oak extract prevented the storage of lipids (G5EQ = 22.79%), cholesterol (G5EQ = 56.04 mg / dl) and triglycerides in liver (G5EQ = 142.16 mg / dl), in addition to maintaining glucose levels (G5EQ = 381.52 mg / dl), the nanocapsules decreased the concentration of lipids (G7N = 23%) and cholesterol in liver (G7N = 17.7 mg / dl), similar to the effect shown when administering medications (lovastatin and bezafibrate), while all treatments showed an increase in the concentration of HLD (C1Y = 104,384, G3YGN = 183.46, G4YG = 172.18, G5EQ = 203.00, G6Y = 203,663, G7N = 195.89), even above the drug treatment (G2M = 117.625). Therefore, although the administration of plurifunctional yogurt not showed conclusive results in reduction of cholesterol and triglycerides in plasma, the atherogenic index was maintained. The groups to which the purified extract of *Q. crassifolia* bark and the nanocapsules were administered decreased the concentration of lipids and cholesterol in the liver.

Key words: polyphenols, oak, yogurth, toxicity, dyslipidemias.

3. INTRODUCCIÓN

Enfermedad cardiovascular es un término colectivo que comprende un grupo de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos. Estas enfermedades son la principal causa de morbilidad y muerte prematura en México y en el mundo, generando grandes pérdidas económicas para la sociedad. Los dos trastornos más frecuentes son la enfermedad coronaria (cardiopatía coronaria) y la enfermedad cerebrovascular (accidente cerebrovascular), entre los factores de riesgo asociados con el desarrollo de estos padecimientos se encuentran las dislipidemias, vinculadas con el estrés oxidativo, que es una condición que surge cuando hay un desequilibrio entre los prooxidantes (como las especies reactivas de oxígeno, ROS) y los antioxidantes (como el glutatión) en el organismo (WHO, 2019).

Como parte de las políticas públicas del Gobierno Japonés, surgen los alimentos funcionales (Valenzuela *et al.*, 2014), con el objetivo de que al ser consumidos puedan retrasar, aminorar o evitar el padecimiento de enfermedades crónico degenerativas. Estos alimentos contienen compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los polifenoles, reconocidos por sus propiedades antioxidantes, además pueden actuar en múltiples vías de señalización implicadas en diversas patologías, lo que los distingue como potentes agentes antiinflamatorios y antiproliferativos, y los convierte en candidatos terapéuticos para el tratamiento de múltiples enfermedades, entre ellas las enfermedades cardiovasculares (García-Pérez *et al.*, 2010, 2014).

Por otro lado, con alrededor de 161 especies, México es el mayor centro de riqueza de encinos (*Quercus* spp.) en el continente americano. Se calcula que 109 de ellas son endémicas del país, es decir el 68% de los encinos del continente americano se encuentran en México, siendo su uso principal el maderable, generando una gran cantidad de corteza, la cual es considerada como desecho por la industria forestal. Los encinos contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos, entre ellos, los polifenoles (Shay *et al.*, 2015), que están disponibles para la extracción con solventes (Stevanovic *et al.*, 2009), lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos.

Sin embargo, estos compuestos naturales son fotosensibles, termolábiles y susceptibles de oxidación cuando se encuentra expuestos a los diversos factores ambientales. Además, los polifenoles a menudo presentan una baja biodisponibilidad principalmente debido a la baja solubilidad en agua. Por último, muchas de estas moléculas poseen un sabor muy astringente y amargo, lo que limita su uso en alimentos o en medicamentos orales. Para sortear estos inconvenientes, se han desarrollado sistemas de liberación y entre ellos, la encapsulación es una técnica prometedora (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Teniendo en cuenta la riqueza en polifenoles dentro de las cortezas de especies europeas del género *Quercus*, es necesario resaltar que se requiere ampliar los conocimientos sobre la composición química y las propiedades biológicas, en particular de los compuestos polifenólicos, de cortezas de especies del género *Quercus* propias de México, debido a la carencia de investigaciones sobre este tema y plantear sus posibles aplicaciones como parte de la formulación de nuevos alimentos funcionales, productos cosmeceúticos y/o farmacéuticos.

3. MARCO TEÓRICO

4.1. Alimentos funcionales

Desde la antigüedad, se conocían las propiedades de ciertos alimentos como promotores de salud, Hipócrates lo enuncia acertadamente “que la comida sea tu medicina y la medicina sea tu comida”, sin embargo el origen del término “alimento funcional” se ubica en Japón, en el año de 1980, donde las autoridades sanitarias, preocupadas por la población en edad adulta, por sus crecientes gastos en salud debido al incremento en la expectativa de vida, desarrollaron programas para prevenir enfermedades, de los cuales se desarrollaron los FOSHU “Food with Specific Health Uses” (Valenzuela *et al.*, 2014; Kaur & Singh, 2017).

Los alimentos funcionales han tomado gran importancia los últimos años, siendo objeto de múltiples investigaciones, desarrollándose como parte de las necesidades de la población y de la mano de los avances científicos y tecnológicos. Existen diferentes definiciones de alimentos funcionales, una de las más recientes es la formulada durante un Panel de discusión organizado

por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Servicio de Investigaciones Agropecuarias (ARS) en 2014, que enuncia: “Alimentos naturales o procesados que contienen compuestos bio-activos; que en concentraciones definidas, efectivas y no tóxicas, proporcionen un beneficio de salud clínicamente probado y documentado para la prevención, el manejo o el tratamiento de enfermedades crónicas”, resaltando en esta definición que los compuestos bioactivos son la “columna vertebral” de los alimentos funcionales, permitiendo a los científicos en alimentos establecer relaciones entre compuestos bioactivos y consecuencias para la salud (Martirosyan & Singh, 2015).

Algunos agentes funcionales son: i) Probióticos que contienen Lactobacilos y bifidobacterias que mejoran la función intestinal; ii) Prebióticos con fructo-oligosacáridos que favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas; iii) Ácidos grasos omega 3 y omega 6 que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, el desarrollo de tumores y que mantienen la piel saludable asegurando una adecuada coagulación de la sangre; iv) Antioxidantes que incluyen las vitaminas C y E, carotenos, así como polifenoles que limitan el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores; v) Fitoquímicos que contienen fitoesteroles, isoflavonas, lignanos y lignina (reducen los niveles de colesterol y los síntomas de la menopausia), así como vitaminas B6, B12, D y K, ácido fólico, calcio, magnesio y zinc que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y fortalecen el sistema inmune (Ramirez-Zermeno, 2010).

3.2. Desarrollo de alimentos funcionales

Siguiendo la definición de alimentos funcionales, Martirosyan & Singh (2015) enumeraron los pasos a seguir para el desarrollo de estos. Como primer paso se debe examinar el vínculo entre un alimento o bioactivo y los beneficios para la salud, realizar estudios *in vitro* e *in vivo* con especímenes no vivos y animales, respectivamente, posteriormente determinar las dosis apropiadas de compuestos bioactivos para humanos y probar los efectos secundarios adversos, desarrollar un vehículo alimenticio adecuado, comercializar el producto e informar al consumidor los beneficios para la salud de los alimentos funcionales. Se deben realizar estudios en poblaciones para probar

los efectos a largo plazo y la efectividad general del producto y finalmente evaluar las actitudes del público hacia el alimento funcional.

Como se puede observar, uno de los pasos para el desarrollo de alimentos funcionales es determinar las dosis apropiadas de bioactivos, particularmente en este estudio, se debió establecer las dosis de extracto purificado de *Q. crassifolia* que fuera segura y tuviera un efecto funcional, ya que en general, el consumo de compuestos fenólicos a niveles fisiológicos se considera seguro, en tanto que el consumo a concentraciones más altas deben someterse a pruebas de seguridad y beneficios de salud (Martirosyan & Singh, 2015).

3.2.1. Clasificación de los alimentos funcionales

Existe una clasificación de alimentos funcionales propuesta por la Asociación Dietética Americana (ADA), la cual la divide en las siguientes categorías (Hasler & Brown, 2009):

Alimentos convencionales son aquellos que no presentan una modificación o alguna alteración. Dentro de esta categoría se considera a las frutas y verduras, tales como tomates, frambuesas, col rizada y brócoli, ya que son ricos en componentes bioactivos, como el licopeno, el ácido elálgico, la luteína y el sulfuraban, respectivamente, que previenen enfermedades (Hasler & Brown, 2009).

Alimentos modificados, como su nombre lo menciona, son los alimentos que han sido alterados de sus compuestos originales, ya sea por adición de un nutriente o vitamina que no estaba en el alimento o por eliminación de uno de sus compuestos, dentro de este grupo se puede mencionar: jugo de naranja fortificado con calcio (para la salud ósea), panes enriquecidos con folato (para el desarrollo fetal adecuado) o alimentos mejorados con componentes bioactivos, como margarinas que contienen ésteres de estanol o esteroles vegetales (para reducir el colesterol) (Hasler & Brown, 2009). Dentro de este grupo también están los alimentos que se modifican para mejorar la biodisponibilidad de sus nutrientes, como el aumento de vitaminas y fibra disponible en los alimentos (González *et al.*, 2014).

La Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. (FDA) define a los *Alimentos médicos* como "un alimento que está formulado para ser consumido o administrado por vía enteral bajo la

supervisión de un médico y que está destinado al manejo dietético específico de una enfermedad o afección para la cual se establecen requisitos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, mediante evaluación médica” (FDA, 2017). Este tipo de alimentos son específicos para cierta poblaciones que necesitan dietas especiales para satisfacer su alimentación diaria (Hasler & Brown, 2009).

Alimentos para uso dietético personal, este tipo de alimentos al igual que los alimentos médicos son formulados para un cierto tipo de población que necesita ciertos nutrientes, pero a diferencia de los anteriores, cuando el alimento se vende a consumidores minoristas se convierte en un alimento para uso dietético personal. Estos alimentos se encuentran en el mercado para personas que no toleren o degraden ciertos componentes que presenten un problema para la salud, como pueden ser alimentos sin gluten o lactosa (Hasler & Brown, 2009).

3.3. Yogurt: un alimento funcional

La Norma Oficial Mexicana (NOM-181-SCFI-2010), define al yogurt como el producto obtenido de la fermentación de la leche, estandarizada o no, por medio de la acción de los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus, teniendo como resultado la reducción del pH (NOM-181-SCFI, 2010). Las bacterias ácido lácticas (BAL) mencionadas, se consideran como cultivos iniciadores de la fermentación láctica. Estos cultivos se encuentran en una relación 1:1. Existe una sinergia entre las BAL presentes en el yogurt, donde se genera una cooperación entre ambas cepas, para dar ciertas características al yogurt, en el caso de *S. thermophilus* produce ácido pirúvico, ácido fórmico y CO₂, que son aprovechados por *L. bulgaricus* para estimular su crecimiento y producir algunos péptidos y aminoácidos que son aprovechados por *S. thermophilus*. La fermentación producida por estos microorganismos se caracteriza por la degradación de carbohidratos presentes en la leche, como la lactosa, la cual es degradada en ácido láctico, en consecuencia se produce una disminución de pH, ayudando a la textura del yogurt, ya que cuando el pH está cerca del punto isoeléctrico de la caseína, junto con otras proteínas presentes en la leche forman un gel constituido por una estructura de red donde se atrapan en su interior el resto de los componentes de la leche, incluyendo el agua (Hernández & Alfaro, 2003; Ruiz & Ramírez, 2009).

El descenso del pH tiene beneficios en las características sensoriales del yogurt, garantizando una adecuada consistencia, un agradable aroma y sabor peculiar, cuyos principales componentes son aldehídos y cetonas, siendo acetaldehído y diacetilo los más notables. Otro efecto positivo de la disminución del pH es la inhibición de los microorganismos patógenos que no crecen en ambientes tan ácidos, como la Salmonela, el *Staphylococcus aureus*, además de otros microorganismos que pueden deteriorar el producto (Hernández & Alfaro, 2003; Diaz, 2015).

El yogurt es considerado un alimento funcional por contener probióticos, siendo una de las propiedades más destacables del yogurt su capacidad de reestablecer o mantener la microbiota intestinal, la cual suele verse alterada por una mala alimentación y sobre todo, por infecciones gastrointestinales y el abuso de medicamentos como los antibióticos (Hernández & Alfaro, 2003).

3.3.1. Probióticos en yogurt

Los probióticos son microorganismos vivos, que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren salud al huésped (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002). Cabe destacar que para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico debe cumplir ciertos criterios como no ser patógenos, tolerar y sobrevivir las secreciones gástricas del tracto gastrointestinal superior, competir por los sitios de adhesión en la superficie epitelial, colonizar el intestino, ser genéticamente estable sin mecanismo de transferencia de plásmido, los productos metabólicos de la cepa no deben tener ninguna reacción patógena, tóxica, mutagénica o cancerígena, demostrar el efecto benéfico en pruebas clínicas, deben poseer buenas propiedades tecnológicas para soportar y sobrevivir a las condiciones durante la fabricación, procesamiento, almacenamiento y transporte de los productos alimenticios, además de tener un nivel satisfactorio de viabilidad en el momento del consumo (González *et al.*, 2014; Bajaj *et al.*, 2015).

A. Streptococcus thermophilus

S. thermophilus son cocos bacilos gram positivos, dispuestos en cadenas de 0.7 a 0.9 μm , no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, oxidasa, catalasa (Blanco, 2015). Dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL), tienen un metabolismo homofermentativo, ya que fermentan los carbohidratos por la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (Parra-Huertas, 2010).

B. Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* pertenecen al grupo de las BAL, son bacterias ácido lácticas heterofermentativas, por lo tanto, fermentan carbohidratos por la vía de las pentosas. Se caracterizan porque sus miembros son bacilos, ya sea largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados. Son gram positivos, con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo. El tamaño de las bacterias en la leche es de 0.8-1 μm de ancho y de 4-8 μm de largo (Samaniego-Fernández & Sosa del Castillo, 2000).

3.3.2. Mecanismos de acción probiótica

El papel de los probióticos es importante porque el mantenimiento efectivo del sistema digestivo y del sistema inmune está influenciado por el equilibrio entre los millones de bacterias que colonizan el intestino humano (Hager & Ghannoum, 2017).

Los probióticos ejercen numerosos beneficios fisiológicos y de salud del hospedero que incluyen la producción de algunas enzimas digestivas y vitaminas, la producción de sustancias antibacterianas, influir en la composición de la microbiota comensal, alteran el tejido epitelial del anfitrión y el sistema inmunológico mediante la lucha contra las toxinas, mejoran la producción de ácidos grasos de cadena corta, además de reducir el pH luminal en el colon (Aluko, 2012; Alu'datt *et al.*, 2015; Bajaj *et al.*, 2015).

Los lactobacilos, generan peróxido de hidrógeno, reduciendo el pH luminal, y produce bactericinas que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas, también producen una gran cantidad de ácido láctico, como *L. salivarius*, que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* y en la reducción de la inflamación de la mucosa gástrica, tienen la función de restablecer la flora normal tras una gastroenteritis aguda, que disminuye la permeabilidad intestinal y potencia el efecto barrera inmunológico, disminuyen la intolerancia a la lactosa, además incrementan la actividad lactásica intestinal mejorando el trofismo del intestino. Una de las características importantes es la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos, afectando

la composición del ecosistema intestinal, algunas veces compiten con diversos patógenos en su adhesión al epitelio por medio de ciertos adhesivos y porque se alojan en sus lugares de anidación, impidiendo el crecimiento de enteropatógenos (Carnicé, 2006).

3.4. Probióticos y polifenoles

Los polifenoles y los probióticos se combinan para obtener un producto con el potencial de obtener mejores beneficios para la salud (Duda-Chodak *et al.*, 2015). Se ha demostrado previamente que la suplementación de un yogur con un extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* aumentó los conteos de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Además, contenía más polifenoles y exhibía mayor actividad antioxidante *in vitro* que el yogurt control, lo que sugiere que la adición de extractos polifenólicos podría ser una buena alternativa para mejorar el carácter funcional del yogurt (Pelaes Vital *et al.*, 2015).

3.5. Aceites y grasas

Los aceites y grasas son sustancias de origen vegetal o animal, que consisten en mezclas de ésteres de glicerina con ácidos grasos, que pueden ser mono, di y triglicéridos. Las grasas de los alimentos son la principal fuente de energía para el organismo, aportan elementos indispensables como vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, esteroides precursores de hormonas, entre otros, y además, son responsables de la palatabilidad y aroma de los alimentos (van Duijn, 2014).

3.5.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG), son principalmente ácidos de cadena lineal conteniendo de 4 a 24 átomos de carbono, que pueden ser saturados o insaturados; estas moléculas de origen lipídico están conformadas por triglicéridos, y estos a su vez están constituidos por ésteres de ácidos grasos con glicerol, por lo tanto estos ácidos grasos conforman una gran parte de los triglicéridos y de las grasas y aceites. También tienen funciones importantes en el cuerpo aportando energía (9 kcal/g) (Badui, 2006; Innis, 2007). Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados; ácidos grasos ramificados, los ácidos grasos insaturados en la configuración *cis* se asocian normalmente con

efectos benéficos para la salud, mientras que los ácidos grasos saturados se relacionan con efectos perjudiciales o neutros (Williams, 2000; González *et al.*, 2014).

Los ácidos grasos saturados están presentes principalmente en las grasas animales y en algunas vegetales como la de palma y el coco, en la grasa de la leche y derivados lácteos. Estas grasas producen una elevación en los niveles séricos de colesterol aumentando el riesgo cardiovascular. Se clasifican además en cuatro subgrupos según la longitud de su cadena: Ácidos grasos de corta (3 a 7 átomos de carbono), ácidos grasos de cadena media (8 a 13 átomos de carbono), ácidos grasos de cadena larga (14 a 20 átomos de carbono) o ácidos grasos de cadena muy larga (21 o más átomos de carbono) (FAO, 2008). Son más estables que los insaturados, ante la oxidación; sin embargo, en condiciones de temperatura mayor a 180 °C y en presencia de oxígeno, pueden sufrir reacciones oxidativas (Badui, 2006).

Los ácidos grasos insaturados (AGI) se clasifican en monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) según el número de insaturaciones que presentan (Simopoulos, 2018). Los AGMI presentan un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico, en especial el ácido oleico que genera pocos derivados de cadena larga en situaciones fisiológicas. A nivel lipídico origina una reducción de triglicéridos, del colesterol total, y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se encargan del transporte del colesterol del hígado a los tejidos a través de las arterias; y cuando esta fracción se encuentra en exceso se puede acumular en arterias y favorecer la arterosclerosis. El ácido oleico induce la elevación de la fracción de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se encargan de recolectar el colesterol de los tejidos y llevarlo al hígado para su excreción, y con ello retirar el colesterol de arterias, evitando así que se acumule (Calabresi, 2004).

Los AGPI son esenciales porque no pueden ser generados por nuestro metabolismo, deben ser obtenidos de la dieta y se clasifican en dos familias, ω -3 y ω -6, de acuerdo a la ubicación de la última doble ligadura respecto del metilo terminal de AG. Dentro de los omega-3 se encuentra el ácido α -linolénico (ALA) (C18:3), el ácido eicosapentanoico (EPA) (C20:5) y docosahexanoico (DHA) (C22:6), que reducen la incidencia de enfermedades cardiovasculares, por la reducción de los niveles de triglicéridos en el plasma sanguíneo, efectos antiarrítmicos, antitrombóticos y

antiinflamatorios. Se encuentran en aceites de pescado y algunos aceites vegetales. En el grupo de los ω -6 se encuentra el ácido linoleico (AL) (C18:2), su conjugado y el ácido araquidónico (ARA) (C20:4) (Michael *et al.*, 2000; Maehre *et al.*, 2015).

3.5.2. Efecto funcional de los ácidos grasos

Se han reportado diversos efectos beneficiosos de los ácidos grasos insaturados, como lo es la modificación de las propiedades biofísicas de las membranas celulares, cambios en las vías de señalización celular específicas y la expresión génica alterada. Uno de los efectos funcionales de los ácidos grasos son sus mecanismos cardioprotectores, modulan las propiedades de la membrana celular cuando se incorporan a la bicapa de fosfolípidos y controlan los canales iónicos de la membrana para prevenir la arritmia letal, estos actúan sobre el canal de sodio y calcio presentes en las membranas celulares, su función es la despolimerización del potencial de membrana, reduciendo el ion citosólico libre de calcio de tipo L, en consecuencia se estabiliza la excitabilidad eléctrica de los miocitos (Endo & Arita, 2016).

3.5.3. Mecanismos de acción de los ácidos grasos insaturados en dislipidemias

Se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados disminuyen la síntesis de triglicéridos hepáticos mediante la inhibición de las actividades de la enzima diacilglicerol aciltransferasa, ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa. También incrementan la β oxidación de los ácidos grasos al estimular los receptores peroxisoma proliferador activado (PPAR- α) (Chan *et al.*, 2002).

La síntesis de novo de triglicéridos está regulada por la proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP) –1c, un factor de transcripción del gen hepático que estimula la síntesis de las enzimas lipogénicas involucradas en esta vía (Davidson, 2006). Los omegas 3 disminuyen el depósito hepático de triglicéridos al suprimir la transcripción del gen SREBP-1c, inhibiendo así la síntesis de novo de ácidos grasos y triglicéridos. En consecuencia, disminuyen los triglicéridos en plasma al inhibir la secreción hepática de VLDL-apoB tanto en humanos como en animales experimentales, estos efectos pueden conllevar una lipólisis mejorada a través de la estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa (Chan *et al.*, 2002).

Al menos 4 receptores nucleares se ven afectados por los ácidos grasos y pueden regular el metabolismo de los triglicéridos. Estos incluyen el receptor X hepático (LXR), el factor nuclear 4 alfa de hepatocito (HNF-4 α), el receptor farnesoide X (FXR), también conocido como receptor de ácido biliar y los receptores del peroxisoma proliferador activado (PPAR). Aunque el SREBP-1c controla las enzimas lipogénicas, como la acetil coenzima A carboxilasa, la síntesis de ácidos grasos, está bajo la regulación de la LXR (Davidson, 2006).

El LXR se activa mediante la unión de ligandos como el oxisterol, que previene los niveles excesivos de colesterol celular. Los ácidos grasos no esterificados también son ligandos de LXR y parecen competir con los oxisteroles por la activación de LXR. La activación de LXR previene la toxicidad celular por colesterol al aumentar la expresión de genes que estimulan la síntesis de ácidos biliares (7- α -hidroxilasa, citocromo P450 [CYP] 7A) y la excreción de colesterol en la bilis e inhibe la absorción intestinal de colesterol (Norlin *et al.*, 2000; Davidson, 2006). LXR también activa el transportador de casete de unión de trifosfato de adenosina (ABC) A1 para promover el flujo de salida de colesterol a HDL, así como a ABCG5 y ABCG8 para aumentar el flujo de salida de las células hepáticas a los ácidos biliares y de las células intestinales del lumen. El resultado neto de estos efectos es la reducción de colesterol celular. La activación de LXR también regula la síntesis de TG al aumentar la expresión de SREBP-1c (Yu *et al.*, 2002; Davidson, 2006).

HNF-4 α se une a la acil coenzima A de cadena larga con alta afinidad. Mientras que la unión de los ácidos grasos saturados estimula la transcripción de HNF-4 α , la unión de los ácidos grasos poliinsaturados inhibe la transcripción del gen HNF-4 α . HNF-4 α afecta a los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo tanto de las grasas como de los carbohidratos, incluidas las apolipoproteínas CIII, AI, AIV en el metabolismo de las lipoproteínas, L-piruvato quinasa en el metabolismo de los carbohidratos y CYP7A en la síntesis de ácidos biliares (Davidson, 2006).

La activación de FXR disminuye los niveles de triglicéridos al aumentar el aclaramiento hepático mediante la modulación de la actividad lipoproteinlipasa, induciendo PPAR- α e inhibiendo SREBP-1c. Los ácidos grasos poliinsaturados también se ha demostrado recientemente ser agonistas de FXR (Davidson, 2006).

Tanto los ácidos grasos no esterificados saturados como los insaturados son los ligandos naturales para PPAR. Se han identificado tres subtipos de PPAR (α , β γ), que varían en la expresión y la función biológica. PPAR- α reduce los niveles de triglicéridos a través de la disminución de la expresión de apolipoproteína CIII, que inhibe la lipoproteínlipasa, lo que mejora el catabolismo de triglicéridos. A nivel celular, PPAR- α aumenta la oxidación de los ácidos grasos microsomales, peroxisomales y mitocondriales. PPAR- α también induce lipoproteínas lipasa y proteínas de transporte de ácidos grasos, y mejora la diferenciación de los adipocitos, lo que resulta en niveles reducidos de triglicéridos. PPAR- α , β y γ parecen influir en el transporte inverso del colesterol y aumentar los niveles de HDL. PPAR- α muestra una clara preferencia por la unión de ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados provocan sus efectos hipotriglicéridémicos al suprimir de manera coordinada la lipogénesis hepática mediante la inhibición de SREBP-1c, regulando al alza la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y el músculo esquelético a través de la activación de PPAR y mejorando el flujo de glucosa a glucógeno a través de la regulación negativa de HNF-4 α (Davidson, 2006).

3.6. Estrés oxidativo

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de radicales libres y especies reactivas con los sistemas antioxidantes. Cuando se rompe este balance los radicales libres pueden dañar ADN, proteínas y lípidos. Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con los diferentes compuestos celulares pueden ser muy variadas, pero siempre de importancia biológica y con consecuencias irremediables a corto, mediano o largo plazo (Valko *et al.*, 2007; Avelar *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo ha sido implicado en varias condiciones patológicas involucradas en enfermedades vasculares, cáncer, desordenes neurológicos, diabetes, envejecimiento, entre otras enfermedades (Valko *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo a través de la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) promueve la obesidad, la hiperglucemia, la hiperlipidemia que es probablemente debido a la mayor incidencia de la

disfunción mitocondrial y a que la producción de superóxido se ha asociado con la acumulación de grasa (Auberval *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2015).

3.7. Polifenoles como antioxidantes

Los polifenoles son considerados como antioxidantes exógenos, debido a que provienen de la dieta (Escorza *et al.*, 2009). Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos polifenólicos pueden captar directamente las especies moleculares reactivas de oxígeno tales como el radical superóxido ($O_2\bullet$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($HO\bullet$), oxígeno singlete (1O_2) o radicales peroxilo ($RO_2\bullet$). Los polifenoles (Williamson & Manach, 2005; Quiñones *et al.*, 2012) poseen características estructurales ideales para su acción antioxidante, debido principalmente a su capacidad para donar átomos de hidrógeno o electrones (Shi & Noriko, 2001).

3.8. Compuestos fenólicos

Los compuestos fitoquímicos fenólicos son una clase de compuestos orgánicos aromáticos (Figura 1), su estructura se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos fenólicos con grupos hidroxilo en su estructura (Williamson & Manach, 2005; Quiñones *et al.*, 2012).

Se trata de metabolitos secundarios procedentes del reino vegetal; encontrándose en los frutos, hojas y diversos alimentos y bebidas, tal es el caso del vino y la soya que contienen resveratrol e isoflavonas, respectivamente (Creus, 2004). Debido a sus diversas funciones biológicas son de importancia para el crecimiento y la reproducción de las plantas. Estas moléculas son sintetizadas ante diferentes estímulos actuando como fitoalexinas, atrayentes para polinizadores, pigmentos que proporcionan color a flores y frutos y como defensa de la planta ante su entorno (Popa *et al.*, 2007; Lattanzio, 2013). A los polifenoles se les atribuye la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul en las frutas; la cantidad dependerá del grado de madurez, variedad, clima, suelo, ubicación geográfica y almacenamiento del fruto en cuestión (Lampila *et al.*, 2009; Haminiuk *et al.*, 2012).

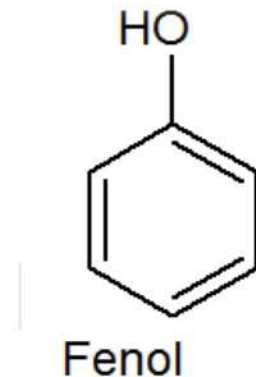


Figura 1. Estructura básica del fenol.

Su consumo no es esencial debido a que no son considerados nutrientes, sin embargo, su ingesta diaria es 10 veces superior a la vitamina C, siendo la principal fuente de antioxidantes dentro de la dieta (Quiñones *et al.*, 2012). Su consumo evita el daño oxidativo, lo que previene el envejecimiento y enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Haminiuk *et al.*, 2012).

Son compuestos ampliamente estudiados debido a que se les ha atribuido propiedades saludables para el cuerpo humano como lo son actividades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, antialérgicas, vasodilatadoras, vasoprotectoras, antitrombóticas, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antilipémicas y antiateroscleróticas (Ferguson *et al.*, 2004; Schroeter *et al.*, 2006; Del Rio *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2012). Muchas de estas funciones biológicas son atribuidas a su efecto antioxidante de manera directa como secuestrantes de radicales libres y de manera indirecta como quelantes de iones metálicos pro-oxidantes (Ignat *et al.*, 2011; Delgado, 2015).

3.8.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los fenoles pueden ser clasificados de diversas formas, siendo la más común la que se basa en el número de anillos fenólicos y los elementos unidos a estos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico) (Figura 2), estilbenos, lignanos, taninos y flavonoides (Figura 3) (Santhakumar *et al.*, 2018).

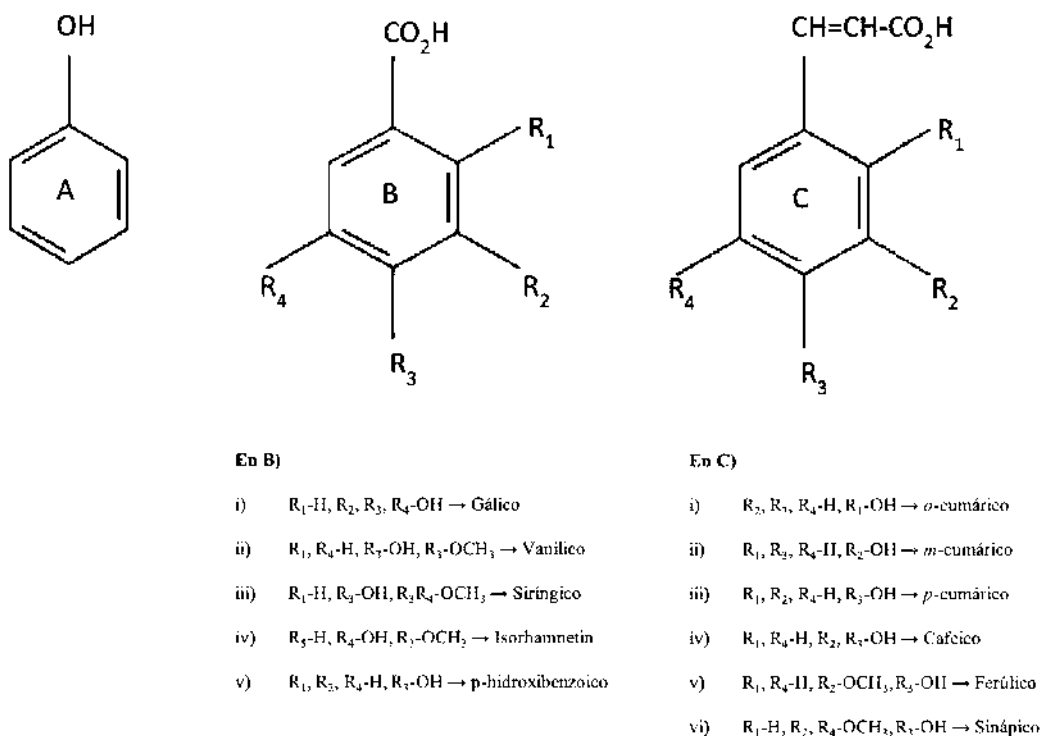


Figura 2. Estructura de ácidos fenólicos o fenoles simples con estructura de 6 carbonos (A), ácido fenilacético (B), ácidos benzoicos (C) y ácidos hidroxicinámicos (D). Las diferentes estructuras de los ácidos benzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (Santhakumar *et al.*, 2018).

A. Fenoles simples, aldehídos fenólicos y ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos: representan un tercio de los fenoles dietéticos; están presentes en forma libre y conjugada con otros compuestos. Los ácidos fenólicos se clasifican en dos subgrupos: los ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Haminiuk *et al.*, 2012). Los derivados del ácido hidroxibenzoico, cuentan con una estructura C6-C1, forman parte de estructuras complejas como taninos hidrolizables. Los principales representantes incluyen al ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatechúico, vanílico y siringico (Manach *et al.*, 2004; Ignat *et al.*, 2011).

Los derivados del ácido hidroxicinámico son compuestos aromáticos C6-C3, incluyen el ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, que se encuentran unidos a otros compuestos como el ácido clorogénico que es un éster de los ácidos quínico y cafeico (Bravo, 1998; Ignat *et al.*, 2011).

B. Estilbenos

Los estilbenos son sintetizados por la adición de 1 a 3 moléculas de malonil-CoA con ácidos cinámicos, que se derivan de la ruta biosintética de fenilpropano. Un estilbeno es, por definición, el 1,2-difeniletano. Agrupados con bibenzilos, que también tienen un esqueleto C₆-C₂-C₆, forman la familia de estilbenoides (Goyal *et al.*, 2012). Se encuentran en plantas superiores y funcionan como fitoalexinas y reguladoras del crecimiento. A estos se les asigna un papel de fungicidas además de proteger los árboles contra el ataque de los insectos. El más representativo de este grupo es el resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno), que se encuentra normalmente en la piel de las uvas en mayor cantidad, donde se produce como una sustancia química por las plantas en respuesta a factores como el estrés, rayos ultravioleta (UV) y en defensa de ciertos hongos, en humanos se le considera como compuesto con actividad antioxidante, actividad protectora del sistema cardiovascular, efecto antiinflamatorio y antiagregante plaquetario (Jang *et al.*, 1997; Belguendouz, & Delpal, 1999; Hung *et al.*, 2000; Orallo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Frémont, Gülçin, 2010; Beltrán, 2013).

C. Los lignanos y neolignanos

Los lignanos y neolignanos son dímeros naturales del fenilpropano, cuya biosíntesis está controlada enzimáticamente y proporciona varios enlaces entre las cadenas de carbonos de propano. Cuando las unidades de fenilpropano están unidas por enlaces C-C en las posiciones 8 y 8', el compuesto se considera un lignano. Si los dímeros fenilpropano están unidos por medio de distintos enlaces C-C 8-8', se trata de un neolignano (Moss, 2000). Por lo tanto, hay neolignanos que contienen enlaces 8-O-4', 3-O-4' (oxineolignanos), 3-3', 8-3', 1-3', etc. (Stevanovic *et al.*, 2009).

Los lignanos son parte del sistema de defensa química de la planta y tradicionalmente se consideran metabolitos secundarios del duramen (Willför *et al.*, 2006). Son reconocidos por su actividad fitoestrogénica, actúan en el organismo como hormonas naturales (estrógenos), aunque con menor potencia. Así, si el cuerpo produce un exceso de estrógenos, los fitoestrógenos pueden bloquear parcialmente sus efectos negativos, en contra, si existe una deficiencia, pueden llenar algunas necesidades. Los lignanos también se consideran potentes antioxidantes y agentes antiinflamatorios (Stevanovic *et al.*, 2009; Aehle *et al.*, 2011).

D. Flavonoides

Los flavonoides comparten la misma ruta biosintética de la lignina y están representados por compuestos que tienen esqueleto C6-C3-C6, es decir, una porción en la base de fenilpropano. Son moléculas ampliamente distribuidas en las plantas que se consumen comúnmente en las frutas, verduras y bebidas como el vino y el té. Su estructura molecular se caracteriza por un esqueleto de carbono tipo difenil 1,3-propano que comprende 15 átomos de carbono divididos en dos anillos de benceno A y B interconectados por la estructura cíclica a tres átomos de carbono. Los flavonoides juegan un papel clave en la pigmentación, la defensa química contra los depredadores y la reproducción de las plantas. Varios subgrupos de flavonoides existen en función del grado de insaturación y oxidación del heterociclo como son las flavonas, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas, etc (Abbas *et al.*, 2017). Los flavonoides generalmente existen en la naturaleza en forma hidroxilada, que también se puede combinar con diversas moléculas (por lo general por la parte aglicona de muchos glucósidos), lo que explica la gran variedad de estos compuestos. La presencia de hidratos de carbono o grupos metilo en el hidroxilo fenólico es muy frecuente (Manach *et al.*, 2004; Stevanovic *et al.*, 2009; Quiñones *et al.*, 2012).

Glucósidos (glicósidos de flavonoles), principalmente kaempferol, quercetina y miricetina son polifenoles predominante en el follaje de las plantas vasculares. Los flavonoles representan un marcador de plantas leñosas en la naturaleza (Stevanovic *et al.*, 2009). Las antocianidinas (del griego anthos, flor y kyanos, azul) son uno de los pigmentos más importantes de las plantas; su solubilidad en agua los distingue de pigmentos lipófilos tales como clorofila y β -caroteno. Ellos son responsables de tonalidades azules, color de malva, púrpura, rojo, escarlata, naranjas brillantes de plantas superiores (Davies *et al.*, 2016). La hidroxilación del anillo A de las antocianidinas es siempre del tipo 5,7-dihidroxi, mientras que el anillo B está hidroxilado en el 4' y los sustituyentes en los carbonos 3' y 5' variarán con el compuesto. Las antocianinas, a su vez, son los glicósidos de las antocianidinas; por tanto, son solubles en agua. Aunque para la mayoría de los flavonoides, la cadena de propano alifático se incluye en un heterociclo de pirano, también

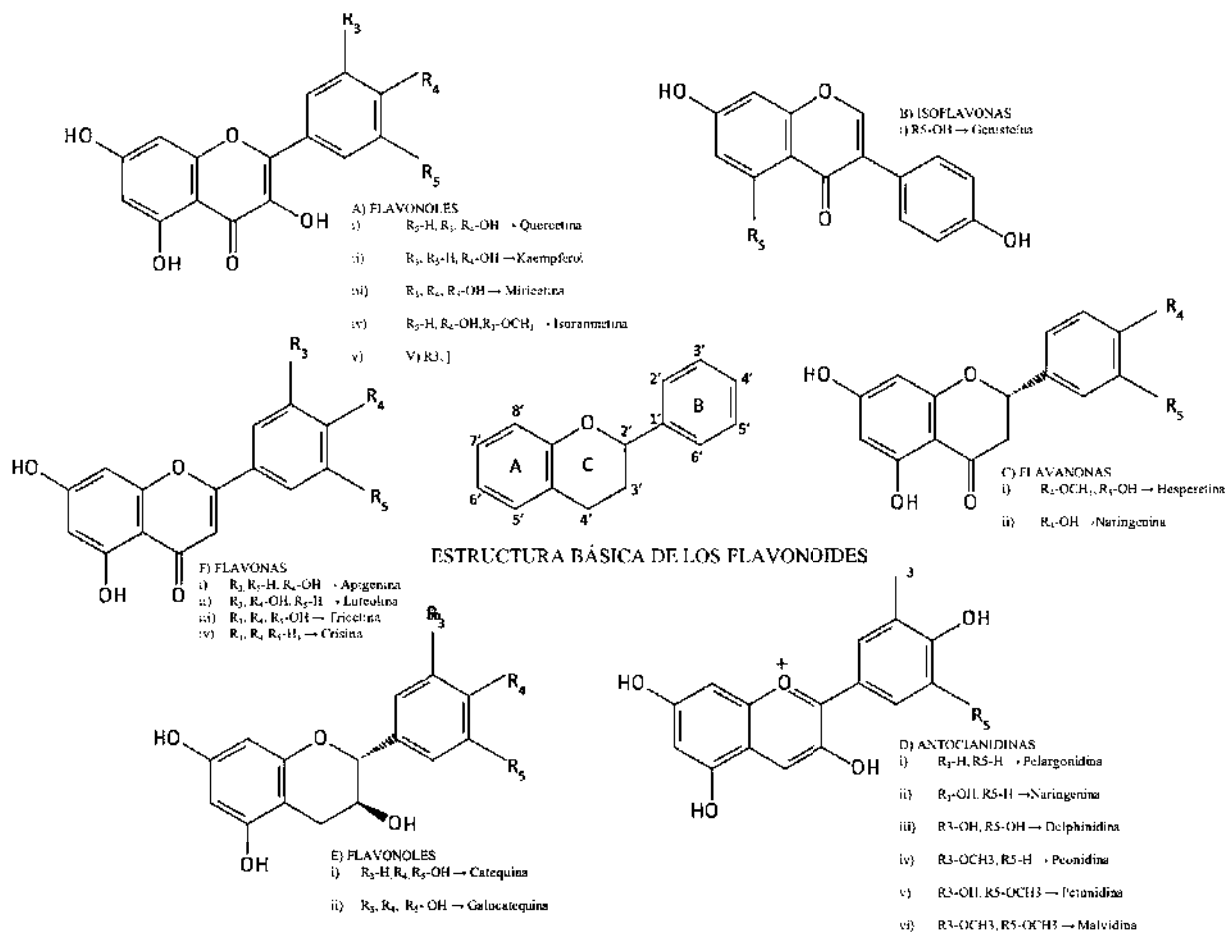


Figura 3. Flavonoides más comunes; (A) Flavonoides, (B) Isoflavonas, (C) Flavanonas, (D) Antocianidinas, (E) Flavonoides, (F) Flavonas (Santhakumar, et al., 2018).

hay otras moléculas para el que la cadena presenta diferentes esqueletos: chalconas, auronas e isoflavonas (Stevanovic *et al.*, 2009).

Las isoflavonas tienen estructuras similares a los estrógenos, se encuentran en las leguminosas, a partir de estas y las uvas se obtienen la epigallocatequina (Vitale *et al.*, 2013). Las proantocianidinas o taninos condensados, están formadas por dímeros, oligómeros y polímeros de catequinas (Weber *et al.*, 2007).

E. Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos, solubles en agua, cuya masa molar está comprendida entre 500 y 3000 Da. Además de presentar las reacciones características de fenoles, son capaces

de precipitar los alcaloides, gelatina y otras proteínas (Ignat *et al.*, 2011; Haminiuk *et al.*, 2012). Esta reactividad con las proteínas es una propiedad que ejercen sobre el colágeno de la piel durante su transformación en cuero. Los taninos están muy extendidos en el reino vegetal, el contenido y la naturaleza varían de una especie a otra. Se distinguen, en función de su estructura y propiedades, dos tipos de taninos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Así, mientras que los taninos condensados están presentes en la mayoría de las plantas vasculares, los taninos hidrolizables se limitan generalmente a las dicotiledóneas (Stevanovic *et al.*, 2009; Falcão *et al.*, 2013).

El papel biológico de taninos en plantas se relaciona principalmente con la protección contra las infecciones, insectos o incluso contra los herbívoros. Estas propiedades están relacionadas principalmente con su capacidad de interactuar con la proteína, de quelar metales y su actividad antioxidante. Estas tres capacidades combinadas con sus efectos antiinflamatorios y antiproliferativos explican los efectos beneficiosos de los taninos sobre la salud humana (Stevanovic *et al.*, 2009).

Taninos hidrolizables. Generalmente, los taninos hidrolizables tienen un peso molecular más bajo y precipitan mucho menos las proteínas que los taninos condensados. Se caracterizan por una parte central que consiste en un poliol (generalmente glucosa) cuyas funciones hidroxilo están esterificadas con ácido gálico. Hay dos tipos de taninos hidrolizables: a) los galotaninos que se liberan del ácido gálico y sus derivados galloilados y b) los elagitaninos que se liberan por hidrólisis de ácido gálico y ácido elágico, hexahidroxidifénico, valónico, etc (Arapitsas, 2012).

Taninos condensados o proantocianidinas. Las proantocianidinas o taninos condensados son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles. Su nombre, proantocianidinas, es debido a que forman, tras su degradación por el ácido clorhídrico en medio alcohólico, pigmentos antociánicos de coloración roja, incluyendo la cianidina y en algunos casos la delfinidina. Las proantocianidinas se pueden clasificar en dos categorías en función del grado de polimerización de sus unidades monoméricas: oligómeros (desde los dímeros hasta los pentámeros) y polímeros (a partir de los hexámeros) (Chai *et al.*, 2018).

La diversidad de las unidades de monómero y el tipo de enlaces interflavánicos que unen a sus monómeros, provocan que exista un número considerable de diferentes proantocianidinas. Dependiendo del número y posición de los grupos hidroxilo que se encuentran en el núcleo flavanol, hay diferentes clases de proantocianidinas, las procianidinas, prodelfinidinas, las profisetinidinas, las prorobinetinidinas, los proguibourtinidinas, la proteracacinidinas, los proapigenidinas, los proluteolinidinas, los protricinidinas, las propelargonidinas, entre otros (Stevanovic *et al.*, 2009).

Las procianidinas son oligómeros y polímeros compuestos de unidades flavan-3-oles. Las dos unidades monoméricas más abundantes son el (+) - catequina y (-) - epicatequina. Este último también puede estar presente en la forma esterificada con ácido gálico. En cuanto a los dímeros, se pueden encontrar dos tipos de procianidinas: las procianidinas de tipo B que resulta de la condensación de dos unidades de flavan-3-ol unidos entre sí por un enlace inter-monómero preferiblemente de tipo C4-C8 y el tipo de procianidinas A vinculadas preferentemente por enlaces C4-C6 y que incluyen, además, un enlace éter entre el oxígeno del carbono 5 (C5) o del carbono 7 (C7) de la unidad terminal y el carbono 2 (C2) de la unidad superior. Las procianidinas del tipo A, menos abundantes que la de tipo B, se pueden obtener de estas últimas a través de una oxidación intramolecular. Los taninos condensados durante mucho tiempo han sido nombrados leucoantocianidinas debido a su falta de color. Actualmente se reserva este nombre a compuestos del tipo flavan-3,4-diol (Gu *et al.*, 2002).

3.8.2. Efecto funcional de los polifenoles

En el transcurso de los últimos 20 años, los polifenoles han sido estudiados por su posible participación en la prevención de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus y las neurodegenerativas (Daglia, 2012).

Los estudios de laboratorio indican que los efectos antiobesidad de las dietas ricas en polifenoles pueden atribuirse a la capacidad de los polifenoles para interactuar, directa o indirectamente, con los tejidos adiposos (preadipocitos, células madre adiposas y células inmunitarias), como las catequinas del té verde y los galatos de epigallocatequina y curcumina (Wang *et al.*, 2014). El galato de epigallocatequina inhibe la diferenciación de preadipocitos, disminuye la proliferación

de adipocitos, induce la apoptosis de los adipocitos, suprime la lipogénesis y promueve la lipólisis y la (β) -oxidación de ácidos grasos (Moon *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2011).

3.8.3. Mecanismos de acción de los polifenoles en dislipidemias

Los polifenoles tienen diferentes estructuras químicas, por lo que podrían estar involucrados en el metabolismo de lípidos a través de más de un mecanismo (Galleano *et al.*, 2012), entre los que se han demostrado la modulación de la actividad de diferentes enzimas y la expresión de los factores de transcripción involucrados en la síntesis de triglicéridos y colesterol (Lee *et al.*, 2015).

La proteína de unión al elemento regulador de esterol 2 (SREBP2) es un factor de transcripción clave en la regulación de la homeostasis del colesterol celular e induce la transcripción de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR) (Miserez *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015). SREBP2 se ancla en las membranas del retículo endoplásmico (precursor SREBP2, pSREBP2) y se transfiere al núcleo (SREBP2 maduro, mSREBP2) antes de regular la transcripción de su gen objetivo (Rawson, 2003). El nivel de transcripción de SREBP2 se redujo mediante el tratamiento con polifenoles, como resultado de la reducción en mSREBP2, y la transcripción de HMGCR disminuyó (Lee *et al.*, 2015).

Los polifenoles pueden actuar directamente sobre el sitio activo de la HMGCR o, indirectamente, al aumentar el tamaño de las gotas de lípidos (triglicéridos), lo que reduce la accesibilidad del sustrato a la enzima. También se han relacionado con un aumento en la expresión hepática del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR) y la carnitina palmitoiltransferasa-1, que están involucradas en la lipólisis, y a una expresión disminuida de las enzimas involucradas en la lipogénesis, incluida la ácido graso sintasa y 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) -coenzima A reductasa (Galleano *et al.*, 2012).

Otro de los mecanismos mencionados es el aumento de la oxidación de los ácidos grasos debida a la activación de la señalización mediada por adiponectina a través de un aumento de la expresión del ARNm de los receptores de adiponectina hepática AdipoR-1 y AdipoR2, y AdeletR1 del músculo esquelético (Galleano *et al.*, 2012).

AMP (AMPK) es un sensor celular del metabolismo energético y un regulador del metabolismo del colesterol y la glucosa y del metabolismo de los lípidos hepáticos (Luo *et al.*, 2005; Steinberg & Kemp, 2009; Carling *et al.*, 2012). La activación de AMPK por fosforilación suprime la biosíntesis de colesterol de HMGCR, inhibiendo la actividad enzimática y bloqueando la biosíntesis del colesterol hepático (Steinberg & Kemp, 2009; Lee *et al.*, 2015). Aunado a esto, la inhibición de la AMPK en la ruta de mTOR activa el proceso de autofagia, que degrada las gotitas de lípidos y mejora la acumulación de lípidos hepáticos y la esteatosis hepática (Kim *et al.*, 2011; Mihaylova & Shaw, 2011). AMPK fosforila directamente la proteína de unión del elemento regulador del estero 2 (SREBP2), que inhibe la translocación nuclear de SREBP2, disminuyendo la transcripción de HMGCR (Li *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). Los polifenoles, específicamente algunos flavonoides han sido identificados como activadores de AMPK, esta activación suprime la síntesis de ácidos grasos en los hepatocitos y la adipogénesis en los adipocitos (Liu *et al.*, 2011; Ono & Fujimori, 2011), además, reducen las concentraciones plasmáticas de LDL (Hooper *et al.*, 2008).

Otro de los mecanismos es la reducción de la expresión de la Acetil-CoA acetil transferasa citosólica (ACAT2). Los ésteres de colesterol se almacenan en gotitas de lípidos y el colesterol libre se eliminan de las células. ACAT2 sintetiza la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre y ácidos grasos, y la expresión reducida de ACAT2 indica una síntesis disminuida de ésteres de colesterol y un aumento posterior en el flujo de salida de colesterol. ACAT2 podría estar implicada en la regulación por varios mecanismos, incluida la disminución de la expresión de ACAT2 por la inhibición de HNF4 α dependiente de AMPK, un factor de transcripción de la expresión de ACAT2 (Hong *et al.*, 2003; Pramfalk *et al.*, 2009). La fosforilación del Factor nuclear del hepatocito 4 α (HNF4 α) por AMPK reduce la estabilidad de unión al ADN, suprimiendo la expresión del gen diana, incluyendo ACAT2 (Chavalit *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015).

3.8.4. Alimentos funcionales con polifenoles

Como se mencionó anteriormente, dentro de los alimentos funcionales se encuentran aquellos a los que se les agregan ingredientes funcionales, como por ejemplo los compuestos fenólicos. Según González (2014) se han llevado a cabo múltiples desarrollos, que tienen en común la aplicación de compuestos fenólicos y extractos vegetales, ricos en estos metabolitos, durante la

elaboración de productos lácteos con el objetivo de mejorar su calidad (tecnológica y nutricional) e incrementar sus propiedades funcionales. La interacción entre los alimentos lácteos y los compuestos fenólicos es determinada por las proteínas, los mecanismos de interacción específicos entre proteínas y polifenoles juegan un papel fundamental en la determinación de las propiedades funcionales que adquieren los productos lácteos. Han *et al.* (2011) estudiaron la inclusión de extractos de uva, arándano rojo y té verde como ingredientes funcionales en la elaboración de queso, notando que la actividad anti-radical del alimento aumenta considerablemente (Han *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014).

Beltrán (2013) produjo un yogurt, como alimento funcional donde se encapsuló resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), para la protección de su bioactividad y estabilización. Vivas *et al.* (2016), a partir del lactosuero y pulpa de curuba, desarrollaron una bebida funcional refrescante rica en antioxidantes, obteniendo una muy buena aceptación por parte de los consumidores.

A. Alimentos funcionales que contienen polifenoles de encino

Las especies de encino contienen una gran cantidad de polifenoles, estos compuestos fenólicos presentes en la madera, bellotas, ramas y hojas, se han usado desde hace mucho tiempo. La madera de encino se usa en la fabricación de barriles para el envejecimiento del vino, durante este proceso hay una extracción de los compuestos fenólicos presentes en la madera de la barrica, influyendo en la calidad de la bebida, además los compuestos fenólicos solubilizados de la madera mejoran el sabor; se produce una oxidación de algunos compuestos fenólicos por el oxígeno atmosférico presente en la barrica que produce una reducción de la astringencia y cambios de color (Alañón *et al.*, 2011).

En Ogliastra, Italia se consumía un pan de bellota de encino de *Quercus*, en el cual era preparado por los antiguos habitantes. En América los pueblos indígenas del norte usaban las bellotas de *Quercus ilex subsp. Ballotta Samp* para la producción de una gran variedad de ingredientes como harina, aceite y bebidas (Claudia, 2013).

3.9. El género *Quercus*

Dentro de la familia Fagaceae se encuentra el género *Quercus*, el cual se distribuye por todo el mundo, en regiones tropicales y subtropicales, pero sobre todo en bosques templados del hemisferio norte, aunque se han encontrado incluso en lugares secos como sureste de Asia y nororiente de África. Dentro de América se localiza desde Canadá hasta Colombia (Romero *et al.*, 2002; Valencia, 2004). No se conoce la cantidad exacta de especies de este género debido a la cantidad de sinónimos existentes, la complejidad de su clasificación taxonómica, la variabilidad morfológica y su capacidad para formar híbridos (Romero *et al.*, 2002).

Dentro del género *Quercus* se encuentran dos subgéneros: *Cyclobalanopsis* y *Quercus* (Valencia, 2004). El subgénero *Quercus* es representado por 3 secciones *Quercus* (encinos blancos) con 81 especies, *Lobatae* (encinos rojos) con 76 especies, y *Protobalanus* (encinos intermedios o de copa dorada) (Valencia, 2004). El género puede presentarse con árboles o arbustos de corteza gruesa, tallos leñosos, hojas coriáceas (diferentes tipos de ápice, textura, tamaño y color), y presencia de bellotas.

3.9.1. Distribución del género *Quercus* en México

El territorio mexicano es reconocido por ser un centro mundial de diversidad para el género *Quercus* (Valencia, 2004). Estas especies constituyen parte de la vegetación presente en Sierra Madre Oriental, occidental y sur, en la sierra del norte de Oaxaca y en las de Chiapas y de Baja California, así como en el Eje Volcánico Transversal. En clima caliente se presentan en forma de manchones a lo largo de litorales desde Nayarit y Tamaulipas hasta Chiapas a excepción de Yucatán y Quintana Roo (Rzedowski, 2006). Se consideran aproximadamente entre 400 y 500 especies del género distribuidas por el mundo de las cuales 161 se encuentran en México y 109 son endémicas del país, esto representa una tercera parte respecto a las existentes a nivel mundial (Manos *et al.*, 1999).

En México los encinos son utilizados para diversos fines, siendo el uso principal el maderable, medicinal (tratamiento de algunas enfermedades), alimenticio (harinas, pan), forraje (alimentación caprina y porcina), artesanal (arreglos navideños), taninos y colorantes (curtir pieles y fijar colores) (Luna-José *et al.*, 2003). El uso medicinal del encino, principalmente como infusiones, está asociado a las etnias indígenas. Moreno-Jiménez *et al.* (2015) demostraron que *Q. sideroxylla*

tenía actividad antiinflamatorias y antiproliferativa, al administrar a ratones infusiones como única fuente de bebida (Moreno-Jimenez *et al.*, 2015).

En el caso específico de Michoacán, los encinos satisfacen 80% de las necesidades energéticas en forma de leña y carbón (Arizaga *et al.*, 2009). Después de los pinos (*Pinus* sp.), los encinos constituyen el recurso forestal más importante de México. Teniendo en cuenta lo anterior, se considera que los volúmenes de cortezas de esta especie son considerables, por lo que resultaría oportuno su estudio con el objetivo de proponer nuevas aplicaciones que permitan su aprovechamiento racional.

Las estructuras del árbol de encino a las que se les ha dado uso son la corteza, bellotas, agallas, savia, hoja, flor y yemas. Cabe destacar que la parte más usada es la corteza ya que en esta se concentra una gran cantidad de componentes químicos, como los taninos (ácido tanínico), que tienen propiedades de astringente, tónico y antiséptico (Ponce, 1946).

Dentro de las especies de *Quercus* con distribución amplia se encuentra *Q. crassifolia*, también conocido por encino chicharrón, encino colorado, encino prieto, encino roble, encino hojarasco y encino huaje. Se presenta en forma de arbolillo que va de los 2 a los 15 metros de altura, con un tronco que puede llegar a ser hasta de un metro de diámetro; se reconoce por sus hojas aristadas con el envés lanoso amarillo o café. Se distribuye ampliamente entre los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz (Valencia, 2004).

3.9.2. Polifenoles identificados dentro del género *Quercus*

Dentro de la literatura se han reportado diversos compuestos fenólicos presentes en diferentes especies del género *Quercus*, en flores, hojas maderas, corteza y bellotas, sobre todo taninos hidrolizables, taninos condensados, flavonoides y ácidos fenólicos (Cuevas-Reyes *et al.*, 2016) (Tabla 1).

En diversas investigaciones se ha determinado la presencia de diferentes compuestos fenólicos en los diversos tejidos provenientes de especies de encino, encontrándose desde compuestos fenólicos

de bajo peso molecular en la madera de *Q. robur*, como ácido gálico, ácido protocatéuico, *p*-cumárico y elágico, hasta elagitaninos, que son polifenoles de alto peso molecular, tales como la castalagina, las roburinas AE, la grandinina y la vescalagina (Alañón *et al.*, 2011). Cabe destacar la alta concentración de compuestos fenólicos presentes en las cortezas de estos mismos árboles, donde han sido detectados ácidos fenólicos como el ácido protocatéuico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido elágico, ácido cinámico, ácido ferúlico y ácido benzoico, en *Q. serrata* (Tuyen *et al.*, 2016).

En las especies mexicanas de encino, también se han detectado y cuantificado ácidos fenólicos y los flavonoides en extractos de hojas de *Q. resinosa*, siendo el ácido gálico más prominente, ácido protocatéuico, 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido vanílico, ácido siríngico, galato de epigallocatequina, epicatequina, vainillina, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido clorogénico y ácido cafeico (Rocha-Guzmán *et al.*, 2012), mientras que en cortezas de *Q. eduardii*, se identificaron: procianidina monogallato, procianidina dímero, procianidina dímero monogallato, procianidina trímero, procianidina tetramero que están presentes en altas concentraciones (Rosales-Castro *et al.*, 2011).

En la industria de la madera se generan algunos desechos propios de los árboles, tal es el caso de las cortezas. La corteza tiene la función de la protección del árbol. Dedrie *et al.* (2015) estudiaron las cortezas de *Q. robur* y *Q. petrae*, encontrando ácidos gálicos y elágicos, así como derivados de catequinas y otros taninos (Dedrie *et al.*, 2015).

Los extractos crudos de corteza de *Quercus robur*, considerados como residuos de la industria forestal, contienen una alta concentración de fenoles y con notables propiedades antioxidantes. Las extracciones pueden obtenerse mediante simples procedimientos de la materia prima de desecho existente, reduciendo la necesidad de una etapa de procesamiento adicional y con esto se pueden obtener aplicaciones como aditivos en productos nutracéuticos y funcionales (Drózdź & Pyrzynska, 2018).

Teniendo en cuenta la riqueza en polifenoles dentro de las cortezas del género *Quercus* es necesario ampliar los conocimientos sobre la composición química y las propiedades biológicas,

en particular de los compuestos polifenólicos, de cortezas de especies del género *Quercus* propias de México, debido a la carencia de investigaciones sobre este tema y plantear sus posibles aplicaciones como parte de la formulación de nuevos alimentos funcionales, productos cosmecéuticos y/o farmacéuticos.

Tabla 1. Polifenoles identificados dentro del género *Quercus*.

Compuesto fenólicos	Ejemplos	Referencia
Taninos hidrolizables	Elagitanina	(Nonaka <i>et al.</i> , 1989; Hervé-du-Penhoat <i>et al.</i> , 1991; Yarnes <i>et al.</i> , 2006; Moctezuma <i>et al.</i> , 2014; Cuevas-Reyes <i>et al.</i> , 2016)
	Castalagina	
	Stenophyllanin	
	Acutisimina B	
	Mongolinina A	
	Cocciferina D3, D2,	
	Ácido elágico	
	Roburina A, B, C, D, E	
	Tellimagrandin	
Flavonoides	Catequina (flavonoide)	(Conde & Cadahı, 1998; Yarnes <i>et al.</i> , 2006; Rivas-Arreola, <i>et al.</i> , 2010; Moctezuma <i>et al.</i> , 2014; Cuevas-Reyes <i>et al.</i> , 2016)
	Kaempferol (flavonol)	
	Quercetina (flavonol)	
	Naringina (flavonoide)	
	Ácido gálico (flavonoide)	
Ácidos hidroxicinámicos y dihidroxibenzoicos	Ácido ferúlico	(Karonen <i>et al.</i> , 2004; Yarnes <i>et al.</i> , 2006; Rivas-Arreola <i>et al.</i> , 2010)
	Ácido clorogénico	
	Ácido vanílico	
	Ácido cafeico	

3.9.3. Toxicidad del género *Quercus*

Aunque los polifenoles han mostrado ser seguros en diversos estudios toxicológicos como es el caso del té verde (Jain & Sethi, 1991), extracto del fruto, piel y semilla de uva (Bentivegna & Whitney, 2002), manzana (Shoji *et al.*, 2004), hojas secas de guanábana (*Annona muricata* L.) (Poma *et al.*, 2011) y hojas de *Psidium guajava* (Rodríguez Amado *et al.*, 2013), en relación a los encinos, pocos estudios se han podido encontrar en la literatura científica. Flaoyen *et al.* (1999), administraron hojas de encino (*Q. robur*) durante tres días a ovejas, en dosis diarias de hasta 50 g/kg de peso, no se presentaron signos de toxicidad. Se realizó una prueba de toxicidad aguda en ratones y una prueba de toxicidad subcrónica en conejos, a los cuales se les administró vía enema un extracto de frutos de *Q. infectoria*, llegando a utilizar concentraciones 300 veces más grandes que las que son comúnmente utilizadas para humanos en la medicina tradicional. No se presentaron muertes ni diferencias con el grupo control, ni efectos adversos causados por el extracto en ninguna de las pruebas (Iminjan *et al.*, 2014).

Sin embargo, no existen reportes toxicológicos respecto al uso de especies mexicanas de *Quercus*, lo cual limita nuestra comprensión acerca de los posibles riesgos a los que pudiera exponerse la población mediante su uso por vía oral, inhalatoria o tópica. Lo anterior es hasta cierto punto preocupante, ya que en México, las cortezas de encino son ampliamente utilizadas por la medicina tradicional para tratar diferentes patologías, tales como dolor estomacal, quemaduras, infecciones, entre otras (José-Luna, *et al.*, 2003; Berahou *et al.*, 2007).

3.10. Pruebas de toxicidad oral

A diferencia de Japón y la Unión Europea, en donde se han regulado los alimentos funcionales, exigiendo se cumpla con características como efectividad en estudios clínicos, seguridad en estudios clínicos y no clínicos, determinar los componentes activos efectivos (Clydesdale, 1997; Shimizu, 2003), en México no existe regulación para los alimentos funcionales. Sin embargo, La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), agencia reguladora en México en materia alimentaria, desde 2014, solicita a las empresas productoras de alimentos

que se realicen estudios toxicológicos *in vitro* o en animales para demostrar la calidad, seguridad y eficacia de nuevos ingredientes, y cuyos resultados puedan extrapolarse a humanos.

Entre los atributos de calidad de un alimento se encuentran las características nutricionales, sensoriales, de servicio e inocuidad. Este último es un requisito básico de la calidad, que implica la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y cualquier otra sustancia que pueda hacer al alimento nocivo para la salud (Mercado, 2007).

En el presente estudio, para conocer con seguridad de que el extracto de *Q. crassifolia* pueda ser incluido en el diseño de un alimento funcional para humanos, como nuevo ingrediente funcional, es necesario llevar a cabo estudios toxicológicos en animales de experimentación, como son las pruebas de toxicidad oral aguda y a dosis repetida, las cuales, además pueden ser una herramienta para establecer la dosis que puede ser administrada para consumo humano.

Los estudios toxicológicos se definen como el conjunto de ensayos realizados a una sustancia o mezcla de sustancias químicas en animales de experimentación o *in vitro*. Dichos estudios son diseñados para obtener la información necesaria que permita conocer el perfil toxicológico de la sustancia en estudio, de manera que, en el caso de desarrollo de moléculas para consumo humano, se puedan justificar más estudios sin exponer a los seres humanos a riesgos injustificados (Ramírez-Herrera & Soto-Ruíz, 2013). Durante el desarrollo de nuevos alimentos o sustancias para consumo humano es necesario evaluar el potencial tóxico de las moléculas a explorar mediante diversos modelos experimentales (Gámez & Más, 2007).

Los estudios toxicológicos pueden clasificarse de acuerdo a su metodología en métodos clásicos y alternativos. Este tipo de pruebas permiten obtener información sobre un daño fisiológico, carcinogénesis (aparición de cáncer), mutagénesis (daños genéticos) y teratogénesis (defectos en el nacimiento) producidos como consecuencia de la exposición a una determinada sustancia química. Los mismos son desarrollados en diferentes especies animales con el fin de obtener información sobre la seguridad del bioactivo y así anticipar efectos nocivos en el hombre (Stelljes, 2008). Dentro de los métodos clásicos válidos, se encuentran tres tipos de pruebas: agudas, subcrónicas, crónicas, efectos sobre el comportamiento reproductivo, potencial carcinogénico y

mutagénico (Rojas, 2001, Arencibia-Arrebola *et al.*, 2003; Stelljes, 2008). Sin embargo, a pesar de la información obtenida en estas pruebas los datos no siempre son extrapolables al ser humano y por ello la molécula no es libre de riesgo.

3.10.1. Estudios de toxicidad aguda

La evaluación de la toxicidad aguda tiene como objetivo conocer el tipo de efectos locales y sistemáticos inducidos por un fármaco, droga, ingrediente funcional o compuesto a ensayar tras una sola exposición a concentraciones altas (Goodman, 1998; Arencibia-Arrebola *et al.*, 2003), brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto, el posible riesgo de su exposición aguda y la identificación de órganos diana, además de aportar información para la selección de los niveles de dosis para estudios subcrónicos para próximos estudios a dosis repetida (subcrónicos y crónicos) (Arencibia-Arrebola *et al.*, 2003; Stelljes, 2008).

El progreso en el campo de la toxicología y la presión de grupos sociales protectores de animales han llevado al desarrollo de métodos alternativos de toxicidad que se fundamentan en el principio de las 3 R (refinamiento, reducción y reemplazo). Estos han sido aceptados y validados por las entidades regulatorias como la OCDE, la FDA y la EPA, y tienen como finalidad la evaluación de la toxicidad de nuevas sustancias o mezclas de sustancias que pretendan un uso en seres humanos (Kandárová & Letašiová, 2011). Es así que hoy en día existen protocolos bien establecidos reconocidos a nivel mundial como el de la dosis fija y el de las clases de toxicidad, reportados a finales del 2002 que se consideran alternativos y se usan ampliamente por las industrias alimentaria y farmacéutica para el desarrollo de nuevos productos (OECD/OCDE, 2001; Curren & Harbell, 2002; Arencibia-Arrebola *et al.*, 2003; Gámez & Más, 2007).

3.10.2. Estudios de toxicidad a dosis repetida

Las pruebas a dosis repetida se realizan después de haber obtenido información de la toxicidad intrínseca de la sustancia con las pruebas agudas. Mediante este tipo de pruebas se obtiene información sobre la toxicidad de una sustancia ante su exposición repetida en una especie considerando un tiempo de exposición que puede variar de 14 a 90 días según sea el objetivo de del estudio seleccionado (OECD/OCDE, 1981).

Los estudios subcrónicos muestran los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o de sus metabolitos, debido a la administración por un periodo no mayor al 10% de la vida del animal, generalmente entre 14 y 30 días, permitiendo conocer la dosis máxima con la que no se aprecia toxicidad (NOAEL) y el nivel de mínimo efecto tóxico observable (LOAEL), identificar los posibles órganos diana, así como conocer si el estado de toxicidad presente en el o los compuestos evaluados es reversible (Parasuraman, 2011; Ramos, 2016).

3.11. Nanoencapsulación

La nanoencapsulación es una tecnología que implica formar partículas cargadas de un compuesto bioactivo con diámetros que varían de 1 a 1000 nm (Reis & Neufeld, 2006). La palabra “nano”, deriva de la palabra griega *nanos*, que significa enano o extremadamente pequeño (Dávalos, 2014). La encapsulación se puede definir como el proceso de protección de compuestos bioactivos o fármacos de factores ambientales y oxidación. La encapsulación es aplicada en diferentes campos, como la biotecnología, o industrias como la farmacéutica, alimentaria, agropecuaria y textil (Ray, *et al.*, 2016).

Las nanocápsulas son nanovesículas donde se presenta una característica estructural (Figura 4), un núcleo y una capa, donde el compuesto bioactivo es revestido por una capa de polímeros, este núcleo puede ser líquido o sólido, que se puede llamar núcleo, relleno, fase activa, interna o de carga útil, en tanto que la membrana polimérica se llama recubrimiento, membrana, caparazón, cápsula, material de soporte, fase externa, material de pared o matriz (Ray *et al.*, 2016) y puede ser hidrofílica o hidrófoba según sea el método de preparación, teniendo en cuenta el proceso de operación, las nanocápsulas también pueden presentar la sustancia activa en sus superficies o cubierta por la membrana polimérica (Mora *et al.*, 2010).

La nanoencapsulación puede ser la solución a problemas de biodisponibilidad de los nutrientes en los alimentos, por su tamaño reducido, micro y nanosistemas puede mejorar la solubilidad, además, por ser de un diámetro menor aumenta su tiempo en el tránsito digestivo, en comparación con otros compuestos bioactivos de mayor tamaño (de Souza Simões *et al.*, 2017), aunado a esto, mejora las características sensoriales de los alimentos, tal es el caso de enmascarar sabores

desagradables, incluido el sabor amargo y la astringencia de los polifenoles (Ballesteros *et al.*, 2017) y protege a los compuestos bioactivos de la degradación evitando reacciones físicas y químicas indeseables (de Souza Simões *et al.*, 2017).

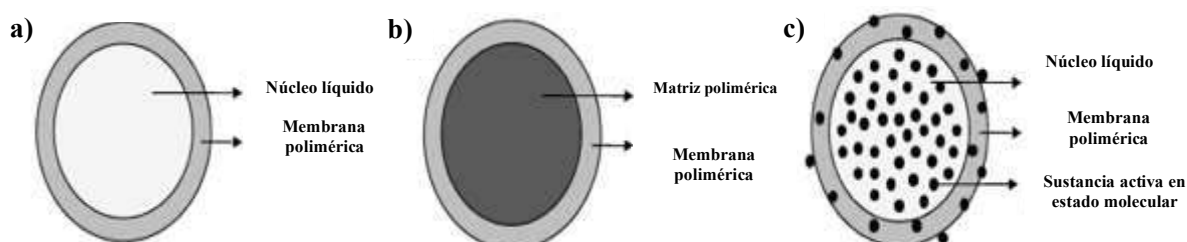


Figura 4. Estructuras de nanocápsulas: (a) Núcleo líquido, (b) Matriz polimérica, (c) Sustancia activa (Mora *et al.*, 2010).

3.12. Métodos de nanoencapsulación

Los procesos de encapsulación se pueden dividir en dos: procesos químicos y procesos mecánicos. Los procesos químicos se dividen en las técnicas de coacervación, cocrystalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento por liposomas e inclusión molecular; dentro de los procesos mecánicos están las técnicas de secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento, electrospinning y electrospray, fluidos supercríticos (SCF), método de difusión de emulsión (EDM), entre otros (Parra, 2011; Fathi *et al.*, 2014).

3.12.1. Secado por aspersión

La técnica de secado por aspersión es muy utilizada en las industrias, también llamado secado por atomización o pulverización, fue empleada inicialmente en la industria de los alimentos, esta técnica, corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente (Pedroza, 2002; Gouin, 2004).

El secado se emplea como proceso continuo y escalable para convertir líquidos (soluciones, emulsiones, suspensiones) en polvos sólidos. Entre las ventajas del secado por aspersión se menciona el hecho de que es adecuado para materiales sensibles al calor, debido a los cortos tiempos de exposición a las altas temperaturas (Guevara-Bretón & Jiménez-Munguía, 2008).

El secado por apersión incluye un equipo específico usado para este trabajo, el Nano Spray Dryer Büchi B-90, que utiliza una boquilla con malla vibratoria que es capaz de generar pequeñas partículas consistentes. Por esta boquilla se introduce la formulación que contiene el agente encapsulante y el ingrediente activo es asperjado en pequeñas gotas, cuando las gotas llegan a la cámara, un flujo de gas, en este caso aire, a alta temperatura, entra en contacto con la muestra asperjada, evaporando el solvente, provocando la caída de las partículas en un colector de partículas electrostáticas, con el que se obtienen altos rendimientos con volúmenes pequeños de muestra (Gu *et al.*, 2015).

3.12.2. Encapsulación de compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos son muy vulnerables a un entorno oxidante, como puede ser la luz, oxígeno, humedad, entre otros, debido a la existencia de enlaces insaturados en las estructuras moleculares. La encapsulación tiene la ventaja de mejorar su estabilidad de almacenamiento, y biodisponibilidad de los compuestos *in vitro* e *in vivo*, la optimización de las rutas para su administración, haciendolos más seguros como ingredientes alimentarios (Fang & Bhandari, 2010; Munin & Edwards-Lévy, 2011; Ballesteros *et al.*, 2017).

A continuación se presentan algunos trabajos de encapsulación de compuestos fenólicos:

Se microencapsuló aceite de oliva extra virgen por secado por aspersion, empleando como material de pared gelatina, goma arábica, maltodextrina y el conjugado de caseinato de sodio-maltodextrina (Calvo *et al.*, 2012); mientras que para las antocianinas, la maltodextrina resultó ser el mejor protector térmico (Ersus *et al.*, 2010). Una mezcla de maltodextrina y goma arábica se aplicó para encapsular procianidinas de semilla de uva (Zhang *et al.*, 2007). El quitosano, como revestimiento fue aprovechado para encapsular extracto de hojas de olivo (Kosaraju *et al.*, 2006). La carragenina mostró ser un material de pared adecuado para la conservación de la actividad antioxidante para diversos extractos ricos en polifenoles (Krishnaiah *et al.*, 2009). Un extracto rico en polifenoles de *Quercus resinosa*, fue encapsulado por la misma técnica, presentando una alta actividad antioxidante, incluso a bajas concentraciones de fenoles, cuando la cobertura fue caseinato de sodio y lactosa (Rocha-Guzmán *et al.*, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos funcionales es cada vez más frecuente, ya que se les atribuye una gran cantidad de beneficios a la salud. Sin embargo, este efecto benéfico debe ser evaluado y autenticado para que el etiquetado del alimento sea fidedigno, lo que ofrecería beneficios reales a los consumidores. Aunque el yogurt es considerado tradicionalmente como un alimento funcional tipo probiótico, debido a su contenido de bacterias ácido lácticas que ayudan a evitar algunos problemas estomacales e intestinales, en este proyecto de investigación se propuso darle un nuevo carácter como alimento plurifuncional. Este aspecto se consiguió mediante la adición de aceite vegetal saludable, rico ácidos grasos isaturados y compuestos fenólicos nanoencapsulados. Los compuestos fenólicos se extrajeron de cortezas de encino, las cuales son consideradas como desechos de la industria forestal. Los ácidos grasos y los compuestos fenólicos han sido relacionados con efectos hipocolesterolémicos e hipolipidémicos. La inocuidad del mismo se determinó mediante la realización de estudios toxicológicos agudos y subcrónicos, mientras que su efectividad *in vivo* se evaluó usando un modelo de hámsteres Golden Syrian. Sumado a lo anterior, el producto puede tener un gran impacto en el mercado de alimentos saludables, orientándose al grupo de consumidores que cuidan su bienestar y/o que padecen de enfermedades crónico-degenerativas.

5. HIPÓTESIS

Un yogurt adicionado con aceite vegetal y nanocápsulas de un extracto polifenólico de *Quercus* spp disminuirá las concentraciones de colesterol y lípidos en un modelo lipémico de hámsteres Golden Syrian.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la incorporación de un aceite vegetal y de polifenoles nanoencapsulados de corteza de una especie mexicana de encino (*Quercus* spp.), en las propiedades hipocolesterolémicas e hipolipidémicas de un yogurt evaluado en hámsteres.

6.1. Objetivos particulares

1. Establecer las mejores condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de cortezas de *Quercus crassifolia*, *Quercus laurina* y *Quercus scytophylla*.
2. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos crudos de encino.
3. Efectuar la purificación del extracto crudo con las mejores características antioxidantes.
4. Determinar la toxicidad del extracto purificado en ratas Wistar.
5. Realizar la caracterización química de compuestos fenólicos presentes en el extracto purificado.
6. Estandarizar el método de nanoencapsulación del extracto fenólico purificado.
7. Estandarizar la formulación del yogurt conteniendo el extracto fenólico purificado.
8. Evaluar el efecto hipocolesterolémico e hipolipidémico del extracto purificado de corteza de encino y aceite adicionados al yogurt.

7. METODOLOGÍA

7.1. Colecta de cortezas

Se realizó una colecta de cortezas de tres diferentes especies de encino en una plantación forestal ubicada en Ciudad Hidalgo, Michoacán; así como de ramas y hojas para posibilitar su identificación botánica. Las especies con nombres comunes “roble”, “escobillo” y “blanco” fueron elegidas teniendo en cuenta su importancia para la industria forestal del Estado de Michoacán. Las cortezas colectadas fueron lavadas y durante este proceso se retiró manualmente todo resto de sílice, líquenes y musgo, que pudieran afectar los resultados obtenidos durante la investigación. Posteriormente, las cortezas se fraccionaron en rectángulos de 5 por 5 cm y se secaron en hornos a una temperatura de 40 °C durante 48 h. Se procedió a la molienda (Thomas Digital ED-5 Wiley® Cutting Mill) y tamizado con malla # 40 (400 µ). La corteza en polvo fue almacenada en la oscuridad a 22 °C.

7.2. Extracción de compuestos fenólicos

7.2.1. Extracción por maceración

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos por maceración según la metodología descrita por Diouf *et al.* (2009). Para ello se tomaron 20 g de corteza secada y molida (tamaño de partícula >0.40 mm), a la cual se le agregaron 200 ml de etanol al 90%, se mantuvo en agitación constante a 100 rpm por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se realizó un lavado con 200 ml de etanol al 90% y se filtró utilizando un papel Whatman® no. 42 para su posterior liofilización y almacenamiento en frascos ámbar a 4°C (Diouf *et al.*, 2009).

7.2.2. Extracción al agua caliente

Se tomaron 50 g de corteza seca, molida y tamizada en malla 40, se realizó la extracción con 500 ml de agua bajo reflujo 1 h y los sólidos fueron separados por filtración con un papel filtro Whatman No. 42 y posteriormente lavados con 500 ml de agua caliente (García-Pérez *et al.*, 2010). El extracto acuoso fue filtrado y liofilizado para almacenarse en frascos ámbar a 4 °C.

7.2.3. Purificación del extracto de encino

Se llevó a cabo una purificación y concentración de compuestos fenólicos líquido-líquido del extracto de *Q. crassifolia* al agua caliente según la técnica propuesta por Diouf *et al.* (2009) con algunas modificaciones, según la cual, 100 mL de extracto crudo de corteza de encino se filtraron con un crisol Gooch (Pyrex 40-60 μm). La solución fue desgrasada con hexano (Meyer) (5X100 ml), se recuperó la fracción acuosa, posteriormente se concentraron los compuestos fenólicos con acetato de etilo (Meyer) (5X100), el solvente fue evaporado y los sólidos remanentes fueron resuspendidos en agua.

7.3. Evaluación de la composición polifenólica de los extractos

En esta primera etapa se realizó una pre-caracterización química de los extractos obtenidos, que consistió en la determinación del contenido en fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides utilizando métodos espectrofotométricos descritos por diferentes autores (Porter *et al.*, 1986; Scalbert *et al.*, 1989; Pharmacopoeia, 2002; Brighente *et al.*, 2007). Los resultados fueron comparados con los del extracto comercial Oligopin®, obtenido a partir de cortezas del Pino marítimo francés (*Pinus pinaster*) reconocido mundialmente por su alto contenido en polifenoles bioactivos y excelentes propiedades antioxidantes (Oloff, 2009; D'Andrea, 2010) y cúrcuma Terana para la capacidad de captar radicales óxido nítrico.

7.3.1. Contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales, se prepararon soluciones de los extractos disueltos en una solución 50:50 (v/v) de H₂O/MeOH. Se mezclaron 2 ml de Na₂CO₃, 2.5 ml de reactivo de Folin y 500 μl de extracto, se colocó 10 min en baño María a 50 °C y se midió la absorbancia a 750 nm. La determinación del contenido total de fenoles se calculó por comparación con una curva de calibración usando ácido gálico (Scalbert *et al.*, 1989).

7.3.2. Contenido de ácidos fenólicos tipo hidroxicinámicos

Para determinar el contenido en ácidos hidroxicinámicos, se utilizó la metodología descrita en la Farmacopea Europea para *Fraxini folium* (Pharmacopoeia, 2002). En un tubo de ensayo se añadió 1 ml del extracto [1 mg/ml], 2 ml de HCl [0.5 M], 2 ml de reactivo Arnou, 2 ml de NaOH [2.125

mol/L] y 3 ml de agua. La absorbancia se tomó a 525 nm. El contenido en ácidos hidroxicinámicos se realizó por comparación con una curva de calibración usando ácido clorogénico como estándar.

7.3.3. Contenido de proantocianidinas

Para definir el contenido de proantocianidinas se tomó 1 ml del extracto [1 mg/ml], al cual se le agregaron 6 ml de butanol ácido en un tubo de ensayo, se añadieron 200 µl de reactivo de hierro a cada tubo de ensayo y se agitó hasta homogeneización (≈ 5 s), se colocaron las muestras en el baño a 95 °C durante 50 min. Para detener la reacción se utilizó hielo durante 10 min (se observó una coloración roja, que está relacionada a la presencia de proantocianidinas). La absorbancia se midió a 550 nm. El contenido de proantocianidinas se calculó por comparación con una curva de calibración usando como estándar cloruro de cianidina (Porter *et al.*, 1986).

7.3.4. Contenido de flavonoides totales

Para establecer el contenido de flavonoides totales, se añadieron 2 ml del extracto en un tubo de ensayo [1 mg/ml] y una solución al 2% de AlCl₃, se agitó vigorosamente, se incubó durante 1 hora a 20 °C y se leyó la absorbancia a 415 nm. El contenido de flavonoides se determinó por comparación a una curva de calibración usando quercetina como estándar (Brighente *et al.*, 2007).

7.4. Capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante de los 6 extractos fenólicos obtenidos a partir de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus*, se realizó por métodos espectrofotométricos considerando su capacidad para captar especies oxidantes de relevancia biológica como el anión superóxido, peroxilo, hidroxilo, ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico. Los resultados fueron comparados con los del extracto comercial Oligopin®. Los resultados permitieron seleccionar el extracto con la mejor capacidad antioxidante, el cual fue utilizado para el resto de la investigación.

7.4.1. Capacidad de atrapar radicales peroxilo (ROO•)

La capacidad de capturar radicales peroxilo (ROO•) se determinó por el método descrito por López-Alarcón y Lissi (2005) para lo cual se prepararon 10 ml de extractos a diferentes

concentraciones (entre 0.1 y 1.0 mg/ml) en una solución MeOH/H₂O 1/1 a partir de una solución madre de 5 ó 10 mg/ml. Se mezclaron 3 ml de la solución de pirogalol rojo [30 µM] con 300 µl de solución de los extractos a diferentes concentraciones en los tubos de ensayo, posteriormente se añadieron 50 µl de 2-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH) [600 mM] para iniciar la reacción y se colocaron en baño María a 37 °C durante 2 h, se midió la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la Ecuación 1 (López-Alarcón & Lissi, 2005):

$$\% \text{ inhibición} = 1 - [(A_{\text{extracto inicial}} - A_{\text{extracto final}}) / (A_{\text{control inicial}} - A_{\text{control final}})] \dots \dots \dots \text{Ec. 1.}$$

Donde:

A_{extracto inicial}: absorbancia de la solución de extracto sin AAPH (sustituir con 50 µL de agua destilada) y sin incubación.

A_{control inicial}: absorbancia testigo (es decir, sin extracto, por tanto, sustituir con 300 µl de MeOH/H₂O 1/1).

7.4.2. Capacidad para eliminar el anión superóxido (•O₂⁻)

La capacidad de los extractos para capturar al anión superóxido (•O₂⁻) se determinó por un método no enzimático descrito por Nishikimi *et al.* (1972). Se prepararon 10 ml de extracto a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 1.0 mg/ml) a partir de una solución madre de 10 mg/ml en MeOH/agua [1:1] o en el disolvente utilizado para la solución extracción. Se mezcló 1 ml de nitroazul de tetrazolio (NTB), 1 ml de NADH y 1 ml de extracto. La reacción se inició con 100 µl de metosulfato de fenazina (PMS), y se puso en el baño María durante 15 min. Se midió la absorbancia de las soluciones (A₁) usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de análisis de 560 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la Ecuación 2 (Nishikimi *et al.*, 1972):

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0 \dots \dots \dots \text{Ec. 2.}$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, se reemplazó la solución de extracto por 1 ml de disolvente utilizado en la preparación de los extractos.

A₁: absorbancia de las soluciones con extracto.

A₂: corresponde a la absorbancia de una mezcla compuesta de 1 ml de la solución de extracto, a la que se le agregarán 2.1 ml de solución de tampón fosfato salino.

7.4.3. Capacidad para eliminar el radical hidroxilo (OH•)

La actividad antirradicalaria de los extractos frente al radical hidroxilo (OH•) se determinó por el método descrito por Smirnoff y Cumbes (1989). Se prepararon las soluciones de extractos a diferentes concentraciones en dimetilsulfóxido (DMSO). En tubos de ensayo se agregaron 2 ml de la solución de extracto, 600 µl FeSO₄ [8 mM], 500 µL de H₂O₂ [20 mM]. Se inició la reacción mediante la adición de 2 ml de la solución de ácido salicílico [3 mM] y luego se llevó a baño María durante 30 min, se añadió agua destilada hasta 900 µl, se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia (A₁) a longitud de onda de análisis de 510 nm utilizando el espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la Ecuación 3:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0 \dots\dots\dots \text{Ec. 3.}$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, se reemplazó la solución de extracto con 2 ml de MeOH/agua.

A₁: absorbancia de las soluciones con los extractos.

A₂: corresponde a la absorbancia de una mezcla compuesta de 2 ml de la solución de extracto a la cual se le añaden 4 ml de agua destilada.

7.4.4. Capacidad para eliminar peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se prepararon 10 ml de extracto a diferentes concentraciones (entre 0.1 y 0.5 µg/ml) a partir de una solución madre de 5 mg/ml en la solución tampón, en tubos de ensayo, a 3.4 ml de la solución de extracto, se añadieron 600 µl de solución de H₂O₂ [40 mM], se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 min. Se midió la absorbancia de las soluciones (A₁) usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de análisis a 230 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la Ecuación 4 (Ruch *et al.*, 1989):

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0 \dots\dots\dots \text{Ec. 4.}$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, corresponde a 3.4 ml de la solución tampón fosfato salino.

A₁: absorbancia de las soluciones con los extractos.

A₂: corresponde a la absorbancia de una mezcla compuesta de 3.4 ml de la solución de extracto a la cual se le añadieron 600 µl de solución tampón fosfato salino.

7.4.5. Capacidad de captar óxido nítrico (NO•)

Se prepararon 10 ml de extracto a diferentes concentraciones (entre 0.2 y 2.0 mg/ml) a partir de una solución madre de 10 mg/ml en MeOH/agua [1:1], se mezclaron 0.5 ml de nitroprusiato de sodio con 0.5 ml de extracto, se inició la reacción colocando la muestra en baño María (37 °C) durante 2.5 h, seguido de 20 min a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de reactivo de Griess, posteriormente se mantuvo durante 40 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de las soluciones (A₁) usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de análisis a 548 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la Ecuación 5 (Sreejayan & Rao, 1997):

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - (A_1 - A_2)) / A_0 \dots\dots\dots \text{Ec. 5.}$$

Donde:

A₀: absorbancia testigo, se reemplazó la solución de extracto con 0.5 ml de disolvente utilizado en la preparación de los extractos.

A₁: absorbancia de las soluciones con los extractos.

A₂: corresponde a la absorbancia de la mezcla compuesta de 0.5 ml de la solución de extracto, 0.5 ml de tampón fosfato salino y 1ml de reactivo de Griess.

7.4.6. Capacidad para inhibir el ácido hipocloroso (HOCl)

Para calcular la capacidad para inhibir el ácido hipocloroso, se introdujeron en los tubos de ensayo: 1 ml del extracto a concentraciones de 0.01 y 2.0 mg/ml, 1 ml de solución de HOCl [14.3 mM] en tampón fosfato salino (PBS), y se dejaron durante 15 min en el baño a 37 °C, se adicionó la catalasa a una concentración final de 18 µM y se dejó durante 15 min en un baño a 37 °C. Se midió a longitud de onda de 240 nm. La capacidad de los extractos para atrapar HOCl se evaluó mediante

la comparación de este valor a la diferencia en la absorbancia de la catalasa menos la absorbancia de la catalasa más HOCl en presencia del extracto (Aruoma & Halliwell, 1987).

7.5. Caracterización química del extracto

Para realizar la caracterización química del extracto, este fue fraccionado en tres fases (García-Pérez *et al.*, 2012), para lo cual se resuspendieron 2 g de extracto purificado de corteza de *Q. crassifolia* en 200 ml de agua desionizada, se añadieron 200 ml de diclorometano (3X) y con ayuda de un embudo de separación se tomó la fracción de diclorometano (FD), mientras a la fracción acuosa (FW) se le añadió acetato de etilo (3X100 mL) para extraer una tercera fracción (FE).

7.5.1. Análisis elemental

Se determinó la composición elemental: carbono, hidrógeno y nitrógeno del extracto purificado y de las fracciones, usando el equipo a Leco TruSpec CHN 628 series, para lo cual se colocaron 0.1 g de muestra, a la que se le añadieron 0.3 g de Leco's Com-Aid. Posteriormente se determinó el contenido de azufre según el método por combustión, utilizando un Leco 628S series. El contenido de oxígeno se calculó por diferencia de peso.

7.5.2. Análisis proximal

El método termogravimétrico fue empleado para la determinación de carbón fijo, volátiles y ceniza, tanto en el extracto purificado como en las FD, FE y FW, para ello se utilizó un analizador termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés) SDTA851e (Mettler Toledo, US). Se colocaron de 4 a 8 mg de muestra en un crisol, en una atmósfera inicial de nitrógeno (100 cm³/min) y durante el proceso el gas fue cambiando a oxígeno para llevar a cabo la combustión de la muestra, mientras que la temperatura se incrementó de 298 K (temperatura ambiente) a 378 K a una velocidad de 10 K/min, manteniendo la temperatura de 378 K durante 15 min, después se incrementó la temperatura a 873 K/min, manteniendo esta durante 10 min. La masa restante se reportó como porcentaje de ceniza, en tanto que el carbono fijo fue calculado por diferencia del porcentaje de material volátil, una vez que fue asignada la pérdida de peso a 423 K a la pérdida de agua libre y no estructural. Cada análisis se realizó por triplicado (Stankovikj *et al.*, 2017).

7.5.3. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Para determinar los compuestos volátiles y no volátiles presentes en el extracto purificado de encino, se analizaron las fracciones, así como el extracto completo, utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 A GC con una columna Agilent 19091S-433 HP-5MS de 30 m×250 μm×0.25 μm (325 °C) y el programa NIST 2.0 f Mass Spectral Search Program. Se prepararon soluciones al 3% w/w usando metanol como solvente, cada muestra fue filtrada (45 μm) antes de ser inyectada en el cromatógrafo (volumen de inyección de 1 μL). El método analítico utilizado fue el siguiente: entrada frontal (250 °C, flujo total He 24 ml/min, flujo de purga de tabique 3 ml/min, relación de división 30:1, 30 ml/min), flujo de columna (1 mL/min), horno (40 °C durante 3 min, rampa a 280 a 3 °C/min). Los gases se introdujeron directamente en la fuente de iones del detector selectivo de masas operado con el modo de ionización por impacto de electrones. El sistema de adquisición de datos utilizado fue el software G1034C Chemstation con una biblioteca NBS (2008).

7.5.4. Pirocromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Pyro- GC-MS)

Se realizó cromatografía de gases de pirólisis/espectrometría de masas usando un muestreador CDS Pyroprobe 5000 Series interconectado a un horno 5975B inert XL MSD el cual fue precalentado a 500 °C. Se colocaron 5 mg de muestra en un capilar acoplado a un Agilent Technologies 6890N Network GC Systems para ser pirolizadas. Los gases se inyectaron directamente en el GC/MS para el análisis (6890 N, Network GC System, Agilent Technologies) equipada con una columna capilar HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (Agilent 19091S-433), de 30 m X 250 μm X 25 μm. El gas utilizado fue helio a un flujo constante de 20.0 mL/min. Los espectros de masas se adquirieron con una energía de ionización de 20 eV. La asignación de los compuestos se logró mediante la base de datos NIST05.

7.5.5. UV de Fluorescencia

El extracto purificado de corteza de encino, así como las tres diferentes fracciones del extracto fueron diluidas en metanol a 10 ppm y analizadas en un espectrofotometro de fluorescencia Shimadzu RF 5301 pc (software: Panorama Fluorescence 2.1).

Se establecieron espectros de fluorescencia síncrona a una diferencia de longitud de onda constante. La longitud de onda de excitación se escaneó de 250 a 500 nm, y las longitudes de onda de emisión se registraron con una diferencia de 5 nm (de 260 a 510 nm). El ancho de la hendidura de excitación y el ancho de la hendidura de emisión se configuraron a 5 nm. Los datos fueron recolectados cada 1 nm.

7.6. Prueba de toxicidad oral aguda

Teniendo en cuenta que la activación o desactivación de los polifenoles bajo la influencia del metabolismo es un aspecto crítico en su eficacia terapéutica o tóxica y considerando que la extracción por solvente no resulta completamente selectiva, pudiendo extraerse compuestos tóxicos para el organismo, en este proyecto se evaluó la toxicidad oral aguda del extracto purificado de *Q. crassifolia*, como un aspecto importante para su utilización como ingrediente funcional en la formulación del yogurt plurifuncional.

Se evaluó la toxicidad oral aguda del extracto purificado de corteza de *Quercus crassifolia* (EPQC), según el método de clases de toxicidad propuesto por la OECD en la guía 423 (OECD/OCDE, 2001). Como modelo biológico se utilizaron ratas Wistar de 8 a 12 semanas de edad, se mantuvieron en un bioterio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos (LIDA) de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo las siguientes condiciones: 22 ± 3 °C, humedad 70%, luz artificial con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, alimento y agua *ad libitum*.

Al llegar al bioterio del LIDA, las ratas fueron pesadas a los 0, 7 y 14 días. Se asignaron aleatoriamente tres ratas al grupo control (C1), al cual se le administró agua destilada, y tres ratas a cada uno de los grupos de estudio (G1, G2, G3, G4) a los cuales se les administró el extracto en diferentes concentraciones usando una cánula intragástrica. Se mantuvieron en aclimatación durante 7 días. Al séptimo día se pesaron y se les administró una dosis de solución acuosa del extracto purificado de *Q. crassifolia* en concentración de 300 mg/kg, el cual no excedió de 2 ml/100 g de peso del animal, previo ayuno de 8 h. Posteriormente, se administró el extracto al

grupo G2, a una concentración de 300 mg/kg, al grupo G3 a una concentración de 2000 mg/kg, al igual que al grupo G4 (2000 mg/kg).

Todos los grupos experimentales estuvieron en observación constante durante la primera media hora, cada media hora las primeras 4 h y cada hora durante las siguientes 24 h, posteriormente una vez al día durante 13 días para determinar muerte o presencia de signos de toxicidad, tales como cambios en el aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, orejas, lagrimeo, excretas), comportamiento (consumo de agua y alimentos, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación), exámenes físicos (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal, lesiones en piel) (OECD/OCDE, 2000).

Al día quince se procedió al sacrificio por dislocación cervical. Con punción cardíaca se tomaron muestras de sangre para la realización de las siguientes pruebas bioquímicas: biometría hemática completa con diferencial, glucosa, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, alanina amino-transferasa (ALT), aspartato amino-transferasa (ALP) y gamma glutamil-transferasa (GGT). Se extrajeron y pesaron el corazón, estómago, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñones, glándula adrenal, intestino grueso, intestino delgado, ovarios, tiroides y encéfalo, para llevar a cabo un análisis macro y microscópico de éstos. Para el análisis histopatológico, se deshidrataron los órganos antes mencionados, se incluyeron en parafina, fueron cortados en un micrótomos a 3 micras, se colocaron los cortes sobre un portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron observados al microscopio.

7.7. Prueba de toxicidad oral a dosis repetida

Se determinó la toxicidad oral a dosis repetida del extracto purificado de *Quercus crassifolia*, utilizando como modelo biológico ratas Wistar. El estudio se llevó a cabo una vez que se realizó la prueba de toxicidad oral aguda, ya que con los resultados de dicha prueba se tuvo un parámetro para establecer las dosis a las que se administró el extracto. Esta prueba permite establecer el nivel al que no se observan efectos adversos (NOAEL) (OCDE, 2006).

Tomando como antecedente la prueba de toxicidad oral aguda (OCDE, 2001), en la cual se mostraron daños microscópicos en riñón y encéfalo, tanto en las concentraciones de 2000 mg/kg como en 300 mg/kg, se propuso administrar el extracto en concentraciones de 100 mg/kg/día, 33 mg/kg/día y 11 mg/kg/día.

Las ratas se obtuvieron recién destetadas, del bioterio de la Universidad Autónoma de México Campus Juriquilla. Los animales sanos adultos se asignaron aleatoriamente al control y a los grupos de estudio (5 ratas hembras y 5 ratas machos) como se muestra en la Tabla 2. Las hembras eran nulíparas y no preñadas.

Tabla 2. Concentración de extracto fenólico administrado a cada grupo de ratas.

Grupo	Sexo	Código	Dosis de Extracto [mg/kg de peso/día]
Control	Hembras	CH	0
Control	Machos	CM	0
Grupo 1	Hembras	G1	100
Grupo 2	Machos	G2	100
Grupo 3	Hembras	G3	33
Grupo 4	Machos	G4	33
Grupo 5	Hembras	G5	11
Grupo 6	Machos	G6	11
Satélite 1	Hembras	S1	100
Satélite 2	Machos	S2	100

El experimento se llevó a cabo en bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual se mantuvo a 22 °C (\pm 3 °C), la humedad relativa mínima del 30% y no excedió el 70%. La luz fue artificial, siguiendo fotoperiodos de 12 h de luz, y 12 h de oscuridad. Se administró alimento y agua purificada *ad libitum*.

Las ratas fueron pesadas al llegar al bioterio y posteriormente dos veces por semana. Se mantuvieron en aclimatación durante 7 días, comenzando la administración del extracto en la

cuarta semana de edad. Al comienzo del ensayo, la variación de peso no excedió el 20% del promedio de peso para hembras y machos.

A los grupos experimentales se les administró durante 28 días consecutivos el extracto concentrado en solución acuosa vía oral a las concentraciones antes mencionadas usando una cánula, a la misma hora diariamente. El volumen de la solución no excedió los 2 ml/100 g de peso de la rata. Se observaron clínicamente los animales diariamente durante el periodo de experimentación, aproximadamente a la misma hora, mientras que se inspeccionaron por mortalidad o morbilidad dos veces al día, la condición de las ratas fue registrada en los formatos diseñados para tal efecto.

Se tuvo un grupo satélite de 10 animales (5 hembras y 5 machos), a este grupo se le administró el extracto de *Q. crassifolia* a la concentración más alta, en este caso 100 mg/kg de peso por día. Se mantuvieron durante 14 días posteriores a la última administración del extracto, antes de proceder al sacrificio, para determinar efectos tardíos, persistencia o recuperación de los efectos tóxicos.

Se realizó una observación clínica detallada antes de comenzar la prueba y una vez a la semana, está se llevó a cabo fuera de la jaula, aproximadamente a la misma hora cada ocasión. Los signos de toxicidad que se buscaba observar incluyeron cambios en la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de pupila, patrón de respiración anormal). Además de cualquier posible cambio en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias (ej. acicalamiento excesivo, movimientos en círculos), comportamiento anómalo (automutilación, marcha hacia atrás) (OECD, 1997, 2000).

Las ratas permanecieron en ayuno durante 8 h antes de la eutanasia; se procedió al sacrificio por dislocación cervical, se realizó la necropsia a cada rata y se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para realizar las siguientes pruebas: biometría hemática completa con diferencial, glucosa, creatinina, urea, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, alanina amino-transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (ALP) y gamma glutaril transferasa (GGT), fosfatasa alcalina, deshidrogenasa láctica, proteínas totales, albúmina, globulina, relación A/G, sodio, potasio, cloro. Además se pesaron y

tomaron muestras del bazo, testículos, hígado, riñón, ovarios, estómago, intestinos, encéfalo, timo, pulmón, corazón, glándulas suprarrenales, tiroides, útero, próstata y médula espinal. Se realizaron los análisis histo-patológicos de encéfalo, riñón e hígado.

7.8. Secado por aspersión del extracto de *Q. crassifolia*

El extracto purificado fue secado por aspersión a una temperatura de entrada de 106 °C, flujo de aire 110 L/min, temperatura de la cámara 120 °C, tamaño de membrana 7 µm. Fue almacenado a 4 °C en frascos ámbar para su posterior análisis.

Se determinaron fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides (Porter *et al.*, 1986; Scalbert *et al.*, 1989; Pharmacopoeia, 2002; Brighente *et al.*, 2007) y la capacidad de captar especies reactivas de importancia biológica como peróxido, anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y ácido hipocloroso en el extracto de encino secado por aspersión (Nishikimi *et al.*, 1972; Aruoma & Halliwell, 1987; Ruch *et al.*, 1989; Smirnov & Cumbes, 1989; Sreejayan & Rao, 1997; López-Alarcón & Lissi, 2005).

7.9. Nanoencapsulación por secado por aspersión

7.9.1. Estandarización de las formulaciones de material de pared

A. Carga electrostática

La carga electrostática fue medida usando un Nano Particle Analyzer SZ-100 Horiba® (Figura 5), expresada como Potencial ζ , todas las mediciones fueron hechas por triplicado, con tres lecturas independientes para cada muestra. El Potencial ζ es una medida de la interacción electrostática o bien la repulsión o atracción entre las partículas afectando su estabilidad. Esta determinación contribuye a observar las causas de la dispersión, agregación y floculación, con esta información se puede mejorar las formulaciones de soluciones como suspensiones y emulsiones (Córdova, 2013). La medición del Potencial ζ es una de las formas de acortar las pruebas de estabilidad al reducir el número de formulaciones candidatas, por lo tanto, se reduce el tiempo y el costo de las pruebas y se mejora la vida útil (Malvern Instruments, 2014).

B. Punto isoeléctrico del caseinato de calcio

Se determinó el punto isoeléctrico del caseinato de calcio en solución acuosa con ayuda del potencial ζ , para ello se prepararon soluciones del reactivo a concentraciones 0.2%, 0.6% y 1% (p/v), se determinó la viscosidad de cada solución, debiendo tener como característica una viscosidad menor a 3 cps. Se ajustó el pH de las diferentes soluciones en un rango de 2.5 a 7, usando ácido clorhídrico [0.2 N] e hidróxido de sodio [0.2 N].

*C. Carga electrostática de la mezcla de soluciones de maltodextrina-caseinato de calcio y extracto purificado de *Q. crassifolia**

Se midió el potencial ζ de la mezcla de solución de maltodextrina-caseinato de calcio en tres diferentes proporciones: 50-50%, 75-25% y 25-75%, respectivamente. Se ajustaron las soluciones a 30% de sólidos y viscosidad menor a 3 cps. Sin embargo, la mezcla 75-25% produjo un gel con una viscosidad mayor a 3cp, por lo que fue descartada para pruebas posteriores. Después, se adicionó a las diferentes mezclas de material de pared el extracto purificado de *Q. crassifolia* en proporción 4:1.



Figura 5. Equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 Horiba®.

7.9.2. Nanoencapsulación

En la Tabla 3 se muestran las 12 formulaciones preliminares a diferente concentración de maltodextrina y caseinato de calcio. Todas las formulaciones se prepararon a una concentración

de 30% de sólidos totales, mientras que la relación material de pared-extracto de *Q. crassifolia* fue 4:1, respectivamente. Para inyectar la solución en el nano-spray dryer se diluyó 1:1 para adecuar la viscosidad a 3 cps, en tanto que el pH se ajustó según correspondió para cada formulación propuesta.

Tabla 3. Formulaciones preliminares para nanoencapsulación.

Formulación	Maltodextrina %	Caseinato de Calcio %	pH
1	50	50	3
2	50	50	3.5
3	50	50	4.5
4	50	50	5
5	75	25	3
6	75	25	3.5
7	75	25	4.5
8	75	25	5
9	25	75	3
10	25	75	3.5
11	25	75	4.5
12	25	75	5

Se inyectó la solución del material de pared y extracto en el Nano-Spray Dryer B-90 BÜCHI Labortechnik AG (Figura 6), bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de entrada de 105 °C, flujo del aire 110 L/min, temperatura de la cámara 120 °C, tamaño de membrana 7 µm.



Figura 6. Nano-Spray Dryer B-90 BÜCHI®.

A. Eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulación del extracto de *Q. crassifolia*. Se tomaron en consideración los compuestos fenólicos que no fueron encapsulados, que se encuentran en la superficie (CS) y la cantidad total de compuestos fenólicos que sí se encuentran encapsulados (CE). Para los CS se pesaron 50 mg de las cápsulas, luego se agregaron 2 ml de una mezcla de etanol y metanol [1:1], se agitó en el Vortex a temperatura ambiente por un 1 min y se filtró. Se determinó fenoles totales con el método ya mencionado de Folin Ciocalteau (Scalbert *et al.*, 1989).

Para la determinación de CE, se rompió la estructura del material de pared de las cápsulas; se pesaron 50 mg de las cápsulas y se agregaron 2 ml de la solución de metanol: ácido acético: agua [50: 8: 42, v/v/v], se agitó durante 1 min y se sonicó durante 40 min. El sobrenadante se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Por último se midieron fenoles totales por el método de Folin Ciocalteau (Scalbert *et al.*, 1989) y con la Ecuación 6 se determinó el rendimiento de encapsulación como propone Robert *et al.* (2010).

$$BS(\%) = \frac{\text{Compuestos bioactivos de superficie}}{\text{Total de compuestos bioactivos}} \times 100 \dots \text{Ec. 6.}$$

Para determinar la Eficiencia de Encapsulación (EE) se usó la ecuación 7:

$$EE = 100 - CS(\%) \dots \dots \dots \text{Ec. 7.}$$

B. Rendimiento de encapsulación

El rendimiento de encapsulación se determinó por el método propuesto por Dominguez *et al.* (2012), para esto se cuantificó el porcentaje de sólidos totales presente en la solución del material de pared y el extracto de *Q. crassifolia*, una vez que se secó la mezcla, se procedió a pesar el polvo obtenido y se usó la Ecuación 8 (Dominguez, 2012):

$$RM\% = (W_s/W_{PC}) \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec. 8.}$$

Donde:

W_s = Peso de la muestra seca en polvo (g)

W_{PC} = Cantidad de sólidos totales presentes en la muestra (g)

Para determinar la cantidad de sólidos totales se transfirieron 5 ml de la muestra a tres cápsulas de porcelana (a peso constante) y se colocaron en una estufa a 105 °C por 3 h, luego se colocaron en un desecador por 30 min y se pesaron. Se calculó el porcentaje de sólidos totales presentes en la solución utilizando la Ecuación 9 (Pacheco *et al.*, 2013):

$$St = (Pr - P)/V \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec. 9.}$$

Donde:

Pr: Masa de la cápsula más el residuo (g)

P: Masa de la cápsula vacía (g)

V: Volumen de la porción de ensayo (mL)

100: Factor matemático

C. Tamaño de partícula

La caracterización de las nanocápsulas mediante la distribución del tamaño de partícula se determinó en el equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 Horiba®. El análisis del tamaño de partícula se realizó por dispersión dinámica de luz (DLS). Dependiendo de las propiedades físicas de la muestra, el rango dinámico es de 0.3 nm - 8 µm. El límite inferior está influenciado por la concentración, la fuerza con que la muestra dispersa la luz y la presencia de partículas grandes no deseadas. El límite superior está influenciado por la densidad de la muestra, ya que DLS se modela en todos los movimientos provenientes del movimiento browniano, no de la sedimentación gravitacional (Horiba, 2017).

Se colocaron 4 mg de las nanocápsulas en 4 mL de agua desionizada, esta mezcla se vertió en una celda de plástico y se midió bajo las siguientes especificaciones: índice de refracción de la maltodextrina, 1.535; índice de refracción del solvente, en este caso del agua, 1.3333 (Flink & Karel, 1972); temperatura, 25 °C; ángulo de 90°.

D. Morfología de las nanocápsulas visualizadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido

Las estructuras externas de las nanocápsulas obtenidas fueron observadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB). Se utilizó un microscopio óptico de la marca LABOMED para observar la morfología de las nanocápsulas, colocando una pequeña cantidad de cápsulas en una laminilla y observando a 10X, 40X y 100X.

Para MEB se usó el Microscopio JEOL JSM-7600F como se puede apreciar en la Figura 7, donde la muestra es metalizada con cobre.



Figura 7. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F.

E. Cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las nanocápsulas

Usando métodos espectrofotométricos se determinaron fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides (Porter *et al.*, 1986; Scalbert *et al.*, 1989; Pharmacopoeia, 2002; Brighente *et al.*, 2007) y la capacidad de captar especies reactivas de importancia biológica como peróxido, anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y ácido hipocloroso (Nishikimi *et al.*, 1972; Aruoma & Halliwell, 1987; Ruch *et al.*, 1989; Smirnov & Cumbes, 1989; Sreejayan & Rao, 1997; López-Alarcón & Lissi, 2005).

7.10. Elaboración de yogurt

La elaboración del yogurt plurifuncional se llevó a cabo según la formulación de Tranquilino *et al.* (2012) con algunas modificaciones. El proceso de elaboración del yogurt adicionado con grasa vegetal se llevó a cabo en dos etapas: primero, se mezcló la leche Sello Rojo® (0% grasa) [91.95 %] con la grenetina [0.25%] y la sacarosa [5%], llevando esta mezcla a 60 °C con agitación constante, mientras que en la segunda etapa se mezcló el aceite vegetal con los mono y diglicéridos a una temperatura cercana a 80 °C, cuando la mezcla se encontró perfectamente homogénea fue vertida a la primer mezcla. Posteriormente, se pasteurizó a 63 °C durante 30 min, se llevó a 4 °C

y se agregó el cultivo láctico (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) a una concentración de 0.03 g/L, se mantuvo en incubación por 9 h a 43 °C (Figura 8), se enfrió hasta alcanzar los 4 °C y finalmente se agregaron las nanocápsulas, en una concentración de 2.45 g de nanocápsulas por cada 10 g de yogurt.



Figura 8. Proceso de fermentación.

7.10.1. Análisis proximal del yogurt

A. Determinación de humedad

La determinación de humedad consistió en evaporar el agua presente en la muestra, a 105 °C durante 3 hr en cápsulas con peso constante, para después por diferencia de peso obtener el porcentaje de humedad (A.O.A.C., 2000).

B. Determinación de extracto etéreo

Se determinó extracto etéreo de acuerdo con el Método Gerber. NMX-F-387-1982 basado en la A.O.A.C. (2000). Se realizó la extracción con equipo Soxhlet y hexano, durante 4 hr se tuvo la muestra en contacto con el solvente en reflujo constante.

C. Determinación de proteína

La proteína se cuantificó por el Método oficial de la A.O.A.C. 2001.11 “Determinación de proteínas, proteína cruda Método Kjeldahl”. El cual consiste en la digestión de muestras con H₂SO₄ y catalizadores, convirtiendo todo el N₂ orgánico e inorgánico en N₂ amoniacal. Se procedió a una destilación donde el amonio se liberó al agregar un álcali, por último se tituló el exceso de ácido con un álcali estandarizado, que en forma indirecta proporciona el contenido de N₂ (A.O.A.C., 2000).

D. Determinación de cenizas

Se calculó el porcentaje de cenizas por medio de la incineración de la muestra en una mufla hasta la obtención de residuos inorgánicos, considerados como la fracción de minerales de la muestra (A.O.A.C., 2000).

E. Cuantificación de fibra dietética soluble e insoluble

Se hizo la cuantificación de fibra dietética por el método enzimático de Prosky *et al.* (1988). Se realizó en dos partes: digestión y filtración.

7.10.2. Análisis físicoquímicos

A. Determinación de acidez titulable

Se reportó la acidez como porcentaje de ácido láctico, de acuerdo con la NMX-F-511-1988, en base a una titulación ácido-base (NMX-F-511-1988. *Alimentos determinación de acidez en leche reconstituida*, 1988).

B. Determinación de pH

Se determinó el pH del yogurt de acuerdo con la NMX-F-317-S-1978. Se midió electrométricamente la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto (NMX-F-317-S-1978. *Determinación de pH en alimento*, 1978).

C. Determinación del grado sinéresis

Para medir la sinéresis se utilizó la técnica descrita por Guinee *et al.* (1995). Se pesaron 10 g de yogurt, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min y se tomó el sobrenadante. Los cálculos se realizaron

con el peso de la muestra y el peso del sobrenadante multiplicado por cien, como se muestra en la Ecuación 10.

$$\text{Grado de sinéresis} = \frac{\text{Peso del sobrenadante}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \dots \text{Ec. 10.}$$

D. Determinación de viscosidad

Se midió la viscosidad con el equipo Brookfield Rheometer DV3T, a 4-100 rpm, torque a 40-50 %, para ello se tomaron 18 mL de la muestra a 4 °C.

E. Análisis microbiológico

Para determinar la cantidad de microorganismos viables en el yogurt se implementó el método para yogures en los que ambos microorganismos, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, están presentes (ISO 7889:2003. Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count technique at 37 °C, 2009).

Se cuantificaron mohos y levaduras según la Norma Oficial Mexicana 111 (NOM-111-SSA1-, 1994) de la Secretaría de Salud. Las unidades formadoras de colonia de coliformes totales se determinaron según lo recomendado por la NOM 113 (NOM-113-SSA1-, 1994) de la misma Secretaría.

7.10.3. Análisis sensorial del yogurt plurifuncional

A. Selección de jueces sensoriales

Se seleccionó un grupo de jueces sensoriales en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos, durante el periodo de agosto a septiembre del 2018.

Se convocó a los estudiantes de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, que consumieran regularmente yogurt, asistieron 50 personas, a las que se les aplicó una encuesta sociodemográfica (Anexo 1) para conocer edad, sexo, tipo de alimentación, así como el estado de salud (si presentaba alguna enfermedad o consumo de medicamentos controlados y tabaco) (Meiselman, 1993).

A quienes fueron seleccionados según la encuesta, se les realizó una prueba de sensibilidad al amargor según la metodología propuesta por Bartoshuk *et al.* (1998), utilizando un papel filtro impregnado con una solución de 6n-propiltiouracilo (PROP) [1.6 mg/ml]. Se pidió a cada panelista colocar el papel filtro en su lengua, manteniéndolo durante 20 s, por último registró la percepción de amargor en la escala “Green” (Anexo 2) (Predero & Pangborn, 1997; Bartoshuk *et al.*, 1998; Fortin & Desplancke, 2001). Se seleccionó a los catadores que registraron una percepción de amargor “alta” a “muy alta” en la prueba PROP.

Posteriormente, se sometieron a una prueba de identificación de sabores básicos (Anexo 3), con el objetivo de determinar la habilidad de los candidatos para discriminar varios estímulos presentados a intensidades por arriba de los niveles de umbral (Lawless & Heymann, 2010). Se prepararon cinco soluciones en agua destilada a temperatura ambiente en las concentraciones que se muestran en la Tabla 4, se agregó como referencia una muestra de agua destilada. Las muestras se etiquetaron con tres números seleccionados al azar y de la misma forma fueron ordenadas para ser presentadas a los jueces. Se indicó a los panelistas que cataran las muestras de izquierda a derecha, colocándolas en la cavidad bucal, haciendo un enjuague con agua purificada al inicio de la prueba y entre cada muestra, se pidió identificar cada uno de los sabores y registrar la percepción en la papeleta proporcionada para tal propósito (Anexo 3). La prueba de identificación de sabores básicos se realizó con cuarenta y dos personas, 22 mujeres y 20 hombres, se eligió a los participantes que obtuvieron más de 60% de aciertos.

Tabla 4. Concentraciones para prueba de sabores básicos.

Sabor	Estímulo	Concentración (g/L)
Ácido	Ácido cítrico	0.5
Amargo	Cafeína	1.0
Dulce	Sacarosa	20
Salado	Cloruro de sodio	2.0
Umami	Ácido glutámico	0.05

Se realizó un entrenamiento para el uso de escalas: se les proporcionó una papeleta (Anexo 4), y se pidió a los participantes contestaran según el ejemplo que se indicó en la misma.

B. Perfil sensorial del yogurt

Se realizó el perfil sensorial de las diferentes formulaciones del yogurt plurifuncional usando la metodología “Perfil ideal basado en preguntas (CATA)” por sus siglas en inglés, “Check all that apply”. Se les proporcionó a cada juez una papeleta (Anexo 5) para cada formulación, yogurt sin grasa (F1), yogurt con grasa vegetal (F2), yogurt plurifuncional (F3), esta papeleta contenía los descriptores sensoriales del yogurt que se reportaron (Karagül-Yüceer & Drake, 2013) como aroma, textura, color, sabor y apariencia. El juez sensorial, marcó en la papeleta el descriptor que percibió y consideró apropiado para cada formulación de yogurt (Figura 9).



Figura 9. Jueces sensoriales catando yogurt.

7.11. Estudio del efecto de un extracto acuoso purificado de *Quercus crassifolia* administrado a hámsteres dislipidémicos (21 días)

Se determinó el efecto de un extracto purificado de *Quercus crassifolia* nanoencapsulado, utilizando como modelo biológico hámsteres Golden Syrian con condición dislipidémica. El estudio se llevó a cabo después de haber determinado la toxicidad oral aguda y a dosis repetida del extracto de encino, ya que con ayuda de estas pruebas se estableció el nivel al que no se observan efectos adversos (NOAEL) (OCDE, 2006) a una concentración de extracto de 11 mg/kg, el cual fue establecido como la dosis a administrar a los hámsteres.

Los animales se obtuvieron del bioterio de la Unidad Experimental de Animales de Laboratorio, del Centro de Investigación y Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional con sede en la Ciudad de México. Los hámsteres se adquirieron a las 8 semanas de edad. Fueron pesados al llegar y dos veces a la semana. Los animales sanos, 6 adultos machos fueron asignados aleatoriamente al control y a los grupos de estudio, como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Dietas y tratamientos administrados a los diferentes grupos de hámsteres.

Grupo	Dieta	Tratamiento
1	AIN-93M (control)	Yogurt plurifuncional (yogurt+aceite vegetal+nanocápsulas)
2	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Atorvastatina (colesterol), Bezafibrato (triglicéridos)
3	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Yogurt plurifuncional (yogurt+aceite vegetal+nanocápsulas)
4	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Yogurt con ácidos grasos sin fenoles (Yogurt+aceite vegetal)
5	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Extracto de encino sin encapsular
6	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Extracto nanoencapsulado
7	AIN-93M adicionado con 2 % colesterol y 10 % aceite de coco	Yogurt sólo con probióticos (sin grasa)

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual se mantuvo a 22 °C (\pm 3 °C), la humedad relativa mínima del 30% y no excedió el 70% durante la limpieza. La luz fue artificial, siendo el fotoperiodo de 12 hr de luz, y 12 hr de oscuridad (Figura 10). Se administró alimento con 20% de caseína, 3.5% de minerales, 1% de vitaminas, 0.3% de cistina, 0.3% de colina y 7% de aceite de soya, de acuerdo con el Instituto Americano de Nutrición-93 (Reeves *et al.*, 1993; Martínez-Flores *et al.*, 2004) y agua purificada *ad libitum*. El consumo de alimento fue medido diariamente.

Los hámsteres se mantuvieron en aclimatación durante 7 días, comenzando la administración del yogurt plurifuncional (el cual fue preparado una vez a la semana) en la semana 9 de edad. A los grupos experimentales se les administró durante 21 días consecutivos los tratamientos como se observa en la Tabla 5: 2 ml yogurt por 100 g de peso de hámster, 2 ml/100 g de peso de hámster de yogurt plurifuncional adicionado con extracto de *Quercus crassifolia* nanoencapsulado, mientras que los medicamentos (atorvastatina 40 mg/kg/día y bezafibrato 50 mg/kg/día), el extracto nanoencapsulado y sin encapsular se administró en solución acuosa vía oral a las concentraciones antes mencionadas usando una cánula, procurando la misma hora diariamente. El volumen de la solución no excedió los 2 ml/100 g de peso del hámster. Se colectaron las heces de los días 6, 13 y 21, fueron secadas en un horno durante 24 hr a 40 °C, se determinaron lípidos por el método soxhlet, usando éter como solvente.

En el día 22 los hámsteres fueron dejados en ayuno durante 8 hr antes de la eutanasia, se anestesiaron con Pentobarbital y se procedió a la eutanasia por exanguinación, se realizó la necropsia a cada hámster. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para realizar las siguientes pruebas: glucosa, colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, colesterol HDL e índice aterogénico.

Además, se pesaron y se tomaron muestras del bazo, testículos, hígado, riñón, estómago, intestinos, cerebro, pulmón, corazón, glándulas suprarrenales, tiroides y médula espinal.



Figura 10. Hámsteres durante la prueba con el yogurt plurifuncional.

Se determinó extracto etéreo en hígado. Se colectó una muestra fresca de hígado: se pesó 1g de hígado, que fue homogeneizado con 10 ml cloroformo/metanol (v/v, 1:2), se agregó y se mezcló con 1.25 ml de cloroformo y 1.25 mL de agua destilada, se centrifugó a 1500 rev/min durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo para determinar colesterol y triglicéridos (Peng *et al.*, 2011).

7.12. Análisis estadístico

Cada una de las determinaciones fue realizada por triplicado. Los resultados experimentales fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. Se analizaron las variables mediante las

pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Se usaron los software de análisis estadístico XLSTAT 2018.5 de Addinsoft y Statistica 13.3 de Tibco.

Para las pruebas de rendimiento de extracción, concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, se realizó una prueba T de student ($p < 0.05$). En las pruebas de capacidad antioxidante los resultados fueron analizados con una análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) y se realizó una prueba de Duncan para la comparación de medias ($p < 0.05$). La prueba de correlación de Spearman fue usada para determinar la correlación ($p < 0.05$) entre el contenido de diferentes clases de fenoles determinados durante la pre-caracterización química y la capacidad antioxidante.

Para las pruebas de toxicidad oral aguda y a dosis repetida, los resultados experimentales fueron expresados como media \pm desviación estándar de las repeticiones. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Tukey o de las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunnett.

8. RESULTADOS

8.1. Colecta y acondicionamiento de cortezas

8.1.1. Identificación botánica de especies de encino

Se colectaron cortezas de tres especies encinos de interés comercial, blanco, roble y escobillo (Figura 11), en una plantación forestal ubicada en Ciudad Hidalgo, Michoacán; así como ramas y hojas para posibilitar su identificación botánica.

Tabla 6. Nombres comunes de encinos y especies identificadas.

Nombre común	Especie
Blanco	<i>Quercus crassifolia</i>
Escobillo	<i>Quercus laurina</i>
Roble	<i>Quercus scytophylla</i>

Fueron identificadas por los expertos en botánica forestal, Dr. Pablo Cuevas Reyes y y el M.C Javier Madrigal, mientras que la especie de *Q. crassifolia* fue identificada por el Dr. Emmanuel Pérez Calix, botánico del "Instituto de Ecología" en Pátzcuaro, Michoacán, y depositadas en este herbario (Tabla 6).

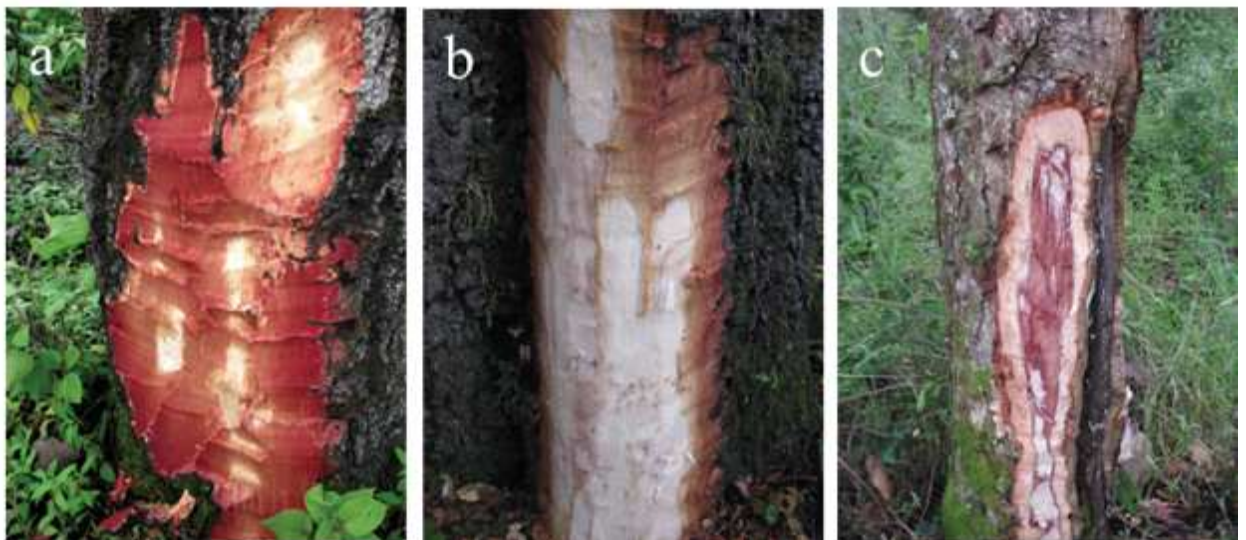


Figura 11. Corteza de a) *Q. crassifolia*, b) *Q. laurina* y c) *Q. scytophylla*.

8.1.2. Rendimientos de extracción

Los rendimientos de extracción para cada una de las tres especies de encino recolectadas utilizando la maceración con etanol/agua (90:10 v/v) y el agua caliente con recirculación se presentan en la Tabla 7. Los resultados obtenidos muestran que los mayores rendimientos de extracción con agua caliente en recirculación fueron para las especies de *Q. crassifolia* y *Q. laurina*, mientras que para *Q. scytophylla*, no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el rendimiento de extracción cuando se comparan los dos métodos de extracción utilizados. En general se obtuvieron los mayores rendimientos de extracción con agua caliente en recirculación, lo cual concuerda con los resultados descritos por García-Pérez *et al.*, quienes en 2010, obtuvieron mayores rendimientos de extracción por este método cuando maceraron cortezas de *Betula alleganiensis* Britton, *Picea mariana*, *Abies balsamea* y *Pinus banksiana* Lamb. Las diferencias obtenidas podrían atribuirse a diferencias en la solubilidad de varios compuestos presentes en la corteza y a una mayor transferencia de masa a la temperatura más elevada que se usa durante la extracción con agua caliente (García-Pérez *et al.*, 2010).

Tabla 7. Rendimientos de extracción de los extractos crudos de especies de encino mexicanas obtenidas por maceración y con agua caliente.

Extracto	Método de extracción	% Rendimiento de extracción*
<i>Q. crassifolia</i>	Agua caliente	21.03±8.09 ^a
<i>Q. crassifolia</i>	Maceración	4.55±0.50 ^b
<i>Q. laurina</i>	Agua caliente	15.11±5.53 ^a
<i>Q. laurina</i>	Maceración	5.77±0.09 ^b
<i>Q. scytophylla</i>	Agua caliente	7.07±1.98 ^b
<i>Q. scytophylla</i>	Maceración	1.86±0.08 ^b

*% (mm^{-1} corteza seca) Medias con diferente letra como superíndice en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas a una $p < 0.05$ (ANOVA, seguida de una prueba de Duncan).

8.1.3. Composición polifenólica de los extractos crudos de especies de encino michoacano obtenidas por maceración y por agua caliente

En la Tabla 8 se presenta el contenido de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides totales en los extractos obtenidos utilizando los dos métodos de

extracción. Es posible observar que se obtiene una mayor cantidad de flavonoides totales en todas las especies utilizando la extracción al agua caliente, mientras que los extractos obtenidos por maceración presentaron un mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos en las 3 especies analizadas, al igual que en proantocianidinas. En el caso de fenoles totales, para *Q. crassifolia* no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a los métodos utilizados, siendo la extracción por maceración la que obtuvo la mayor cantidad de fenoles en *Q. laurina* y al agua caliente para el extracto de *Q. scytophylla*.

Tabla 8. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas de los extractos crudos.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides totales (mg EQ/ g)	Ácidos hidroxicinámicos (mg EACl/g)	Proantocianidinas (mg ECIC/g)
<i>Q. crassifolia</i> agua	746.54±41.09 ^a	25.42±0.64 ^a	234.67±1.53 ^c	25.74±1.25 ^d
<i>Q. crassifolia</i> maceración	694.88±61.88 ^a	14.01±0.31 ^d	268.67±36.90 ^b	53.50±0.96 ^b
<i>Q. laurina</i> agua	474.04±43.92 ^b	24.08±1.12 ^b	132.67±4.04 ^{e,f}	14.19±0.38 ^c
<i>Q. laurina</i> maceración	756.13±16.82 ^a	15.73±0.21 ^c	145.33±17.01 ^{e,f}	24.28±1.84 ^d
<i>Q. scytophylla</i> agua	329.46±37.51 ^c	24.08±0.47 ^b	113.00±3.46 ^{e,f}	12.55±2.32 ^e
<i>Q. scytophylla</i> maceración	521.13±40.06 ^b	12.89±0.33 ^c	172.67±12.90 ^{d,e}	48.41±3.82 ^c
Oligopin ®	735.71±19.94 ^a	6.44±0.24 ^f	336.67±27.96 ^a	69.22±0.82 ^a

Medias con diferente letra como superíndice en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas a una $p < 0.05$ (ANVA, seguida de una prueba de Duncan). Donde: EAG, equivalentes de ácido gálico; EQ, equivalentes de quercetina; EACl, equivalentes de ácido clorogénico y ECIC, equivalentes de cloruro de cianidina.

Tomando en cuenta estos resultados, la técnica de maceración obtuvo los extractos con mayor contenido en flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas, concordando con

trabajos anteriores (García-Pérez *et al.*, 2010; Naima *et al.*, 2015) en los cuales se ha analizado la relación entre diferentes métodos de extracción, solventes y rendimiento en diferentes clases de compuestos fenólicos. *Q. crassifolia* y *Q. laurina* obtuvieron la mayor cantidad de fenoles totales, similar a la cantidad determinada para el Oligopin®. En cuanto a flavonoides totales el extracto crudo al agua caliente de *Q. crassifolia* obtuvo una alta cantidad de flavonoides totales, mientras que *Q. crassifolia* extraído por maceración mostró una alta cantidad de ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas.

De acuerdo con la Tabla 8, el Oligopin® contiene una mayor cantidad de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas, comparada con los extractos crudos de las especies de encino michoacanas que se analizaron. Se puede resaltar el contenido de flavonoides totales del extracto crudo de *Q. crassifolia* por agua caliente, el cual es significativamente mayor que el del Oligopin®. El menor contenido de ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas de las especies de encino michoacanas comparadas con el extracto comercial Oligopin® puede ser debido al hecho de que estos extractos son extractos crudos, los que deben contener cantidades relativamente altas de compuestos polares no selectivamente extraídos usando estos métodos (ej. azúcares), a diferencia del extracto comercial Oligopin® que representa la fracción acetato de etilo del extracto acuoso de cortezas del Pino marítimo francés. Efectivamente, la literatura demuestra que para aumentar el contenido en fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas en extractos polifenólicos crudos suele ser necesario emprender un proceso ulterior de purificación (Diouf *et al.*, 2009a; García-pérez *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2015).

8.1.4. Capacidad antioxidante de los extractos crudos de especies de encino michoacano obtenidos por maceración y por agua caliente

La Tabla 9 muestra los valores de capacidad antioxidante de los extractos crudos de las tres especies de encino michoacano obtenidos por maceración y por agua caliente, así como del Oligopin® y la cúrcuma Terana®, considerando su capacidad para captar radicales y especies reactivas de relevancia biológica como como ión superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y ácido hipocloroso. Dadas las características de estos métodos antioxidantes, estos proveen información acerca de la reactividad química intrínseca de

los extractos polifenólicos para captar a los diferentes radicales y especies reactivas que se mencionan.

Los valores de EC₅₀ mostraron que los extractos de *Q. crassifolia*, tanto por maceración como por agua caliente, fueron los extractos con la mejor capacidad para capturar el anión superóxido (40.89 µg/ml y 80.45 µg/ml, respectivamente), mientras que el extracto de *Q. crassifolia* con el agua caliente mostró la mejor capacidad para capturar el radical hidroxilo (918.19 µg/ml), incluso que Oligopin® (1270.92 µg/ml). En cuanto a la capacidad de captar el radical peroxilo, el extracto de *Q. scytophylla* al agua caliente obtuvo la mejor capacidad de captar al radical peroxilo (390.47 µg/ml), seguido por *Q. crassifolia* agua (577.01 µg/ml) y *Q. laurina* agua (621.67 µg/ml), los cuales obtuvieron valores similares al Oligopin (563.49 µg/ml).

Sin embargo, los extractos de *Q. scytophylla* mostraron un desempeño pobre frente a otros extractos en la capacidad de captar el radical superóxido e hidroxilo. En cuanto a la capacidad de captar peróxido de hidrógeno, *Q. crassifolia* al agua caliente, *Q. crassifolia* por maceración, *Q. laurina* al agua, *Q. laurina* por maceración, así como *Q. scytophylla* por maceración, no se encontraron diferencias ($p < 0.05$).

Para determinar la capacidad de los extractos para captar el óxido nítrico se evaluó a la par al extracto cúrcuma, obtenido a partir de rizomas secos de *Curcuma longa*, es un material de color dorado, de uso común en todo el mundo como condimento y colorante alimenticio. Varios estudios han sido publicados en los últimos años relacionados a la actividad biológica de la curcumina incluyendo sus propiedades antioxidantes, antitumorales, anti-inflamatorias, antiviral, antibacterianas y antifúngicas, atribuyendo estos a su alta capacidad para captar el óxido nítrico (Sueth-Santiago *et al.*, 2015). Fue el extracto de cúrcuma Terana® (Terana S.A) el que registró mejor capacidad de captar óxido nítrico (53.84 µg / ml), seguido por el extracto de *Q. laurina* por maceración (149.47 µg / ml).

En cuanto a la capacidad de inhibir al ácido hipocloroso, *Q. laurina* por maceración obtuvo la mejor capacidad antioxidante (386.94 µg / ml), seguida por la especie de *Q. crassifolia* al agua caliente (740.37 µg / ml) y *Q. laurina al agua caliente* (774.47 µg / ml).

Como podemos ver, en los resultados generales destacaron los extractos de *Q. crassifolia* al agua caliente y *Q. laurina* por maceración, con mayor eficiencia para captar los diferentes radicales y especies reactivas, sin embargo, *Q. crassifolia* tuvo un mayor rendimiento de extracción (Tabla 7).

Tabla 9. Actividad antioxidante de extractos crudos de especies de encino michoacano.

Extracto	OH• EC ₅₀ (µg/mL)	O ₂ • ⁻ EC ₅₀ (µg/mL)	ROO• EC ₅₀ (µg/mL)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (µg/mL)	NO• EC ₅₀ (µg/mL)	HClO EC ₅₀ (µg/mL)
<i>Q. crassifolia</i> agua	918.19±9.17 ^a	80.45±0.71 ^a	577.01±40. 30 ^{b,c}	596.92±162. 49 ^b	*Sin actividad ^d	740.37±53.9 3 ^b
<i>Q. crassifolia</i> maceración	2023.55±197 .65 ^c	40.89±16.40 ^a	1747.26±86 .70 ^e	652.61±122. 26 ^b	873.39±48. 96 ^c	1275.68±39. 81 ^c
<i>Q. laurina</i> agua	1257.04±75. 15 ^b	628.81±8.87 ^a	582.14±15. 11 ^b	727.34±56.8 5 ^b	*Sin actividad ^d	774.47±191. 61 ^b
<i>Q. laurina</i> maceración	*Sin actividad ^d	3212.76±917 .34 ^b	621.67±47. 92 ^c	519.11±116. 46 ^b	149.47±17. 19 ^a	386.94±85.9 3 ^a
<i>Q. scytophylla</i> agua	1864.55±396 .37 ^c	*Sin actividad ^c	390.47±160 .29 ^a	1101.64±48. 80 ^c	*Sin actividad ^d	866.29±183. 33 ^b
<i>Q. scytophylla</i> maceración	*Sin actividad ^d	406.20±134. 67 ^a	856.38±23. 60 ^d	1049.76±165 .80 ^b	661.03±177 .39 ^b	952.66±211. 64 ^b
Oligopin®	1270.92±72. 05 ^b	104.44±8.00 ^a	563.49±32. 85 ^{b,c}	174.43±9.54 ^a	*Sin actividad ^d	1310.42±114 .41 ^c
Cúrcuma					53.84±39.0	
Terana®					4 ^a	

EC₅₀>2000 µg ml⁻¹. Medias con diferente letra como superíndice en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas a una p<0.05 (ANOVA, seguida de una prueba de Duncan).

Para identificar la asociación de los distintos tipos de contenido polifenólico con la actividad antioxidante, se realizó un análisis de correlación de Spearman. La habilidad para captar radicales superóxido estuvo correlacionada con la cantidad de ácidos hidroxicinámicos ($r = -0.829$, $p = 0.001$) y fenoles totales ($r = -0.567$, $p = 0.004$), lo cual coincide con lo reportado por Natic *et al.* (2015), quienes encontraron que los polifenoles presentes en las frutas de mora cultivadas en Vojvodina poseen una alta actividad antioxidante-antirradical, actuando como potentes eliminadores del anión superóxido, también encontraron que los ácidos fenólicos predominantes fueron el ácido protocatéquico y el ácido ferúlico, que mostraron una alta correlación positiva con la capacidad para captar al radical aniónico superóxido (Natic *et al.*, 2015).

El contenido de flavonoides ($r = -0.631$, $p = 0.001$) y fenoles totales ($r = -0.441$, $p = 0.035$) en los extractos está en correlación con la capacidad de capturar radicales hidroxilo, como se encontró en los extractos de *Matricaria pubescens* estudiado por Metrouh-Amir *et al.* (2015), en el que los resultados revelaron una correlación significativa entre el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides y la actividad antioxidante evaluada por la capacidad de eliminación de radicales hidroxilo (Metrouh-Amir *et al.*, 2015).

La actividad de captación de peróxido de hidrógeno está más fuertemente asociada al total de fenoles ($r = -0.821$, $p = 0.002$) que a los ácidos hidroxicinámicos ($r = -0.545$, $p = 0.007$). La capacidad de los extractos de especies de madera canadienses para eliminar H_2O_2 se asoció también con el contenido total de fenoles, tal como lo describió García-Pérez *et al.* (2010):

La concentración de flavonoides totales y el contenido de proantocianidinas tuvo correlación con la capacidad de captar ácido hipocloroso, $r = -0.532$ ($p = 0.009$) y $r = 0.688$ ($p = 0.0002$), respectivamente. Quettier-Deleu *et al.* (2000), también demostraron una alta asociación entre los compuestos de flavonoides y las actividades antioxidantes en extractos de cáscara y harina de trigo sarraceno (Quettier-Deleu *et al.*, 2000). Además, la concentración total de flavonoides tiene correlación con la capacidad para capturar el óxido nítrico ($r = 0.511$, $p = 0.013$). Eso significa que a concentraciones altas de proantocianidinas y flavonoides totales muestran una mayor capacidad para captar ácido hipocloroso y óxido nítrico.

8.1.5. Rendimiento de extracción del extracto purificado

El rendimiento de extracción del extracto crudo y purificado se puede observar en la Tabla 10, en donde el rendimiento de extracción del extracto purificado disminuyó considerablemente en comparación con el rendimiento de extracción del extracto crudo de *Q. crassifolia* al agua caliente. Esto es razonable debido a que en esta etapa se está obteniendo solo la fracción correspondiente a aquellos compuestos solubles en acetato de etilo.

Tabla 10. Rendimiento de extracción del extracto de *Q. crassifolia* crudo y purificado/ 50 g de corteza seca.

Extracto	Rendimiento de extracción (%)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	20.04±7.71*
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	2.70 ± 0.33

Medias con *en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente. Prueba t ($p < 0.05$).

8.1.6. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de *Q. crassifolia* crudo y purificado.

En la Tabla 11 se presenta el contenido de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas y flavonoides totales en el extracto obtenido por el método de extracción al agua caliente crudo y el purificado, este último considerado como una fracción enriquecida en compuestos fenólicos.

Como se puede observar en la Tabla 11, después del proceso de purificación y concentración de compuestos fenólicos con hexano y acetato de etilo, desechando la fracción acuosa, se determinó la cantidad de fenoles totales del extracto purificado, teniendo una mayor cantidad de fenoles totales, flavonoides totales así como una mayor cantidad de ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo, la concentración de proantocianidinas disminuyó, de 25.74 equivalentes a 9.95 equivalentes de cloruro de cianidina, lo cual concuerda con el estudio efectuado por Diouf *et al.* (2009a), trabajo en el cual se determinó el contenido de fenoles totales y proantocianidinas de un extracto acuoso

de corteza de *Picea mariana*, tanto del extracto crudo, como de la fracción de acetato de etilo. Estos autores obtuvieron como resultado un aumento en la cantidad de fenoles totales para la fracción acetato de etilo, en comparación con el extracto crudo, mientras que la concentración de proantocianidinas, disminuyó en la fracción de acetato de etilo.

Tabla 11. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas del extracto de *Q. crassifolia* crudo y purificado.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides totales (mg EQ/g)	Ácidos hidroxicinámicos (mg EACL/g)	Proantocianidinas (mg ECIC/g)
<i>Q.</i> <i>crassifolia</i> agua crudo	746.54±41.09 ^b	25.42±0.64 ^b	234.67±1.15 ^b	25.74±1.25 ^a
<i>Q.</i> <i>crassifolia</i> agua purificado	2391.04±185.01 ^a	43.59±0.31 ^a	362.37±13.47 ^a	9.35±0.32 ^b

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente con una significancia de $p < 0.05$. (Prueba t). Donde: EAG, equivalentes de ácido gálico; EQ, equivalentes de quercetina; EACL, equivalentes de ácido clorogénico y ECIC, equivalentes de cloruro de cianidina.

Este resultado puede explicarse si se considera que la fracción acuosa, que se desecha como resultado de la purificación, contiene principalmente proantocianidinas poliméricas, mientras que la fracción de acetato de etilo está compuesta principalmente por proantocianidinas oligoméricas. Esto supondría que una parte de las proantocianidinas de elevado peso molecular se perdería como resultado del proceso de purificación en consecuencia disminuyendo la concentración de proantocianidinas totales en la fracción acetato de etilo.

Cabe destacar que se ha demostrado que las proantocianidinas oligoméricas, debido a su menor peso molecular, poseen mayor actividad biológica que las poliméricas. De hecho, estas últimas, dado su gran tamaño, son incapaces de atravesar las membranas biológicas y consecuentemente no pueden interferir en las vías de señalización relacionadas con la patogénesis de enfermedades (Crozier *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2014).

8.2. Capacidad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia* crudo y purificado obtenido por agua caliente

La Tabla 12 muestra los valores de capacidad antioxidante del extracto crudo de *Q. crassifolia* al agua caliente y del extracto purificado de *Q. crassifolia*, considerando su capacidad para captar especies reactivas como el ión superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso.

Como podemos observar, el extracto purificado mejoró la capacidad de captar al radical hidroxilo, ión superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso, es decir se requiere una menor concentración del extracto de encino purificado para poder captar al 50% de las especies reactivas que se mencionaron. De igual forma, en el trabajo de (Diouf *et al.*, 2009a), se pudo observar, que la fracción de acetato de etilo del extracto de corteza de *Picea mariana*, tuvo, en general, una mayor capacidad antioxidante que el extracto crudo.

Tabla 12. Actividad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia* purificado.

Extracto	OH• EC ₅₀ (µg/ml)	O ₂ • ⁻ EC ₅₀ (µg/ml)	ROO• EC ₅₀ (µg/ml)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (µg/ml)	NO• EC ₅₀ (µg/ml)	HClO EC ₅₀ (µg/ml)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	918.19± 9.17 ^a	80.45±0.71 ^a	577.01±40.30 ^b	596.92±162.49 ^a	>4000 ^a	740.37±53.93 ^a
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	467.05±50.00 ^b	58.07±1.61 ^b	716.62±9.18 ^a	21.97±1.82 ^b	>4000 ^a	107.97±24.70 ^b

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente con una significancia de $p < 0.05$. (Prueba t). OH•: radical hidroxilo; O₂•⁻: anión superóxido; ROO•: radical peroxilo; H₂O₂: peróxido de hidrógeno; NO•: radical óxido nítrico; HClO: ácido hipocloroso.

Mientras que para el radical peroxilo, aunque hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), el radical purificado, aumentó la EC₅₀ en comparación al extracto crudo, esto puede ser debido a la pérdida en la fracción acuosa de compuestos que pudieran estar relacionados con la

capacidad de captar radicales peroxilo, tales como proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolizables, lignanos, estilbenos, entre otros, los cuales no fueron determinados en este trabajo.

En lo que respecta al radical óxido nítrico, tanto el extracto crudo como el extracto purificado, a concentraciones menores a 4000 µg/ml, no tuvieron capacidad de captar a la especie reactiva de nitrógeno.

8.3. Caracterización química del extracto purificado de *Q. crassifolia*

Se obtuvieron tres fracciones del extracto purificado de encino (EP), mostrándose los siguientes rendimientos: Fracción de diclorometano (FD), 49.61%; Fracción acuosa (FW), 29.62% y Fracción de acetato de etilo (FE), 20.77%.

8.3.1. Análisis elemental

En la Tabla 13 se muestra el análisis elemental del extracto purificado de encino y de las tres fracciones. Como se puede apreciar, la fracción de diclorometano, presenta las proporciones más altas de carbono, hidrógeno, azufre, nitrógeno y proteínas, mientras que la fracción acuosa presenta un mayor porcentaje de ceniza y oxígeno.

Tabla 13. Análisis elemental del extracto de encino y sus fracciones.

Muestra	C %	H %	N %	S %	Proteína %	Ceniza %	O %
EP	52.88±0.03	4.95±0.02	0.17±0.01	0.05±0.08	1.05±0.04	6.76±0.26	35.19±0.11
FW	49.29±0.21	4.38±0.05	0.14±0.01	0.90±0.03	0.90±0.03	6.94±2.13	38.34±0.23
FE	54.74±0.87	4.82±0.25	0.08±0.02	0.48±0.1	0.48±0.10	5.44±1.33	34.44±1.00
FD	55.18±0.11	5.35±0.01	0.18±0.01	1.13±0.04	1.13±0.04	4.15±0.61	34.01±0.15

8.3.2. Análisis proximal

En la Tabla 14 se puede observar en el análisis proximal, que el contenido de compuestos volátiles es mayor en la fracción de diclorometano y la fracción acuosa muestra un contenido mayor de carbono fijo.

Tabla 14. Análisis proximal del extracto de encino y sus fracciones.

Muestra	Volátiles %	Carbón fijo %	Ceniza %
EP	63.97±0.36	29.27±0.14	6.76±0.26
FW	60.85±5.94	32.21±3.84	6.94±2.13
FE	63.55±1.15	31.02±1.07	5.44±1.33
FD	67.53±0.24	28.33±0.53	4.15±0.62

8.3.3. GC-MS

En la Tabla 15 se muestran los compuestos identificados, podemos ver los cromatogramas tanto en el extracto purificado de encino (Figura 12), como en las tres diferentes fracciones (Figura 13, 14 y 15). Se identificaron 85 compuestos diferentes, tanto en el extracto purificado, como al analizar las tres fracciones del mismo, clasificándolas en aldehídos (1.18%), ácidos carboxílicos (5.88%), ácido nitroso (1.18%), alcanos (2.35%), alcoholes (16.47%), alquenos (2.35%), amidas (4.71%), aminas (12.94%), aminoácidos (1.18%), azoles (2.35%), azúcares (4.71%), cetonas (15.29%), cicloalcanos (2.35%), cicloalquenos (3.53%), ésteres (4.71%), éteres (1.18%), fenoles (12.94%), furanos (1.18%), glicoles (1.18%), hidrazinas (1.18%) y peróxidos (1.18%).

Como podemos observar en el análisis por cromatografía de gases, la mayor proporción de compuestos volátiles y semivolátiles detectados fueron cetonas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, donde se reportó para el extracto purificado de corteza de *Quercus crassifolia* un alto contenido de polifenoles (860.40 ± 5.68 mg EAG/g), entre los que destacan el alto contenido de flavonoides (43.597 ± 0.31 , mg EQ/g) y ácidos hidroxicinámicos (362.37 ± 13.47 mg EACl/g) y aunque la cantidad de proantocianidinas presentes en el extracto de encino es baja, la presencia de taninos tanto hidrolizables como condensados es característica del género *Quercus*, los taninos por ser moléculas oligoméricas y poliméricas, no son fácilmente observables mediante cromatografía de gases.

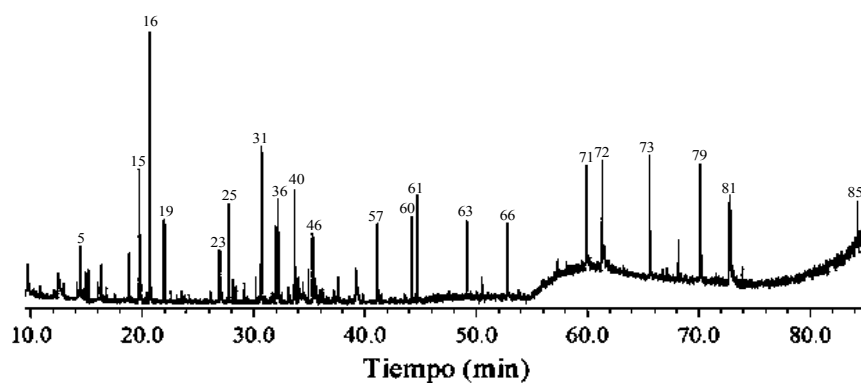


Figura 12. Cromatograma del extracto purificado de corteza de Q. crassifolia (EP).

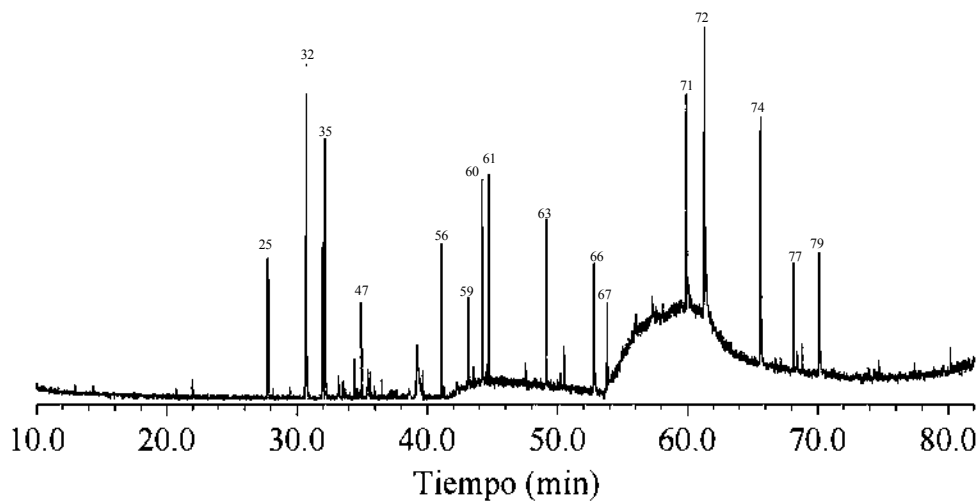


Figura 13. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo (EF).

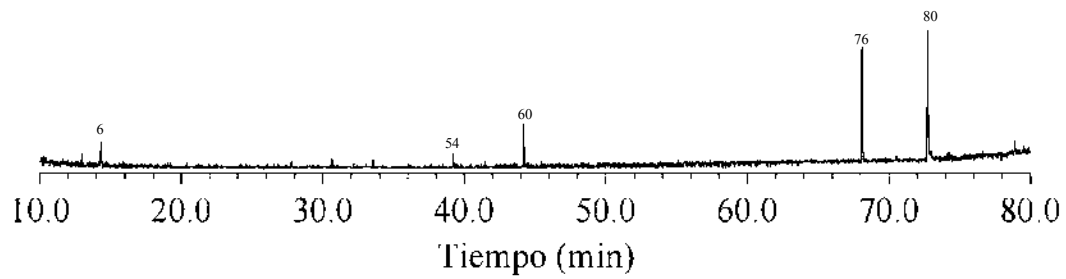


Figura 14. Cromatograma de la fracción de agua (WF).

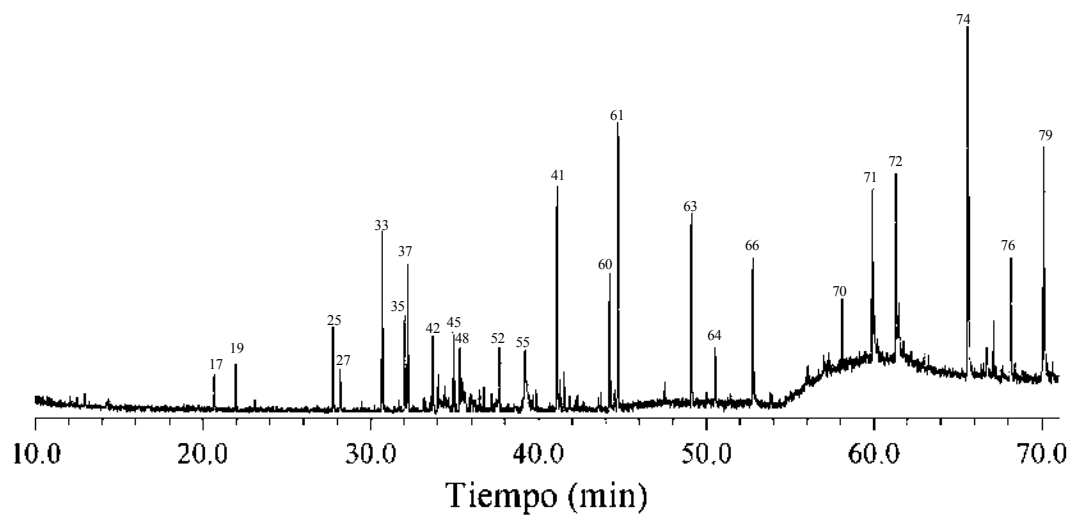


Figura 15. Cromatograma de la fracción de diclorometano (DF).

Dentro del grupo de compuestos fenólicos que pudieron ser detectados destacan como mayoritarios: el 72, 4-hydroxy-Benzeneethanol, también conocido como tyrosol, el cual está presente en dos de los componentes principales de la dieta mediterránea: el vino y el aceite de oliva, este último se ha reportado, es absorbido al ingerir oralmente dosis sostenidas y moderadas de aceite de oliva virgen. Además de evitar la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) previniendo la peroxidación lipídica y el proceso de aterosclerosis (Covas *et al.*, 2003; Miró-Casas *et al.*, 2003). Por ejemplo, el 4-hydroxy-Benzeneethanol, ha sido detectado en vinos añejados en barricas de encino *Quercus petraea* (Simón *et al.*, 2014), además de ser uno de los principales componentes de la biomasa de *Cunninghamia lanceolata*, una especie conífera asiática (Zhang *et al.*, 2015).

El compuesto 66, Phenol,2,6,dimetoxi, también conocido como siringol, fue detectado en vinos cuando se añejaron en barricas de *Quercus petraea* (Simón *et al.*, 2014), mientras que ha sido encontrado también en flores de *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* y hojas de *Rubus plicatus* y *Fragaria vesca*, reportando que los glicoconjugados de estas plantas poseen capacidad protectora contra la radiación-gamma en un sistema celular *in vitro* y mitigaron el daño por la radiación en linfocitos, atribuyendo estas cualidades a la alta concentración de siringol y ácido ferúlico (Szejka *et al.*, 2017).

El compuesto número 81, Scyllo-inositol fue descubierto por primera vez en tiburones, en riñón, hígado, bazo y branquias, sin embargo, también se encuentra en tejidos vegetales, incluyendo el coco, guanábana, uva, algunos cítricos, vegetales de la familia *Apiaceae* y la corteza del roble blanco y el inglés. Además, a este compuesto bioactivo y sus isómeros, se les ha atribuido la capacidad de regular el metabolismo del azúcar y proteger a las células de los daños oxidativos, citotóxicos y mutagénicos (Kallio *et al.*, 2009). Aunado a esto, se tienen reportes de ensayos *in vivo* en ratones donde se ha demostrado que el scyllo-inositol inhibe los déficits cognitivos y mejora significativamente la patología de la enfermedad, lo que sugiere que podría ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Fenili *et al.*, 2007), mientras que ensayos preclínicos y clínicos en humanos, se han obtenido resultados positivos en el tratamiento la enfermedad predominante Alzheimer, también han generado gran interés en este compuesto de origen natural (Ma *et al.*, 2012).

Tabla 15. *Compuestos identificados en el extracto de encino por Cromatografía de Gases.*

No.	TR (min)	Compuestos identificados	Fracción
1	9.672	Cycloserine	EP
2	12.398	Acetic acid, anhydre with formic acid Acetic acid, anhydre with formic acid	EP
3	12.903	[(aminocarbonyl)amino]oxo-Acetic acid	EP
4	12.916	hexyl-Thiophane	EF
5	14.141	2-Acetylamino-2-cyano-acetamide	EP
6	14.33	(propoxymethyl)-Benzene	WF
7	14.418	3 methyl-1-Penten-3-ol	EP
8	14.86	tetrahydro-5-methyl-cis-Furfuryl alcohol	EP
9	15.1	3-ethoxy-3-methyl-2-Butanone	EP
10	15.958	Methanol, chloro-, acetate	EP
11	16.249	Pentanoic acid, 2 (aminooxy)-	EP
12	16.703	2-Propenoic acid, 2-methyl-, ethenyl ester	EP
13	18.761	Ether, 3-butenyl pentyl	EP
14	19.645	Pantolactone	EP
15	19.746	Cyclopentanol, 1-methyl-	EP
16	20.617	(2,3,3-Trimethyloxiranyl)methanol	E
17	20.665	2-Hexanone,3-hydroxy-3,5-dimethyl	DF
18	20.692	Acetamide, N-(aminocarbonyl)-	EF
19	21.93	1,2-Hydrazinedicarboxamide	EF
20	22.511	Butanemide, N,N-dimethyl-	EP
21	23.457	1-H-Imidazol-2-amine	EP
22	26.096	Ethylamine, 1-methyl-2-(5-methyl-1-H-pyrazol-3-yl)-	EP
23	26.891	Ethanol, 2-butoxy-	EP
24	27.661	Hydrazinecarboxamide	DF
25	27.724	L-(+)-Rhamnose	EP, EF
26	28.116	Furan, 2,4-dimethyl-	EP
27	28.128	2-cyclopenten-1-one, 2 methyl	EP, DF
28	28.154	Hex-4-yn-3-one	EF
29	28.419	Cyclohexyl 2,2-dimethylpentanoate	EP

30	29.1	2-Hydroxy-2-methyl-but-3-enyl 2-methyl-2(Z)-butenoate	EP
31	30.148	N,N'-Diacetylenediamine	EP
32	30.628	2,3-Butanediol,2,3-dimethyl-	EF
33	30.64	D-(+)-Xilose	DF
34	30.678	Hydrazine, (1-methylethyl)-	WF
35	31.941	1-Butanol, 4-(1-methylethoxy)-	EF, DF
36	31.954	2-Hydroxy-2-methylbutyric acid	EP
37	32.143	1-Butanol, 4-(1-methylethoxy)-	EP
38	33.127	2-Furamethanol, tetrahydro-5-methyl-, trans-	EF
39	33.519	Acetic acid, hydrazide	WF
40	33.632	2-cyclopenten-1-one, 3 methyl	EP, DF
41	34.011	1-Pentene,4,4-dimethyl	EP, DF
42	34.352	2-Buten-1-ol, E	EP
43	34.365	1,3-Butanediol, (S)-	EF
44	34.882	3-Hexanol, 2,3-dimethyl-	EP, EF
45	34.907	Pentanoic acid, 2-Hydroxy-4-methyl-,ethyl ester	DF
46	35.274	4(1H)-Pyrimidinone, 6-methyl-	EP, DF
47	35.362	4,5-Octanediol	EF
48	35.577	Paraldehyde	EF
49	36.448	3-Methyl-1-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl]butan-2-one	EF, DF
50	36.713	4H-Imidazol-4-one, 2 amino-1,5-dihydro	DF
51	37.155	1H-Tetrazol-5-amine	DF
52	37.596	1-Hexanone, 5 methyl-1-phenyl	EP, DF
53	39.149	2-Cyclopenten-1-one, 3,4,5-trimethyl-	DF
54	39.162	Phenol, 2-methoxy-, acetate	EP, WF
55	39.591	Oxirane, (ethoxymethyl)	EF
56	41.056	Cyclohexene, 1-methoxy-	EF, DF
57	41.068	1-Hexene-3,5-dione	EP
58	43.101	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	EF
59	43.53	Benzeneethamine, N-hydroxy-2,5-dimethoxy- α ,4-dimethyl-	EF
60	44.174	ter-Butyl Hydroperoxide	EP, EF, DF
61	44.666	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-	EF, DF
62	47.494	2-(2-Furyl)-2,5-dimethyltetrahydrofuran	DF
63	49.085	2,3-Dimethyl-3-pyrazolin-5-one	EP, EF, DF

64	50.473	4-Acetoxy-3-methoxystyrene	DF
65	50.486	Phenyl-1,2-diamine, N,4,5-trimethyl-	EP
66	52.746	Phenol,2,6,dimetoxo	EP, EF, DF
67	53.756	3,5-Dimethyl-1-dimethylphenylsilyloxybenzene	EF
68	56.053	2-(Methylmercapto)-benzothiazol	EF
69	57.265	4-Ethylbiphenyl	EF
70	58.035	2-Fluoro-6-trifluoromethylbenzoic acid, 3 -tridecyl ester	DF
71	59.866	2H-Pyran-2-one, 4 methoxy-6-(2-oxopropyl)	EP, EF, DF
72	61.267	Benzeneethanol, 4-hydroxy-Benzeneethanol, 4-hydroxy-	EP, EF, DF
73	65.534	1,2-Butanediol, 1-(2-furyl)-3-methyl-	EP, EF
74	65.534	β -D_Glucopyranose,1,6-anhydro	DF
75	67.087	2-Chloro-5-methoxybenzimidazole	DF
76	68.084	9H-Fluorene, 9-methylene-	WF, DF
77	68.337	1-Methyl-1,6-diazaplenalene	EF
78	68.753	4,4'-Dimethylbiphenyl	EF
79	70.079	2,4,6,(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-acetyl-	EP, EF, DF
80	72.717	DL-Arabinose	WF
81	72.743	Scyllo-Inositol	EP
82	74.674	Phenethylamine, 2,4,5-trimethoxy- α -methyl-	EF
83	77.426	Doxilamine Succinate	EF
84	80.141	17,21-Dimethylheptatriacontane	EF
85	84.193	Apigenin 7-glucoside	EP

Donde EP: extracto purificado de *Q. crassifolia*, WF: fracción acuosa, EF: fracción de acetato de etilo y DF: fracción de diclorometano.

8.3.4. Pyro- GC-MS

En la Tabla 16 podemos observar los compuestos identificados en la pirocromatografía de gases, en tanto que en las Figuras 16, 17, 18 y 19 se muestran los pirogramas, de los cuales se determinaron 351 compuestos, clasificándolos en: ácido carboxílico (3.42%), ácidos grasos (2.56%), alcanos (9.97%), alcoholes (9.97%), alcoholes (5.13%), aldehídos (2.85%), alquenos (2.85%), alquinos (0.57%), amida (2.56%), amina (7.12%), azoles (1.42%), azúcar (1.14%), benzofuranos (0.57%), cetonas (8.54%), cicloalcanos (4.27%), cicloalquenos (16.81%), cicloalquinos (0.57%), ésteres (0.85%), esteroides (0.57%), éteres (2.28%), fenoles (22.79%),

hidracina (0.28%), indol (0.57%), inositol ((0.28%), óxido (0.57%), quinolina (0.28%), sesquiterpeno (0.28%), terpeno (0.28%) y tiazol (0.28).

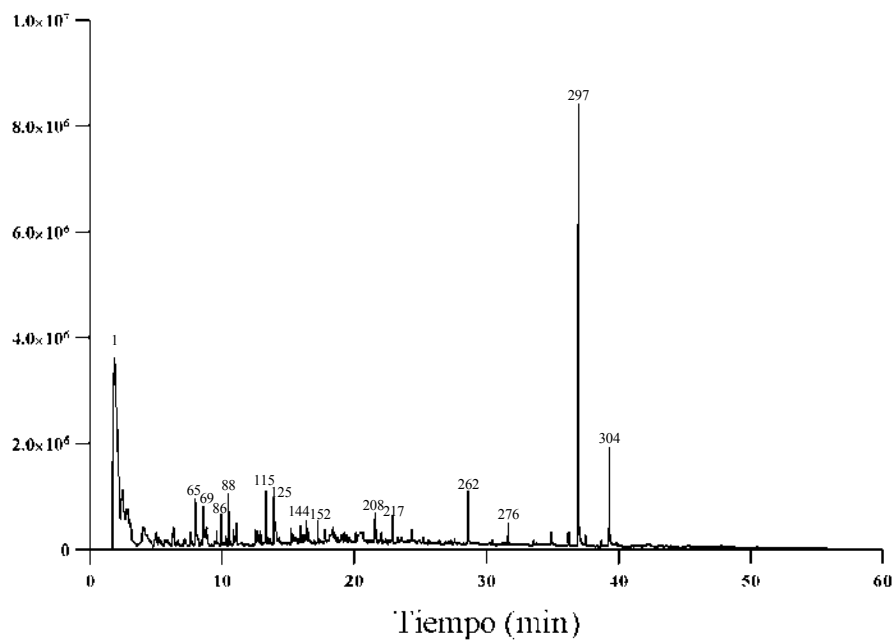


Figura 16. Pirograma del extracto purificado de corteza de *Q. crassifolia* (EP).

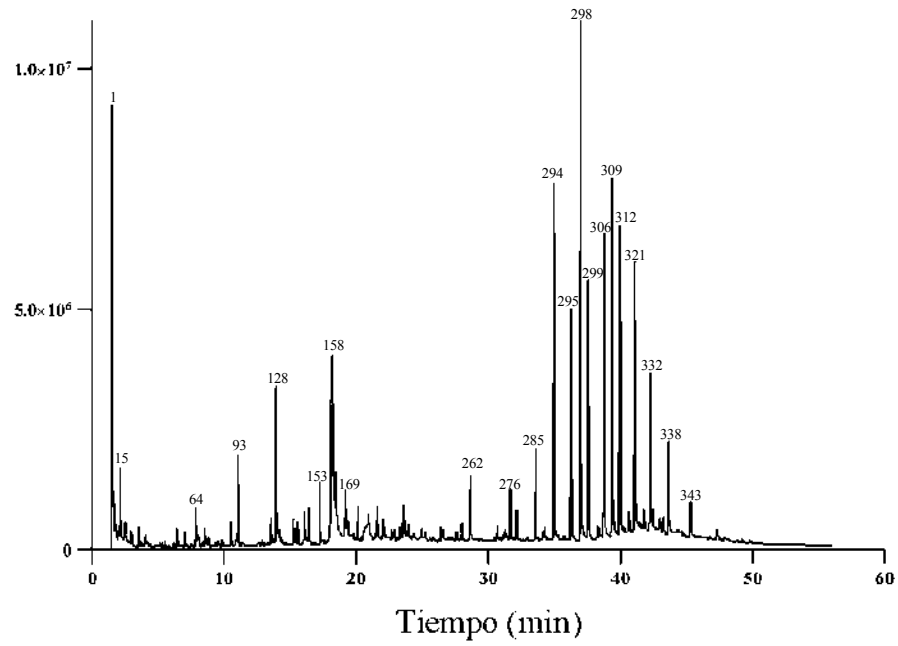


Figura 17. Pirograma de la fracción de acetato de etilo (EF).

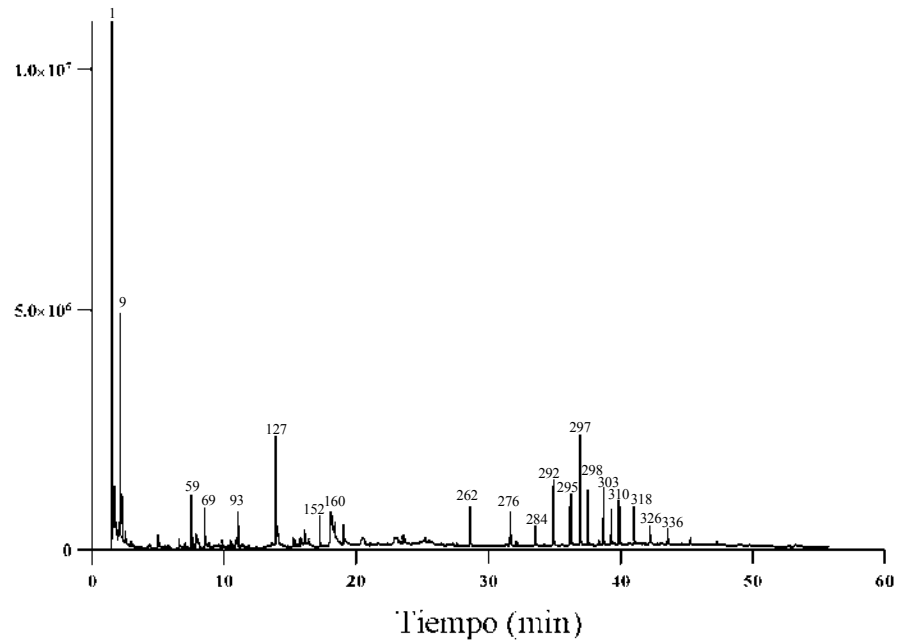


Figura 18. Pirograma de la fracción de agua (WF).

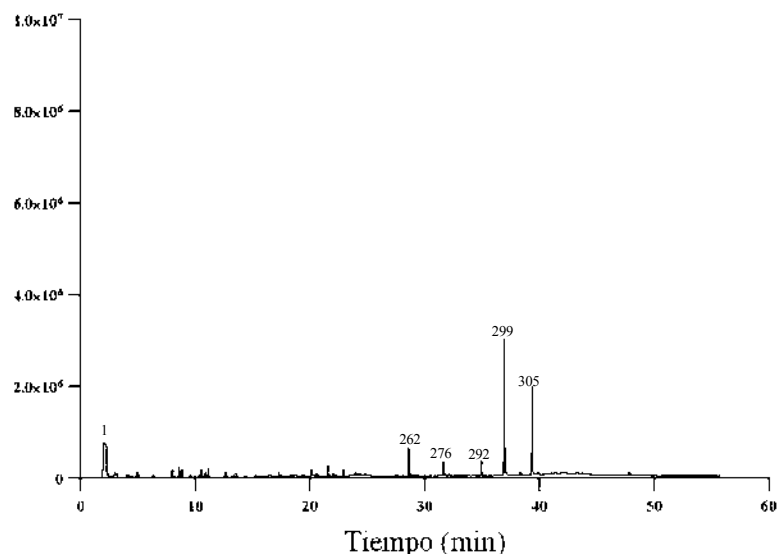


Figura 19. Pirograma de la fracción de diclorometano (DF).

Entre los compuestos indentificados destacan el **115**, Phenol, 2,4-dimethyl- y el **294**, Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-, ambos detectados cuando se realizó un tratamiento hidrotérmico de celulosa (Gao *et al.*, 2012); además existió cantidades significativas del compuesto número el **127**, el Resorcinol, que también se ha detectado en cereales como cebada, centeno, trigo, mostrando efectos antioxidantes y moduladores de membrana (Naczki & Shahidi, 2006), además se ha reportado que posee actividad anti-tirosinasa, pudiéndose usar como despigmentante de la piel (Stratford *et al.*, 2013); además se muestra el compuestos **299**, 4-Methoxy-4',5'-methylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid, identificado como uno de los principales componentes en madera de *Cunninghamia lanceolata* (Zhang *et al.*, 2015).

El compuesto **88**, Phenol, 4-methyl-, también llamado *p*-Cresol, se emplea principalmente en la síntesis de antioxidantes tales como butilhidroxitolueno (Scott & Summit, 1985), y es proveniente de la termodegradación de la lignina, por lo tanto, se ha reportado en la composición química de compuestos volátiles de vinos añejados en barricas elaboradas con madera de encino americano (*Quercus alba*) y francés (*Quercus sessilis*) (Cerdán *et al.*, 2002).

Mientras que otros compuestos que se encontraron en alta proporción en las tres fracciones fueron los ácidos grasos como Eicosano, n-Hexadecanoic acid, Heneicosane, los cuáles han sido compuestos ampliamente reportados en análisis de compuestos en cortezas de *Quercus suber* y *Betula pendula* después de ser sometidas a una hidrólisis alcalina (Pinto *et al.*, 2009).

Tabla 16. Compuestos identificados en el extracto de encino utilizando Pirólisis y Cromatografía de Gases.

No	TR (min)	Compuestos identificados	Fracción
1	1.52	Carbon dioxide	EP, EF, WF, DF
2	1.658	Dimethylamine	EF
3	1.753	Acetone	EF, WF
4	1.826	O-Methylisourea	EF
5	1.835	2-Propanamine	WF
6	1.89	Nitrous Oxide	EP, DF
7	1.925	Butanal	EP
8	2.029	Cyclopropanecarboxaldehyde	EP
9	2.042	Aziridine, 2,2-dimethyl-	WF
10	2.051	3-Butenamide	EF
11	2.063	Cyclobutanol	WF, DF
12	2.089	Ethylene oxide	DF
13	2.137	Furan, 2-methyl-	EF, WF
14	2.154	Propanenitrile, 3-(methylamino)-	EF
15	2.184	Ethyl Acetate	EP, EF, WF
16	2.309	Acetic acid	EF, WF
17	2.365	2-Formylhistamine	EF
18	2.56	Benzene	EP, EF, WF, DF
19	2.991	trans-1-Ethoxy-1-butene	EF
20	3.008	Formamide, N-(1-cyanoethenyl)	WF
21	3.051	Butanal, 2,2-dimethyl-	EF
22	3.064	1-Propene, 3-methoxy-	WF

23	3.099	1,3-Hexadien-5-yne	DF
24	3.539	3-Pentanone, 2-methyl-	WF
25	3.694	Oxirane, 2-methyl-2-(1-methylethyl)-	EF
26	3.811	Toluene	EP, EF, DF
27	3.827	Cyclopropanecarboxylic acid, cyclo hexylmethyl ester	EP, EF
28	3.88	1,3,5-Cycloheptatriene	EF
29	4.039	2,4-Pentanedione	EF
30	4.208	3-Methylenecyclohexene	EF
31	4.332	Heptane, 3-methylene-	EP
32	4.345	3-Hexene-2,5-diol	WF
33	4.354	Butane, 1-(ethenyloxy)-	EF
34	4.402	1-(2-Phenylsulfanyl-ethyl)-pyrrolidine	WF
35	4.949	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	EP, DF
36	4.98	1,5-Cyclooctadiene	WF
37	4.997	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	DF
38	5.036	Furfural	EP, WF
39	5.118	Cyclooctanone	EF
40	5.122	3(2H)-Pyridazinone	WF
41	5.338	Ethanol, 2-[2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy]-	EF, DF
42	5.351	1-Methoxymethoxy-hexa-2,4-diene 1-Pentanol, 5-methoxy-	WF
43	5.519	2,3-Butanediol, 2,3-dimethyl-	EF
44	5.549	(SS)- or (RR)-4-methyl-2,3-pentanediol	WF
45	5.7	Ethylbenzene	EP
46	5.889	o-Xylene	EP
47	6.231	Styrene	EP, EF
48	6.265	1,1-Difluoro-2-vinylcyclopropane	WF
49	6.373	Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene	EF, DF
50	6.395	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	DF
51	6.455	2-Propanol, 1-methoxy-2-methyl-	EF
52	6.58	2-Propanol, 1-[1-methyl-2-(2-propenyloxy)ethoxy]-	EP
53	6.602	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	EP, EF, WF
54	7.05	2-Methyl-5-hexen-3-ol	EF
55	7.089	3-Pentanol, 2,4-dimethyl-	EF
56	7.098	Cyclohexanone	WF

57	7.175	Piperidine, 1-methyl-	EP
58	7.516	2-Propenoic acid	EF
59	7.555	2,5-Furandione, 3-methyl-	EF, WF
60	7.606	2,5-Furandione, dihydro-3-methylene-	EP
61	7.736	2H-Pyran-2-one	EP
62	7.797	Hydrazine, 2-propenyl-	EF
63	7.814	2-Propen-1-ol, 2-methyl-	WF
64	7.87	Benzaldehyde	EP, EF, WF, DF
65	7.999	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	EP, WF
66	8.077	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	EF
67	8.379	Propane, 1-(1-methylethoxy)-	EF
68	8.452	1-Propyne, 3-bromo-	EP
69	8.539	Phenol	EP, EF, WF, DF
70	8.827	7H-Dibenzo[b,g]carbazole, 7-methyl	EP
71	8.832	(R,R)-(-)-2,3-Dimethoxy-1,4-bis(dimethylamino)butane	EF
72	8.836	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	DF
73	8.849	Oxazolidine, 2-butyl-2-ethyl-3-methyl-	WF
74	8.879	2H-Pyran, 3,4-dihydro-2-methoxy-	EP
75	9.156	Sorbic Acid	EF
76	9.371	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	EF
77	9.418	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	EP
78	9.522	Butyrolactone	WF
79	9.53	Benzene, 1-propenyl-	EP
80	9.604	1-Hexanol, 2-ethyl-	EP, EF, DF
81	9.617	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	EF, WF
82	9.898	Methylenecyclopropane	WF
83	9.902	Thiazole, 2,5-dimethyl-	EF
84	9.958	Indene	EP
85	10.225	3-Phenylbut-1-ene	EP
86	10.346	Phenol, 2-methyl-	EP, EF, DF
87	10.51	Acetophenone	EP, EF, WF, DF

88	10.885	Phenol, 4-methyl-	EP, EF, WF, DF
89	10.942	Phenol, 3-methyl-	EF, WF
90	11.002	Hydrouracil, 1-methyl-	WF
91	11.006	Formamide, N,N'-1,3-propanediylbis	EF
92	11.027	2,4,5-Trihydroxypyrimidine	EP
93	11.084	Phenol, 2-methoxy-	EP, EF, WF, DF
94	11.317	N-Hydroxymethylacetamide	WF
95	11.356	Propanoic acid, 2-methyl-, decyl ester	EF
96	11.412	Nonanal	WF
97	11.433	Benzofuran, 7-methyl-	EP
98	11.477	2-Butenediamide, 2-methyl-, (Z)-	EF
99	11.562	Cinnamaldehyde, (E)-	EP
100	11.714	2-Furanmethanol	EF
101	11.739	5-(3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-4-methyl-2,3-dihydrothiophene 1,1-dioxide	EP
102	11.946	Benzene, 1-methyl-2-(2-propenyl)-	EP
103	12.283	Benzene, (2-methyl-2-propenyl)-	EP
104	12.386	Phenol, 2,3-dimethyl-	EP
105	12.512	Benzene, (1-methylene-2-propenyl)-	EF
106	12.52	Naphthalene, 1,2-dihydro-	EP
107	12.603	Triquinacene	EP, EF
108	12.654	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	DF
109	12.663	Tetracyclo[5.3.0.0<2,6>.0<3,10>]deca-4,8-diene	EP, EF
110	12.667	Benzene, 1-butyryl-	EP
111	12.822	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-	EP
112	12.887	1,4-Dihydronaphthalene	EP
113	13.077	Phenol, 4-ethyl-	EF
114	13.081	Phenol, 3-ethyl-	EP
115	13.133	Phenol, 2,4-dimethyl-	EP
116	13.284	Benzeneacetic acid, .alpha.,4-dihydroxy-	EF
117	13.336	Benzenecarboxylic acid	EP, EF, WF
118	13.366	Naphthalene	EP

119	13.486	2-Phenyl-4-penten-2-ol	EP
120	13.521	Ethanol, 1-(2-butoxyethoxy)-	EF
121	13.551	2H-Thiopyran-3(4H)-one	WF
122	13.599	Phenol, 2-methoxy-4-methyl-	EP, EF, WF
123	13.616	2-Methoxy-5-methylphenol	WF
124	13.711	4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl-	EF, WF
125	13.875	Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-	EP
126	13.974	1,2-Benzenediol	EP
127	14.147	Resorcinol	WF
128	14.173	3(2H)-Pyridazinone, 6-methyl-	EF
129	14.341	Catecholborane	EP
130	14.802	(1-Methylenebut-2-enyl)benzene	EP
131	14.876	2-Amino-3-hydroxypyridine	EF
132	15.026	Naphthalene, 1,2-dihydro-3-methyl-	EP
133	15.165	1H-Indene, 1,1-dimethyl-	EP
134	15.273	Naphthalene, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	EP, DF
135	15.286	1,2-Benzenediol, 3-methoxy-	EF, WF
136	15.372	1H-Cyclopropa[b]naphthalene, 1a,2,7,7a-tetrahydro-	EP
137	15.501	1H-Indene, 1-ethenyl-2,3-dihydro-	EP
138	15.618	Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	EP, EF, WF
139	15.704	1H-Inden-1-one, 2,3-dihydro-	EP
140	15.786	Hydroquinone	WF
141	15.95	Naphthalene, 1-methyl-	EP, EF
142	16.032	Benzonitrile, 4-methyl-	EP
143	16.049	1,2-Benzenediol, 4-methyl-	EP, EF, WF
144	16.265	2,4-Diaminophenol	EP
145	16.321	Naphthalene, 2-methyl-	EP
146	16.326	1,4-Methanonaphthalene, 1,4-dihydro-	EF
147	16.33	Benzocycloheptatriene	DF
148	16.416	2-Methoxy-4-vinylphenol	EP, EF, WF, DF
149	16.554	1,2-Benzenedicarboxylic acid	DF
150	16.644	N-(2-Fluoro-phenyl)-2-iodo-benzamide	EP
151	16.964	Methanamine, N-(phenylmethylene)-	EP, EF

152	17.266	Phenol, 2,6-dimethoxy-	EP, EF, WF, DF
153	17.382	Phenol, 2-methoxy-5-(1-propenyl)-,(E)-	EF
154	17.438	Benzylidenemalonaldehyde	EP
155	17.456	3-Phenyl-2-propyn-1-ol	EF
156	17.551	5-Hexen-3-ol, 2,3-dimethyl-	EF
157	17.728	D-Erythro-Pent-1-enitol, 1,5-anhydro-2-deoxy-, cyclic ethylboronate	EF
158	17.827	Biphenyl	EP, EF
159	18.012	2,2'-Bipyridine	EP
160	18.016	Benzene, 1-methyl-4-(phenylmethyl)	WF
161	18.141	1,4-Hexadiene, 2,3,4,5-tetramethyl	EP
162	18.18	1,2,3-Benzenetriol	EP, EF, WF
163	18.379	Naphthalene, 2,7-dimethyl-	EP, DF
164	18.547	1,3-Disilacyclobutane, 1,1,3,3-tetramethyl-	DF
165	18.551	Phenol, 2-[5-(2-furyl)pyrazol-3-yl]-4-methoxy-	EP
166	18.676	Naphthalene, 1,4-dimethyl-	EP
167	18.749	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	EP
168	18.887	Naphthalene, 1,4-bis(bromomethyl)-	EP
169	19.203	Benzeneethanol, 4-hydroxy-	EP, EF, WF
170	19.293	1,2,4-Trimethoxybenzene	DF
171	19.306	Biphenylene	EP
172	19.306	Hydrazine, 1-(3-hydroxybenzyl)-	WF
173	19.341	4-Methoxy-2-methyl-1-(methylthio)benzene	EF
174	19.349	(1H)Imidazole-4-acetonitrile	WF
175	19.414	1,1,6,8-Tetramethyl-1,2-dihydro-naphthalene	EF
176	19.414	Naphthalene, 2,3-dimethyl-	EP
177	19.638	2-Allylphenol	EP
178	19.768	1-Pentadecanol	EP
179	19.772	2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-2-hydroxy-	WF
180	19.798	Phenol, o-(tert-butylthio)-	EF
181	20.035	1-Isopropenylnaphthalene	EP
182	20.117	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-2,2,5,7-tetramethyl-	EP, EF, DF
183	20.19	Ethanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	EP
184	20.251	1,2,4-Benzenetriol	EF

185	20.281	L-Mannose, 6-deoxy-	EP
186	20.325	Benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-, methyl ester	EF
187	20.475	1,6-Anhydro-.beta.-D-glucopyranose(levoglucosan)	EP, EF, WF
188	20.514	D-Allose	EP, EF, WF
189	20.549	Acetamide, N-(4-hydroxycyclohexyl)-, cis-	EF
190	20.579	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	DF
191	20.699	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,4,6-trimethyl-	EP
192	20.79	1-Allyloxy-1-ethyl-1-silacyclohexane	EP
193	20.795	Ethyl .beta.-d-riboside	EF
194	20.829	Heptanoic acid	EF
195	20.911	Benzene, 1,1'-ethylidenebis-	EP
196	20.929	Phenol, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-	EF
197	21.071	Benzeneacetic acid, 4-hydroxy-3-methoxy-	EP, WF
198	21.113	5-Benzocyclooctenol, 5,6,7,8-tetrahydro-8,8-dimethyl-	EP
199	21.127	2(1H)-Quinazolinone	EF
200	21.243	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,5,8-tri methyl-	EF
201	21.282	Azulene, 4,6,8-trimethyl-	EP
202	21.412	2-Naphthyl methyl ketone	EF
203	21.575	Naphthalene, 1,6,7-trimethyl-	EP, EF, WF, DF
204	21.58	Naphthalene, 2,3,6-trimethyl-	DF
205	21.679	(E)-Stilbene	DF
206	21.683	(3,3-Dimethyl-5-methylthio-3,4(2H)-dihydropyrrol-2-ylidene)acetonitrile	EP, WF
207	21.696	2,3,5,6-Tetrafluoroanisole	EF
208	21.899	Benzaldehyde, 4,6-dihydroxy-2,3-dimethyl-	EF
209	21.989	Fluorene	EP
210	22.029	3-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid	EF
211	22.085	Naphthalene, 1,4,5-trimethyl-	EP, EF
212	22.223	1-Propanone, 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	EP, EF
213	22.403	Phenanthrene, 1,2,3,3a-tetrahydro-cyclopenta[def]-	EP
214	22.417	2',4'-Dihydroxyacetophenone oxime	EF
215	22.46	1,4,5,8-Tetramethylnaphthalene	EP
216	22.68	Phenol, 3,4,5-trimethoxy-	EP, EF

217	22.913	Benzophenone	EP, EF, WF, DF
218	23.042	Ethanone, 1-(2,2-dimethylcyclopentyl)-	WF
219	23.09	Propanoic acid, 2-methyl-,nonyl ester	WF
220	23.331	Phenol, 4-(ethoxymethyl)-2-methoxy	EP, WF
221	23.366	Phenol, 2-methoxy-4-(methoxymethyl)-	EF
222	23.487	Mephenesin	EF
223	23.56	3-(2-Methyl-propenyl)-1H-indene	EP
224	23.564	1'-Acetonaphthone	WF
225	23.59	2,4,6,(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-acetyl-	EF, WF
226	23.676	Naphthalene, 1,4,6-trimethyl-	WF
227	23.68	6-Methoxy-9-thia-bicyclo[3.3.1]non-2-ene	EP
228	23.974	D-glycero-D-gulo-Heptonic acid, .delta.-lactone	DF
229	23.978	Phenylthiotrimethylsilane	EP
230	23.983	Cyclododecane, ethyl-	WF
231	23.987	2-Propenoic acid, pentadecyl ester	EF
232	24.255	Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)-	EP, EF
233	24.323	[1,1'-Biphenyl]-4-methanol	DF
234	24.324	Azulene, 7-ethyl-1,4-dimethyl-	EP, EF
235	24.349	Benzoic acid, 2-ethylhexyl ester	EP
236	24.496	2,2'-Dimethylbiphenyl	EF
237	24.798	2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-ethyl-1,3-dimethyl-	EF
238	24.923	Ethanone, 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-	EP, EF
239	24.971	3,4-Dimethoxy-6-methylpyrocatechol	EF
240	25.242	Tetradecanoic acid	EP, EF, WF
241	25.523	2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 6-phenyl-	EF
242	25.549	2-Pentanone, 1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)	EP, WF
243	25.57	Benzenepropanol, .beta.-phenyl-	EF
244	25.63	Phenanthrene	EP
245	25.833	Benzenamine, 4-isothiocyanato-N,N-dimethyl-	EF
246	26.377	Isoquinoline, 1-butyl-	EF
247	26.381	1-Methyl-4-phenyl-3,4-dihydroisoquinoline	EP
248	26.463	9H-Carbazole, 2-methyl-	EP
249	26.472	4(1H)-Quinolinone, 7-chloro-2,3-dihydro-	WF

250	26.558	Benzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	EF
251	26.925	Pentadecanoic acid	EP, WF
252	26.938	1,1'-Biphenyl, 2,3'-dimethyl-	EF
253	27.132	s-Triazine, 2,4-diamino-6-(o-aminophenyl)-	EF
254	27.227	6-Tridecene, (Z)-	WF
255	27.231	Cyclotetradecane	EP, EF
256	27.36	3-Ethoxy-2-nitro-phenol	EP
257	27.365	Acetamide, N-(4-hydroxyphenyl)-	WF
258	27.378	1-Chloro-1-ethyl-3-methyl-1-germacyclopent-3-ene	EF
259	27.624	Diphenylmethane	EP, WF
260	27.986	Hexadecanoic acid, methyl ester	EF
261	28.257	4,6-Dimethyl-2-propylsulfanyl-nicotinamide	EP
262	28.659	n-Hexadecanoic acid	EP, EF, WF, DF
263	30.139	Benzene, 1-methyl-3-(phenylmethyl)	EF
264	30.458	Cyclopentadecane	WF
265	30.462	1-Nonadecene	EP, EF
266	30.644	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	EF
267	30.734	11-Octadecenoic acid, methyl ester	EF
268	30.864	3-(6-Phenyl-1,3,5-hexatrienyl)pyra zole	EF
269	31.118	Octadecanoic acid, methyl ester	EF
270	31.179	Tricyclo[4.4.1.0(2,5)]undeca-1(10) ,3,6,8-tetraene, 11-(1-methylethylidene)-	EF
271	31.234	2(1H)-Quinolinone, 4-phenyl-	EP
272	31.235	4-Cyclopropylnorcarane	EP
273	31.299	9-Octadecenoic acid, (E)-	EP, DF
274	31.317	14-Pentadecenoic acid	EF
275	31.541	Bi-1,3,5-cycloheptatrien-1-yl	EF
276	31.7	Octadecanoic acid	EP, EF, DF, WF
277	32.084	1H-Benzotriazole, 1-[(m-chlorobenzylidene)amino]-	DF
278	32.115	Ethyl 4-[4-fluorophenyl]-2,4-dioxo butyrate	EF
279	32.145	2(5H)-Furanone, 4-methyl-5,5-bis(2-methyl-2-propenyl)-	DF
280	32.162	Docosane	EP, EF, WF

281	32.568	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene, 4-iodo-	EF
282	32.917	3,4-2H-Isocoumarin-3-one, 4,4,5,6, 7-pentamethyl-	EF
283	33.568	Nonadecane, 2-methyl-	EP
284	33.586	Octadecane	EP, WF
285	33.754	9,10-Anthracenedione, 1,2,5,8-tetrahydroxy-	EF
286	33.823	Menthyl salicylate	DF
287	33.831	6-Hexadecenoic acid, 7-methyl,methyl ester (Z)	EP
288	33.996	.delta.5-Androsten-3,17-dione	EF
289	34.168	6-Amino-2,4-dimethylphenol	EF
290	34.233	13-Hexyloxacyclotridecan-2-one	DF
291	34.272	1,2-Benzisothiazole, 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide	EF
292	35.027	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	EF,WF, DF
293	35.19	1,4-Methanonaphthalen-9-ol, 1,2,3,4-tetrahydro-, acetate, stereoisomer	EF
294	35.337	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	EF
295	35.756	Octadecane, 1-chloro-	EF, WF
296	37.244	Silane, dimethoxymethylphenyl-	EP, EF
297	37.55	Hexacosane	EP, EF, WF
298	38.271	Tetracosane	EP, WF
299	38.318	4-Methoxy-4',5'-methylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid	EF, WF, DF
300	38.331	10,11-Dihydro-10-hydroxy-2,3-dimethoxydibenz(b,f)oxepin	WF
301	38.396	Benzene, 1-(1-buten-3-yl)-4-decyl-	EF
302	38.547	4H-Naphtho[2,3-b]pyran-4-one, 5,6-dihydroxy-8-methoxy-2-methyl-	EF
303	38.78	Heptacosane	EF, WF
304	38.987	Eicosane	EP, EF
305	39.017	Heptadecane	EF, DF
306	39.448	Octadecane, 1-iodo-	WF
307	39.466	Docosane, 11-butyl-	EF
308	39.768	Cyclohexane, 2-butyl-1,1,3-trimethyl-	EF
309	39.893	Heneicosane	WF
310	39.957	Octacosane	EF, WF
311	40.225	1-Chloroeicosane	EF
312	40.281	Pyridine-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)-	EF

313	40.561	Hexacosane, 13-dodecyl-	EF
314	40.596	Nonadecane	WF
315	40.613	Tricosane, 2-methyl-	EF
316	40.738	Pentacosane	EP, EF
317	40.937	1-Hexacosene	EF
318	41.023	Nonadecane, 9-methyl-	WF
319	41.092	Nonacosane	EF
320	41.113	Nonadecane, 1-chloro-	WF
321	41.191	2H-Isoindole, 4,5,6,7-tetramethyl-	EF
322	41.303	Dodecane, 1,1'-oxybis-	EF
323	41.346	Benzaldehyde, 2,4-dihydroxy-	DF
324	41.446	Cadina-1(10),6,8-triene	EF
325	41.7	Benzamide, N-(4-chlorodifluoromethoxyphenyl)-4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butynyl)-	EF
326	41.761	Tricosane	WF
327	41.899	Hexacosane, 9-octyl-	EF
328	42.166	.beta.-Vatirenene	EF
329	42.27	Hexadecane, 1-iodo-	EF
330	42.438	N-(4-Acetyl-phenyl)-2-(2-thiazol-5-yl-benzoimidazol-1-yl)-acetamide	EF
331	42.68	N-(2,2-Diphenylethyl)-2,2-dimethylpropionamide	EF
332	42.964	4-Methoxy-2-octadecylphenol	EF
333	43.253	Benz[3,4]anthra[2,1,9,8-opqra]naphthacene	EF
334	43.348	1H-Pyrrole-2,5-dione, 1,1'-(methylenedi-4,1-phenylene)bis-	EF
335	43.71	4-Dehydroxy-N-(4,5-methylenedioxy-2-nitrobenzylidene)tyramine	DF
336	43.741	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	EF, WF
337	44.172	Ethyl 4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 3-methylenamine, N-oxide	EF
338	44.224	Methoxyacetic acid, heptadecyl ester	EF
339	44.34	cis-Inositol tri-methylboronate	EF
340	44.358	5-Acetamido-4,7-dioxo-4,7-dihydrobenzofurazan	EF
341	45.51	Cyclohexane, (1-methylpropyl)-	EF
342	45.924	4-Allyl-5-furan-2-yl-2,4-dihydro-[1,2,4]triazole-3-thione	EF
343	46.489	Heneicosane, 3-methyl-	EF

344	46.73	Benz[b]-1,4-oxazepine-4(5H)-thione, 2,3-dihydro-2,8-dimethyl-	EF
345	47.399	Stigmastan-3,5,22-trien	EF
346	47.826	1H-Indole, 1-methyl-2-phenyl-	DF
347	47.869	Purine-2,6-dione, 8-(3-ethoxypropylamino)-1,3-dimethyl-3,9-dihydro-	EF
348	47.947	Benzene, 1-(1-formylethyl)-4-(1-buten-3-yl)-	EF
349	49.211	Oxazole, 2,2'-(1,4-phenylene)bis[4-methyl-5-phenyl-	EF
350	49.724	Octadecane, 9-ethyl-9-heptyl-	WF
351	49.746	Silane, trimethyl[5-methyl-2-(1-methylethyl)phenoxy]-	EF

Donde EP: extracto purificado de *Q. crassifolia*, WF: fracción acuosa, EF: fracción de acetato de etilo y DF: fracción de diclorometano.

8.3.5. UV de Fluorescencia

Como se describió anteriormente, los compuestos polifenólicos se encuentran en una alta concentración en la corteza de *Q. crassifolia*, pudiéndose determinar la presencia de flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas. Además, el género *Quercus* se caracteriza por la presencia de taninos hidrolizables. Dentro de estos grupos de compuestos fenólicos podemos encontrar fenoles simples, sistemas conjugados pequeños, así como estructuras policondensadas (taninos poliméricos). Diferentes conformeros con diferentes ángulos diedros entre los anillos aromáticos caracterizan los dímeros de fenol, oligómeros y estructuras poliméricas (García-Pérez *et al.*, 2018).

En la Figura 20, podemos observar el espectro de UV de fluorescencia, en el cual se aprecia que la fracción de acetato de etilo concentra una mayor cantidad de compuestos monoméricos, seguida por la fracción de diclorometano, y por último la fracción acuosa. En cuanto a compuestos diméricos y conjugados de cadena corta se muestra que la fracción de diclorometano presenta una mayor concentración. Mientras que la mayor cantidad de compuestos poliméricos, se obtiene en la fracción de acetato de etilo, seguida por la fracción de diclorometano, lo cual indica que en el extracto purificado de corteza de encino, se encuentran presentes un amplio espectro de moléculas consideradas como polifenoles, que pueden ir desde estructuras simples hasta complejas, sin embargo, la mayor concentración de estos compuestos pertenecen a fenoles monoméricos, seguida por estructuras policondensadas (Del Rio *et al.*, 2013).

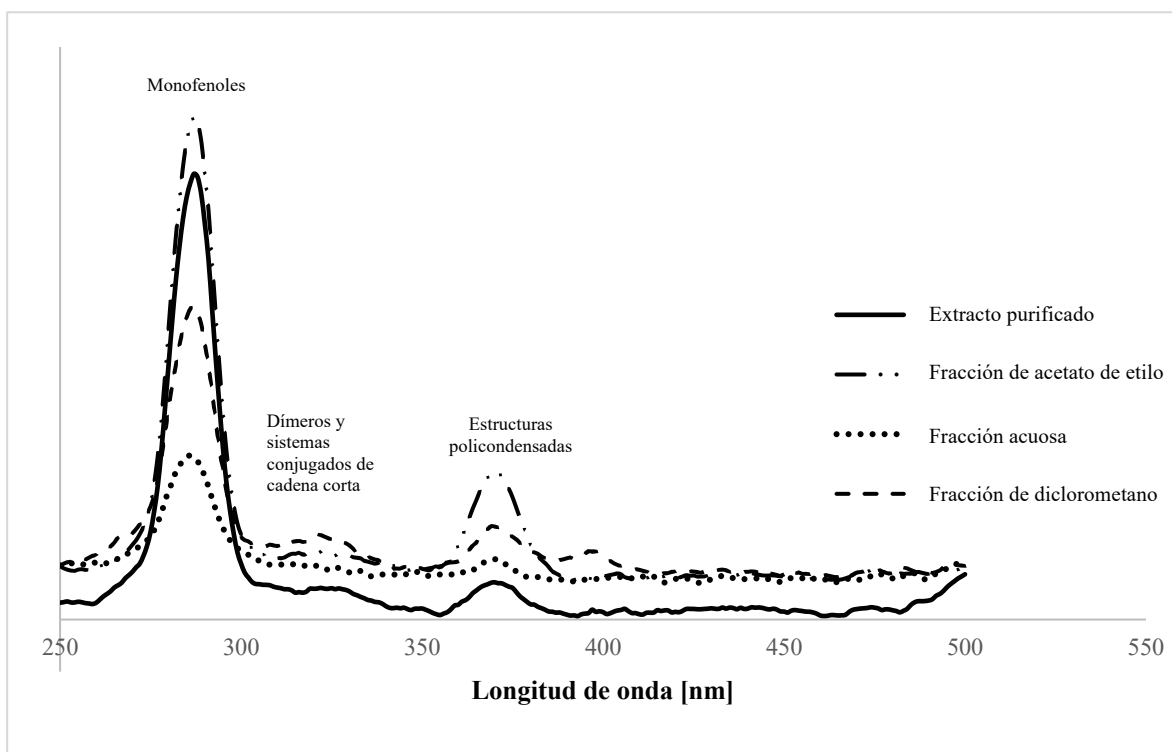


Figura 20. Espectro de Fluorescencia del extracto purificado de corteza de *Q. crassifolia*

8.4. Prueba de toxicidad oral aguda

8.4.1. Registro de alimento consumido y pesos de las ratas

Algunos parámetros críticos para la evaluación toxicológica son los cambios en el peso corporal, el comportamiento y la ingesta de alimentos (Gad, 2007). En la Figura 21 se observan los pesos corporales de las ratas Wistar al iniciar el periodo de prueba y cada 7 días. Todos los grupos siguieron la misma tendencia de aumento de peso corporal en el tiempo. No se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación al grupo control y los grupos a los cuales se les administró el extracto de encino.

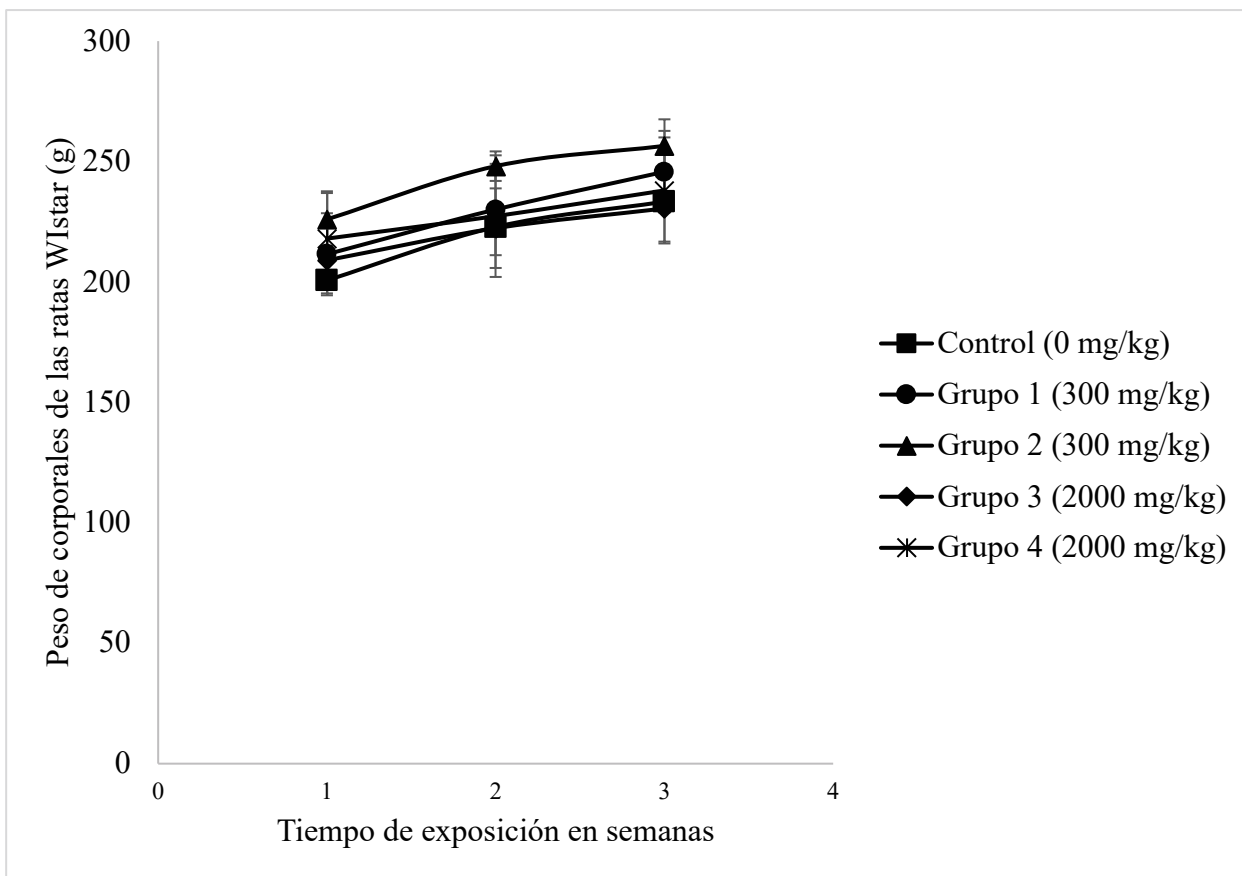


Figura 21. Pesos corporales de ratas Wistar (hembras y machos) durante prueba de toxicidad oral a dosis repetida con el extracto purificado de *Q. crassifolia*. Los valores son expresados como media \pm desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

En la Figura 22 se muestra la cantidad de alimento consumido por las ratas del grupo control y de los grupos de prueba G1, G2, G3 y G4. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación al grupo control y los grupos a los cuales se les administró el extracto de encino.

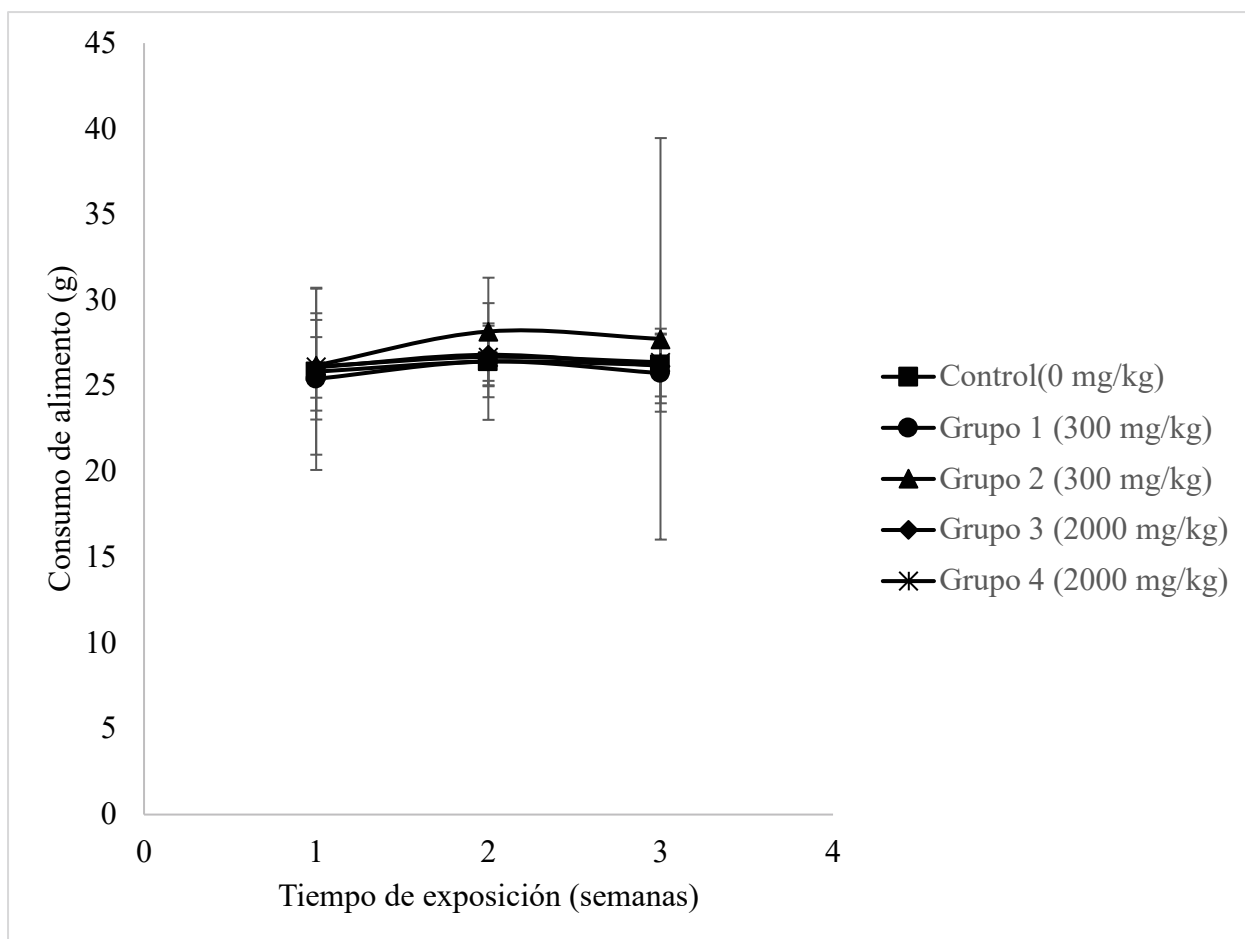


Figura 22. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad oral aguda. Media \pm Desviación estándar. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

8.4.2. Registro de signos de toxicidad

No se registraron muertes ni signos de toxicidad en el grupo control ni en los grupos a los que se les administró el extracto de *Q. crassifolia* en las diferentes dosis.

8.4.3. Necropsia

Se realizó la observación macroscópica de las ratas del grupo control, del grupo G1, G2, G3 y G4, no hubo alteraciones perceptibles en la posición, aspecto y/o morfología de los tejidos de las ratas de los grupos observados.

A. Pesos de los órganos de las ratas Wistar

En la Tabla 17 se observan los pesos de los tejidos y las longitudes de los intestinos grueso y delgado de las ratas tanto del grupo control, como de los grupos de prueba. No se registraron diferencias significativas significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y los grupos G1, G2, G3 y G4.

Tabla 17. Medidas de los órganos de las ratas.

Órgano	Control	G1 (300 mg/kg)	G2 (300 mg/kg)	G3 (2000 mg/kg)	G4 (2000 mg/kg)
Bazo (g)	0.63±0.11	0.58±0.06	0.68±0.15	0.57±0.06	0.64±0.03
Corazón (g)	0.86±0.07	0.88±0.09	0.96±0.04	0.84±0.06	0.97±0.13
Encéfalo (g)	1.81±0.07	1.83±0.02	1.80±0.17	1.81±0.02	1.79±0.14
Estómago (g)	1.57±0.13	1.61±0.15	1.52±0.26	1.49±0.07	1.63±0.26
Suprarrenal derecha (g)	0.07±0.019	0.04±0.02	0.05±0.01	0.05±0.02	0.06±0.01
Suprarrenal izquierda (g)	0.05±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01
Hígado (g)	9.72±1.18	8.81±0.53	9.04±0.64	7.67±0.04	8.68±1.12
Intestino delgado (cm)	124.17±4.25	121.33±8.14	118.83±1.04	117.67±1.53	114.67±8.33
grueso (cm)	23.33±2.08	22.00±3.88	21.33±1.53	21.33±3.21	21.83±2.00
Ovario derecho (g)	0.10±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.02	0.11±0.02
izquierdo (g)	0.09±0.05	0.35±0.46	0.11±0.01	0.10±0.02	0.10±0.02
Páncreas (g)	0.27±0.15	0.27±0.17	0.58±0.16	0.45±0.20	0.47±0.05

Pulmón					
derecho (g)	0.74±0.13	0.79±0.22	1.06±0.07	0.85±0.08	0.93±0.16
izquierdo (g)	0.49±0.10	0.57±0.12	0.51±0.07	0.47±0.05	0.42±0.05
Riñón					
derecho (g)	0.96±0.13	0.89±0.09	1.03±0.14	0.95±0.06	0.99±0.03
izquierdo (g)	0.94±0.15	0.90±0.14	1.01±0.05	0.94±0.05	0.95±0.05
Tiroides (g)					
	0.23±0.17	0.42±0.09	0.45±0.05	0.45±0.17	0.40±0.03
Útero (g)					
	0.21±0.09	0.23±0.05	0.15±0.01	0.15±0.02	0.19±0.07

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05.*Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05).*

En la Tabla 18 se muestran los pesos relativos de los tejidos en relación al peso total de la rata observada. No se muestran diferencias significativas (p<0.05) al comparar el grupo control y los grupos a los que se les administró el extracto.

Tabla 18. Pesos relativos de los órganos de las ratas (%).

Órgano	Control	G1 (300 mg/kg)	G2 (300 mg/kg)	G3 (2000 mg/kg)	G4 (2000 mg/kg)
Bazo (%)	0.27±0.04	0.24±0.03	0.27±0.06	0.25±0.02	0.28±0.02
Corazón (%)	0.37±0.02	0.36±0.01	0.39±0.01	0.37±0.01	0.42±0.04
Encéfalo (%)	0.78±0.06	0.75±0.06	0.72±0.08	0.80±0.04	0.77±0.03
Estómago (%)	0.67±0.06	0.66±0.02	0.61±0.09	0.65±0.02	0.70±0.05
Suprarrenal					
derecha (%)					

	0.03±0.01	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01
izquierda (%)	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01
Hígado (%)	4.16±0.33	3.61±0.08	3.62±0.19	3.36±0.21	3.74±0.25
Ovario					
derecho (%)	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
izquierdo (%)	0.04±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
Páncreas (%)	0.11±0.06	0.12±0.08	0.23±0.06	0.19±0.08	0.20±0.01
Pulmón					
derecho (%)	0.32±0.06	0.32±0.10	0.42±0.03	0.37±0.01	0.40±0.07
izquierdo (%)	0.21±0.05	0.23±0.05	0.20±0.03	0.21±0.03	0.18±0.01
Riñón					
derecho (%)	0.41±0.03	0.36±0.02	0.41±0.05	0.41±0.05	0.43±0.03
izquierdo (%)	0.40±0.04	0.37±0.03	0.41±0.01	0.41±0.04	0.41±0.02
Tiroides (%)	0.10±0.07	0.17±0.03	0.19±0.02	0.19±0.06	0.17±0.01
Útero (%)	0.09±0.04	0.09±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.08±0.02

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

8.4.4. Análisis hematológico y bioquímico

La Tabla 19 muestra los resultados correspondientes a la biometría hemática completa de los grupos control y experimentales (300 mg/kg y a 2000 mg/kg). Se observó para los grupos a los cuales se les administró una concentración de 2000 mg/kg, un aumento significativo ($p < 0.05$) en la Concentración de hemoglobina corpuscular media, así como una disminución significativa en la Amplitud de distribución de glóbulos rojos (%) en comparación con el grupo control, sin

embargo, todos los valores se encuentran dentro de los límites permitidos (Giknis & Clifford, 2008; Arcila-Quinceno *et al.*, 2009), mientras que en los parámetros restantes no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) estadísticamente.

Tabla 19. *Biometría hemática completa de los grupos de ratas control y de prueba.*

Parámetro	Concentración de extracto administrado (mg/kg)		
	Control	300	2000
Leucocitos totales ($10^3/\mu\text{L}$)	2.63±1.50	2.75±1.47	2.37±1.04
Linfocitos (%)	2012.67±1234	1812.83±672	1753.33±848
Bandas (%)	0	0	0
Segmentados (%)	466.00±193	451.17± 223	428.33±136
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	154.67± 96	132.00± 90	155.33± 68
Eosinófilos (%)	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0
Glóbulos rojos ($10^6/\mu\text{L}$)	8.13 ± 0.14	8.28 ± 0.32	7.75 ± 0.61
Hemoglobina (g/dl)	15.63 ± 0.25	16.18 ± 0.69	15.53 ± 0.91
Hematocrito (%)	46.30± 0.10	47.42± 1.48	42.93± 3.15
Volumen corpuscular medio (fL)	57.03± 0.85	57.40± 1.32	55.48± 1.15
Volumen corpuscular medio de la hemoglobina (pg)	19.20 ± 0.36	19.517 ± 0.79	20.017 ± 0.99
Concentración hemoglobina corpuscular media (g/dl)	33.70± 0.50	34.08± 1.10	36.17± 1.54*
Amplitud de distribución de glóbulos rojos (%)	14.20±0.37	13.90± 0.67	12.77± 0.86*

Conteo de plaquetas (10 ³ /μL)	655.33± 83	518.83± 231	620.17± 239
Volumen corpuscular medio de las plaquetas (fL)	11.97± 0.06	10.90± 1.32	11.43± 0.46
Ancho de distribución de las plaquetas (%)	20.57± 0.21	19.33± 1.91	20.22± 0.60
Procalcitonina (%)	0.23± 0.39	0.21± 0.29	0.23± 0.29

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05).*

La Tabla 20 muestra los resultados correspondientes a la realización de pruebas bioquímicas para los grupos control y experimental. En ésta se encontró una disminución significativa (p<0.05) en la concentración de creatinina en la sangre para los grupos de prueba a los cuales se les administró el extracto de encino a una concentración de 2000 mg/kg, comparados con el grupo control. Aunque, no se han establecido las causas claras de la disminución de creatinina, este efecto pudiera ser consecuencia de una disminución de la masa muscular en el grupo que recibió la dosis más alta del extracto de encino. Lo cual pudiera estar relacionado con la capacidad de los taninos de quelar proteínas exógenas, impidiendo su asimilación (Makkar, 2003).

Tabla 20. *Química sanguínea de los grupos de ratas control y de prueba.*

Parámetro	Concentración de extracto administrado (mg/kg)		
	Control	300	2000
Glucosa (mg/dl)	148.47 ± 31.77	148.05 ± 31.21	134.95 ± 16.15
Urea (mg/dl)	38.17 ± 5.80	50.27 ± 6.37	50.75 ± 9.03
Bilirrubina (mg/dl)	17.67 ± 2.50	23.43 ± 2.99	23.67 ± 4.23
Creatinina (mg/dl)	0.75 ± 0.08	0.89 ± 0.10	0.50 ± 0.13*

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05).*

La Tabla 21 muestra el perfil hepático de los grupos control y experimentales. No se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los parámetros analizados entre los grupos de prueba y el control, excepto en los valores de la concentración de fosfatasa alcalina, estos se muestran disminuidos en los grupos a los que se les administró el extracto de encino a una concentración de 2000 mg/kg, en comparación al grupo control.

Tabla 21. Perfil hepático de los grupos de ratas control y de prueba.

Parámetro	Concentración de extracto administrado (mg/kg)		
	Control	300	2000
Bilirrubina total (mg/dl)	0.33 ± 0.03	0.69 ± 0.36	0.59 ± 0.09
Bilirrubina indirecta (mg/dl)	0.23 ± 0.03	0.43 ± 0.20	0.33 ± 0.05
Bilirrubina directa (mg/dl)	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.17	0.26 ± 0.09
Aspartato amino transferasa	166.03 ± 68.41	213.47 ± 48.08	152.17 ± 82.30
Alanina aminotransferasa	58.37 ± 16.81	68.58 ± 20.71	50.47 ± 35.02
Fosfatasa alcalina	117.93 ± 18.74	94.57 ± 17.73	83.40 ± 15.17*
Gama glutamil transpeptidasa	10.80 ± 1.39	9.92 ± 2.57	9.35 ± 1.64

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

La fosfatasa alcalina, es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Los niveles bajos de fosfatasa alcalina, pueden deberse a indicios de daño hepático o desnutrición debida a deficiencias de proteínas, lo cual concuerda con los resultados encontrados en la química sanguínea y que pudieran corresponder a la baja disponibilidad proteica debida a la acción quelante de los compuestos fenólicos, lo cual ha sido reportado como un efecto de los taninos a altas concentraciones, presentando en los animales a los que les fueron administrados un decremento en la ingesta de alimento, en el crecimiento, en la eficiencia del alimento, en la energía metabólica neta, así como la digestibilidad de proteínas (Bravo, 1998), debido a la capacidad de los taninos de formar complejos y reducir la digestibilidad de las proteínas, además del decremento en la eficiencia o incluso inhibición de las enzimas digestivas en la absorción de nutrientes y su eficiencia en la

conversión de estos a nuevas sustancias (Niho *et al.*, 2001; Bentivegna & Whitney, 2002; Mennen *et al.*, 2005).

8.4.5. Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico que se llevó a cabo, no se encontraron alteraciones microscópicas atribuibles al extracto de *Quercus crassifolia* purificado en los tejidos de corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, glándula adrenal, intestino grueso e intestino delgado, útero, tiroides, estómago y ovarios. Mientras que en el riñón, órgano por excelencia encargado de la eliminación de xenobióticos del organismo, se encontró que la administración del extracto a una concentración de 300 mg/kg presentó un engrosamiento moderado de las membranas basales glomerulares (Figura 23). Mientras que para los grupos de ratas a los cuales se les administró el extracto a una concentración de 2000 mg/kg se observó daño microscópico atribuible a la administración del extracto. En síntesis, estos resultados indican la presencia de daño renal, caracterizado por un engrosamiento tanto moderado como intenso de las membranas basales glomerulares, así como aumento del espacio de Bowman (A) que se presenta en forma dosis-dependiente a consecuencia de la administración oral del extracto purificado de *Q. crassifolia*.

A nivel encefálico también se presentaron alteraciones histopatológicas (Figura 24). De hecho, al comparar al grupo control con los grupos de prueba a los que se les administró el extracto de encino, se apreciaron daños microscópicos. En el encéfalo de los grupos a los que se les administró el extracto a concentraciones de 300 mg/kg se observó la presencia escasa de astrocitos reactivos con citoplasma condensado eosinófilo, así como gliosis de escasa a moderada, lo cual se intensifica para los grupos a los que se les administró el extracto a concentraciones de 2000 mg/kg notando la presencia intensa de astrocitos reactivos con citoplasma condensado eosinófilo además de gliosis intensa.

Como se ha mencionado anteriormente, se han encontrado relativamente pocos reportes científicos de toxicidad oral de encino, entre la que se destaca el realizado por Pérez *et al.* (2011), quienes evaluaron los efectos tóxicos de hojas jóvenes de *Quercus pyrenaica* en ganado de pastoreo, reportando daño renal atribuido a la presencia de taninos hidrolizables. Sin embargo, los mecanismos precisos que favorecen el desarrollo de la toxicidad aún son objeto de investigación.

Niho *et al.* (2001), reportaron presencia de daño en hígado y riñón, al administrar concentraciones altas de ácido gálico, que puede ser obtenido por la hidrólisis de galotaninos a partir de semillas de *Quercus infectoria* Oliv. y *Quercus stenophylla*.

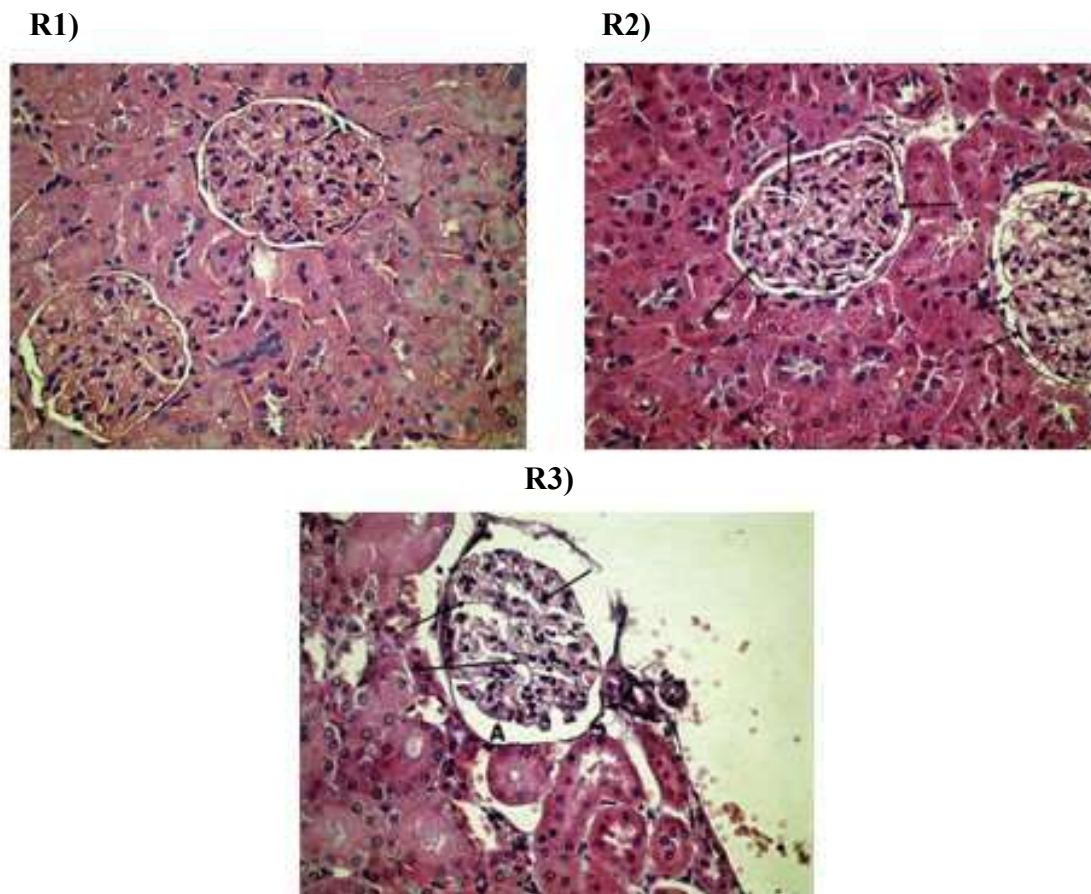


Figura 23. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de *Q. crassifolia*. R1) Grupo control; R2) Grupo al que se le administraron 300 mg/kg; R3) Grupo al que se le administraron 2000 mg/kg. Las flechas indican engrosamiento tanto moderado (300 mg/kg) como intenso (2000 mg/kg) de las membranas basales glomerulares, así como aumento del espacio de Bowman (A).

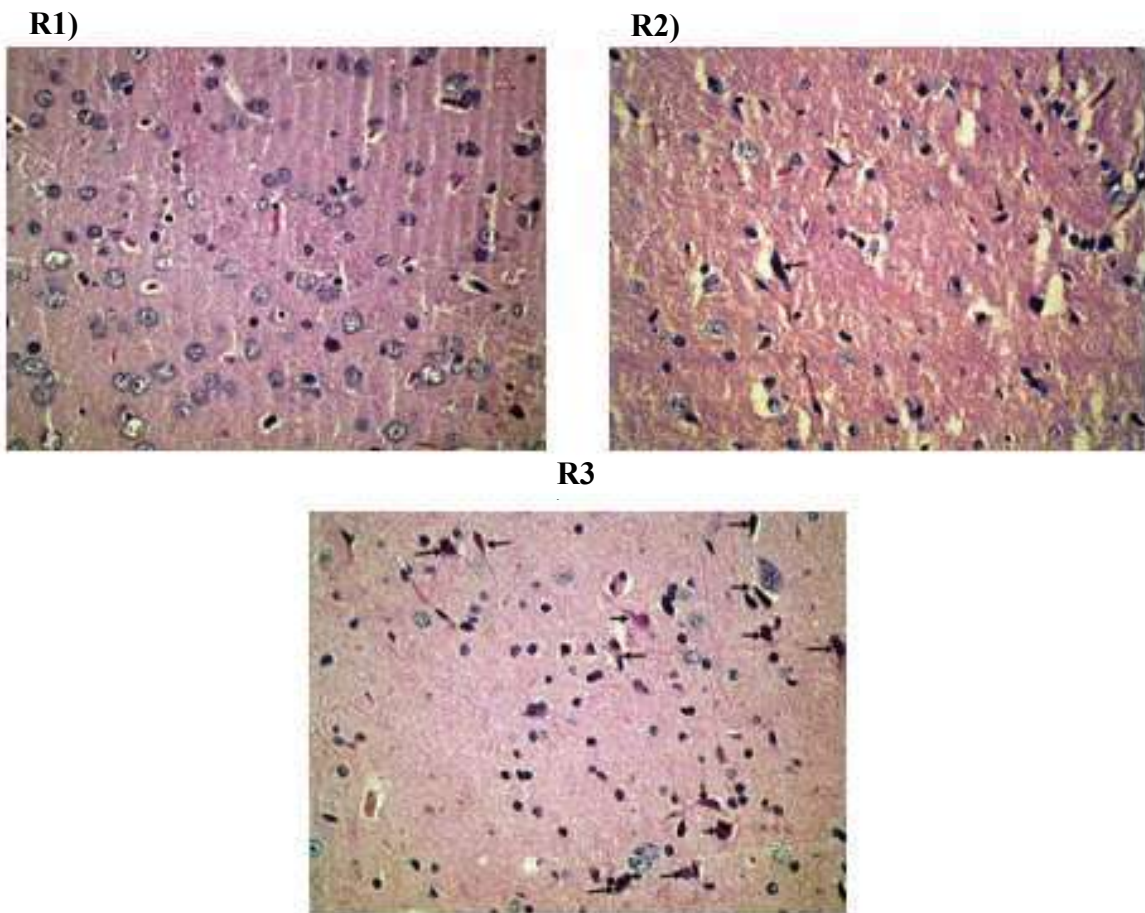


Figura 24. Análisis histopatológico a nivel encéfalo después de la administración oral del extracto purificado de *Q. crassifolia*. R1) Grupo control; R2) Grupo al que se le administraron 300 mg/kg; R3) Grupo al que se le administraron 2000 mg/kg. Las flechas indican la presencia de astrocitos con citoplasma condensado eosinófilo, así como gliosis escasa a moderada (300 mg/kg) como intensa (2000 mg/kg).

8.5. Prueba de toxicidad a dosis repetida

8.5.1. Registro de alimento consumido y pesos de las ratas

En la Figura 25 se pueden observar los pesos corporales de las ratas Wistar machos y hembras al iniciar el periodo de prueba y cada 7 días hasta el final del experimento. Todos los grupos siguieron la misma tendencia de aumento de peso corporal en función del tiempo. No se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación al grupo control tanto en hembras como en machos y los grupos a los cuales se les administró el extracto de encino.

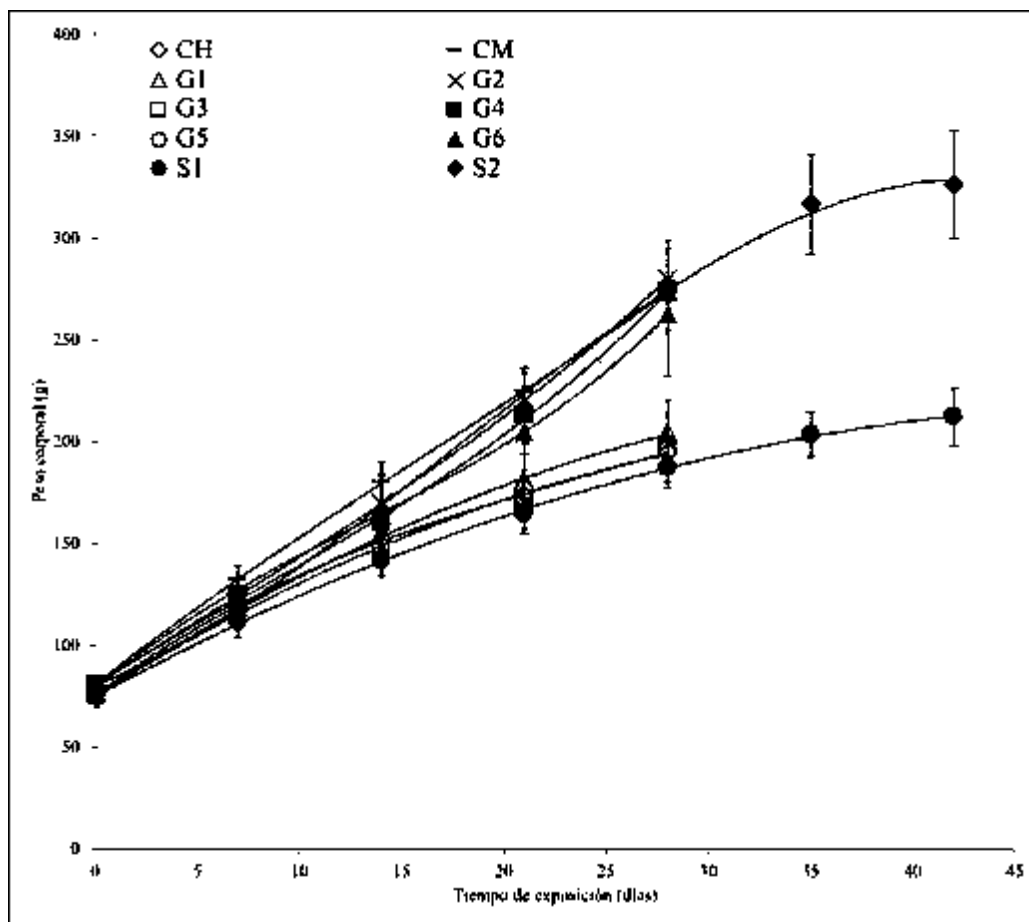


Figura 25. Pesos corporales de ratas Wistar (hembras y machos) durante prueba de toxicidad oral a dosis repetida con el extracto purificado de *Q. crassifolia*. Los valores son expresados como media \pm desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

En la Figura 26 se muestra la cantidad de alimento promedio consumido por las ratas de los grupo control de hembras y machos y de los grupos de prueba G1, G2, G3, G4, G5, G6, S1 y S2. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos control y los grupos a los cuales se les administró el extracto de encino.

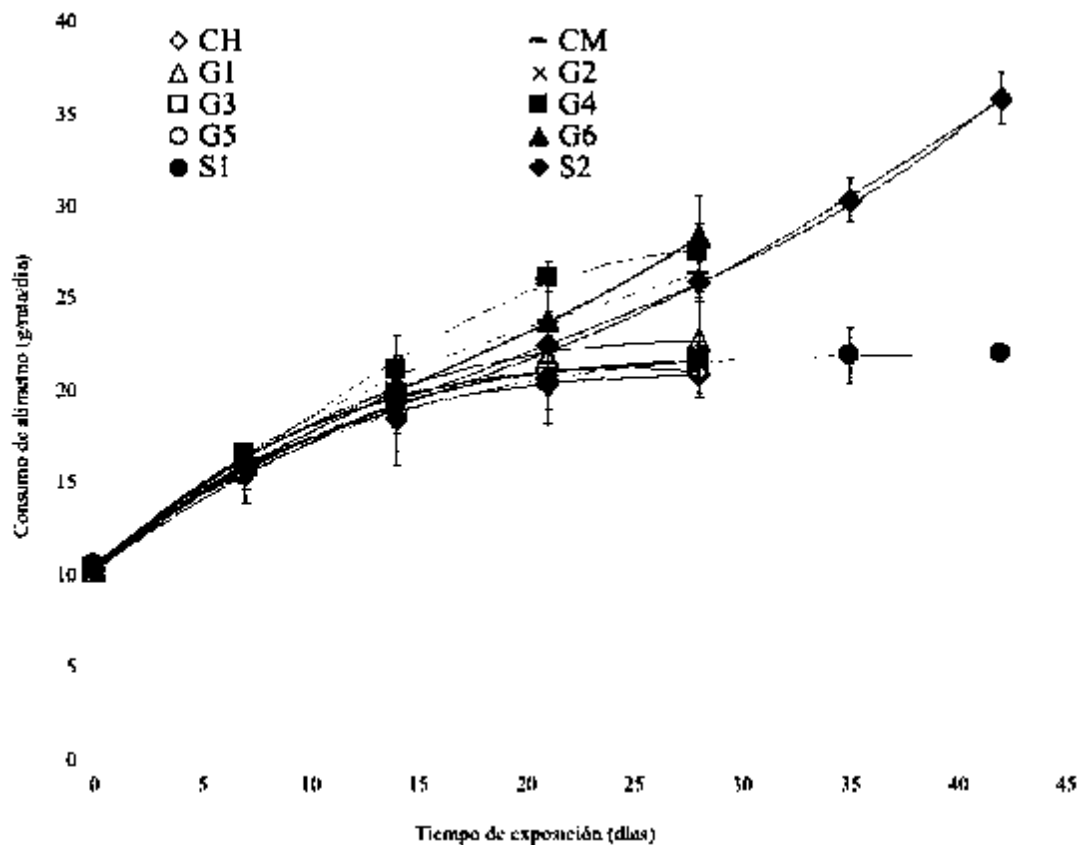


Figura 26. Cantidad de alimento consumido (g) por las ratas Wistar durante la exposición a dosis repetida del extracto purificado de *Q. crassifolia*. Los valores son expresados como media \pm desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

8.5.2. Signos de toxicidad

En la Tabla 22 se observan los grupos control y los grupos a los que se les administraron diferentes dosis de extracto de *Q. crassifolia* purificado. Durante el período experimental no se registraron muertes ni signos de toxicidad evidentes de los grupos administrados con el extracto ni en los grupos control.

Tabla 22. Registro de signos de toxicidad.

Grupo	Dosis mg/kg	M/T	Signos de toxicidad
CH	0	0/5	Ninguno
CM	0	0/5	Ninguno
G1	100	0/5	Ninguno

G2	100	0/5	Ninguno
G3	33.33	0/5	Ninguno
G4	33.33	0/5	Ninguno
G5	11.11	0/5	Ninguno
G6	11.11	0/5	Ninguno
S1	100.00	0/5	Ninguno
S2	100.00	0/5	Ninguno

Donde M/T: muertes/total de ratas vivas.

8.5.3. Necropsia

Se realizó la observación macroscópica de las ratas de los grupos control, G1, G2, G3, G4, G5, G6, S1 y S2. La administración oral repetida del extracto de encino no afectó las características macroscópicas de los órganos relacionados con su posición, color, aspecto y morfología.

En las Tabla 23 y 24 se muestran los pesos relativos de los órganos de los grupos control, experimental y satélite. Para las hembras, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimental, satélite y control con respecto a los pesos relativos de los órganos analizados. El peso relativo del hígado de los machos administrados con 11 mg/kg de peso corporal/día de extracto de *Q. crassifolia* purificado mostró una disminución significativa ($p < 0.05$). Asimismo, se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) con respecto al control en el peso de la glándula suprarrenal derecha en los machos del grupo administrado con 100 mg/kg de peso corporal/día de extracto. Sin embargo, cuando se sumaron los pesos de las glándulas suprarrenales derecha e izquierda, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

El grupo satélite de los machos mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en el peso relativo del cerebro, aunque no se encontraron efectos relacionados con el tratamiento en la histopatología ni en las observaciones clínicas para este grupo.

El riñón izquierdo del grupo de los machos a los que se les administraron 33 mg/kg de peso corporal/día presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) de peso cuando se compara con el control ($p < 0,05$). De hecho, se observó una tendencia hacia la disminución del peso de los riñones, especialmente en los machos. Esta alteración se ha relacionado con la nefrotoxicidad, la necrosis

y el daño degenerativo (Babaknejad *et al.*, 2016), que se confirmó mediante hallazgos histopatológicos y bioquímicos, como se describen a continuación.

Tabla 23. Pesos relativos de los órganos de las ratas hembras.

Órgano	Grupo				
	CH	G1	G3	G5	S1
Bazo (%)	0.29±0.02	0.33±0.04	0.26±0.02	0.28±0.04	0.28±0.02
Corazón (%)	0.42±0.07	0.40±0.04	0.42±0.06	0.42±0.02	0.40±0.04
Encéfalo (%)	0.87±0.04	0.86±0.08	0.87±0.05	0.88±0.05	0.82±0.05
Estómago (%)	0.68±0.10	0.70±0.08	0.64±0.07	0.66±0.06	0.58±0.06
Suprarrenal derecha (%)	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
izquierda (%)	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
Hígado (%)	3.83±0.26	3.59±0.28	3.83±0.41	3.63±0.24	3.55±0.36
Ovario derecho (%)	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.00	0.04±0.01	0.03±0.01
izquierdo (%)	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01
Páncreas (%)	0.32±0.05	0.36±0.05	0.36±0.09	0.38±0.05	0.32±0.04
Pulmón derecho (%)	0.38±0.06	0.36±0.062	0.36±0.07	0.40±0.07	0.34±0.02
izquierdo (%)	0.21±0.08	0.19±0.02	0.19±0.02	0.20±0.03	0.18±0.01
Riñón derecho (%)	0.42±0.04	0.41±0.02	0.44±0.04	0.42±0.02	0.40±0.02
izquierdo (%)	0.42±0.05	0.41±0.02	0.4±0.05	0.41±0.02	0.38±0.02
Tiroides (%)	0.22±0.05	0.26±0.05	0.29±0.07	0.24±0.03	0.27±0.04
Útero (%)	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02	0.05±0.01

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

Tabla 24. Pesos relativos de los órganos de las ratas machos.

Órgano	Grupo				
	CM	G2	G4	G6	S2
Bazo (%)	0.30±0.05	0.28±0.03	0.30±0.05	0.29±0.04	0.24±0.02
Corazón (%)	0.37±0.02	0.42±0.02	0.37±0.05	0.41±0.03	0.37±0.04
Encéfalo (%)	0.67±0.04	0.66±0.02	0.68±0.02	0.68±0.03	0.58±0.04*
Estómago (%)	0.55±0.13	0.59±0.05	0.62±0.02	0.57±0.04	0.54±0.03
Suprarrenal					
derecha (%)	0.02±0.01	0.01±0.00*	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
izquierda (%)	0.02±0.01	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00
Hígado (%)	3.82±0.21	3.62±0.16	3.68±0.22	3.52±0.19*	3.48±0.21
Páncreas (%)	0.39±0.09	0.35±0.07	0.33±0.06	0.44±0.15	0.29±0.02
Pulmón derecho					
(%)	0.30±0.04	0.31±0.04	0.35±0.03	0.32±0.03	0.31±0.04
izquierdo (%)	0.19±0.05	0.17±0.02	0.18±0.02	0.17±0.02	0.16±0.02
Riñón					
derecho (%)	0.42±0.09	0.42±0.04	0.39±0.06	0.46±0.04	0.39±0.03
izquierdo (%)	0.43±0.05	0.40±0.03	0.37±0.06*	0.42±0.01	0.39±0.03
Testículo					
derecho (%)	0.60±0.05	0.54±0.08	0.62±0.03	0.60±0.02	0.60±0.05
izquierdo (%)	0.59±0.06	0.58±0.03	0.60±0.04	0.60±0.03	0.59±0.05
Tiroides (%)	0.21±0.05	0.21±0.03	0.21±0.02	0.25±0.05	0.16±0.02
Vesícula					
seminal derecha					
(%)	0.07±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02	0.07±0.02	0.07±0.02
izquierda (%)	0.09±0.02	0.07±0.01	0.09±0.03	0.07±0.02	0.08±0.01

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

8.5.4. Análisis hematológico y bioquímico

A. Biometría hemática

El sistema hematopoyético se considera un objetivo para sustancias tóxicas. Las Tablas 25 y 26 muestran los resultados de la biometría hemática completa con diferencial para ratas hembras y

machos, respectivamente, después de la administración oral de EP. Para las hembras, la hemoglobina corpuscular media (HCM) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando se administraron a 11 y 33 mg/kg de peso corporal/día, sin mostrar una tendencia dosis dependiente. En los machos se observó también que la HCM disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a dosis de extracto de 11, 33 y 100 mg/kg de peso corporal/día, mostrando recuperación en los grupos de satélites.

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CMHG) disminuyó cuando se administró EP a 11, 33 y 100 mg/kg de peso corporal por día para hembras y machos ($p < 0.05$) con un aumento significativo en los grupos de satélites, mientras que el ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW, %) disminuyó en los grupos de satélites en comparación con los controles ($p < 0.05$). El recuento total de leucocitos (WBC) mostró una tendencia no significativa a aumentar a través de las dosis administradas en hembras y machos, alcanzando significancia estadística en los grupos satélite. Estos resultados podrían indicar que EP tiene propiedades inmunomoduladoras, como se ha demostrado con otros extractos de plantas polifenólicas (García-Pérez *et al.*, 2018).

Tabla 25. Biometría hemática completa de los grupos de ratas hembra control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CH	G1	G3	G5	S1
Eritrocitos ($10^6/UL$)	6.48±0.63	6.91±0.80	6.97±0.58	7.36±0.34	6.74±0.80
Hemoglobina (g/dL)	14.2±0.76	14.14±1.74	13.85±1.02	14.56±0.71	15.33±1.94
Hematocrito (%)	40.64±4.18	43.86±4.84	43.08±3.59	44.44±1.17	40.23±4.43
VGM (fL)	62.72±1.35	63.50±1.69	61.80±0.46	60.44±1.79	59.70±1.10
HCM (pg)	22.04±1.84	20.44±0.37	19.90±0.29*	19.54±0.74*	22.73±1.10
CMHG (g/dL)	35.14±2.64	32.22±1.11*	32.20±0.54*	32.30±0.64*	38.07±1.36*
RDW (%)	13.74±0.45	13.80±0.34	13.98±0.80	13.78±0.30	12.23±0.21*
Leucocitos totales (μL)	4320.00±558. 57 ^a	5940.00±2003 .25 ^a	5075.00±2010 .60	6040.00±1761 .53	9166.67±4593 .84*
Neutrófilos (%)	13.60±3.98	15.40±5.51	13.50±6.14	14.00±3.39	16.33±6.35
Linfocitos (%)	81.00±6.44	79.20±6.61	83.75±6.08	80.60±4.04	81.33±4.16

Monocitos (%)	4.00±3.00	5.00±2.45	2.25±1.26	4.00±1.23	0.67±1.16
Eosinófilos (%)	1.40±1.14	0.40±0.89	0.50±0.58	1.40±1.14	1.67±1.53
Basófilos (%)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Plaquetas (μL)	456200.00±41	634000.00±35	511250.00±52	610400.00±34	157333.33±21
	8210.71	2186.74	3682.08	1195.40	9696.00
Volumen plaquetario (fL)	7.80±2.02	8.22±2.08	7.80±1.28	7.08±1.14	8.20±0.52
Neutrófilos (μL)	584.40±165.7	854.40±262.9	629.50±224.8	824.60±232.8	1536.33±1139
	9	7	3	2	.67*
Linfocitos (μL)	3514.20±631.	4797.00±2054	4318.50±1957	4885.40±1506	7400.67±3478
	51	.00	.52	.31	.43*
Monocitos (μL)	134.20±130.9	269.40±107.2	106.75±49.05	246.60±124.5	54.00±93.53
	6	2		5	
Eosinófilos (μL)	57.20±46.12	19.20±42.93	20.25±24.39	83.40±60.58	175.67±153.5
					1
Basófilos (μL)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$). Donde: VGM, volumen globular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media, CMHG, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW, ancho de distribución de glóbulos rojos.

Tabla 26. Biometría hemática completa de los grupos de machos control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CM	G2	G4	G6	S2
Eritrocitos (10 ⁶ /UL)	6.39±0.50	7.31±0.29*	6.27±0.82	6.88±0.30	7.14±0.52
Hemoglobina (g/dL)	14.05±1.25	14.65±0.57	12.75±1.75	14.10±0.37	15.64±1.32
Hematocrito (%)	40.55±4.10	47.12±1.98	39.72±5.54	43.47±1.09	43.40±4.01
VGM (fL)	63.40±1.46	64.45±1.07	63.32±1.92	63.25±1.66	60.74±1.52
HCM (pg)	22.00±0.22	20.07±0.84*	20.33±0.64*	20.52±0.51*	21.88±0.42
CMHG (g/dL)	34.70±0.55	31.12±0.92*	32.10±0.38*	32.43±0.46*	36.06±0.31*
RDW (%)	14.43±0.77	14.8±0.80	14.67±0.82	15.35±1.25	13.04±0.52*

Leucocitos totales (μL)	4775.00±1150. 00	6116.67±2611. 07	5250.00±1291. 12	5583.33±1440. 02	6940.00±1312. 63
Neutrófilos (%)	15.50±6.35	14.00±5.73	12.67±6.77	17.67±1.37	12.6±7.34
Linfocitos (%)	80.50±7.85	81.83±6.24	84.50±6.90	76.83±2.32	84.20±8.59
Monocitos (%)	3.50±1.29	3.67±1.75	2.17±0.98	4.83±1.17	2.40±1.82
Eosinófilos (%)	0.667±1.00	0.333±0.52	0.33±0.82	0.50±0.55	0.80±0.84
Basófilos (%)	0±0	0±0	0±0	0.167±0.41	0±0
Plaquetas (μL)	444500.00±49 7356.68	365833.33±45 5360.70	416166.67±44 2768.75	740833.33±38 6698.03	362200.00±44 3444.13
Volumen plaquetario (fL)	8.38±2.69	9.73±2.01	8.53±2.07	7.52±2.35	8.12±1.17
Neutrófilos (μL)	628.33±307.18	887.83±613.97	670.17±411.36	994.67±308.86	867.40±561.08
Linfocitos (μL)	4031.00±1122. 53	4938.67±1851. 87	4448.33±1228. 28	4285.33±1092. 47	5847.60±1325. 25
Monocitos (μL)	151.33±41.61	252.17±244.96	109.00±50.31	268.50±83.60	176.80±139.66
Eosinófilos (μL)	17.00±34 ^{.00}	20.33±32.40	9.33±22.86	28.67±31.60	48.20±48.08
Basófilos (μL)	0±0	0±0	0±0	0.17±15.11	0±0

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05.*Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05). Donde: VGM, volumen globular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media, CMHG, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW, ancho de distribución de glóbulos rojos.*

Como se observa, los parámetros determinados en la biometría hemática, la química sanguínea, el perfil hepático y los electrolitos séricos se encuentran dentro de los valores de referencia para ratas Wistar, tanto de hembras como de machos (Arcila-Quinceno *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2012). Sin embargo, la disminución de HCM, CMHG y RDW, pudieran ser indicadores de deficiencias de

hierro, lo que conduciría a anemia microcítica (Munker *et al.*, 2007; Weiss, 2012). Lo cual pudiera estar relacionado con la capacidad de los taninos de quelar hierro y zinc, además de proteínas exógenas, impidiendo su asimilación (Makkar, 2003). Generalmente, se espera que los eventos tóxicos en animales sigan un patrón de dosis-respuesta en relación con la incidencia y la gravedad (Dorato & Engelhardt, 2005), no obstante, esta tendencia no se observó para los parámetros hematológicos, por lo que estas alteraciones no se atribuyeron a la toxicidad de EP. Serían necesarios más estudios para analizar cuidadosamente los efectos de este extracto en el sistema hematopoyético.

B. Química sanguínea

En las Tablas 27 y 28 se observan los parámetros medidos en la química sanguínea, tanto para hembras como machos, respectivamente. Se presenta un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de creatinina entre los grupos control y los satélite. Además, los machos a los que se les administró EP a 100 mg/kg de peso corporal/día y el grupo de satélite mostraron niveles elevados de urea ($p < 0.05$). Cabe mencionar que ambos parámetros son indicadores de daño renal, ya que al ser productos del desecho del metabolismo proteico, si los riñones no realizan correctamente su función, tanto la urea como la creatinina se acumulan en la sangre elevando su concentración (White *et al.*, 2001), concordando con los resultados reportados en el estudio de (Niho *et al.*, 2001), evidenciando que la administración subcrónica de compuestos polifenólicos, como el ácido gálico producen daño renal, resultados que se apoyan en los hallazgos histopatológicos que serán descritos posteriormente.

Tabla 27. Química sanguínea de los grupos de ratas hembras control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CH	G1	G3	G5	S1
Glucosa (mg/dL)	120.637±12.34 3	151.708±38.06 4	135.932±34.60 2	143.558±35.91 9	118.708±27.96 7
Urea (mg/dL)	38.225±4.836	36.048±5.686	41.152±8.193	33.012±3.886	38.263±6.579
Creatinina (mg/dL)	0.2±0.063	0.22±0.045	0.18±0.045	0.2±0	0.3±0*

Ácido úrico (mg/dL)	2.067±0.543	3.82±2.402	2.54±1.374	2.183±0.945	1.9±0.503
Colesterol (mg/dL)	69.367±8.036	68.516±6.474	63.154±7.879	66.683±5.719	71.69±2.092
Triglicéridos (mg/dL)	109.078±94.76	75.09±48.662	81.652±25.606	54.772±15.802	63.183±20.501

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05.*Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05).*

Tabla 28. *Química sanguínea de los grupos de ratas machos control y de prueba.*

Parámetro	Grupo				
	CM	G2	G4	G6	S2
Glucosa (mg/dL)	136.396±39.085	140.3±31.041	138.6±60.104	147.468±60.179	134.733±33.774
Urea (mg/dL)	27.1±3.687	32.027±3.364*	30.068±4.168	29.315±2.237	36.652±4.346*
Creatinina (mg/dL)	0.16±0.055	0.233±0.052	0.233±0.052	0.183±0.041	0.35±0.055*
Ácido úrico (mg/dL)	3.14±1.464	3±0.844	2.317±1.065	2.567±0.891	2.033±0.683
Colesterol (mg/dL)	55.892±4.263	54.218±5.314	54.877±3.107	57.518±10.345	55.5±9.761
Triglicéridos (mg/dL)	92.704±35.569	81.472±13.645	88.71±16.825	75.627±11.583	88.792±15.245

*Los valores son expresados como media ± desviación estándar p<0.05.*Diferente estadísticamente significativo comparado con el control (p <0.05).*

C. Perfil hepático

La concentración de los parámetros evaluados en el perfil hepático son exhibidos en las Tablas 29 para las hembras y 30 para machos. En la primera se aprecia un decremento significativo (p<0.05) en la concentración de bilirrubina total en comparación con el control, presente cuando se administró EP a 11 y 33 mg/kg peso corporal/día y en el grupo satélite. Las hembras también presentaron una disminución significativa (p<0.05) de los valores de bilirrubina indirecta cuando

se administró el extracto a 11 y 33 mg/kg de peso corporal/día, así como en el grupo satélite, sin una tendencia dosis dependiente en ambos parámetros. También se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de deshidrogenasa láctica en el grupo satélite de las hembras. Para los machos las proteínas totales y la globulina aumentaron significativamente ($p < 0.05$) en el grupo satélite.

La concentración de fosfatasa alcalina disminuyó en el grupo de satélites en comparación con el control ($p < 0.05$), que podría estar asociada con anemia (Yuji *et al.*, 2014) debido a la presencia de taninos en el extracto como se explicó anteriormente (Makkar, 2003) o como consecuencia de la nefropatía (Weiss & Wardrop, 2012).

Las alteraciones en las concentraciones de bilirrubina, fosfatasa alcalina, proteínas totales y parámetros de globulina pueden indicar daño hepático (Shaffer & Romagnuolo, 2012). Sin embargo, cabe destacar que las enzimas aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, ambas muy sensibles a las lesiones hepáticas, en nuestro estudio permanecieron sin cambios. Además, las alteraciones en estos parámetros bioquímicos no se correlacionaron con los resultados del análisis histopatológico, por lo que estos hallazgos no se consideraron como indicativos de daño hepático. No obstante, el hecho de que en muchos casos estos parámetros cambiaron en el grupo satélite podría indicar que el daño hepático podría ocurrir como un efecto retardado después de la exposición oral con 100 mg/kg de peso corporal/día de EP.

Tabla 29. Perfil hepático de los grupos de ratas hembras control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CH	G1	G3	G5	S1
Bilirrubina total (mg/dL)	0.117±0.075	0.1±0	0±0*	0±0*	0±0*
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.05±0.055	0.06±0.055	0±0	0±0	0±0

Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.067±0.052	0.04±0.055	0±0*	0±0*	0±0*
Aspartato aminotransferasa (TGO) (U/L)	341.583±291.46 5	378.68±383.1 62	514.74±349.67 9	263.033±148.5 62	405.925±260. 625
Alanino aminotransferasa (TGP) (U/L)	69.15±48.015	70.42±60.180	97.82±55.229	48.717±25.932	87.4±49.831
Fosfatasa alcalina (U/L)	176.933±25.355	175.74±66.17 0	164.68±49.772	170.017±25.69 6	141.1±32.128
Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT) (U/L)	0.333±0.816	0±0	0.16±0.230	0.783±0.886	0.7±0.837
Deshidrogenasa láctica (U/L)	1373.683±1119. 480	1614.4±1035. 780	2167.68±1099. 246	1196.617±815. 420	3230.8±632.1 33*
Proteínas totales (g/dL)	6.3±0.762	6.6±1.107	5.74±0.329	6.033±0.250	5.625±0.222
Albúmina (g/dL)	4.268±0.374	4.506±0.758	4.018±0.163	3.967±0.497	3.92±0.102
Globulina (g/dL)	2.032±0.519	2.094±0.530	1.722±0.180	2.067±0.543	1.705±0.230
Relación A/G (g/dL)	2.183±0.496	2.22±0.444	2.344±0.169	2.023±0.567	2.29±0.360

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

Tabla 30. Perfil hepático de los grupos de ratas machos control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CM	G2	G4	G6	S2
Bilirrubina total (mg/dL)	0.08±0.084	0.05±0.055	0.05±0.055	0.017±0.041	0.017±0.041
Bilirrubina directa (mg/dL)	0±0	0.017±0.041	0.017±0.041	0±0	0±0
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.08±0.084	0.033±0.052	0.033±0.052	0.017±0.041	0.017±0.041
Aspartato aminotransferasa (TGO) (U/L)	401.32±186.93 1	412.117±244.8 45	313.783±131. 404	287.933±184. 335	284.767±193. 831
Alanino aminotransferasa (TGP) (U/L)	77.06±30.487	74.75±33.923	65.417±18.93 7	51.9±26.413	70.333±28.31 3
Fosfatasa alcalina	252.3±19.319	249.333±34.02 4	201.767±29.7 69	211.333±37.3 09	161.983±30.9 03*
Gamma Glutamil Transpeptidasa (GGT) (U/L)	0±0	0.117±0.286	0.183±0.449	0.1±0.245	0.267±0.653
Deshidrogenasa láctica (U/L)	2072.38±1093. 094	1662.767±874. 514	1926.05±965. 880	1284.3±835.2 60	1488.5±954.3 60
Proteínas totales (g/dL)	5.5±0.592	5.667±0.314	5.55±0.207	5.683±0.223	5.95±0.105*
Albúmina (g/dL)	3.774±0.385	3.905±0.251	3.737±0.165	3.882±0.136	4.035±0.108

Globulina (g/dL)	1.726±0.224	1.762±0.103	1.813±0.079	1.802±0.142	1.915±0.181*
Relación A/G (g/dL)	2.192±0.143	2.217±0.142	33.572±77.12	2.16±0.156	2.122±0.276

4

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

D. Electrolitos séricos

En las Tablas 31 y 32 se muestra la concentración de electrolitos séricos determinados para las ratas Wistar, tanto de los grupos control de hembras y machos, así como de los grupos de prueba, como se puede apreciar, no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos control y los grupos a los cuales se les administró el extracto de *Q. crassifolia*.

Tabla 31. Electrolitos séricos de los grupos de ratas hembras control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CH	G1	G3	G5	S1
Na (mmol/L)	141.167±1.941	138.4±1.140	142.8±1.924	142.167±1.602	141±2.160
K (mmol/L)	5.6±0.790	6.26±0.832	6.46±0.841	6.017±0.637	5.85±0.507
Cl (mmol/L)	106.167±2.401	104.6±1.517	108.4±2.881	107.667±1.862	106±1.414

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

Tabla 32. Electrolitos séricos de los grupos de ratas macho control y de prueba.

Parámetro	Grupo				
	CM	G2	G4	G6	S2
Na (mmol/L)	141±1.87	143.5±2.07	139.83±2.93	142±2.83	143±2.683
K (mmol/L)	5.84±0.69	5.8±0.79	6.32±0.63	6.5±0.75	6.33±0.67
Cl (mmol/L)	107.06±1.47	106.17±1.47	105.17±1.72	106.67±1.75	107±1.27

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control ($p < 0.05$).

8.5.5. *Análisis histopatológico*

El análisis histopatológico se llevó a cabo en hígado, riñón y encéfalo, ya que los resultados reportados en la prueba de toxicidad oral aguda mostraron estos órganos como posibles dianas de los compuestos fenólicos, presentes en el extracto purificado de *Q. crassifolia* (Valencia-Avilés *et al.*, 2017). No se encontraron lesiones significativas o cambios patológicos atribuibles a la administración oral del EP por una duración subaguda en el hígado y el cerebro de los animales en los grupos tratados y satélites en comparación con el control (datos no mostrados). Sin embargo, se observó daño renal caracterizado por hiperplasia endotelial en la corteza y la médula, tanto para hembras como machos a dosis de 33 y 100 mg/kg de peso corporal/día. Estas alteraciones persistieron en los grupos satélite de machos y hembras (Figura 27).

Como se demostró en la caracterización química, de los compuestos identificados, los polifenoles están presentes en gran proporción al extracto de *Q. crassifolia*, con un 12.94% en la cromatografía de gases y un 22.79% en la cromatografía de gases de pirólisis. A pesar de su potencial para ofrecer propiedades beneficiosas para la salud, la ingesta alta y crónica de estas moléculas puede provocar efectos renales dañinos (Inoue *et al.*, 1992; Lambert *et al.*, 2007). Se ha postulado que los conjugados polifenólicos-glutación (PP-GSH) y sus metabolitos muestran propiedades electrofílicas y redox que frecuentemente exceden al del polifenol original. Las células con altas cantidades de γ -glutamil transpeptidasa, como las células epiteliales tubulares proximales renales, tienen la capacidad de acumular PP-GSH, quedando sujetas a las propiedades redox y electrofílicas de este, causando daño renal cuando los polifenoles se encuentran en altas concentraciones (Monks & Lau, 1998).

Como se mencionó anteriormente, se han encontrado relativamente pocos informes disponibles sobre la toxicidad oral de las preparaciones de encino, en los cuales se discuten resultados contradictorios, entre estos destaca el realizado por Pérez *et al.* (2011), quienes evaluaron los efectos tóxicos de hojas jóvenes de *Quercus pyrenaica* en ganado de pastoreo, informando daño renal atribuible a la presencia de taninos hidrolizables (Pérez *et al.*, 2011). Sin embargo, los mecanismos precisos que favorecen el desarrollo de la toxicidad aún son objeto de investigación.

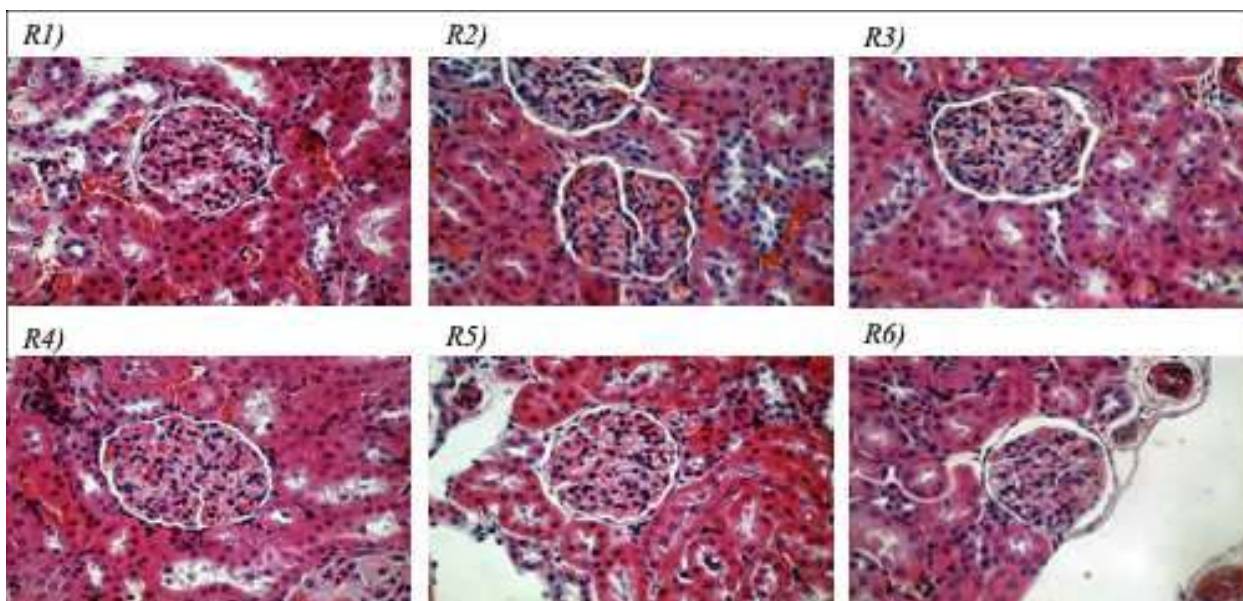


Figura 27. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de *Q. crassifolia*. R1) Grupo de hembras al que se le administró 100 mg/kg/día; R2) Grupo de hembras al que se le administró 33 mg/kg/día; R3) Grupo satélite de hembras; R4) Grupo de machos al que se le administró 100 mg/kg/día; R5) Grupo de machos al que se le administró 33 mg/kg/día; R6) Grupo satélite de machos.

La administración oral aguda y subaguda de la capa interna de la fruta de *Q. brantii* no mostró cambios en el comportamiento animal de ratas Wistar ni en los órganos diana a dosis de 5000 mg/kg (Mirzaei & Mirzaei, 2012). Los terneros administrados por vía oral con 22.8 y 10.7 kg de bellotas y hojas de *Q. robur* durante 22 y 30 días, respectivamente, mostraron riñones pálidos y nefrosis tubular aguda, lo que sugiere que el riñón es un órgano diana para compuestos presentes en *Quercus* sp en concentraciones altas (Dutra *et al.*, 2014). Se deben realizar investigaciones adicionales para determinar las moléculas responsables de la nefrotoxicidad de EP y para dilucidar los mecanismos toxicológicos involucrados.

En general, los resultados presentados aquí muestran daño renal atribuido a la administración oral de EP a 33 y 100 mg/kg de peso corporal/día, que se manifiesta por hiperplasia endotelial en la corteza y la médula. Estos resultados están respaldados por alteraciones en los parámetros bioquímicos (creatinina y urea), la pérdida significativa de peso del riñón izquierdo para los machos a 33 mg/kg de peso corporal/día. Aunque en los grupos a los que se administró el extracto a 100 mg/kg de peso corporal/día no se observó una pérdida de peso renal significativa, los análisis

bioquímicos e histopatológicos son concluyentes con respecto a la lesión renal tanto en hembras como en machos cuando el extracto se administró durante 28 días consecutivos.

Estos resultados demostraron que es fundamental, que como fase del desarrollo de un ingrediente funcional usando un extracto polifenólico, se realice su evaluación toxicológica para determinar los niveles de dosis y la duración de la exposición donde ocurren eventos adversos sustanciales y las concentraciones donde estos eventos no se presentan.

8.6. Estandarización del proceso de nanoencapsulación del extracto purificado de *Q. crassifolia*

8.6.1. Potencial ζ

Se determinó el potencial ζ con el objetivo de establecer el pH y la proporción de materiales de pared donde exista una solución o emulsión que puede ser administrada al equipo de secado por aspersion.

8.6.2. Punto isoeléctrico del caseinato de calcio

Se estableció el punto isoelectrico del caseinato de calcio al 0.2% en solución acuosa, como se observa en la Figura 28, se determinó la carga electrostática en solución con el uso del potencial ζ , en un rango de pH de 2.5 a 7.5, estableciendo las zonas de estabilidad para esta proteína.

La solución de caseinato de calcio presentó valores de potencial ζ positivos en un rango de pH de 2.5 a 4, volviéndose negativos a valores de pH superiores a 4.3 (su punto isoeléctrico), que concuerda con los valores presentados por Kleemann *et al.* (2018), donde mencionan que el punto isoeléctrico de las proteínas de suero de leche se encuentra entre pH de 4.2 y 8.3 (Kleemann *et al.*, 2018), cercano a los rangos que se reportan para las caseínas de la leche (4.44 a 5.77) (Badui-2006).

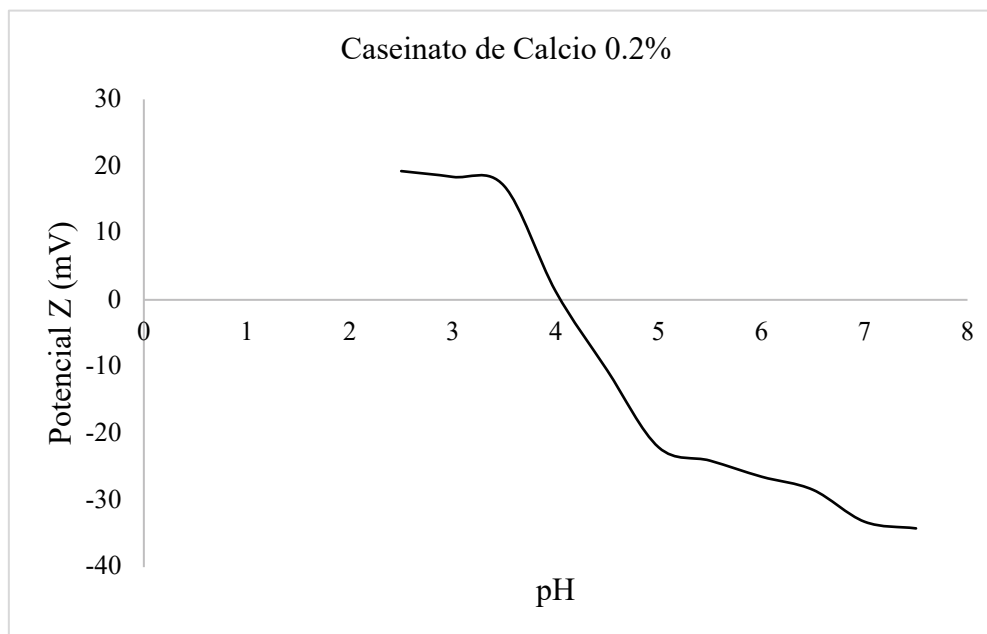


Figura 28. Potencial ζ del caseinato de calcio.

8.6.3. Carga electrostática de los materiales de pared en solución

En la Figura 29 se observa la gráfica de los valores de potencial ζ , obtenidos en el rango de pH de 2.5 a 7.5 para la mezcla de caseinato de calcio y maltodextrina en concentración de 25-75% (CCMD 25-75) y 50-50% (CCMD 50-50) respecto a los sólidos totales. Como se puede apreciar, se obtuvieron valores positivos en el rango de pH de 2.5 (16.83 ± 1.46 mV) a 4.5 (0.37 ± 0.06 mV), en tanto que la solución CCMD 25-75 aumentó la electronegatividad conforme aumentó en pH de 5 (-1.3 ± 0.1 mV) a 7.5 (-30.33 ± 0.12 mV).

Para la mezcla CCMD 50-50 se mostró una tendencia similar que la mezcla CCMD 25-75, con ligeras diferencias, con valores de potencial ζ que van de 4.23 ± 0.06 (pH 2.5) a 2.43 ± 0.15 (pH 3.5) en el rango positivo, mientras que se obtuvieron valores negativos de potencial ζ a pH 4 (-1.83 ± 0.45) a pH 7.5 (-25.63 ± 0.31). Las diferencias en cuanto a concentración de caseinato de calcio-maltodextrina alteran los valores de potencial ζ , mostrando la concentración CCMD 50-50 mayores similitudes que el comportamiento del caseinato de calcio, debido a que tiene una mayor concentración de este en la mezcla.

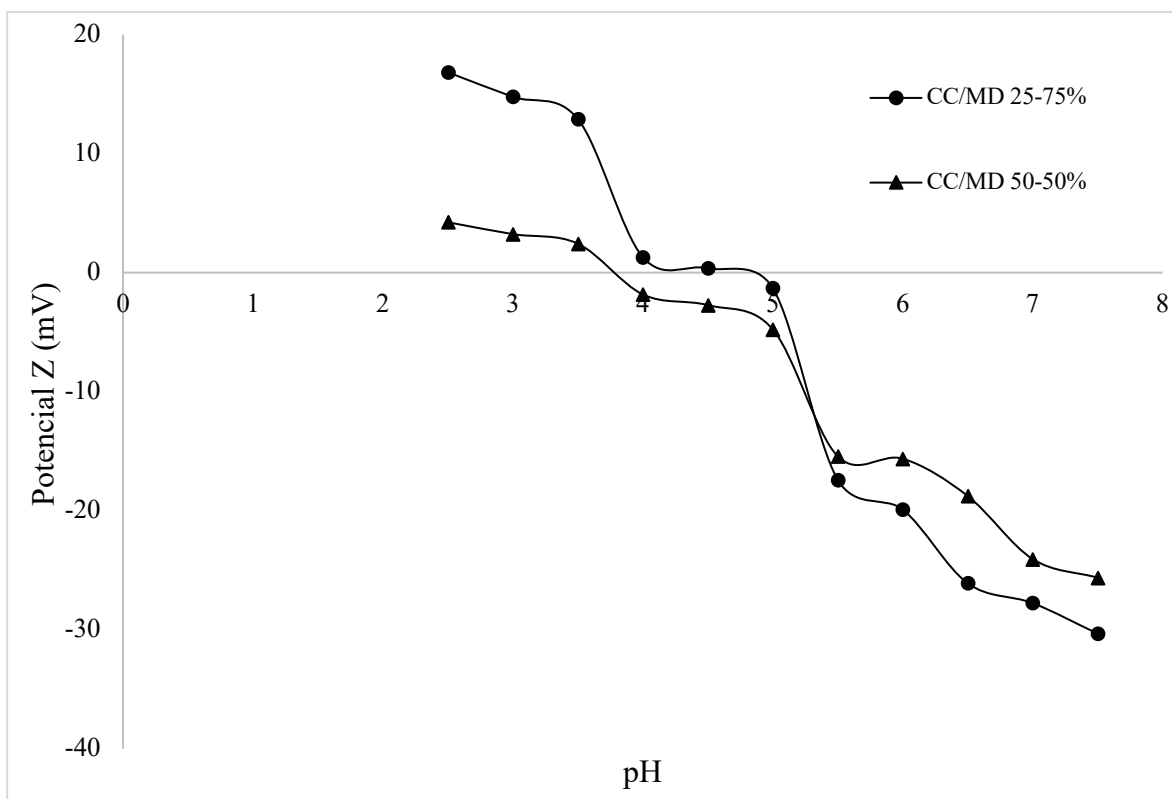


Figura 29. Potencial ζ de la mezcla de caseinato de calcio y maltodextrina.

8.6.4. Carga electrostática de los materiales de pared en solución con el extracto de *Q. crassifolia*

Se evaluó el potencial ζ de la mezcla de los materiales de pared, en las dos formulaciones propuestas, y el extracto de encino. Ambas mezclas siguieron la misma tendencia (Figura 30), iniciando con un ascenso en el potencial ζ cuando se elevó el pH de 2 a 2.5, posteriormente disminuyó conforme aumentó el pH de 3 (14.7 ± 1.73) a 4 (8.6 ± 5.92) para la mezcla CCMD 50-50 a la que se le añadió el extracto (CCMDE 50-50), mientras que la mezcla CCMD 25-75 con el extracto (CCMDE 25-75) presentó valores más bajos de potencial ζ para pH 3 (16.9 ± 3.7) a 4 (1.8 ± 1.21), en tanto que los valores negativos comienzan para ambas concentraciones en pH de 4.5 (-10.97 ± 1.18 , CCMDE 50-50; -13.3 ± 0.35 , CCMDE 25-75) a 7 (-21.2 ± 7.16 , CCMDE 50-50; y -22.87 ± 3.97 , CCMDE 25-75).

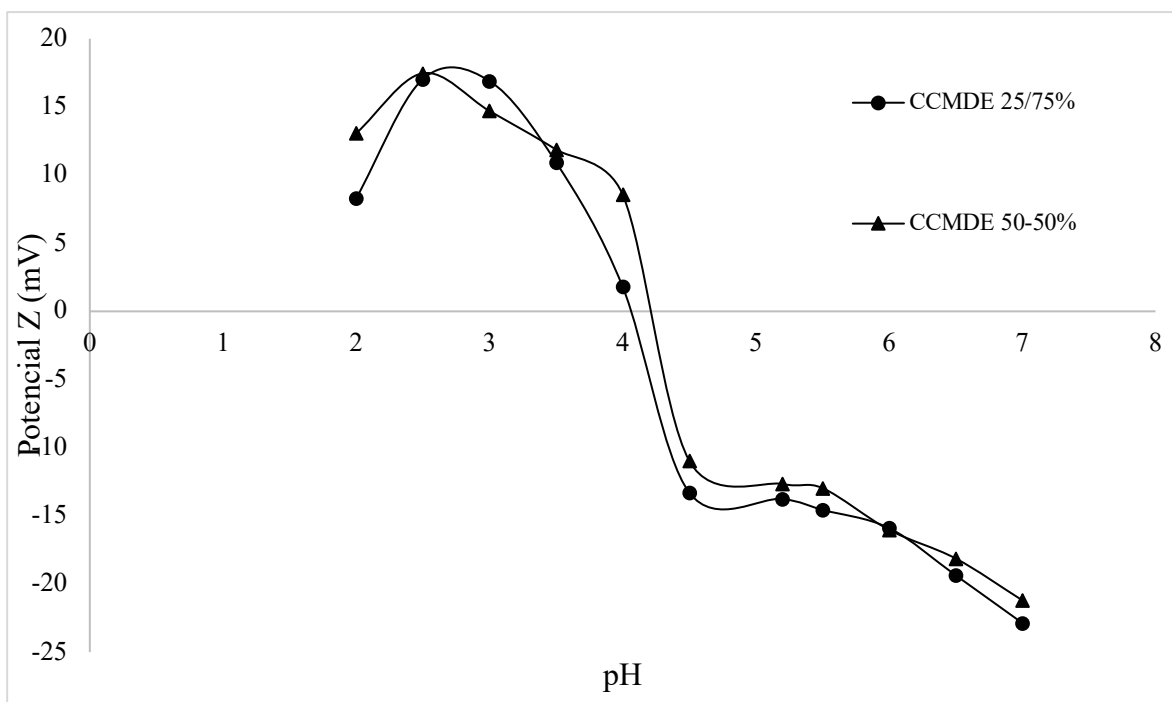


Figura 30. Potencial ζ de la mezcla de los materiales de pared y el extracto de encino.

8.7. Producción de nanocápsulas usando secado por aspersión

Se produjeron nanocápsulas de las dos diferentes formulaciones CCMDE 25-75 y CCMDE 50-50, a pH 3, 3.5, 4.5 y 5, ya que son las zonas que se identificaron como estables para la formación de una solución que pudiera ser inyectada en el nanospray dryer.

8.7.1. Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto purificado de *Q. crassifolia* secado por aspersión y nanoencapsulado

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos del extracto purificado de *Q. crassifolia* secado por aspersión, así como de las nanocápsulas del mismo extracto. Como se observa en la Tabla 33, la cantidad de compuestos fenólicos por gramo de extracto encapsulado disminuyó notablemente, debido a que al mezclar los materiales de pared con el extracto de encino rico en compuestos fenólicos estos se diluyen.

Tabla 33. Contenido de fenoles totales del extracto purificado y de las nanocapsulas de *Q. crassifolia*.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g)
Extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	664 ± 29*
Nanocápsulas de extracto de <i>Q. crassifolia</i>	18.82± 0.2

Los promedios con * en la misma columna son diferentes a $p < 0,05$ (prueba t de Student). EAG, equivalentes de ácido gálico.

8.7.2. Eficiencia de encapsulación

La Tabla 34 exhibe la eficiencia de encapsulación de las formulaciones CCMDE 25-75 y CCMDE 50-50 a los diferentes pH. Los valores de eficiencia de encapsulación oscilan en el rango de 53.3 a 72% para la formulación CCMDE 50-50, mientras que para CCMDE 25-75, la eficiencia se encuentra en el rango de 51.2 a 67.5%. Estos resultados se ubican en el rango reportado por Kyriakoudi y Tsimidou (2018), quienes determinaron una eficiencia de encapsulación de 54 y 81%, sin embargo, la eficiencia de encapsulación fue menor.

En cuanto al rendimiento de encapsulación (Tabla 34) se observan rangos de 44.9 a 70.1% y 67.9 a 77.7% para las formulaciones CCMDE 50-50 y CCMDE 25-75, respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado por Kyriakoudi y Tsimidou (2018), quienes nanoencapsularon un extracto de azafrán usando como material de pared maltodextrina y secado por aspersion, bajo las mismas condiciones de operación y el nanospray drying de Büchi, obteniendo rendimientos de extracción de 71 a 87%, considerando estos rendimientos como satisfactorios:

Tabla 34. Eficiencia y rendimiento de encapsulación del extracto de *Q. crassifolia*.

Formulación	Eficiencia de encapsulación Fenoles totales(%)	Rendimiento de encapsulación (%)
CCMDE 50-50% pH 3	58.5 ± 4.2 ^{bc}	56.7 ± 8.6 ^{bc}
CCMDE 50-50% pH 3.5	72.5 ± 5.5 ^a	61.9 ± 2.5 ^{abc}
CCMDE 50-50% pH 4.5	53.3 ± 5.5 ^c	70.1 ± 11.9 ^{ab}

CCMDE 50-50% pH 5	68 ± 2.8 ^{ab}	44.9 ± 3.6 ^c
CCMDE 25-75% pH 3	51.2 ± 1.33 ^c	67.9 ± 6.7 ^{ab}
CCMDE 25-75% pH 3.5	59.4 ± 1.3 ^{bc}	77.7 ± 3.9 ^a
CCMDE 25-75% pH 4.5	57.4 ± 4.72 ^{bc}	77.0 ± 5.8 ^a
CCMDE 25-75% pH 5	67.5 ± 7.317 ^{ab}	68.9 ± 0.2 ^{ab}

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

8.7.3. Tamaño de partícula

El tamaño medio de las nanocápsulas se muestra en la Tabla 35, en la que se observa que el tamaño de partícula se encontró entre los rangos de 198 a 471 nm para CCMDE 50-50 mientras que para CCMDE 25-75 el rango fue de 299 a 341 nm, sin embargo, no se mostraron diferencias en el tamaño de las partículas entre las diferentes formulaciones. Dichos rangos concuerdan con los reportados por Orozco-Alfaro (2017) de 206.73 y 356.50 nm, mientras que Mancilla en 2014, reportó tamaños de partícula de 2173 nm utilizando también Nano Spray Dryer bajo las mismas condiciones de secado (Mancilla-Dávalos *et al.*, 2014).

Tabla 35. Tamaño de partícula de las nanocápsulas.

Muestra	Tamaño de partícula (nm)
CCMDE 50-50% pH3	198.6 ± 67.2 ^a
CCMDE 50-50% pH 3.5	279.6 ± 180.4 ^a
CCMDE 50-50% pH 4.5	471.5 ± 246.8 ^a
CCMDE 50-50% pH 5	200 ± 57.5 ^a
CCMDE 25-75% pH 3	299.8 ± 97.2 ^a

CCMDE 25-75% pH 3.5	341.8 ± 196.4 ^a
CCMDE 25-75% pH 4.5	314.1 ± 77.9 ^a
CCMDE 25-75% pH 5	328 ± 117.4 ^a

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

8.7.4. Morfología de las nanocápsulas

A. Microscopía óptica

Las nanocápsulas formadas en el Spray Dryer fueron observadas al microscopio óptico, tanto en las micrografías para las formulaciones CCMDE 50-50 (Figura 31) como en CCMDE 25-75 (Figura 32) en los diferentes pH, se pueden apreciar pequeños puntos, sin embargo, debido al tamaño de partícula y la resolución con que cuenta este equipo, no fue posible observar con mayor detalle, pudiendo observar únicamente aglomerados de las partículas, lo cual coincide con (Jones y McClements, 2010), quien comenta que las cápsulas producidas por biopolímeros pueden presentar estructuras esféricas, sin embargo, también se pueden observar aglomerados de las mismas (Jones *et al.*, 2010).

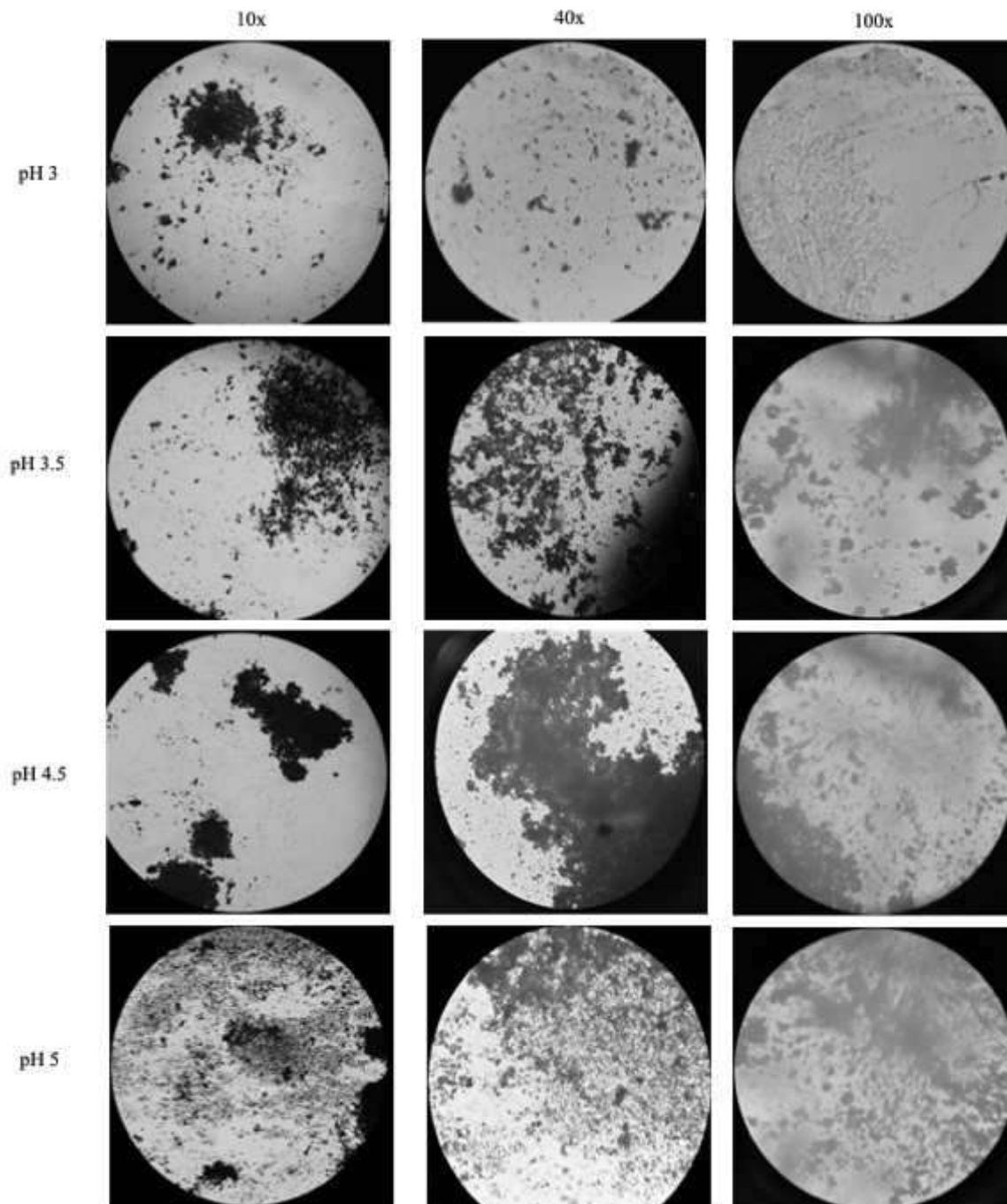


Figura 31. Micrografías con microscopio óptico de las formulaciones CCMDE 50-50.

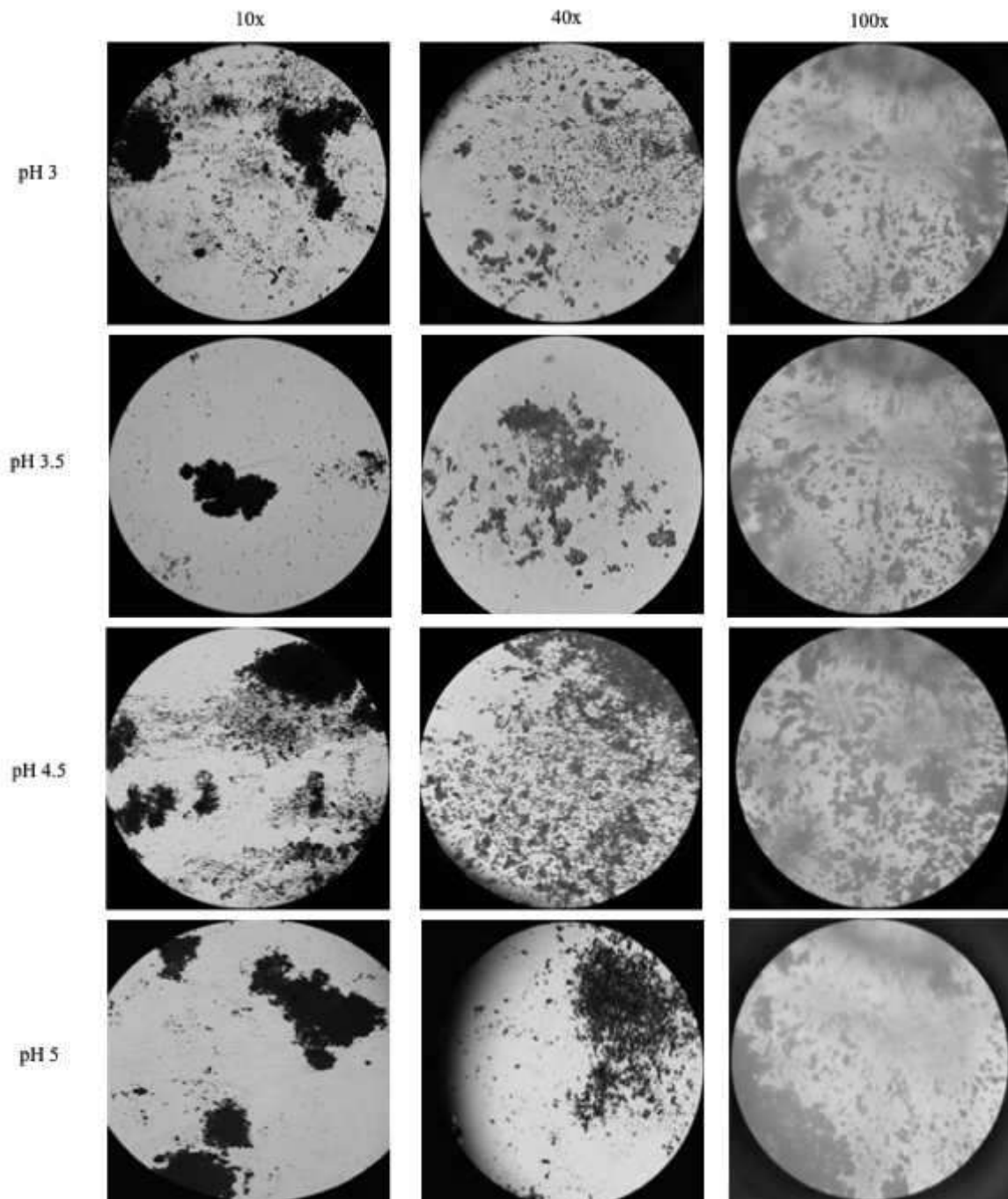


Figura 32. Micrografías con microscopio óptico de las formulaciones CCMDE 25-75.

B. Microscopía electrónica de barrido

En las Figuras 33, 34, 35 y 36 se observan las micrografías de las nanopartículas obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB), siendo en su mayoría formas esféricas, sin embargo, también se muestran algunas esferas con aspecto deshidratado, que puede suponerse fue debido al proceso al que se sometieron de secado por aspersion, además de observarse partículas que puede suponerse son nanocápsulas fracturadas. Cabe señalar, que en las formulaciones CCMDE 25-75 a las que se les ajustó el pH de 3.5, 4.5 y 5, presentaron morfología esférica más homogénea y las nanocápsulas mejor formadas.

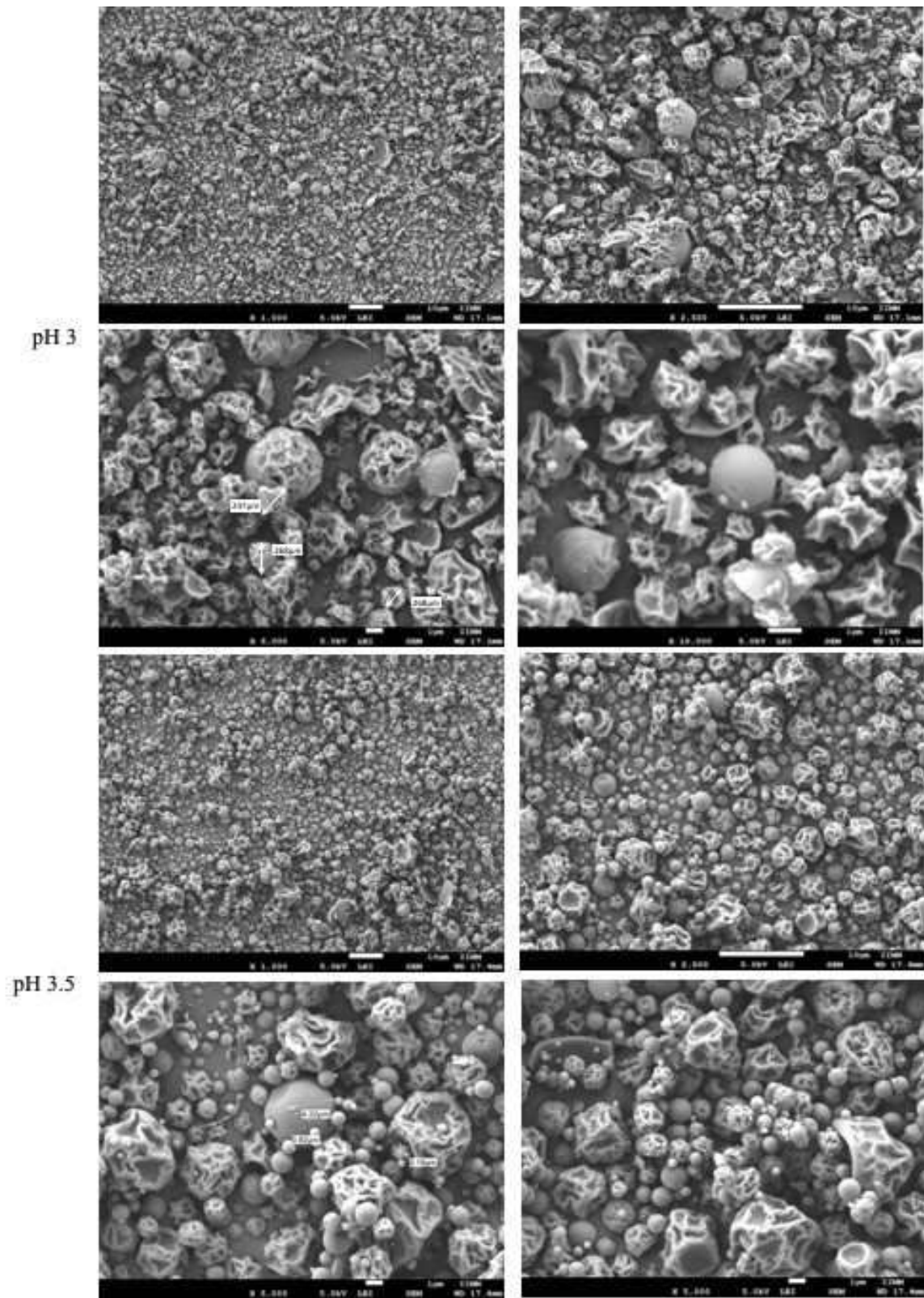


Figura 33. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 50-50.

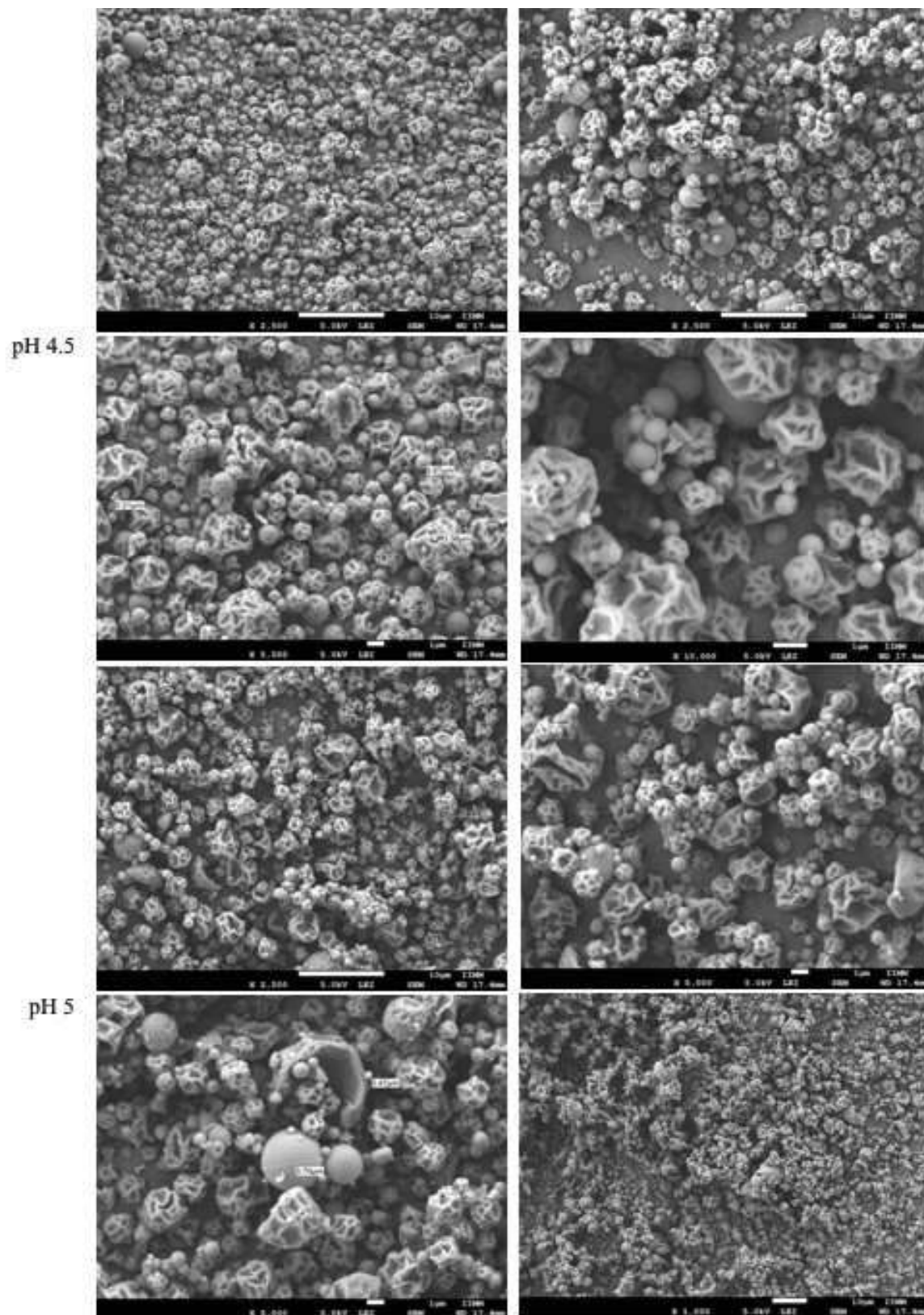


Figura 34. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 50-50.

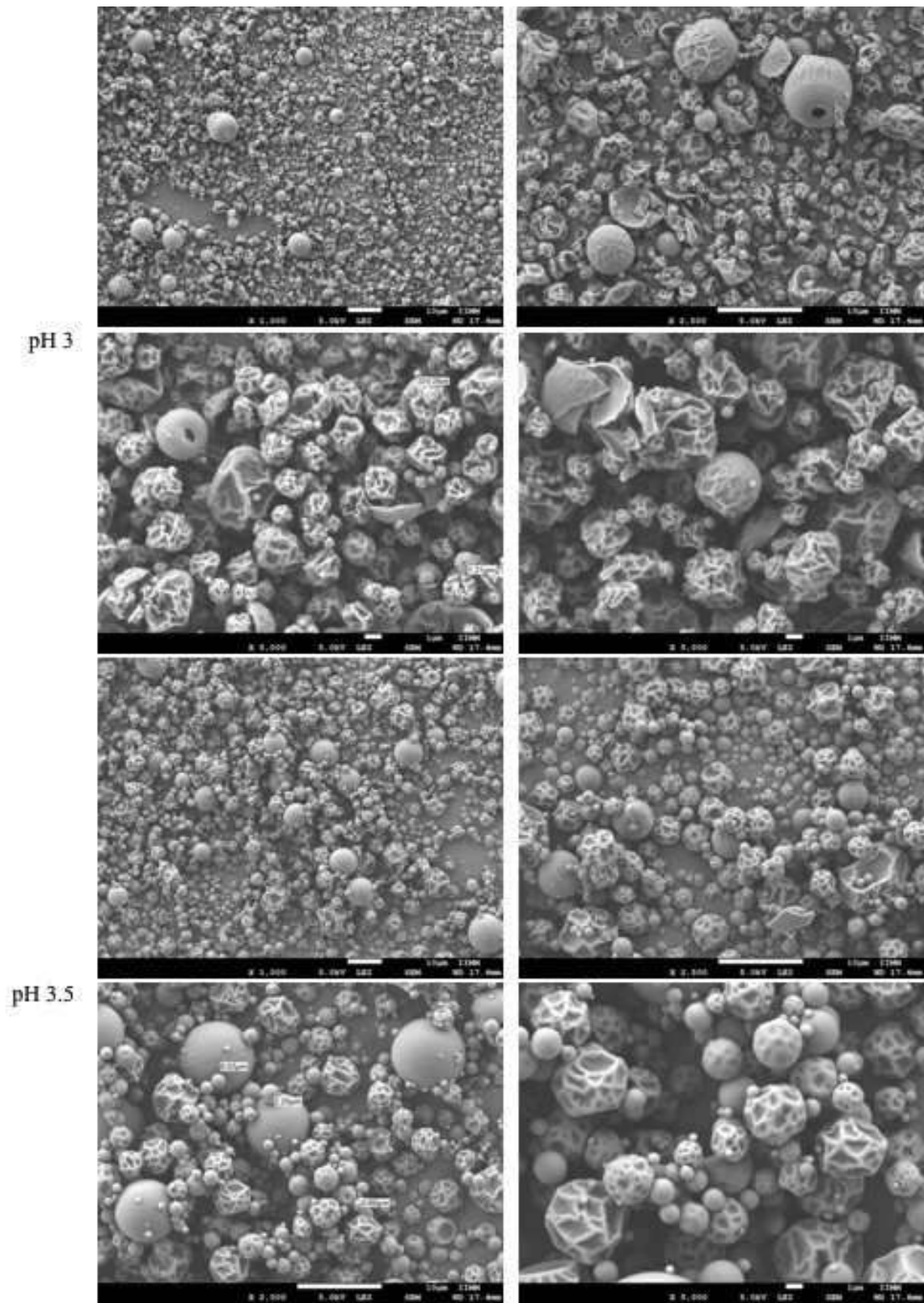


Figura 35. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 25-75.

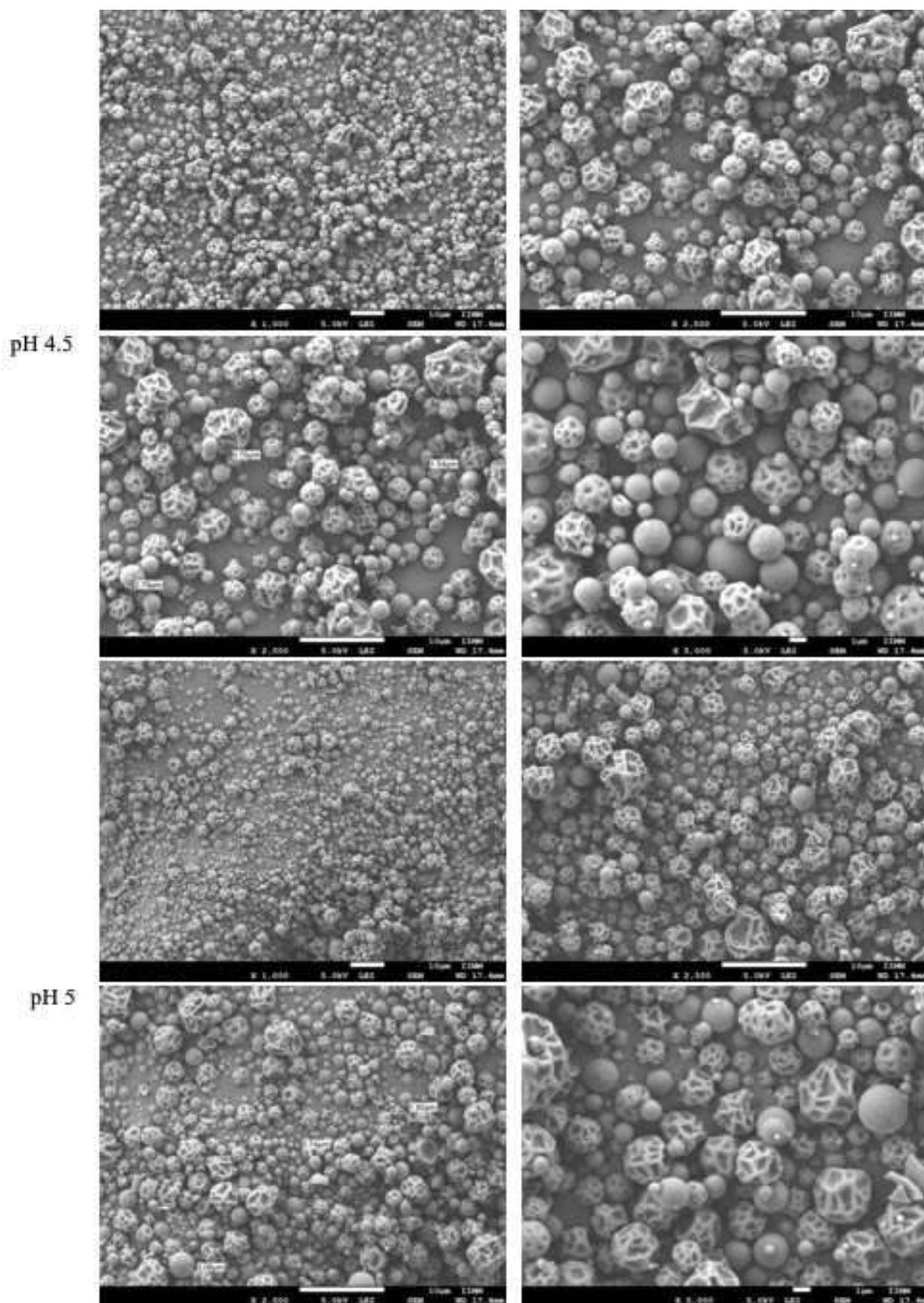


Figura 36. Micrografías MEB de las nanocápsulas de las formulaciones CCMDE 25-75.

8.7.5. Cuantificación de compuestos fenólicos en extracto purificado de *Q. crassifolia* secado por aspersión y nanoencapsulado

Se determinó la concentración de compuestos fenólicos del extracto purificado de *Q. crassifolia* secado por aspersión (Figura 37 a), así como de las nanocápsulas del mismo extracto (Figura 37 b).



Figura 37. Extracto de *Q. crassifolia* a) secado por aspersión, b) nanocápsulas.

Como se observa en la Tabla 36, la cantidad de compuestos fenólicos por gramo de extracto encapsulado disminuyó notablemente, tanto para fenoles totales, flavonoides totales, ácidos hidroxicinámicos y proantocianidinas, debido a que al mezclar los materiales de pared con el extracto de encino, rico en compuestos fenólicos, estos se diluyen, no obstante, al comparar con lo reportado por Yilma *et al.* (2006), quienes determinaron la concentración de fenoles totales de extractos de piel de uva (14.99 ± 5.97 mg EAG/g), que se caracteriza por un alto contenido en compuestos fenólicos, en nuestro estudio el extracto nanoencapsulado de *Q. crassifolia* tuvo una mayor concentración (18.82 ± 0.2 mg EAG/g).

Tabla 36. Concentración de fenoles del extracto de corteza de *Q. crassifolia* sin encapsular y nanoencapsulado.

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides totales (mg EQ/g)	Ácidos hidroxicinámicos (mg EACI/g)	Proantocianidinas (mg ECIC/g)
Extracto purificado de <i>Q. crassifolia</i>	664 ± 29*	37.30 ± 3.11*	25.31 ± 9.48*	10.34 ± 0.22*
Nanocápsulas de extracto de <i>Q. crassifolia</i>	18.82 ± 0.2	3.13 ± 0.05	0.12 ± 0.07	0.03 ± 0.00

Las medias con * en la misma columna son significativamente diferentes. Prueba T ($p < 0.05$). Donde: EAG, equivalentes de ácido gálico; EQ, equivalentes de quercetina; EACI, equivalentes de ácido clorogénico y ECIC, equivalentes de cloruro de cianidina.

8.7.6. Capacidad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia* secado por aspersión y nanoencapsulado

En la Tabla 37 se observa la capacidad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia* secado por aspersión y del extracto nanoencapsulado. Los valores de IC₅₀ de las nanocápsulas, para captar al radical hidroxilo, superóxido, peróxido y peróxido de hidrógeno son mayores a los determinados al extracto de encino, correspondiendo con la concentración de compuestos fenólicos disminuidos en las nanocápsulas debido a la adición del material de pared.

Tabla 37. Actividad antioxidante del extracto de *Q. crassifolia* secado por aspersión y nanoencapsulado.

Extracto	OH• IC ₅₀ (µg/mL)	O ₂ •- IC ₅₀ (µg/mL)	ROO• IC ₅₀ (µg/mL)	H ₂ O ₂ IC ₅₀ (µg/mL)
Extracto de <i>Q. crassifolia</i> secado por aspersión	957.28 ± 65.28	385.49 ± 34.59	709.37 ± 17.10	60.6 ± 7.9
Nanocápsulas de extracto de <i>Q. crassifolia</i>	32710 ± 920	14740 ± 5060	44300 ± 440	6900 ± 700

8.7.7. Tamaño de partícula

El tamaño medio de las nanocápsulas se muestra en la Tabla 38, en la que se observa que el tamaño de partícula se encontró entre los rangos de 198 a 471 nm para CCMDE 50-50 mientras que para CCMDE 25-75 el rango fue de 299 a 341 nm, sin embargo, no se mostraron diferencias en el tamaño de las partículas entre las diferentes formulaciones. Dichos rangos concuerdan con los reportados por Orozco-Alfaro (2017) de 206.73 y 356.50 nm, mientras que Mancilla en 2014, reportó tamaños de partícula de 2173 nm utilizando también Nano Spray Dryer bajo las mismas condiciones de secado (Mancilla-Dávalos *et al.*, 2014).

Tabla 38. Tamaño de las nanocápsulas.

Muestra	Tamaño de las nanocápsulas (nm)
CCMDE 50-50% pH 3	198.6 ± 67.2 ^a
CCMDE 50-50% pH 3.5	279.6 ± 180.4 ^a
CCMDE 50-50% pH 4.5	471.5 ± 246.8 ^a
CCMDE 50-50% pH 5	200 ± 57.5 ^a
CCMDE 25-75% pH 3	299.8 ± 97.2 ^a
CCMDE 25-75% pH 3.5	341.8 ± 196.4 ^a
CCMDE 25-75% pH 4.5	314.1 ± 77.9 ^a
CCMDE 25-75% pH 5	328 ± 117.4 ^a

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

8.8. Estandarización de la formulación del yogurt con nanocápsulas de extracto purificado de *Q. crassifolia*

Se realizaron las tres formulaciones de yogurt; yogurt con nanocápsulas, yogurt sin nanocápsulas y yogurt sin aceite vegetal. Posteriormente, se realizaron las pruebas reológicas, microbiológicas y el análisis proximal.

8.8.1. Análisis proximal

En la Tabla 39, se muestra el análisis químico-próximo de las diferentes formulaciones del yogurt: yogurt sin aceite vegetal ni nanocápsulas (F1), yogurt con aceite vegetal, sin nanocápsulas (F2) y yogurt plurifuncional, es decir con aceite vegetal y nanocápsulas (F3).

Tabla 39. Análisis proximal del yogurt; sin aceite vegetal (F1), con aceite vegetal (F2) y con nanocápsulas (F3).

Determinación	Muestra		
	F1	F2	F3
Humedad (%)	7.14 ± 4.82	7.14 ± 0.10	7.69 ± 0.72
Extracto Etéreo (%)	0.32 ± 0.22	1.43 ± 0.06	1.13 ± 0.09
Cenizas (%)	5.23 ± 0.07	5.09 ± 0.03	2.66 ± 0.06
Proteína (%)	20.48 ± 6.04	19.72 ± 0.15	21.43 ± 0.26
Fibra (%)	0.09 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.01 ± 0.03
Carbohidratos (%)	66.74 ± 2.24	66.51 ± 0.18	67.08 ± 0.80

En el análisis químico proximal realizado a las tres formulaciones previamente sometidas a deshidratación, se obtuvo una humedad del 7 % aproximadamente, mientras que el contenido de proteína incrementó de 19.72% de F2 y 20.48% de F1 a 21.43% con la incorporación de las nanocápsulas (F3), cabe mencionar el contenido de la proteína que fue aportado por la caseína al ser incorporada como material de pared en la formulación de las nanocápsulas. En tanto que la cantidad de lípidos fue menor (0.32%) en F1 ya que no se le adicionó el aceite vegetal, mientras que para F3 el porcentaje de lípidos disminuyó con las nanocápsulas, de 1.43 (F2) a 0.32%, esta misma tendencia a la baja en comparación con las formulaciones sin nanocápsulas (F2= 5.09% y F1= 5.23%) se observó para el contenido de cenizas (2.66%) y fibra (0.01%), mientras que el porcentaje de carbohidratos se mantuvo alrededor del 67% en promedio para las tres formulaciones.

8.8.2. Análisis microbiológico

En la Tabla 40 se muestran los resultados del análisis microbiológico en el que se observó que para F3 se detectó 1 UFC/g de hongos y levaduras. Así mismo se muestra que F2, F3 y el F1 contienen 4.73×10^6 , 3.01×10^6 y 3.74×10^6 UFC/g de yogurt, respectivamente. Como se puede notar, en el análisis microbiológico todas las formulaciones de yogurt están dentro de los límites de control que establece la Norma Mexicana NMX-F-444-1983 (*NMX-F-444-1983. Alimentos yogurt o leche búlgara.*, 1983). Este tipo de análisis es útil para determinar si el proceso de elaboración del producto se lleva a cabo bajo las condiciones de inocuidad adecuada y conocer si se tiene alguna contaminación durante el proceso (*NMX-F-444-1983. Alimentos yogurt o leche búlgara.*, 1983).

Tabla 40. Microorganismos detectados en las diferentes formulaciones de yogurt.

Microorganismo	F1	F2	F3	NMX-F-444-1983
Hongos y levaduras	No detectable	No detectable	1 UFC/g	Máximo 10 UFC/g
Coliformes totales	No detectable	No detectable	No detectable	Máximo 10 UFC/g
Bacterias lácticas (<i>S. thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>)	3.75×10^6	4.73×10^6	3.01×10^6	Mínimo 2,000 000 UFC/g

8.8.3. Análisis fisicoquímicos

En la Tabla 41 se muestran los resultados del análisis fisicoquímico a que fueron sometidas las formulaciones de yogurt. Se determinó el porcentaje de ácido láctico presente en cada una de las diferentes muestras, donde se observa que todas las formulaciones cumplen con lo establecido por la Norma NMX-F-511-1988, ya que el porcentaje mínimo permitido de ácido láctico es 0.5%. (*NMX-F-511-1988. Alimentos determinación de acidez en leche reconstituida.*, 1988). En cuanto

al pH, hay diferencia entre las formulaciones, estos valores son mayores a los reportados por Ruiz-Rivera y Ramírez-Matheus en 2009, que hicieron un yogurt con probióticos donde el valor de pH mayor fue de 4.64 ± 0.09 , estas diferencias pueden atribuirse a la incorporación del aceite vegetal modificando las propiedades del yogurt.

El grado de sinéresis para F2 y F3 fue de 84.18% y 73.42% respectivamente, no observándose cambios macroscópicos en ambas formulaciones, notándose en la formulación del yogurt sin aceite vegetal un grado mayor de sinéresis (90.09%). La viscosidad de cada formulación se comportó como un fluido no newtoniano, un pseudoplástico, al aumentar las rpm disminuye la viscosidad. La viscosidad fue mayor en el yogurt con nanocápsulas, además fue el que menor grado de sinéresis presentó, esto se debe a que presentó mayor cantidad de sólidos en la muestra, provocando el aumento de su viscosidad.

Tabla 41. Análisis fisicoquímicos de las diferentes formulaciones de yogurt.

Formulación	Ácido láctico %	pH	Sinerésis %	Viscosidad cP
F1	0.72 ± 0.02	4.38 ± 0.08	90.09 ± 4.17	150.13 ± 4.42
F2	0.69 ± 0.02	4.69 ± 0.01	84.18 ± 1.33	154.93 ± 8.25
F3	0.59 ± 0.05	4.78 ± 0.01	73.42 ± 1.24	341.42 ± 7.84

8.8.4. Evaluación sensorial

A. Selección y entrenamiento de jueces sensoriales

De los 50 participantes a los que se les aplicó la encuesta sociodemográfica, se eliminaron ocho debido a que eran fumadores o estaban tomando medicamentos controlados. Según los resultados de la prueba PROP, así como la prueba de sabores básicos y el entrenamiento para escalas, se eligieron 6 jueces sensoriales para realizar el perfil sensorial del yogurt.

En la Tabla 42 se presentan los 17 descriptores que utilizaron los evaluadores, de los cuales, 4 son de apariencia, 3 de aroma y 6 de sabor y textura en la boca, así como la frecuencia con que fueron mencionados cada uno de los atributos para cada formulación.

Tabla 42. Frecuencia en que los jueces sensoriales mencionaron los descriptores.

Atributo	Frecuencia mencionada total	F1	F2	F3
Apariencia homogénea	12	5	5	2
Color blanco	15	5	5	5
Color amarillo	5	3	0	2
Sinéresis	4	1	1	2
Olor ácido	9	3	3	3
Olor dulce	9	4	3	2
Olor cremoso	13	3	5	5
Sabor ácido	10	3	4	3
Sabor dulce	13	5	6	2
Sabor salado	2	0	0	2
Sabor fermentado	8	2	3	3
Sabor cremoso	12	5	4	3
Espeso	5	1	1	3
Textura homogéneo	15	5	5	5
Suavidad	16	6	5	5
Recubrimiento bucal	12	3	3	6
Astringente	3	1	0	2

Donde: F1 (Yogurt sin aceite vegetal), F2 (Yogurt sin nanocapsulas y con aceite vegetal) y F3 (Yogurt con aceite vegetal y nanocápsulas).

En la Tabla 43 se muestran los valores de p asociados a las pruebas Q de Cochran, donde se observa que los atributos que tuvieron una proporción elevada, indica que fue marcado con mayor frecuencia por los jueces que evaluaron el producto. También se aprecia que la muestra 671 (yogurt sin nanocápsulas) es más homogénea y dulce que la muestra 797 (yogurt con nanocápsulas), mientras que la muestra 797 fue percibida como salada por algunos jueces, sin embargo, no hay diferencias significativas ($p < 0.05$), se tomó a F1 como la formulación ideal.

Tabla 43. Valores p y proporciones de los atributos asociados a las pruebas Q de Cochran tomando a F1 como producto ideal.

Atributos	Valores p	671	797
Homogénea	0.083	0.833 (a)	0.333 (a)
Color blanco	1.000	0.833 (a)	0.833 (a)
Color amarillo	0.564	0.500 (a)	0.333 (a)
Sinerésis	0.317	0.167 (a)	0.333 (a)
Olor ácido	1.000	0.500 (a)	0.500 (a)
Olor dulce	0.083	0.833 (a)	0.333 (a)
Olor cremoso	1.000	0.833 (a)	0.833 (a)
Sabor ácido	1.000	0.500 (a)	0.500 (a)
Sabor dulce	0.317	1 (a)	0.833 (a)
Sabor salado	0.157	0 (a)	0.333 (a)
Sabor fermentado	0.317	0.333 (a)	0.500 (a)
Sabor cremoso	0.317	0.833 (a)	0.500 (a)
Espeso	0.157	0.167 (a)	0.500 (a)
Homogéneo	1.000	0.833 (a)	0.833 (a)
Suavidad	0.317	1 (a)	0.833 (a)
Recubrimiento bucal	0.180	0.333 (a)	0.833 (a)
Astringente	0.564	0.167 (a)	0.333 (a)

De acuerdo a la Figura 38, el yogurt ideal, es decir, de la formulación F1 debe ser ácido, homogéneo, cremoso, presentar color blanco, sabor fermentado y un sabor ácido. Mientras que se espera que los atributos sensoriales como recubrimiento bucal, olor dulce, ácido, así como suavidad, estén presentes, pero con menor intensidad. Además, se aprecia que el producto más parecido al ideal es la F2 yogurt sin nanocápsulas y con aceite vegetal, con atributos como sabor dulce, apariencia homogénea, sabor cremoso y suavidad son los más característicos, en tanto que la fórmula F3, yogurt con nanocápsulas, es la más lejana, debido a sus características astringentes, sabor salado, es más espeso y presenta color amarillo en comparación con el producto F1.

En la Tabla 44 se muestran las correlaciones entre los atributos sensoriales de los productos y la evaluación hedónica global que se hizo de las tres formulaciones de yogurt. Así podemos notar que la apariencia homogénea, el olor dulce, olor cremoso, sabor dulce, sabor cremoso y la suavidad, están positivamente correlacionados con la evaluación global hedónica, mientras que atributos como sinéresis, sabor ácido, sabor salado, el recubrimiento bucal y el sabor salado presentan una correlación negativa con la evaluación hedónica.

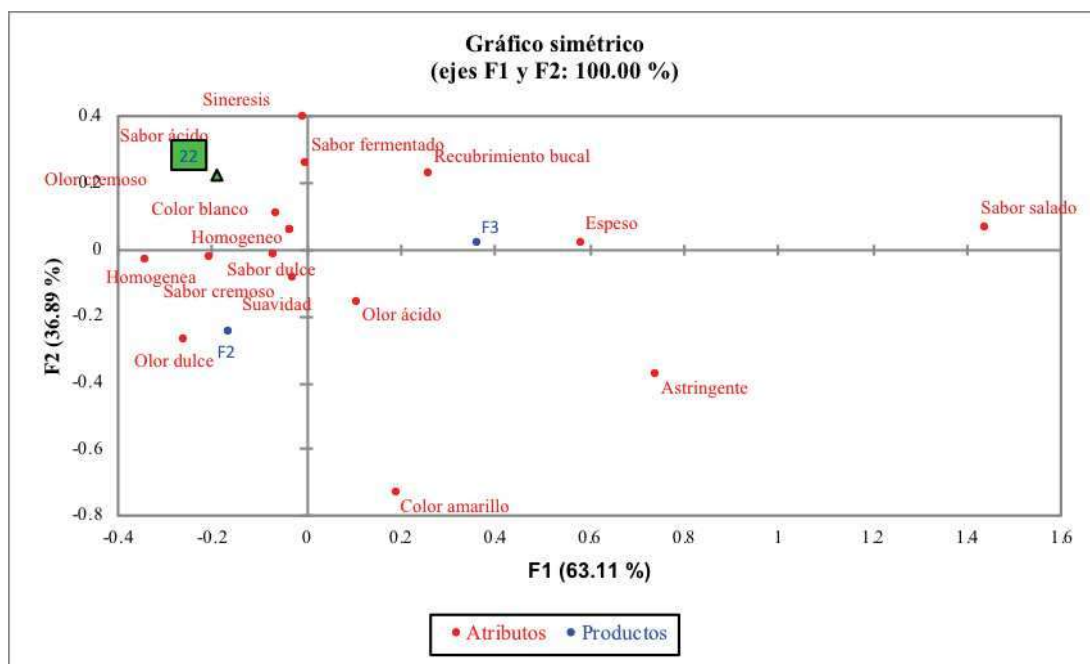


Figura 38. Atributos sensoriales de cada formulación de yogurt.

Tabla 44. Mapa sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.

	Homogénea	Color blanco	Color amarillo	Sinerésis	Olor agrio	Olor dulce	Olor cremoso	Sabor agrio	Sabor dulce	Sabor salado	Sabor fermentado	Sabor cremoso	Espeso	Homogéneo	Suavidad	Recubrimiento bucal	Astringente	Evaluación global
Homogénea	1	0.140	0.046	-0.997	0.265	0.477	0.140	-0.723	0.956	-0.991	0.046	0.696	-0.193	0.140	0.956	-0.046	0.170	0.577
Color blanco	0.140	1	-0.991	-0.451	-0.970	0.140	-0.878	0.000	-0.844	0.878	-0.140	0.288	0.936	0.651	-0.844	0.140	-0.451	0.232
Color amarillo	0.046	-0.991	1	-0.170	-0.265	0.570	0.956	-0.265	0.916	-0.956	0.860	0.391	0.193	-0.140	0.916	0.046	-0.170	0.157
Sinerésis	-0.997	-0.451	-0.170	1	0.325	-0.476	-0.451	0.987	-0.983	0.451	-0.170	-0.627	-0.962	0.911	0.863	0.170	0.197	-0.479
Olor agrio	0.265	-0.970	-0.265	0.325	1	-0.723	-0.970	0.500	-0.937	0.000	-0.723	-0.549	-0.995	0.000	0.937	-0.265	0.325	-0.165
Olor dulce	0.477	0.140	0.570	-0.476	-0.723	1	0.991	-0.265	0.956	-0.991	0.570	0.878	0.391	0.140	0.956	-0.570	0.170	0.459
Olor cremoso	0.140	-0.878	0.956	-0.451	-0.970	0.991	1	-0.970	0.998	-0.651	0.956	0.992	0.936	-0.878	-0.844	0.140	-0.451	0.432
Sabor agrio	-0.723	0.000	-0.265	0.987	0.500	-0.265	-0.970	1	-0.937	0.000	-0.265	-0.549	-0.549	0.970	0.937	-0.723	-0.325	-0.358
Sabor dulce	0.956	-0.844	0.916	-0.983	-0.937	0.956	0.998	-0.937	1	-0.996	0.916	0.972	0.891	-0.844	-0.787	-0.916	-0.983	0.507
Sabor salado	-0.991	0.878	-0.956	0.451	0.000	-0.991	-0.651	0.000	-0.996	1	-0.956	-0.992	0.288	-0.651	-0.996	0.956	0.451	-0.631
Sabor fermentado	0.046	-0.140	0.860	-0.170	-0.723	0.570	0.956	-0.265	0.916	-0.956	1	0.391	0.696	0.956	0.916	0.570	-0.170	0.071
Sabor cremoso	0.696		0.391	-0.627	-0.549	0.878	0.992	-0.549	0.972	-0.992	0.391	1	0.213	0.288	0.972	-0.391	0.000	0.765
Espeso	-0.193		0.193	-0.962	-0.995	0.391	0.936	-0.549	0.891	0.288	0.696	0.213	1	-0.288	-0.972	0.391	0.000	0.098
Homogéneo	0.140		-0.140	0.911	0.000	0.140	-0.878	0.970	-0.844	-0.651	0.956	0.288	-0.288	1	0.998	0.140	-0.451	0.206
Suavidad	0.956		0.916	0.863	0.937	0.956	-0.844	0.937	-0.787	-0.996	0.916	0.972	-0.972	0.998	1	-0.916	0.863	0.344
Recubrimiento bucal	-0.046		0.046	0.170	-0.265	-0.570	0.140	-0.723	-0.916	0.956	0.570	-0.391	0.391	0.140	-0.916	1	0.170	-0.170
Astringente	0.170		-0.170	0.197	0.325	0.170	-0.451	-0.325	-0.983	0.451	-0.170	0.000	0.000	-0.451	0.863	0.170	1	-0.337
Evaluación global	0.577		0.157	-0.479	-0.165	0.459	0.432	-0.358	0.507	-0.631	0.071	0.765	0.098	0.206	0.344	-0.170	-0.337	1

Las puntuaciones hedónicas parecen estar positivamente correlacionadas con los atributos que están vinculados con el producto ideal (ácido, homogéneo, cremoso, color blanco, sabor fermentado), excepto por el sabor ácido.

En la Figura 39 se observa el Análisis de Coordenadas Principales en donde nuevamente vemos que la evaluación global hedónica está relacionada con el sabor dulce, fermentado y cremoso y la apariencia homogénea. Como se observa, también está presente el color amarillo, que en el producto ideal está ausente, sin embargo, en el producto que se está analizando está presente.

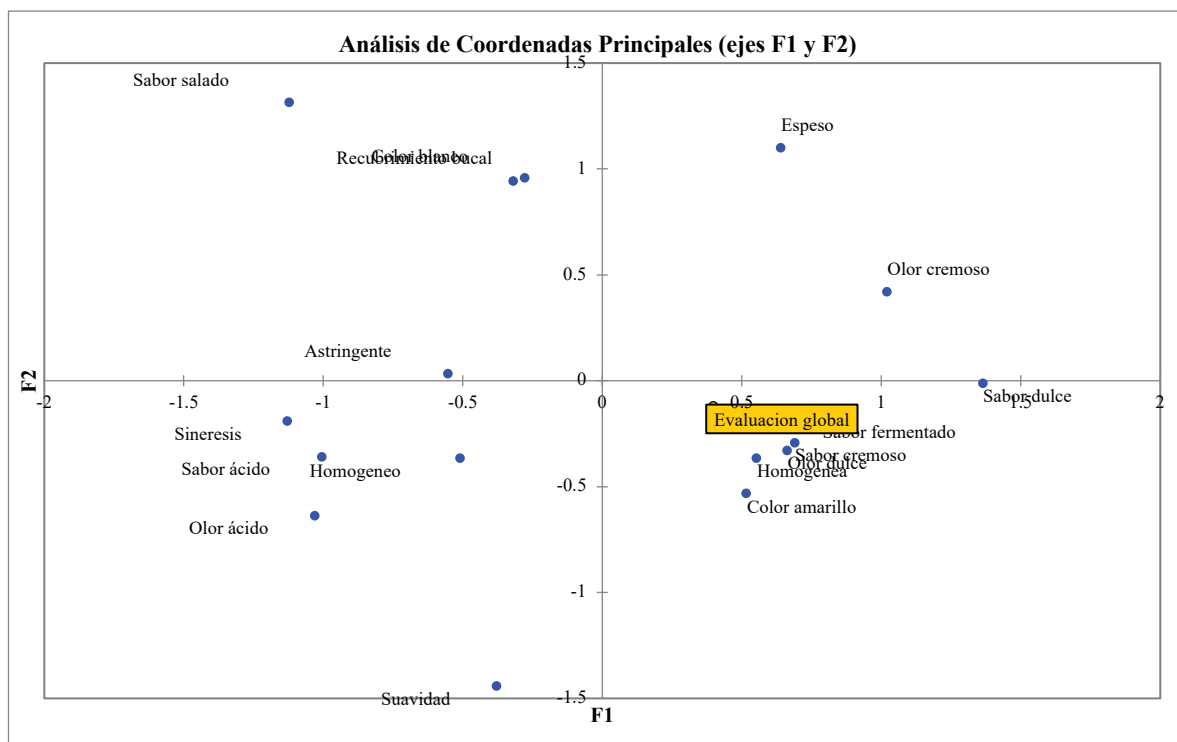


Figura 39. Coordenadas principales con descriptores de la escala hedónica.

En la Tabla 45 se muestra el Análisis de Varianza de la Evaluación global hedónica. Como se aprecia, el yogurt sin nanocápsulas obtuvo la mayor puntuación, seguida del yogurt sin grasa y por último el yogurt con nanocápsulas, sin embargo, no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones del yogurt con nanocápsulas, sin nanocápsulas y sin aceite vegetal.

Tabla 45. Análisis de Varianza de la escala hedónica de las diferentes muestras de yogurt.

Muestra	Calificación de evaluación global
F1	63.94 ± 16.57 ^a
F2	65.91 ± 25.65 ^a
F3	44.09 ± 28.46 ^a

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

En la Figura 40 se observa el perfil sensorial de las formulaciones de yogurt, los panelistas no entrenados utilizaron los descriptores establecidos para caracterizar cada formulación de yogurt, describieron el yogurt sin nanocápsulas, con una apariencia homogénea, color blanco, con un olor dulce, sabor ácido, cremoso, textura homogénea y suavidad, con una mayor aceptación que las otras dos formulaciones, mientras que a la muestra del yogurt con nanocápsulas lo describieron, de color blanco en menor medida que el anterior, con sinéresis, con olor ácido, cremoso, sabor ácido, un poco salado, con una textura homogénea menor que las demás muestras, con recubrimiento bucal, astringente y una aceptación menor que las otras dos formulaciones. El yogurt sin aceite vegetal fue caracterizado con una textura homogénea, color amarillo, olor ácido y dulce, sabor cremoso y una aceptación mayor que el yogurt con nanocápsulas, pero menor que el yogurt sin nanocápsulas.

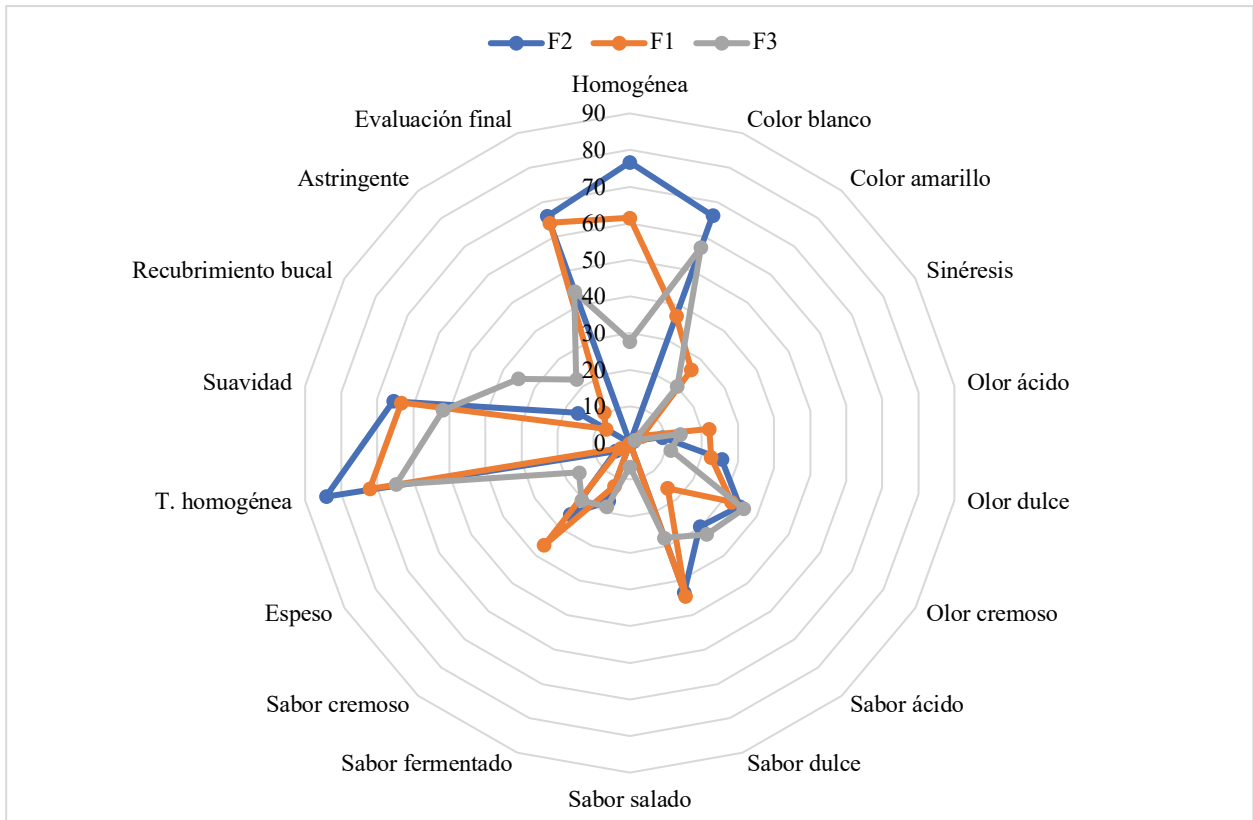


Figura 40. Perfil sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.

En la Figura 41 se observan las diferentes formulaciones que se separaron en cuadrantes, en el cuadrante superior e inferior izquierdo se encuentra el yogurt que se relaciona con atributos como sabor ácido, recubrimiento bucal, sabor fermentado, astringente, color amarillo, sabor dulce y astringente, características descritas para el yogurt con nanocápsulas. En el cuadrante superior derecho se agrupan las características para el yogurt sin nanocápsulas, las cuales fueron, apariencia homogénea, sabor fermentado, textura homogénea, olor dulce y cremoso, por último en el cuadrante inferior derecho, para el yogurt sin aceite vegetal se aprecian las características como textura suave, sabor dulce y olor cremoso.

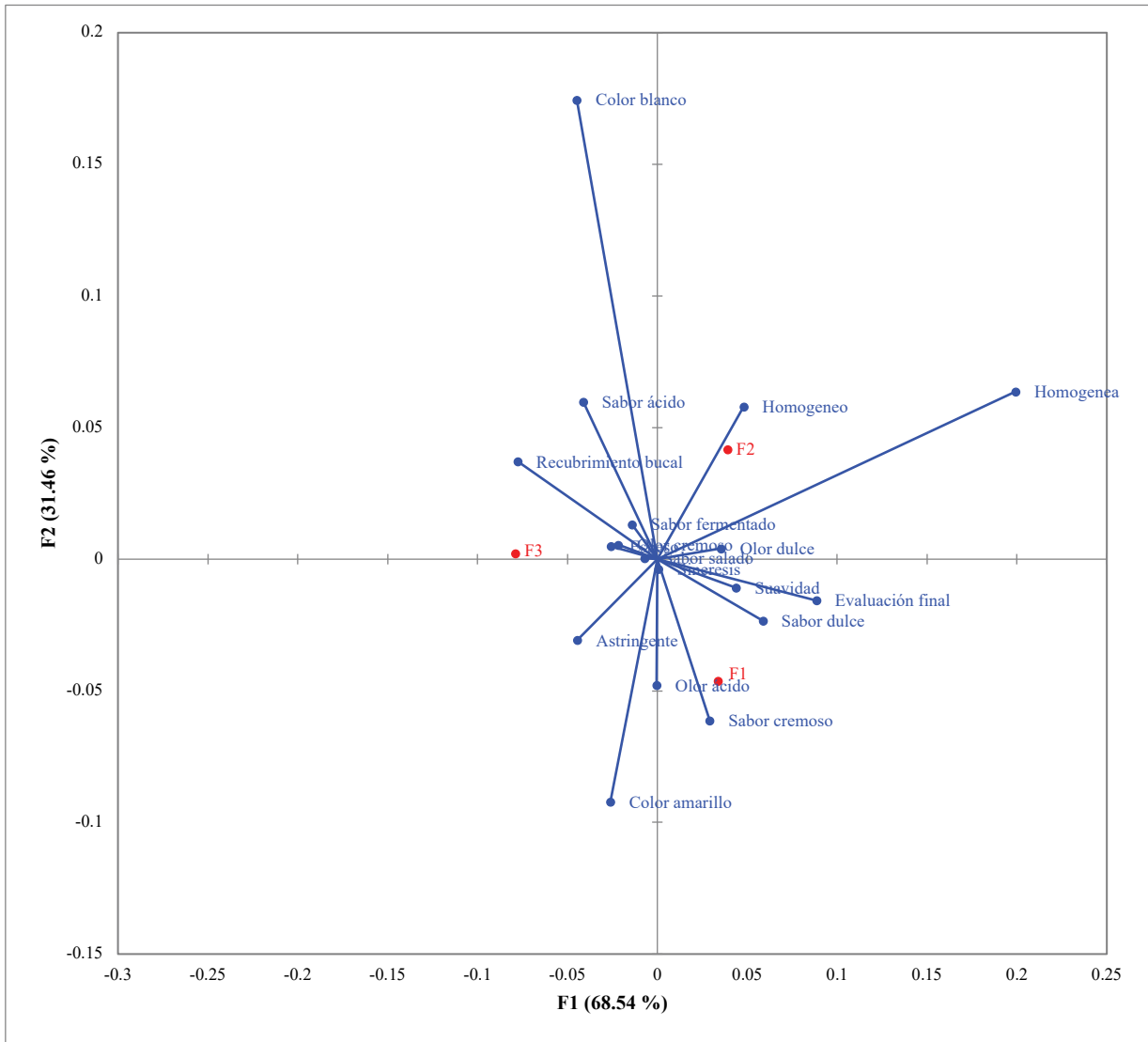


Figura 41. Mapa sensorial de las formulaciones de yogurt F1, F2 y F3.

8.9. Efecto de la administración del yogurt plurifuncional en hámsteres dislipidémicos

8.9.1. Consumo de alimento y peso corporal de los hámsteres

El peso de los hámsteres al momento de iniciar el experimento fue de 92.64 ± 9.48 . Mientras que en la Tabla 46 se muestra el peso final de los hámsteres de los diferentes grupos, el peso ganado, el consumo de alimento, así como la tasa de conversión alimenticia, en donde no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en las medias de peso ganado durante los 21 días, ni en la tasa de conversión alimenticia. El grupo G6Y presentó peso final mayor comparado con los grupos C1Y, G2M y G7N, en tanto que los grupos G3YGN, G4YG y G5EQ no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$). En cuanto al consumo de alimento, se observó que el grupo C1Y tuvo un mayor consumo de alimento en comparación con los grupos G2M, G5EQ, G6Y, siendo G7N el grupo con menor consumo.

Aunque algunos estudios han mostrado efectos en disminución de masa corporal al ingerir polifenoles, otros estudios en donde se han administrado catequina y epicatequina a sujetos (1.0 g/día) durante 2 semanas (Almoosawi *et al.*, 2010), aceite de regaliz rico en flavonoides (300 mg/día) durante 8 semanas (Bell *et al.*, 2011) o quercetina como suplemento (500 y 1000 mg/día) durante 12 semanas, no afectaron el peso o la composición corporal (Knab *et al.*, 2011).

Tabla 46. Datos de peso de los hámsteres y consumo de alimento de los hámsteres de los diferentes grupos.

Grupo	Peso final	Peso ganado (g/21 días)	Consumo de alimento (g/21 días)	Tasa de conversión alimenticia
C1Y	117.00±2 ^b	25.83±1.89 ^a	185.21±1.68 ^a	7.19±0.51 ^a
G2M	112.25±9.75 ^b	27.58±6.68 ^a	173.74± 5.30 ^{bc}	6.52±1.40 ^a
G3YGN	124.83±14.01 ^{ab}	25.58±1.53 ^a	181.36±5.14 ^{ab}	7.11±0.42 ^a
G4YG	118.80±9.92 ^{ab}	25.60±5.06 ^a	174.77± 7.31 ^{abc}	7.00±1.12 ^a
G5EQ	118.10±12.11 ^{ab}	22.40±8.18 ^a	170.56± 7.44 ^{bc}	8.46±3.02 ^a
G6Y	132.83±6.17 ^a	30.67±3.69 ^a	174.56±6.14 ^{bc}	5.75±0.73 ^a
G7N	117.40±6.05 ^b	24.10±4.19 ^a	168.83±5.26 ^c	7.19±1.31 ^a

8.9.2. Necropsia

Se realizó una observación macroscópica de los órganos de los animales. En la Figura 42 se visualizan los hígados de los diferentes grupos a los que se les administraron los tratamientos antes mencionados, existiendo un cambio de coloración de rojo a pálido, que se ha relacionado con hígado graso en gallinas (Hamilton & Garlich, 1971), que en este experimento se puede atribuir a la dieta hipercolesterolémica e hiperlipidémica.

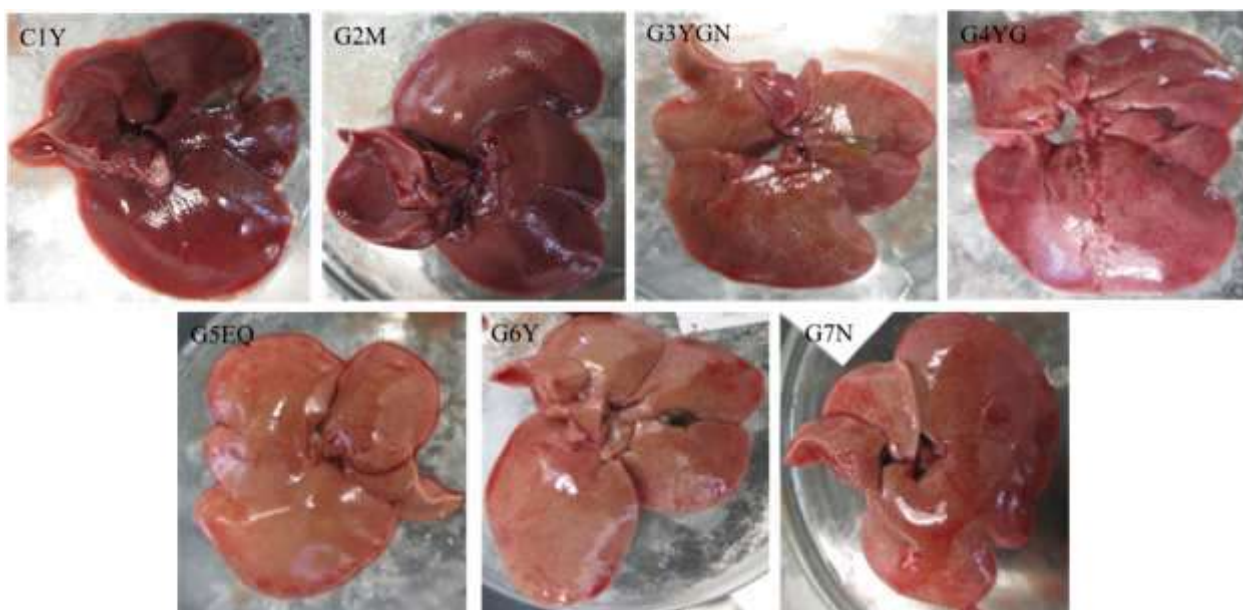


Figura 42. Hígados de hámsteres de los diferentes grupos.

A. Pesos absolutos y relativos de los órganos de los hámsteres

No se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los pesos absolutos de los órganos de los hámsteres, así como en el tejido adiposo, entre los grupos de prueba y el grupo control (C1Y), excepto en el hígado (Tabla 47). Los hígados de los grupos G6Y y G7N pesaron más que el grupo C1Y, mientras que los grupos G3YGN, G4YG y G5EQ no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) ni con el grupo control ni con el grupo G2M. Sin embargo, en los pesos relativos de los órganos de cada uno de los grupos, no se mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al compararlos con el grupo control (Tabla 48), excepto en el riñón derecho del grupo G6Y, por lo que no puede ser atribuido a un efecto producido por el extracto de encino.

Tabla 47. Medidas absolutas de los órganos de los hámsteres.

Órgano	Grupo						
	C1Y	G2M	G3YGN	G4YG	G5EQ	G6Y	G7N
Bazo (g)	0.20±0.02 ^a	0.17±0.05 ^a	0.19±0.01 ^a	0.21±0.04 ^a	0.21±0.03 ^a	0.25±0.04 ^a	0.21±0.03 ^a
Corazón (g)	0.54±0.08 ^a	0.44±0.05 ^a	0.67±0.16 ^a	0.54±0.07 ^a	0.55±0.04 ^a	0.58±0.09 ^a	0.51±0.09 ^a
Encéfalo (g)	0.91±0.08 ^a	1.00±0.05 ^a	0.95±0.10 ^a	1.01±0.07 ^a	1.00±0.02 ^a	1.06±0.04 ^a	1.01±0.04 ^a
Estómago (g)	0.89±0.10 ^a	0.77±0.00 ^a	0.87±0.10 ^a	0.88±0.14 ^a	0.85±0.04 ^a	0.94±0.04 ^a	0.88±0.07 ^a
Suprarrenal derecha (g)	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
Suprarrenal izquierda (g)	0.02±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.02 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
Hígado (g)	7.23±0.70 ^b	8.09±0.61 ^{ab}	7.57±0.7 ^{ab}	7.72±1.09 ^{ab}	7.88±1.22 ^{ab}	9.35±0.79 ^a	9.19±0.94 ^a
Intestino delgado (cm)	41.5±3.7 ^a	37.0±9.8 ^a	46.3±1.1 ^a	47.2±4.9 ^a	42.4±2.8 ^a	43.3±1.7 ^a	45.4±2.0 ^a
Intestino grueso (cm)	29.2±8.3 ^{ab}	19.3±6.6 ^b	35.5±7.3 ^a	38.4±2.4 ^a	34.8±2.9 ^a	35.3±1.7 ^a	37.0±4.2 ^a
Páncreas (g)	0.25±0.01 ^a	0.23±0.05 ^a	0.35±0.07 ^a	0.25±0.23 ^a	0.27±0.05 ^a	0.28±0.06 ^a	0.25±0.05 ^a
Pulmón derecho (g)	0.57±0.03 ^a	0.53±0.04 ^a	0.51±0.07 ^a	0.51±0.10 ^a	0.58±0.06 ^a	0.63±0.16 ^a	0.54±0.07 ^a
Pulmón izquierdo (g)	0.23±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.30±0.11 ^a	0.26±0.03 ^a	0.26±0.07 ^a	0.28±0.04 ^a	0.22±0.03 ^a
Riñón derecho (g)	0.56±0.05 ^{ab}	0.63±0.07 ^a	0.51±0.04 ^b	0.49±0.04 ^b	0.47±0.01 ^b	0.51±0.02 ^b	0.49±0.01 ^b
Riñón izquierdo (g)	0.56±0.04 ^{ab}	0.61±0.09 ^a	0.53±0.05 ^{ab}	0.51±0.02 ^{ab}	0.47±0.03 ^b	0.56±0.01 ^{ab}	0.5±0.02 ^{ab}
Tiroides (g)	0.13±0.02 ^a	0.16±0.07 ^a	0.17±0.08 ^a	0.19±0.09 ^a	0.11±0.05 ^a	0.12±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a

Tejido adiposo (g)	2.77±0.01 ^a	2.75±0.23 ^a	4.30±2.42 ^a	3.92±0.62 ^a	4.26±0.97 ^a	4.99±0.34 ^a	4.00±0.68 ^a
--------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

Tabla 48. Pesos relativos de los órganos de los hámsteres (%).

Órgano	Grupo						
	C1Y	G2M	G3YGN	G4YG	G5EQ	G6Y	G7N
Bazo	0.18±0.10 ^a	0.16±0.03 ^a	0.16±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a	0.17±0.01 ^a	0.18±0.03 ^a	0.17±0.01 ^a
Corazón	0.48±0.05 ^a	0.42±0.02 ^a	0.55±0.17 ^a	0.44±0.09 ^a	0.45±0.03 ^a	0.41±0.05 ^a	0.41±0.06 ^a
Encéfalo	0.82±0.12 ^{ab}	0.97±0.11 ^a	0.76±0.12 ^{ab}	0.82±0.09 ^{ab}	0.81±0.06 ^{ab}	0.76±0.02 ^b	0.82±0.05 ^{ab}
Estómago	0.80±0.04 ^a	0.75±0.06 ^{ab}	0.70±0.11 ^{ab}	0.71±0.12 ^{ab}	0.69±0.06 ^{ab}	0.67±0.01 ^b	0.71±0.04 ^{ab}
Suprarrenal derecha	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a
Suprarrenal izquierda	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a
Hígado	6.51±1.01 ^a	7.78±0.06 ^a	6.13±1.13 ^a	6.19±0.45 ^a	6.31±0.47 ^a	6.64±0.29 ^a	7.41±0.77 ^a
Páncreas	0.22±0.00 ^a	0.16±0.10 ^a	0.28±0.05 ^a	0.19±0.17 ^a	0.22±0.05 ^a	0.20±0.04 ^a	0.20±0.04 ^a
Pulmón derecho	0.51±0.00 ^a	0.51±0.08 ^a	0.41±0.08 ^a	0.41±0.07 ^a	0.47±0.07 ^a	0.44±0.09 ^a	0.44±0.07 ^a
Pulmón izquierdo	0.21±0.02 ^a	0.23±0.03 ^a	0.24±0.10 ^a	0.21±0.02 ^a	0.20±0.04 ^a	0.20±0.04 ^a	0.18±0.02 ^a
Riñón derecho	0.51±0.08 ^{ab}	0.62±0.12 ^a	0.41±0.05 ^{bc}	0.40±0.02 ^{bc}	0.38±0.03 ^{bc}	0.36±0.01 ^c	0.39±0.02 ^{bc}
Riñón izquierdo	0.51±0.06 ^{ab}	0.60±0.15 ^a	0.42±0.06 ^b	0.41±0.03 ^b	0.38±0.03 ^b	0.40±0.02 ^b	0.40±0.02 ^b
Tiroides	0.12±0.03 ^a	0.16±0.09 ^a	0.14±0.08 ^a	0.15±0.06 ^a	0.09±0.04 ^a	0.09±0.01 ^a	0.06±0.03 ^a

Tejido adiposo	2.48±0.14 ^a	2.65±0.05 ^a	3.42±2.09 ^a	3.13±0.32 ^a	3.39±0.47 ^a	3.55±0.14 ^a	3.20±0.43 ^a
----------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

B. Determinación de lípidos en hígado y heces

En la Tabla 49 se muestran el extracto etéreo en base seca de los hígados y heces de los diferentes grupos de hámsteres. El grupo C1Y tuvo un mayor porcentaje de lípidos en hígado, sin embargo, no fue diferente ($p < 0.05$) con los grupos G2M, G3YGN, G4YG y G6Y, mientras que los grupos G5EQ y G7N, tratamientos que incluyen el extracto de encino purificado secado por aspersión y nanoencapsulado, tuvieron un menor contenido lipídico en hígado, destacando que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con el grupo al que se le administró el medicamento. Esto concuerda con los resultados reportados por Mulvihill *et al.* (2009), quienes al administrar naringenina (3%) a ratones durante 4 semanas observaron la disminución de la sobreproducción de lipoproteínas apoB100, atenuando la acumulación de lípidos en hígado (Mulvihill *et al.*, 2009), este mismo equipo de investigación administró naringenina a ratones y ratones carentes del gen LDLR, ambos sometidos a dietas hiperlipídicas, reduciendo esteatosis hepática así como hiperinsulinemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, efectos atribuidos a la reducción tanto en la síntesis de colesterol como en la esterificación y la disminución de triglicéridos hepáticos a través de un aumento de la oxidación de ácidos grasos, lo que lleva a una reducción de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, previniendo dislipidemias (Mulvihill *et al.*, 2010).

En cuanto al porcentaje de lípidos en heces (Tabla 49) se observó un significativo ($p < 0.05$) menor porcentaje de lípidos en las heces del grupo C1Y, indicador de grasa en la dieta que el cuerpo no absorbe. Los grupos G2M, G3YGN, G4YG, G5EQ, G6Y, G7N no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos, no obstante se observa una tendencia no significativa en los grupos G2M, G3YGN, G6Y y G4YG, grupos que tienen en común como tratamiento la adición de la grasa vegetal. Mientras que los grupos G7N y G5EQ, aunque presentan menores porcentajes de lípidos en heces, la diferencia no es significativa con los grupos a los que se les administró la grasa vegetal en el yogurt, en tanto que sí hay una diferencia significativa con el control, además de que en hígado, presentan menores porcentajes de lípidos. El consumo de té de oolong,

enriquecido con polifenoles como catequinas y ácidos hidroxycinámicos, incrementó la excreción de lípidos de 13% en el placebo a 21% a los sujetos a los que se administró la bebida, elucidaron que esos resultados fueron obtenidos debido a que los polifenoles contenidos en el té de oolong influyen en la absorción intestinal de lípidos ingeridos en la dieta debido a la inhibición de la actividad de la lipasa (Hsu *et al.*, 2006).

Tabla 49. Extracto etéreo de hígado y heces de los hámsteres.

GRUPO	Hígado (%)	Heces (%)
C1Y	29.68± 2.97 ^a	3.29 ± 1.98 ^b
G2M	24.19± 5.29 ^{ab}	19.89 ± 4.83 ^a
G3YGN	26.71 ± 2.78 ^{ab}	16.15 ± 1.80 ^a
G4YG	25.87± 2.93 ^{ab}	15.17 ± 1.318 ^a
G5EQ	22.79± 1.21 ^b	14.829 ± 0.415 ^a
G6Y	25.79± 2.18 ^{ab}	16.10 ± 2.00 ^a
G7N	23.00± 2.06 ^b	14.71 ± 0.78 ^a

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

* Sobre base seca, % en peso.

C. Análisis bioquímico en suero e hígado

En la Tabla 50 se muestra la concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y el índice aterogénico en suero, mientras que en hígado se determinó colesterol y triglicéridos.

La dieta hiperlipidémica e hipercolesterolémica aumentó la concentración en suero de glucosa, colesterol, triglicéridos, y lipoproteínas de baja y alta densidad. En cuanto a la concentración de glucosa, G6Y no mostró diferencias con C1Y ni con G2M. En tanto que los grupos G3YGN, G5EQ y G4YG no mostraron diferencias con el grupo al que se le administró el bezafibrato y la lovastatina. Tanto los ácidos grasos poli-insaturados como algunos polifenoles se han asociado en la reducción de la concentración de glucosa. Los primeros, inhiben la transcripción del gen HNF-4 α . HNF-4 α afecta a los genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo tanto de las grasas como de los carbohidratos, incluidas las apolipoproteínas CIII, AI, AIV en el

metabolismo de las lipoproteínas, L-piruvato quinasa en el metabolismo de los carbohidratos y CYP7A en la síntesis de ácidos biliares (Davidson, 2006). Las catequinas del té verde, pueden reducir la absorción de glucosa por la inhibición de las enzimas gastrointestinales relacionadas al metabolismo de azúcares, como alfa amilasa y alfa-glucosidasa (Rains *et al.*, 2011). En cuanto a los probióticos, en un meta-análisis se demostró que la suplementación con probióticos redujo significativamente la concentración de glucosa y mitigó la resistencia a la insulina, sin embargo, aún existe una gran heterogeneidad en los resultados encontrados de la participación de los probióticos en el metabolismo de los lípidos (Rains *et al.*, 2011).

En los niveles de colesterol en suero, se obtuvo una menor concentración en los grupos C1Y y G2M, seguidos por G3YGN, G4YG, que no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), en tanto que los grupos G6Y y G5EQ no son estadísticamente diferentes de G3YGN y G4YG, sin embargo, tampoco presenta diferencias con G7N, el grupo con la mayor concentración de colesterol en suero. Esta tendencia pudiera ser atribuida a la presencia de ácidos grasos insaturados en el yogurt, ya que el yogurt sin grasa, así como el extracto y las nanocápsulas muestran las concentraciones más elevadas de colesterol. Se ha visto que al tratar células con ácidos grasos insaturados, la secreción de colesterol por los macrófagos, mediada por ABCA1, es suprimida al aumentar la tasa de degradación de ABCA1 (Wang & Oram, 2002).

La concentración de triglicéridos en suero muestra los valores más bajos en los grupos C1Y y G2M, seguido por los grupos G5EQ, G6Y, G3YGN y G4YG, destacando el grupo al que se le administró el extracto de *Q. crassifolia*, que muestra valores similares (213.04 ± 39.87) a los presentados por el grupo al que se le administró el medicamento (155.21 ± 61.52). Se ha reportado que la naringenina, un flavonoide derivado de los cítricos, previene la hipertrigliceridemia, incrementando la oxidación hepática de ácidos grasos a través del Coactivador 1-alfa del Receptor gamma Activado por Proliferadores de Peroxisomas, además de mejorar la utilización de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Mulvihill *et al.*, 2009). En tanto que los polifenoles de uva, principalmente flavanos, antocianinas, quercetina, miricetin, kaempferol y resveratrol, disminuyeron la concentración de triglicéridos en plasma de conejillos de Indias ovariectomizados (Zern *et al.*, 2018).

En la Tabla 50 se observan también los valores de colesterol HDL y LDL. Para el primero, se observan concentraciones mayores que las de los grupos C1Y y G2M, en todos los tratamientos, destacando los grupos G6Y, G5EQ, G7N, G3YGN. Las concentraciones de colesterol LDL menores se muestran en los grupos C1Y y G2M, mientras que los grupos G3YGN, G6Y, G4YG y G7N no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos, siendo el grupo al que se le administró el extracto el que presenta mayores concentraciones de LDL. El índice aterogénico indica el riesgo de padecer esterosclerosis. Los valores menores se obtuvieron en los grupos C1Y y G2M, seguidos por los grupos G3YGN, G6Y, G4YG, G5EQ y G7N.

Se cree que las HDL protegen contra la aterosclerosis al promover la eliminación del exceso de colesterol de los macrófagos de la pared arterial. Este aclaramiento es facilitado por el transportador de casete de unión a ATP, ABCA1, que interviene en el transporte de colesterol y fosfolípidos celulares hacia las apolipoproteínas HDL pobres en lípidos (Wang & Oram, 2002).

El consumo humano de aceite de oliva, rico en ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (18:1 n-9) y polifenoles como hidroxityrosol, tyrosol y oleuropeína, ha sido asociado al mejoramiento del perfil lipídico, incrementando la concentración de HDL (Covas *et al.*, 2013), disminuye el estrés oxidativo, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas, haciendo que las LDL sean menos aterogénicas, además, los polifenoles del aceite de oliva aumentan el tamaño de las partículas de HDL, mejorando su estabilidad y la fluidez de la capa fosfolípida, mostrando que los polifenoles tyrosol e hidroxityrosol, estimulan la expresión de la proteína ABCA1 en macrófagos J774 (Berrougui *et al.*, 2015).

Tabla 50. Análisis bioquímico en suero e hígado de los hámsteres.

Parámetro	Grupo						
	C1Y	G2M	G3YGN	G4YG	G5EQ	G6Y	G7N
Suero							
Glucosa		224.549±	360.232±	392.330±	381.521±	322.145±	496.939±
mg/dl	216.617±6.21 ^c	112.08 ^{bc}	53.94 ^{ab}	95.90 ^{ab}	29.94 ^{ab}	59.44 ^{abc}	117.92 ^a
Colesterol	155.17±	117.43±	374.15±	374.85±	487.05±	425.61±	539.13±
mg/dl	3.26 ^c	24.49 ^c	64.25 ^b	31.17 ^b	34.54 ^{ab}	34.60 ^{ab}	100.60 ^a

Triglicéridos	119.66±	155.21±	284.29±	375.79±	213.04±	293.37±	496.75±
mg/dl	8.86 ^c	61.52 ^{bc}	72.93 ^{ab}	155.71 ^{ab}	39.87 ^b	57.38 ^{ab}	172.25 ^a
Colesterol	104.384±	117.625±	183.46±	172.18±	203.00±	203.663±	195.89±
HDL mg/dl	5.59 ^c	23.46 ^c	31.14 ^{ab}	12.17 ^b	29.53 ^{ab}	6.36 ^a	25.73 ^{ab}
Colesterol	30.27±	33.34±	139.63±	162.96±	246.99±	162.22±	199.04±
LDL mg/dl	4.10 ^c	1.33 ^c	37.13 ^b	73.86 ^{ab}	38.44 ^a	24.88 ^b	77.17 ^{ab}
Índice	1.56±	1.45±	2.06±	2.18±	2.44±	2.11±	2.872±
aterogénico	0.07 ^b	0.12 ^b	0.21 ^{ab}	0.136 ^{ab}	0.35 ^{ab}	0.22 ^{ab}	0.99 ^a
(CT/HDL)							
Hígado							
Colesterol	59.29±	31.96±	71.98±	68.34±	56.04±	91.95±	17.7±
mg/dl	2.04 ^{abc}	7.48 ^{bc}	14.64 ^{ab}	15.29 ^{ab}	14.82 ^{abc}	32.00 ^a	22.50 ^c
Triglicéridos	157.23±	97.95±	184.40±	167.34±	142.16±	173.66±	246.60±
mg/dl	2.08 ^{ab}	36.26 ^b	29.78 ^{ab}	47.06 ^{ab}	19.31 ^b	31.19 ^{ab}	53.60 ^a

Medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0.05$ (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).

La menor concentración de colesterol en hígado se presentó en el grupo al que se le administraron las nanocápsulas (G7N) y el extracto de encino (G5EQ), sin encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) con los grupos C1Y y G2M. Al determinar la concentraciones de triglicéridos en hígado destacó el grupo G5EQ, que no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) al compararlo con G2M, los cuales presentaron las menores concentraciones de triglicéridos en hígado, seguidos por G4YG, G6Y y G3YGN que no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con C1Y.

Se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados disminuyen la síntesis de triglicéridos hepáticos mediante la inhibición de las actividades de la enzima diacilglicerol aciltransferasa, ácido graso sintasa y acetil-CoA carboxilasa. También mejoran la oxidación de los ácidos grasos mediante la estimulación de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR- α). Además, disminuye el conjunto (pool) hepático de triglicéridos al suprimir la transcripción del gen SREBP-1c, inhibiendo así la síntesis de novo de ácidos grasos y triglicéridos (Chan *et al.*, 2002), también se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados son agonistas del Receptor Farnesoide (FXR), la activación de este disminuye los niveles de triglicéridos al aumentar el

aclaramiento hepático mediante la modulación de la actividad de la lipoproteína lipasa, induciendo PPAR- α e inhibiendo SREBP-1c (Davidson, 2006).

La naringenina (3 g/100 g de la dieta durante cuatro semanas), administrada a ratones con receptores de LDL-nulos, aceleró la oxidación de los ácidos grasos hepáticos y evitó la acumulación de triglicéridos en el hígado, así como de colesterol y ésteres de colesterol, previniendo esteatosis hepática (Mulvihill *et al.*, 2009). Del mismo modo un extracto de brotes de cebada, rico en flavonoides, incluyendo saponarina (isovitexin-7-O-glucosido), orientina (luteolin-8-glucosido) y vitexina (apigenin-8-glucosido) disminuyó significativamente la concentración de ésteres de colesterol y colesterol en hepatocitos cultivados, mientras que en ratones alimentados con el extracto de cebada, se redujo la acumulación lipídica. Estos resultados demostraron que los reguladores de autofagia estaban regulados a la alza con la estimulación del extracto. Estas vías autofágicas son iniciadas y promovidas por la inhibición, dependiente de AMPK, de la vía de señalización mTOR (Lee *et al.*, 2015).

Con la culminación de este experimento se obtuvieron resultados que muestran que los diferentes tratamientos administrados: microorganismos probióticos, ácidos grasos insaturados o el extracto de *Q. crassifolia* o nanoencapsulado tiene efectos moderados en hámsteres dislipidémicos, cuando se administran durante 21 días a las concentraciones antes mencionadas. No se observaron diferencias en cuanto a ganancia de peso corporal, peso del hígado o del tejido adiposo en los diferentes tratamientos.

Se presentaron tendencias a disminuir el porcentaje de lípidos, colesterol cuando se administró el extracto de *Q. crassifolia* o las nanocápsulas, también la concentración de triglicéridos en hígado disminuyó con el extracto de encino. Se puede considerar que el control de los niveles de glucosa han sido debidos a la administración ya sea de microorganismos probióticos, ácidos grasos vegetales insaturados o el extracto. Se resalta que la dosis que se administró de yogurt fue aproximadamente 3 veces mayor que la presentación comercial que consumiría un humano.

La disminución de colesterol en suero, únicamente estuvo presente en el grupo al que se le administró el aceite vegetal rico en ácidos grasos insaturados, mientras que la concentración de

triglicéridos en plasma fue similar en el grupo al que se le administró el extracto de encino sin encapsular y el del medicamento.

Otro hallazgo positivo, del efecto en dislipidemias, de los tratamientos administrados es el alza de colesterol HDL en todos los tratamientos, siendo los grupos a los que se les administraron el extracto y las nanocápsulas, así como los probióticos, los que mostraron esta tendencia. No así para la concentración de LDL, que incluso fue mayor en el grupo administrado con este, entre tanto el yogurt plurifuncional no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con el control.

Hasta ahora los resultados encontrados en este trabajo, no fueron contundentes en la reducción de colesterol en plasma cuando se administró el yogurt plurifuncional, a pesar de esto, se obtuvieron resultados que indican que en general, el extracto de *Q. crassifolia*, así como las nanocápsulas, tuvieron efecto evitando la acumulación de lípidos, colesterol y triglicéridos en hígado, además de aumentar la concentración de HDL, pudiendo evitar esteatosis hepática y aterosclerosis.

Estos hallazgos conducen a plantear experimentos que sean sensibles en detectar cambios en la concentración de VLLP e ILP, cambios en el tamaño de las HDL y las LDL, así como efectos en arterosclerosis y patologías asociadas al síndrome metabólico como la resistencia a la insulina, en los que se administren los tratamientos por un periodo más largo, incluyendo un mayor número de muestra.

9. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de este proyecto fue el desarrollo de un yogurt con características plurifuncionales, que tuviera actividad hipocolesterolémica e hipolipidémica. Durante el desarrollo del mismo, se pudo generar conocimiento acerca de cortezas de tres especies de encino michoacano: *Q. crassifolia*, *Q. laurina* y *Q. scytophylla*, de importancia para la industria forestal y que generan una gran cantidad de cortezas que pudieran ser utilizadas para la formulación de este producto a gran escala.

Los resultados obtenidos muestran que los mayores rendimientos de extracción con agua caliente en recirculación fueron para las especies de *Q. crassifolia* (21.03%) y *Q. laurina* (15.11%). En general se obtuvieron los mayores rendimientos de extracción con agua caliente en recirculación, lo cual concuerda con los resultados descritos por García-Pérez et al., quienes en 2010, obtuvieron mayores rendimientos de extracción por este método cuando maceraron cortezas de *Betula alleganiensis* Britton, *Picea mariana*, *Abies balsamea* y *Pinus banksiana* Lamb. Las diferencias obtenidas podrían atribuirse a diferencias en la solubilidad de varios compuestos presentes en la corteza y a una mayor transferencia de masa a la temperatura más elevada que se usa durante la extracción con agua caliente (García-Pérez et al., 2010).

Una primera aproximación en conocer la composición química de los extractos fue la cuantificación de las diversas clases de compuestos fenólicos. También se determinó la capacidad de captar especies reactivas de importancia biológica, destacando por su alto contenido de compuestos polifenólicos y en la capacidad antioxidantes, el extracto de *Q. crassifolia* obtenido al agua caliente, este extracto mejoró las características antioxidantes y su composición polifenólica, debido a la purificación que se realizó, pues al hacer la extracción líquido-líquido con hexano y acetato de etilo, se eliminaron compuestos de polaridad baja y alta, concentrándose los polifenoles (Diouf et al., 2009a; Fan et al., 2015; García-Pérez et al., 2012).

En el análisis químico del extracto purificado de *Q. crassifolia*, se pudieron detectar compuestos fenólicos que van desde simples hasta policondensados, característicos de las especies de encino. Además algunos compuestos con actividad biológica destacable como antioxidantes.

Cabe destacar, que según la literatura científica revisada, es la primera vez que se realizan pruebas de toxicidad oral aguda y subaguda de un extracto de corteza mexicana, *Q. crassifolia*, usando modelos de ratas Wistar, mostrando que el extracto posee toxicidad intrínseca, cuando se administró a 300 y 2000 mg/kg de peso de rata, también mostró toxicidad renal cuando fue administrado a 33 y 100 mg/kg durante 28 días, estableciendo como dosis segura 11 mg/kg, cumpliendo así con los objetivos de la prueba a dosis repetida, además de que estos resultados hicieron posible la inclusión del extracto en las concentraciones adecuadas dentro del yogurt funcional de manera de no ocasionar efectos tóxicos a los consumidores (OCDE, 2006).

Ha pesar de que el consumo de compuestos polifenólicos provenientes del encino, data de siglos atrás, la ingesta elevada de estos antioxidantes, puede causar daños tanto en hígado como en riñón (Pérez *et al.*, 2011) y aunque los mecanismos precisos que favorecen el desarrollo de la toxicidad aún son objeto de investigación, se ha reportado que los compuestos fenólicos son capaces de formar conjugados con glutatión, acumulándose en las células tubulares proximales renales, provocando daño celular (Monks & Lau, 1998). Un aspecto interesante a evaluar en futuras investigaciones es el determinar las moléculas responsables de la nefrotoxicidad del extracto de *Q. crassifolia* y dilucidar los mecanismos toxicológicos involucrados.

En cuanto al proceso de nanoencapsulación, se determinó el pH en el que la mezcla de los materiales de pared es estable. Al evaluar los parámetros de eficiencia y rendimientos de encapsulación, tamaño de nanocápsulas, y morfología, se determinó que la concentración fuera 25% de caseinato de calcio y 75% de maltodextrina. Una vez encapsulado se adicionó al yogurt, resaltando que las ananocápsulas no fueron perceptibles sensorialmente, ya que los jueces evaluaron de manera positiva la textura homogénea del producto, característica sensorial que está correlacionada con la calificación de agrado global del yogurt plurifuncional. Es importante hacer notar, que el producto, cumple con la cantidad de bacterias lácticas requeridas para ser considerado como alimento probiótico (NMX-F-444-1983).

Hablando del efecto funcional del yogurt plurifuncional administrado a los hámsteres con dislipidemia, no se mostraron diferencias significativas en el peso corporal de los animales, ni en el consumo de alimento. Durante la necropsia, se observaron diferentes grados de palidez en los

hígados de los hámsteres a los que se les administró la dieta hipercolesterolémica e hiperlipémica (Hamilton & Garlich, 1971), sin embargo, no hubo diferencias significativas en el peso del hígado entre el control y los diferentes grupos de prueba. La dieta adicionada con colesterol y aceite de coco aumentó la concentración de glucosa, colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. Los resultados de la concentración de glucosa en plasma de los hámsteres, mostraron que los grupos a los que se les administraron el yogurt con grasa y el extracto de encino mantuvieron los niveles de glucosa similares a los del grupo al que se le administró el medicamento. Tanto los ácidos grasos poli-insaturados como algunos polifenoles se han asociado en la reducción de la concentración de glucosa (Davidson, 2006; Rains et al., 2011).

En los parámetros evaluados en el hígado, como colesterol, triglicéridos y lípidos, se observó disminución significativa de estos parámetros en los grupos a los que se les administraron el extracto de corteza en *Q. crassifolia* y las nanocápsulas del extracto. Los resultados señalan que los compuestos polifenólicos evitan la acumulación de colesterol y lípidos en hígado. Se ha señalado que la ingestión de compuestos polifenólicos se han asociado a la disminución de la sobreproducción de lipoproteínas apoB100, atenuando la acumulación de lípidos en hígado, reducen esteatosis hepática así como hiperinsulinemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, efectos atribuidos a la reducción tanto en la síntesis de colesterol como en la esterificación y la disminución de triglicéridos hepáticos a través de un aumento de la oxidación de ácidos grasos, lo que lleva a una reducción de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad, previniendo dislipidemias (Mulvihill et al., 2009, 2010).

En cuanto a los niveles de colesterol, triglicéridos, colesterol LDL, no se mostraron resultados contundentes, sin embargo podemos observar algunas tendencias que pudieran marcar la pauta para nuevas investigaciones, donde se incluyan tiempos de prueba más largos y mediciones de parámetros que puedan evidenciar efectos en el tamaño de las lipoproteínas, aterosclerosis, etc.

10. CONCLUSIONES

Se indentificaron tres especies de encinos michoacanos.

Los extractos acuosos y etanólicos de las cortezas de estas especies de encino presentan alto contenido de compuestos fenólicos y alta capacidad de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

El extracto de *Q. crassifolia* obtuvo las mejores características para ser incluido en el yogurt plurifuncional, como alto rendimiento de extracción, alta concentración de compuestos fenólicos y sobresaliente capacidad de captar especies reactivas de oxígeno.

La purificación del extracto de *Q. crassifolia* al agua caliente mejoró la concentración de compuestos polifenólicos en comparación al extracto crudo de corteza de encino de la misma especie. Aunado a esto, el extracto purificado presentó, en general, una mejor capacidad antioxidante que el extracto crudo.

El extracto purificado de corteza de *Q. crassifolia* fue clasificado de acuerdo a la OECD con una DL50 > 2000 mg/kg. Sin embargo posee toxicidad intrínseca, mostrando alteraciones microscópicas en encéfalo y riñón a dosis agudas de 300 y 2000 mg/kg.

Con la prueba de toxicidad subcrónica se estableció el nivel mínimo de efecto adverso observable (LOAEL) en 33 mg/kg y el nivel de efecto adverso no observable (NOAEL) en 11 mg/kg.

Se detectaron una amplia variedad de compuestos polifenólicos, que van desde fenoles simples, hasta policondensados como los taninos característicos de género *Quercus*. Además, algunos de notable importancia por su actividad biológica como el tyrosol, siringol, scyllo inositol, resorcinol y *p*-cresol.

El extracto de encino fue nanoencapsulado usando como materiales de pared maltodextrina (75%) y caseinato de calcio (25%) con una eficiencia y rendimiento aceptable.

El yogurt plurifuncional cumplió con las características de calidad de un yogurt, además las nanocápsulas no fueron perceptibles sensorialmente al ser incluidas en el producto.

Al evaluar el efecto funcional del yogurt plurifuncional, no se tuvo resultados contundentes en disminución de colesterol y triglicéridos en plasmas, sin embargo se observó que el extracto de encino y las nanocápsulas evitan la acumulación de lípidos, colesterol y triglicéridos en hígado, mantiene los niveles de glucosa, el índice aterogénico y aumenta la concentración de HDL por lo que se sugiere el plantear experimentos de mayor duración y con un número de muestra mayor.

11. PRODUCTOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

11.1. Artículo de divulgación “El encino y su uso en envejecimiento de vinos”



U.M.S.N.H.

Los encinos en México

Las especies del género *Quercus*, comúnmente conocidos como encinos, pertenecen a la familia *Fagaceae*. Comprende alrededor de 450 especies alrededor del mundo, con una importante distribución en México, donde están presentes de 135 a 150 especies, considerando a 86 como endémicas. Son especies de árboles que junto con los pinos dominan los bosques templados en México. Además de su contribución económica, cultural y ecológica, son especies clave en la conducción de la biodiversidad terrestres.



Árbol de Encino (*Quercus* sp.) E. Valencia-Avilés

En México el uso de los encinos está estrechamente ligado a la presencia de grupos indígenas, quienes lo han aprovechado mediante la elaboración y el consumo de alimentos frescos (el fruto del encino, conocido como bellota) o procesados (capeado de las flores, bellotas tostadas para diversos usos como harina); de forma artesanal, en la elaboración de rosarios o juguetes; como forraje, principalmente para ganado porcino y

caprino; taninos y colorantes, para curtir pieles y teñir textiles.



Hojas de encino



Frutos de encinos (bellotas)

Además, se ha utilizado en la medicina tradicional (Que hacen los encinos por nuestra salud, Saber Más No. 16), para el tratamiento de diferentes padecimientos gastrointestinales, infecciones de la piel, infecciones de amígdalas, hemorragias y disentería. Se han reportado que extractos de encino poseen actividad antibacterial, que puede estar relacionada con la riqueza en extractos ricos en compuestos fenólicos como flavonoides y taninos. Se resalta su uso maderable debido a sus propiedades físicas, químicas y anatómicas. Se ha utilizado tradicionalmente para la elaboración de recipientes culinarios, pisos, postes, durmientes, chapa, embarcaciones, muebles, mangos para herramientas y partes de instrumentos musicales, entre otras aplicaciones. A pesar de esto, las especies de encino mexicanas han sido subvaluadas, ya que la madera de éstos ha sido principalmente destinada ya sea para usos industriales o como leña y carbón.

El encino y su uso en el envejecimiento de vinos

Saber más Año 4 / Julio-Agosto/ No. 22

19

Sin embargo, uno de los usos económicamente más redituables de maderas de árboles de encino es la industria de la tonelería. Las maderas usadas en el añejamiento de vinos son consideradas productos de alta calidad, por lo que sería una magnífica oportunidad para que exista un aprovechamiento racional sustentable de las especies de encino mexicanas.

La madera de encino en la tonelería

Los toneleros han producido barriles de madera desde el imperio romano, y la madera de encino ha sido el principal material usado con este fin por más de 2000 años. Las especies tradicionalmente usadas en la tonelería han sido *Quercus alba*, conocida como encino americano y dos especies europeas *Quercus robur* L., conocido como encino pedunculado y *Quercus petraea* Liebl., conocido como encino sésil.



Madera de encino



Barriles de encino

Las características estructurales y de composición química de la madera pueden influir en los procesos físicos, químicos y bioquímicos que toma lugar durante el añejamiento de los vinos en barriles, afectando su composición, regulando sus cualidades y su complejidad, como lo son: el desarrollo de aromas, color, sabor, astringencia, persistencia y contribución a su estabilidad. Estos cambios son la consecuencia de diferentes procesos como la difusión de oxígeno a través de los poros de la madera y la extracción de muchas sustancias propias de ésta, resultando en una mejora de la calidad y enriquecimiento de sus características sensoriales.

Diversos estudios han demostrado que estas especies son una importante fuente de compuestos polifenólicos, los cuales juegan un papel importante en la elaboración de vinos debido a los efectos anteriormente mencionados, aunado a que los polifenoles son antioxidantes que están presentes en la madera de encino y pueden redu-

cir la concentración de radicales libres (intermedios de las reacciones biológicas que son dañinos y altamente reactivos), previniendo daños a la salud humana. Los antioxidantes previenen el proceso de oxidación debido a su capacidad para capturar, desactivar o reparar el daño causado por los radicales libres, que están implicados en el desarrollo de múltiples enfermedades, como Alzheimer, carcinogénesis, diabetes, aterosclerosis y el propio proceso de envejecimiento.

Ha sido demostrado por diversos reportes, que el resultado de la interacción entre diferentes factores naturales y el origen geográfico conlleva a establecer diferencias en cuanto a la composición química de la madera, incluso de la misma especie, lo cual impacta en el contenido de compuestos volátiles, así como el proceso bajo el que se llevó a cabo el añejamiento, secado e intensidad de tostado de las barricas. Por lo que cada tipo de madera presenta una característica de composición de volátiles desde el punto de vista cuantitativo.

Algunos de los compuestos característicos de los vinos almacenados en barricas de madera de encino, son los compuestos volátiles fenólicos como la vainillina (aroma a vainilla), el siringaldehído, eugenol (aroma a clavo), guaiacol (aroma a ahumado), 4-metilguaiacol (aroma a leña o ceniza), metil-g-octalactona (aroma a coco), 4-etilguaiacol (aroma a ahumado, especia y tocino), además de algunos compuestos volátiles no fenólicos como el furfural, 5-metilfurfural y el 5-hidroxi-metil-furfural.

Alternativas de especies de *Quercus* para el añejamiento del vino

Especies europeas, diferentes a las utilizadas tradicionalmente, están siendo empleadas para la maduración de vino. Estudios en cuanto a composición química de la madera de diversas especies de encinos soporta la posibilidad de emplear estas maderas en el envejecimiento de vinos, ya que se ha demostrado que la composición química de ciertas especies de *Quercus* es similar al de las especies comúnmente usadas en añejamiento.



El encino y su uso en el envejecimiento de vinos



Tomando en cuenta la variabilidad entre las diferentes especies de encino, y debido a la poca o nula información acerca de los efectos de la madera de especies mexicanas en las características de vino, vinagre, sidra y otras bebidas, incluso como el tequila, podría ser interesante el determinar la composición química de la madera de especies de encino mexicanas. Esto, con la finalidad de buscar nuevas fuentes de madera para elaborar barricas que pudieran ser alternativas a las especies de encino usadas tradicionalmente, con el objetivo de darles una personalidad especial a las bebidas maduradas, con la posibilidad de presentar una composición química y un perfil sensorial similar o incluso mejor que las almacenadas en barricas de maderas tradicionales, obteniéndose bebidas de buena calidad.

El considerar los recursos de encinos mexicanos como materia prima para la elaboración de barricas, pudiera ser una opción económicamente viable, además de apreciar la producción y mantenimiento de los bosques, no sólo por la importancia ecológica o cultural, sino generando fuentes de empleo para los habitantes de la región, así como

una estructura forestal competitiva y programas serios de reforestación. ■

Para saber más:

Arizaga, S., Martínez-Cruz, J.M., Salcedo-Cabrales, M. y Bello-González, A. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. IEPSA, S.A. de C.V. México, D.F. <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/603.pdf>

La M.C. Eréndira Valencia Avilés es alumna del Programa Institucional del Doctorado en Ciencias Biológicas, opción de Biotecnología Alimentaria (Facultad de Químico Farmacobiología) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH); el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores es Profesor Investigador, Jefe del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos en la Facultad de Químico Farmacobiología de UMSNH.

11.2. Artículo de divulgación “Polifenoles: Tesoros naturales a explorar para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares”

SALUD 



POLIFENOLES: TESOROS NATURALES

A EXPLORAR PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Eréndra Valencia Avilés, Héctor Eduardo Martínez Flores, Martha Estrella García Pérez

Derecho de autor: duron0123 / 123RF Foto de archivo/c

Los polifenoles son un gran grupo de metabolitos secundarios de las plantas caracterizados por presentar un anillo aromático con uno o más grupos fenólicos [Fig.1]. Estos compuestos son omnipresentes en las plantas y han sido ampliamente estudiados debido a las funciones que desempeñan, tales como asimilación de nutrientes, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la señalización química en la floración y la polinización de las plantas. Además, estos participan en los procesos de simbiosis y parasitismo vegetal además de la defensa de las plantas ante los factores adversos del ambiente.

Algunos ejemplos de polifenoles conocidos

Los compuestos fenólicos son muy variados y dependiendo de sus estructuras químicas se pueden clasificar en varios grupos como los fenoles simples, entre



Figura 1. Estructura del fenol. Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Fenol#/media/Archivo:Phenol_Chemical_Structure_es.svg

los que se encuentran la vainillina (usada como saborizante en múltiples alimentos), el ácido salicílico (precursor del principio activo de la aspirina) y el ácido cafeico (presente en el café). También tenemos a los estilbenos, a quienes se les asigna un papel de fungicidas además de proteger a los árboles contra el ataque de los insectos. El resveratrol es un estilbeno muy conocido por sus propiedades anti-inflamatorias y está presente en el vino.

38 **Lectura Científica / Nivel Medio Superior**



La M.C. **Eréndira Valencia Avilés** es estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAGNH. El Dr. **Héctor Eduardo Martínez Flores** es Profesor Investigador de la UMSNH en la Facultad de Química-Farmacología. La Doctora **Martha Estrella García Pérez**, Profesora Investigadora de la UMSNH en la Facultad de Química-Farmacología.

Los lignanos y neolignanos, también conocidos como estrógenos naturales, son parte del sistema de defensa química de la planta y se consideran potentes **antioxidantes** y agentes **anti-inflamatorios**.

Los taninos, son solubles en agua y poseen alto peso molecular. Además de presentar las características de los fenoles, son capaces de precipitar los alcaloides, gelatina y otras proteínas. Debido a esta propiedad, son usados para la transformación de la piel en cuero. El papel biológico de taninos en plantas se relaciona principalmente con la protección contra las infecciones, insectos o incluso contra los herbívoros.

¿POR QUÉ CONSUMIR POLIFENOLES?

Si los polifenoles no son esenciales para los humanos, es decir, que el no consumirlos no causa ningún tipo de deficiencia específica, entonces, ¿por qué es recomendable incluir polifenoles en la dieta?



Derecho de autor: sa href="http://es.123rf.com/profile_arwasabi">arwasabi / 123RF Foto de archivo/a



Los compuestos fenólicos presentan una amplia gama de actividades fisiológicas, con diversos beneficios para la salud humana. En muchos casos la actividad biológica de los polifenoles se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes debido a que el estrés oxidativo, es decir, el desbalance en la cantidad de radicales libres en nuestro organismo, está implicado en las muchas causas de trastornos y enfermedades degenerativas. Los polifenoles pueden actuar en múltiples vías de señalización, lo que los distingue como potentes agentes antiinflamatorios y antiproliferativos, convirtiéndolos en candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades pluricausales como el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, entre otras.

POLIFENOLES EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos. Son la principal causa de muerte en México y en el mundo, constituyendo un problema de salud pública, además de provocar un impacto económico considerable para la sociedad.

Entre los factores de riesgo que más influyen para el padecimiento de enfermedades cardiovasculares se encuentran el estrés oxidativo y los niveles elevados de colesterol y otros lípidos en la sangre. Aunque los radicales libres tienen una función en el cuerpo humano durante procesos fisiológicos normales, una producción excesiva de éstos, causa daños al material biológico, oxidando proteínas y lípidos. Así, cantidades elevadas de colesterol y triglicéridos en plasma aunado al estrés oxidativo provocan una alteración llamada aterosclerosis (figura 2), en la que se oxidan estos compuestos, formando depósitos que obstruyen las arterias provocando la disminución del flujo

de sangre y con ello ataques al corazón y accidentes cerebrovasculares.

En la actualidad, existe un gran interés por parte de los consumidores y la comunidad científica por incluir en la dieta antioxidantes naturales, tales como los polifenoles, ya que, debido a su capacidad antioxidante reducen la cantidad de radicales libres, evitando el estrés oxidativo. Además, se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en polifenoles como flavonoides, reduce el colesterol LDL (colesterol malo) y triglicéridos en plasma, además de regular la absorción de lípidos y la lipogénesis. Igualmente, estas moléculas pueden aumentar la concentración de colesterol HDL (colesterol bueno), reduciendo con ello la incidencia y mortalidad por enfermedades cardiovasculares.

Como ejemplo podemos mencionar a un extracto de corteza de pino marítimo Francés (*Pinus pinaster*) que contienen una alta concentración de polifenoles. Se ha demostrado en diversos estudios farmacológicos empleando pruebas en células, animales y humanos que este extracto es capaz de captar radicales libres, previniendo el estrés oxidativo y los daños que causan al organismo. También se ha comprobando su efectividad en



Figura 2. Esquema que ejemplifica la formación de placas de grasa en las arterias, causando de aterosclerosis.
<http://www.saludtotal.com/tratamiento-cabeza-para-la-arteria/cas.html>



el mejoramiento de la salud cardiovascular, resultando en la mejora de la función endotelial y la insuficiencia venosa crónica.

Estos resultados nos demuestran que además de llevar una alimentación balanceada, tener un programa de actividad física y mantener un peso corporal adecuado, una opción para reducir el padecimiento de enfermedades cardiovasculares es el consumo de compuestos fenólicos como suplementos alimenticios o bien incluir alimentos ricos en polifenoles como parte de una alimentación saludable.

¿QUÉ ALIMENTOS SON RICOS EN POLIFENOLES?

Ahora que conocemos algunos de los beneficios de la ingestión de compuestos fenólicos, es necesario explorar acerca de alimentos que son ricos en compuestos fenólicos. Como se ha mencionado, los compuestos fenólicos están presentes en las plantas, particularmente en hojas, frutos, tallos, raíces y cortezas. Las principales fuentes en la dieta humana son las frutas, hortalizas y diversas bebidas.

Los polifenoles están presentes en cantidades apreciables en algunos alimentos como el cacao, el aceite de oliva, las manzanas, las uvas, el aguacate, los frutos rojos, el nopal y el maíz azul. Así que no te detengas y consúmelos, te aportarán muchos beneficios. Además, se encuentran también en plantas herbáceas como el espino amarillo, la salvia, la mejorana, el ajeno, las flores de nopal y la exquisita jamaica. Si te gusta el té verde, el café, el chocolate (figura 3) y el vino rojo, debes conocer que estas bebidas son reconocidas por su efecto antioxidante debido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos.



Figura 3. Chocolate, bebida tradicional mexicana que se prepara con manteca de cacao y azúcar.
<https://www.24horas.com/blog/prepara-un-delicioso-chocolate-a-diente>

Una fuente importante y poco usada en México para la obtención de compuestos fenólicos son los árboles. En tejidos como hojas y corteza de especies como eucalipto, roble, pino y encino (figura 4) se ha determinado la presencia de diversos compuestos fenólicos con actividad biológica importante.



Figura 4. Cortezas de encino, ricas en compuestos fenólicos.

PREGUNTAS DE REFLEXIÓN:

¿Qué acciones llevarías a cabo para evitar padecer enfermedades cardiovasculares?

¿Cuál es lo importante del seguir investigando en fuentes de antioxidantes naturales?

¿En qué productos de tu dieta diaria puedes encontrar polifenoles?

¿Cómo los polifenoles nos pueden ayudar a mantener la salud?



Derecho de autor: hywards / 123RF Foto de archivo

GLOSARIO:

Anti-inflamatorio: propiedad de combatir la inflamación.

Antioxidante: compuesto que es capaz de inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo la peroxidación lipídica.

Anti-proliferativo: adjetivo usado para referirse a una sustancia que previene o retarda la propagación de células, especialmente cancerosas en tejidos aleadaños.

Aterosclerosis: endurecimiento de los vasos sanguíneos, en especial de ciertas arterias, por la formación de ateromas.

Colesterol: es un esteroide (lipido), participa en la estructura de algunas proteínas plasmáticas y su presencia en exceso se atribuye a la génesis de la aterosclerosis.

HDL (lipoproteínas de alta densidad): también conocidas como: colesterol "bueno", porque son las encargadas de recoger el colesterol de los tejidos y transportarlo al hígado para su eliminación en lo que es conocido como transporte inverso de colesterol. Un nivel bajo de colesterol HDL (o-HDL) aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Inflamación: interacción patológica en una parte cualquiera del organismo, caracterizada por trastornos de la circulación de la sangre y frecuentemente, por aumento de temperatura, enrojecimiento, hinchazón y dolor.

Insuficiencia venosa crónica: incapacidad de las venas para realizar un adecuado retorno de la sangre al corazón.

LDL (lipoproteínas de baja densidad): que también se conocen como colesterol "malo". Son las lipoproteínas encargadas de transportar el colesterol a los tejidos para su utilización, incluyendo las arterias.

Radical libre: es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad.

Triglicéridos: es un éster obtenido del glicerol por esterificación del grupo hidroxilo con ácidos grasos, están presentes en tejidos animales y vegetales.

11.3. Artículo de revisión “Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas”

Revista de la Facultad de Ciencias Químicas • ISSN: 1390-1869 • N° 16 • Octubre, 2016-Enero, 2017

Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas

Polyphenols: antioxidant and toxicological properties

Eréndira Valencia-Avilés¹, Iván Ignacio-Figueroa¹, Erika Sosa-Martínez¹, María Carmen Bartolomé-Camacho¹, Héctor-Eduardo Martínez-Flores¹, Martha-Estrella García-Pérez*

¹ Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tzinzuntzan 173, Col Matamoros, Morelia, Michoacán, México
*margarc@live.ca

Recibido: 26-12-2016. Aceptado después de revisión: 31-1-2017

Resumen: Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, con diversas funciones fisiológicas. Variadas estructuras químicas caracterizan a este grupo de moléculas. Su amplia distribución, así como su capacidad de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas con el padecimiento de enfermedades, perfila a los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos como ingredientes que pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica, de alimentos y cosméticos. Sin embargo, para lograr tales propósitos, es necesario asegurar su inocuidad, a través de la realización de pruebas rigurosas de toxicidad. En este artículo se describen los diferentes tipos de compuestos fenólicos desde el punto de vista químico, así como múltiples estudios que avalan sus propiedades antioxidantes. De igual modo, se discuten diferentes métodos toxicológicos y su impacto en la determinación del grado de toxicidad de extractos polifenólicos naturales provenientes de plantas.

Palabras claves: antioxidante, polifenoles, toxicidad.

Abstract:

Phenolic compounds are secondary plant metabolites, with various physiological functions. Several chemical structures characterize these molecules. They are widely distributed and have a high capacity to capture reactive oxygen and nitrogen species associated to the disease pathogenesis. Taking into account these characteristics, natural extracts rich in polyphenols can be used for the development of new pharmaceutical, alimentary and cosmetic products. However, it is necessary to ensure the safety of these products by performing toxicity tests. This article describes polyphenols from the chemical point of view, as well as multiple studies that support their antioxidant properties. Additionally, different toxicological methods are discussed, as well as their impact in the determination of the toxicity of natural polyphenolic extracts from plants.

Keywords: antioxidant, polyphenols, toxicity.

1. Introducción

Los polifenoles (PF) o compuestos fenólicos (CF) son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías de shiquimato y de los fenilpropanoides [1]. En el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos, de hecho, las plantas sintetizan miles de CF diferentes [2].

El contenido de PF en las plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento [3]. Además de participar en la función fisiológica de los vegetales [4], también son componentes importantes de la dieta humana, aunque no se consideran como nutrientes [5]. Son objeto frecuente de investigación debido a sus diversas funciones como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos [6]. Además de estas funciones, los PF son reconocidos por su reconocida capacidad antioxidante [7] [8]. Los CF son los antioxidantes más abundantes en frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas plantas [9]. Su ingesta es en promedio 1g, lo que es 10 veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E [10]. Más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de importancia en la patogénesis de enfermedades, los CF pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos.

Investigadores y grandes industrias han mostrado un gran interés en estas moléculas [10], lo que ha llevado a realizar diversos estudios con el fin de encontrar CF con propiedades farmacológicas de interés, dentro de las que se encuentra el carácter antioxidante, importante para combatir enfermedades producidas por el estrés oxidativo [11], [12]. Adicionalmente, a la capacidad antioxidante de estos compuestos, se les atribuyen propiedades antiinflamatorias [13], antialérgica, antitrombóticas, antimicrobianas, antineoplásicas y anticarcinógenas [14]–[18], que justifican el número importante de publicaciones que pueden encontrarse en la literatura científica relacionadas con este tipo de compuestos.

2. Clasificación y distribución de los compuestos fenólicos en el reino vegetal.

Los CF presentan una estructura molecular similar, caracterizada por tener de uno a más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado [19]. Su diversidad estructural implica que existan un amplio grupo de moléculas pertenecientes a este grupo [20] los cuales van desde estructuras simples hasta compuestos complejos, siendo clasificados de diversas maneras [21]. De manera general, los CF han sido clasificados en dos grandes grupos: flavonoides (F) y no-flavonoides. En el grupo de los F, se encuentran los flavonoles (FN), flavonas (FAS), flavan-3-ols, isoflavonas (IF), flavanonas (FNA), dihidroflavonoles (DHF), antocianidinas y chalconas. Mientras que en el grupo de no F están los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, polifenoles volátiles, estilbenos y compuestos diversos (lignanos y cumarinas) [22].

El grado de solubilidad es otro factor tomado en cuenta para su clasificación. Los compuestos solubles en agua son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas. Por otro lado, se encuentran los compuestos insolubles en agua, tales como los taninos condensados, lignanos y ácidos hidroxicinámicos, los cuales están unidos a la pared celular de las células vegetales [3]. Los PF también se clasifican acorde al número de anillos fenólicos y los elementos estructurales unidos a las unidades básicas, siendo los principales grupos de compuestos fenólicos, los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos hidrolizables, taninos condensados, estilbenos y lignanos [21], [23], [24].

2.1. Flavonoides

Los flavonoides son la clase más abundante de PF, derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina [25]. Estos compuestos de bajo peso molecular son necesarios para el desarrollo de vegetales ya que pueden actuar como señaladores químicos y tiene efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo del vegetal [2]. En seres humanos, son compuestos con propiedades asociadas a una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares [26]. Se encuentran ampliamente distribuidos en reino vegetal, con una menor proporción en hongos y algas. En las plantas se localizan principalmente en las partes aéreas [2].

El esqueleto químico de los F está basado en compuestos de 15 carbonos (C6-C3-C6), con numerosos sustituyentes. Los cuales comparten un esqueleto de carbono tipo difenil 1,3-propano con dos anillos enlazados (anillo A y B) ligados por un tercer anillo de pirano (anillo C). La mayoría aparecen como glucósidos, en menor frecuencia como sulfatos, dímeros, polímeros o en su forma libre (agliconas). Los glucósidos se pueden presentar como C-glucósidos o como O-glucósidos, siendo estos últimos los más frecuentes. La glucosa es el azúcar más común en estos compuestos pero se podrían encontrar en su estructura química la ramosa, xilosa y galactosa. Las posiciones C3 o C5 del anillo A son los sitios de glucosilación más comunes y raramente en el sitio C7 del esqueleto flavoinde [21].

Dentro del grupo de los F pueden encontrarse diversos subgrupos con una gran variedad de compuestos, diferenciados por el número y posición de grupos hidroxilos, así como por los grupos funcionales que presentan [27]. Los principales subgrupos de flavonoides son: FN, FAS, FNA, dihidroflavonas, IF, antocianidinas, flavan-3-ol y flavanoles monoséricos (catequinas y leucoantocianidinas) así como flavanoles poliméricos (proantocianidinas). De menor importancia son las chalconas, dihidrochalconas, DHF, flavan-3,4-dioles, cumarinas, auronas, biflavonoides y neoflavonoides [21], [28].

El subgrupo de los FN es omnipresente en los alimentos. Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3. Entre los FN más comunes se pueden nombrar el kaempferol, quercetina, isorramnetina y miricetina. Su contenido en frutas, verduras y bebidas puede variar considerablemente debido a diversas condiciones como son los cambios de estación y las condiciones de crecimiento de la especie vegetal donde se encuentran. La cebolla amarilla y roja (*Allium espo*) es una fuente rica en FN [2], [20][29].

Las FAS son estructuralmente similares a los FN, a diferencia de que las FAS carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3. Aunque se han encontrado en vegetales, tanto en forma de O-glucósidos como C-glucósidos, siendo abundantes en el apio (*Apium graveolens*), perejil (*Petroselinum hortensis*) y algunas hierbas, no son compuestos con amplia distribución [20].

Debido a su similitud estructural con los estrógenos y la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos, las IF, se consideran como fitoestrógenos. Estas poseen un anillo benzenico en el carbono C3 con grupos hidroxilos en C7 y C4. Son compuestos que pueden presentarse glicosilados o como agliconas, siendo encontrados con regularidad en plantas leguminosas. Durante su procesamiento tienden a hidrolizarse además de ser termosensibles. Los productos de soya fermentados pueden ser ricos en agliconas como resultado de la hidrólisis de los glucósidos, mientras que los productos cuya fabricación implica calentamiento, tales como leche de soya y tofu, contienen cantidades reducidas de IF [2], [20].

Las antocianidinas son las estructuras básicas de las antocianinas [26]. Conforman un grupo importante de pigmentos vegetales formando conjugados con azúcares y ácidos grasos para formar un grupo diverso en colores responsables de tonalidades azules, color de malva, púrpura, rojo, escarlata y naranjas brillantes. Las más comunes son la pelargonidina, la

cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina. Su principal fuente son las frutas, aunque se les encuentra en cereales, vinos y algunos vegetales [30].

Los FN estructuralmente tienen un anillo C saturado y un hidroxilo en carbono C3. Pueden aparecer como monómeros o polímeros, y las combinaciones heterosídicas son poco habituales. Los flavanoles representativos en alimentos son los flavan-3-ol, que a su vez pueden encontrarse ya sea en forma de monómero (catequina), dímero condensado, oligómero (procianidinas) o polímero (proantocianidinas o taninos condensados). Las catequinas se encuentran principalmente en frutas, vino y chocolate. Mientras que galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato aparecen principalmente en el té [31].

Fuentes como verduras, frutas, té y vino son alimentos con gran contenido de FN. Se distribuyen principalmente en tejido externo y aéreo de la planta; la concentración de FN en frutas de la misma planta pueden variar en función de la exposición solar [32][33].

Una subclase compleja de flavonoides, que pueden ser encontrados desde simples monómeros a proantocianidinas oligoméricas y poliméricas son los taninos condensados o proantocianidinas. La catequina y la epicatequina están ampliamente distribuidas (como dímeros y trímeros) a diferencia de la poca distribución de epiafzelequina. Los taninos son compuestos polifenólicos, solubles en agua con amplia variedad de estructuras cuyo peso molecular tiende a ser alto [21]. Se caracterizan por ser astringentes, amargos y por su capacidad de precipitar proteínas [3]. Se dividen en dos grandes grupos en función de su estructura y propiedades: los taninos condensados y los hidrolizables. Más recientemente, una tercera clase de taninos es agregada; los florotaninos, los que se han aislado en varios géneros de algas [34].

Los taninos condensados son oligómeros o polímeros de flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles, encontrados principalmente en las uvas. Están muy extendidos en todos los helechos, gimnospermas y algunas angiospermas [21]. Las proantocianidinas, cuando están en contacto con las proteínas salivales, son responsables de la astringencia de los frutos [3]. El tipo más abundante de proantocianidinas son las procianidinas compuestas por unidades de epicatequina. Las proantocianidinas pueden ser polímeros de hasta 50 unidades. El tipo menos frecuente son las propelargonidinas y prodelphinidinas [35].

2.2. No flavonoides

El ácido gálico, vanílico y *p*-hidroxibenzoico son los ácidos hidroxibenzoicos más comunes. Estos compuestos orgánicos con un anillo fenólico y un grupo carboxílico asociado forman una estructura de tipo C6-C1 [21]. Se encuentran además muy frecuentemente en las frutas en forma de ésteres [3]. Los ácidos hidroxicinnámicos con un esqueleto C6-C3, se encuentran principalmente como ácido cumárico, cafeico y ferúlico conjugados con ácido tartárico o ácido quínico y en raras ocasiones en estado libre [34].

Los hidroxicinnamatos C6-C3 producidos como conjugados son denominados ácidos clorogénicos, estos compuestos presentes en un 10% en granos de café (*Coffea canephora*) son la principal ingesta de fenólicos en consumidores regulares. Están presentes en alimentos como uvas y en vinos tintos y blancos procedentes de *Vitis vinifera* [36].

Los taninos hidrolizables como el ácido tánico y los elagitaninos son polímeros cuyo peso molecular varía entre 500 y 5000 Da [37], [38]. Se caracterizan por una parte central que consiste en un poliol (generalmente glucosa) donde las funciones hidroxilo están esterificadas con ácido gálico. Hay dos tipos de taninos hidrolizables: a) los galotaninos cuya hidrólisis libera ácido gálico y sus derivados galoilados así como b) los elagitaninos quienes liberan por hidrólisis al ácido gálico, elágico, hezalhidroxidifenico, valónico y cuyos grupos galoil están conectados a través de enlaces C-C [36].

Los estilbenos son compuestos con una estructura C6-C2-C6, sintetizados por la adición de 1 a 3 moléculas de malonil-CoA con ácidos cinámicos, que se derivan de la ruta biosintética de fenilpropano. Pueden actuar como fitoalexinas producidas por las plantas en respuesta a enfermedades, lesiones y estrés, contribuyendo también al sabor y potentes actividades biológicas de las plantas. La síntesis de estilbenos antifúngicos puede ser inducida por organismos apropiados, o por una serie de estímulos abióticos [34]. El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) principal representante de este grupo se produce en las plantas principalmente en respuesta a una lesión y a una infección por hongos [39]. Estudios recientes indican que el resveratrol tiene propiedades que ayudan a la prevención de cáncer y de enfermedades degenerativas [40]. Las concentraciones en vinos tintos son bajas en comparación con otros PF [20], [21].

Los lignanos y neolignanos son un gran grupo de compuestos con una estructura (C6-C3) producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropano [41] [34]. Cuando las unidades de fenilpropano están unidas por enlaces C-C en las posiciones 8 y 8', el compuesto se considera un lignano. Si los dímeros fenilpropano están unidos por medio de enlaces distintos de C-C 8-8', se trata de un neolignano [42].

Los lignanos son parte del sistema de defensa química de la planta y tradicionalmente se consideran como metabolitos secundarios del durameo en los árboles [43]. Estos compuestos son reconocidos como fitoestrógenos; en el tracto gastrointestinal tienen propiedades estrogénicas y antiestrogénicas [3]. Se encuentran principalmente en forma libre, aunque también se presentan como derivados glucósidos [26]. Las cumarinas son benzo- α -pironas que se encuentran de forma libre o combinada con azúcares. Se pueden clasificar en hidroxycumarinas simples, furanocumarinas con anillo furano unido a núcleo cumarínico; y las piranocumarinas con un anillo pirano [34].

3. Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación y la eliminación de especies reactivas, las que tienen como característica común el tener un electrón incompleto en su último orbital. Este desequilibrio ocasiona que la célula sea atravesada por radicales con gran capacidad oxidante [44]. Estos radicales pueden ser resultado del metabolismo celular y un claro ejemplo de ellos son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) [45], [46], tales como el anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y ácido nítrico. Los ROS y NOS causan daño celular grave lo que lleva a una amplia lista de enfermedades como el síndrome metabólico, cáncer, Alzheimer y problemas cardiovasculares [4].

El alto contenido en PF, particularmente de flavonoides, ha correlacionado positivamente con la capacidad de ciertas plantas para eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes [47]. Los CF han sido situados como los antioxidantes más abundantes proporcionados por la dieta humana [48]. Se ha reportado que extractos de PF inhiben las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [49], mientras que estudios epidemiológicos, han sugerido que la ingesta de fitoquímicos y en particular PF está asociada con la disminución de enfermedades incluyendo las cardiovasculares, el cáncer y las neurodegenerativas [50].

Los PF son sustancias caracterizadas por su actividad antioxidante, lo que se ha demostrado *in vitro* considerando su capacidad para eliminar ROS y NOS [9], [47], [51], [52]. Los PF disminuyen los niveles de ROS y NOS mediante un mecanismo donde atrapan y disipan los electrones libres de los radicales a través de la donación de un átomo de hidrógeno, generándose como consecuencia la formación de un radical fenoxilo menos dañino para las células [53]–[55]. Sin embargo, se ha documentado que diversos parámetros pueden ejercer una influencia sobre la actividad antioxidante de los PF. Cambios en la estructura de los PF como la sulfatación o glucuronidación, reducen la actividad antioxidante. Se ha demostrado

que glucuronidos de quercetina conservan su actividad antioxidante pero en menor medida que la quercetina como tal [56], [57]. Los PF son compuestos omnipresentes en el reino vegetal. De hecho, en la Tabla 1 se puede observar la concentración de compuestos polifenólicos en diversas estructuras como frutos, flores, tallos, hojas, raíces, semillas y cortezas.

Tabla 1. Concentración de fenoles totales en frutos, flores, tallos, hojas, raíces, semillas y cortezas de especies vegetales.

Especie	Nombre común	Tejido	Fenoles totales mg EAG/g	Fenoles totales mg EAG/g extracto seco	Ref.
<i>Rhynchos vulgaris</i> L.	Tomillo	Hoja		7.30 ± 1.47	[58]
<i>Salvia officinalis</i> L.	Salvia	Hoja		6.80 ± 1	[58]
<i>Origanum majorana</i> L.	Mejorana	Hoja		4.65± 1	[58]
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Quinoa rosada	Semilla	6.66 ± 0.33		[59]
<i>Baccharis platyphloea</i>		Hojas	149.13±1.91		[60]
<i>Polygonum sabotiana</i>		Partes aéreas	102.94± 1.27		[60]
<i>Cyathea phalerata</i>	Helecho	Madera	305.57± 2.98		[60]
<i>Cyathea phalerata</i>	Helecho	Madera	119.00± 2.90		[60]
<i>Trichilia catigua</i>		Corteza	486.07± 3.90		[60]
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Ajenjo, hierba santa	Callos		8.53	[61]
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Espino amarillo	Hojas		245.65	[62]
<i>Opuntia ficus indica</i> f. <i>inermis</i>	Nopal	Flor		159.76±0.32	[63]
<i>Vitis vinifera</i>	Uva (merlot)	Semilla		38.45 ±79.30	[64]
<i>Vitis vinifera</i>	Uva (merlot)	Piel		14.90±75.97	[64]
<i>Vitis rotundifolia</i>	Uva (muscadine)	Semilla		32.1371.63	[64]
<i>Persea americana</i> Mill, Fuente	Aguacate	Fruto	0.66±0.01		[65]
<i>Persea americana</i> Mill, Hass	Aguacate	Fruto	0.78±0.01		[65]
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Arándano azul	Fruto	2.81 ± 0.162 /ml de jugo		[66]
<i>Fragaria x ananassa</i> Duch (Eliot)	Fresa	Fruto	0.29 mg/g		[67]
<i>Betula alghasianensis</i>	Abedul amarillo	Follaje		70.2 ± 2.5	[68]
<i>Betula alghasianensis</i>	Abedul amarillo	Ramos tiernos		58.3 ± 1.5	[68]
<i>Betula alghasianensis</i>	Abedul amarillo	Madera		240.1 ± 6.8	[68]

<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Corteza Exterior		170.2 ± 3.0	[68]
<i>Betula alleghaniensis</i>	Abedul amarillo	Corteza Interior		313.1 ± 18.0	[68]
<i>Picea mariana</i>	Picea negra	Corteza		193.06 ± 4.21	[51]
<i>Picea mariana</i>	Picea negra	Corteza		404.39 ± 4.04	[51]
<i>Abies balsamea</i>	Abeto balsámico	Corteza		182.08 ± 7.69	[51]
<i>Abies balsamea</i>	Abeto balsámico	Corteza		44.01 ± 0.34	[51]
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Pino gris, ciprés	Corteza		232.58 ± 2.36	[51]
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Pino gris, ciprés	Corteza		30.75 ± 0.48	[51]
<i>Betula alleghaniensis</i> Britton	Abedul amarillo	Corteza		314.98 ± 7.83	[51]
<i>Betula alleghaniensis</i> Britton	Abedul amarillo	Corteza		309.07 ± 8.55	[51]
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucalipto	Corteza		385.63 ± 11.02	[69]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino	Hojas	6.91 ± 0.02		[70]
<i>Quercus grisea</i>	Encino	Hojas	7.06 ± 0.28		[70]
<i>Quercus laevis</i>	Encino	Hojas	5.75 ± 0.03		[70]
<i>Quercus obtusata</i>	Encino	Hojas	5.72 ± 0.21		[70]
<i>Quercus macrocarpa</i> subsp. <i>sporinensis</i>	Encino	Corteza	337.101 ± 0.02		[71]
<i>Quercus emoryi</i>	Encino	Corteza	357.401 ± 0.82		[71]
<i>Quercus emoryi</i>	Encino	Corteza	389 ± 0.84		[71]
<i>Quercus suber</i> L.	Encino	Corteza exterior	200 ± 0.04		[72]
<i>Quercus suber</i> L.	Encino	Corteza exterior	350 ± 0.01		[72]
<i>Quercus suber</i> L.	Encino	Corteza exterior	280 ± 0.02		[72]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino	Hojas		561.5 ± 71.06	[73]
<i>Quercus sideroxyia</i>	Encino	Corteza		464.0 ± 11.6	[74]
<i>Quercus sideroxyia</i>	Encino	Corteza		686.7 ± 12.9	[74]
<i>Quercus alba</i>	Encino		34.36 ± 0.85		[75]
<i>Quercus durifolia</i>	Encino		20.98 ± 1.03		[75]
<i>Quercus sideroxyia</i>	Encino		36.93 ± 0.76		[75]
<i>Quercus resinosa</i>	Encino		130.74 ± 1.67		[75]

En la tabla se muestra la media ± la desviación estándar, expresada como Equivalentes de Ácido Galico por gramo de extracto (EAG/g) o Equivalentes de Ácido Galico por gramo de extracto seco (EAG/g extracto seco).

4. Estudios toxicológicos realizados con polifenoles

Los estudios toxicológicos se definen como el conjunto de ensayos realizados a una sustancia o mezcla de sustancias químicas en animales de experimentación o *in vitro*. Dichos estudios son diseñados para obtener la información necesaria que permita conocer el perfil toxicológico de la sustancia en estudio, de manera que, en el caso de desarrollo de moléculas para consumo humano, se puedan justificar más estudios sin exponer a los seres humanos a riesgos injustificados [76]. Durante el desarrollo de nuevos fármacos, alimentos o sustancias para consumo humano es necesario evaluar el potencial tóxico de las moléculas a explorar mediante diversos modelos experimentales. Esto es posible debido a la realización de ensayos toxicológicos en diferentes especies animales [77].

La toxicidad de las sustancias puede observarse a través de: a) el estudio de su exposición accidental; b) el estudio de su impacto *in vitro* utilizando células/lineas celulares; c) el estudio de su impacto *in vivo* en animales de experimentación [78]. En este último tipo de estudios se identifica la dosis inicial que se administrará en un estudio ulterior así como la esquematización de los aumentos posteriores de dosis y la identificación de los órganos diana que permitirán conocer si los efectos adversos que puedan presentarse son reversibles o irreversibles [79]. A continuación se describen las características de los estudios toxicológicos más empleados en el desarrollo de nuevas moléculas como candidatas a alimentos, medicamentos o productos cosméticos.

4.1. Estudio de toxicidad aguda

Este tipo de estudios son los encargados de evaluar la toxicidad producida por un fármaco o compuesto bioactivo como resultado de su administración en altas dosis, ya sea como dosis únicas o repetidas en un lapso no mayor a 24 h. Durante mucho tiempo este tipo de estudios eran utilizados para la búsqueda de la dosis letal media (DL₅₀), definida como la concentración que causa la muerte del 50% de los animales. En la actualidad, este tipo de estudios dejó de ser un requerimiento para el registro de nuevos medicamentos, siendo reemplazados por métodos alternativos como el de la dosis fija y el de las clases de toxicidad, reportados a finales del 2002 [77], [80].

Las dosis administradas en estos estudios han ido variando a raíz de los nuevos cambios que se han introducido en la experimentación animal para disminuir al máximo el sufrimiento de los animales, siendo aceptada hasta el 2001 una dosis máxima de 5000 mg/kg, mientras que 2000 mg/kg es la dosis máxima aceptada en la actualidad [77].

El objetivo es obtener los datos de los efectos ocasionados en los animales al ser expuestos a la sustancia estudiada en el ensayo [76]. Para obtener los resultados correspondientes del estudio agudo es necesario la observación de los animales expuestos durante un periodo de 14 días, concluido este periodo de observación los animales son sacrificados y analizados anatómico-patológicamente [81], [82].

4.2. Estudios de toxicidad a dosis repetidas

Este tipo de estudios toxicológicos tienen algunas diferencias con los estudios agudos. Además de la diferencia en cuanto a las concentraciones utilizadas, existen generalmente repeticiones de dosis. Estos estudios también se diferencian por la duración llegando a prolongarse hasta por 12 meses [77].

4.3. Estudios subcrónicos

En estos estudios se analizan los efectos adversos que puede producir una sustancia que es administrada en un animal de experimentación o en su defecto alguno de sus metabolitos, todo

esto durante un tiempo equivalente a no mayor del 10% de la vida del animal [76]. Esto conlleva a la detección de la dosis máxima en la cual no se presenta toxicidad relacionada con la droga (NOEL). Estos estudios también permiten conocer la dosis máxima tolerada (DTM). Una limitación importante es que estos estudios no permiten conocer los efectos que pueda presentar una sustancia a un tiempo mayor que su periodo de latencia, pero aportan la información necesaria para conocer cuáles son los órganos diana y sirven de base para elegir los niveles de dosificación que se utilizarán en los estudios crónicos [77], [83].

4.4. Estudios crónicos

Estos son los estudios donde se observan los efectos adversos o tóxicos que puede tener una sustancia como consecuencia de una administración diaria durante un periodo prolongado, generalmente más del 50% de la vida del animal de experimentación. Estos estudios varían en el tiempo que se ve expuesto el animal a la sustancia o mezcla de sustancias, y pueden tener una duración mínima de tres meses hasta en algunos casos de 2 años [76].

Estas investigaciones son realizadas con al menos dos especies animales, por ejemplo con algún roedor y otra especie no roedora, siendo los perros los más utilizados. El diseño de estos estudios está escamoteado a detectar efectos tóxicos generales entre ellos neurológicos, fisiológicos, bioquímicos, conductuales y patológicos. La dosis máxima utilizada no debe superar los 1000 mg/kg. Esta dosis puede tener efectos tóxicos pero sin comprometer la supervivencia del animal de experimentación [77].

4.5. Estudios toxicológicos alternativos

En los últimos años los métodos alternativos de experimentación animal han progresado, siendo hoy en día los métodos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* muy importantes en la evaluación del perfil toxicológico de nuevos compuestos. Estos métodos son muy utilizados para la evaluación de moléculas y son aceptados por las entidades regulatorias como la OCDE, la FDA y la EPA, debido a que pueden reducir, refinar y/o sustituir la experimentación *in vivo* en animales [84]. Los métodos alternativos se fundamentan en el principio de las 3 R (refinamiento, reducción y reemplazo) [84].

5. Estudios toxicológicos basados en compuestos fenólicos

A pesar de las características beneficiosas para la salud de los compuestos polifenólicos, la ingesta elevada y crónica de estas moléculas consumidas normalmente en la dieta diaria puede resultar en efectos adversos negativos para la salud. Por ejemplo, algunos taninos pueden ocasionar efectos antinutricionales debido a su capacidad como agentes quelantes [85]. Los polifenoles pueden interferir en la absorción del hierro consumido en los alimentos de la dieta diaria y provocar anemia [86].

Se ha reportado que los PF pueden alcanzar concentraciones tóxicas si su ingesta se encuentra entre el 1 y 5% total de la dieta diaria, no obstante en condiciones normales, lo habitual en una persona es ingerir, aproximadamente entre 25 mg y 1 g por día [86].

Debido al interés suscitado por estas moléculas en cuanto a su bioactividad, que las convierte en candidatas para el desarrollo de nuevos productos, en años recientes se han realizado diversos estudios toxicológicos para determinar su toxicidad con el objetivo de garantizar la seguridad de su consumo humano.

En 2015, Soto y colaboradores [87] evaluaron la toxicidad de la infusión de las hojas de chaya orgánica, obteniendo como resultado de dicha infusión, administrada en larvas de *A. sabina* una DL₅₀ de 1070.42 µg/ml. En base a estos resultados se llegó a la conclusión, de que el extracto no es tóxico y es seguro para el consumo como agente terapéutico en el tratamiento de la

diabetes mellitus. En un ensayo de letalidad en *A. salina* se demostró que los extractos hidroalcohólicos de las hojas de naranjo dulce (*Citrus aurantium* L. var. *sinensis* L.), naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), limón criollo (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), lima persa (*Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), todos ricos en polifenoles, presentaron cierta toxicidad dependiendo de la concentración, resultando ser no tóxicos a concentraciones menores de 10 µg/ml. Sin embargo, se presentó toxicidad moderada a concentraciones entre 100 y 1000 µg/ml [88]. En otra investigación se demostró que el extracto metanólico de limón criollo posee un valor de CL_{50} de 74,78 µg/ml [88].

Plazas Gonzalez (2015) [90] realizó un ensayo de toxicidad en *A. salina* de los CF presentes en fruto, hojas y flores de *C. bracteata*, *M. rupestris*, *G. erecta*, *B. racinosa*, *T. floribunda* y *D. alaternoides* obteniendo como resultado que los extractos de los frutos de *M. rupestris* y *G. erecta* poseen un CL_{50} superior a 1000 ppm, mostrando que a la mayor concentración ensayada no se afectó a la mitad de la población de este crustáceo. Los extractos de *G. erecta*, *D. alaternoides* y flores de *T. floribunda* presentaron una CL_{50} de 229, 173 y 196 ppm respectivamente, mientras que otros extractos estudiados en este ensayo (*C. bracteata*, *M. rupestris*, *G. erecta*, *B. racinosa*) resultaron poseer una toxicidad baja o moderada.

Poma, Requis y Gordillo (2011) [91], reportaron que los compuestos polifenólicos del extracto acuoso de hojas secas de *Asynon mariocata* L. (Guanábana) no presentó toxicidad, basado en el método de dosis límite establecido por la OCDE en el que se administra 1.5mg/kg a ratas. El extracto no produjo la muerte ni signos de toxicidad posteriores a la administración. La necropsia aplicada a las ratas no mostró alteraciones macroscópicas en los tejidos que se examinaron.

Se valoró la toxicidad aguda que presenta el extracto de hoja de *Psidium guajava*, reportada por poseer un elevado contenido de PF, por el método de las clases de toxicidad aguda y dosis letal media en ratas. En ambos estudios se reportó la ausencia de toxicidad a una dosis límite de 2000 mg/kg [92].

Si se analiza la información presentada anteriormente, es posible constatar que la toxicidad presentada por los extractos polifenólicos en modelos animales es relativamente baja sobre todo en el caso de una ingesta moderada. Esto podría deberse a su baja absorción y a su rápida metabolización [86]. Aunque estos estudios resultan alentadores, análisis más profundos dirigidos a comprender el mecanismo de toxicidad de los polifenoles deben realizarse sobre todo considerando mayores periodos de exposición con el fin de que los resultados puedan ser extrapolables a los seres humanos [86].

6. Conclusiones

Durante los últimos años ha habido un interés notable en el estudio de los PF, en parte atribuible a sus numerosas propiedades biológicas. Su capacidad antioxidante ha sido identificada como una de las más representativas. De hecho, la capacidad para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de numerosas plantas se ha asociado con su contenido en este tipo de moléculas. La distribución de PF no se restringe solamente a las flores o frutos de la planta, en diversos estudios se han demostrado la existencia de CF en hojas, raíces y cortezas.

Como se ha mencionado, y de acuerdo la revisión de la literatura realizada, los estudios utilizando extractos polifenólicos, han demostrado que la toxicidad de estos es de leve a moderada, llegando incluso a ser aparentemente inocuos. Estos resultados implicarían que la relación beneficio riesgo de estos compuestos podría ser muy prometedora, vislumbrándose como candidatos terapéuticos en el tratamiento de algunas enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Sin embargo, mucho queda aún por estudiar en cuanto a su toxicidad potencial, particularmente en lo relacionado con aparición de efectos tóxicos acumulativos tardíos, los que solo pueden

ser detectados con la realización de investigaciones toxicológicas de larga duración ejecutadas sobre la base de lineamientos bioéticos que garanticen el cumplimiento del principio de las tres R. Lo anterior resulta de vital importancia para establecer la utilidad de estas moléculas en el desarrollo de productos de uso humano generados por las industrias farmacéuticas, alimentaria y cosmecéutica donde se vislumbra un futuro prometedor para este tipo de compuestos.

Referencias

- [1] A. Mouni and F. Edwards-Lévy, *Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review*, vol. 3, no. 4, 2011.
- [2] M. Quiñones, M. Miguel, and A. Alejandro, "Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular," *Nutr. Hosp.*, vol. 27, no. 1, pp. 76-89, 2012.
- [3] C. W. I. Hamidini, G. M. Maciel, M. S. V. Plata-Oviedo, and R. M. Peralta, "Phenolic compounds in fruits - an overview," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 10, pp. 2023-2044, 2012.
- [4] J. Shay, H. A. Elraz, I. Lee, S. P. Zieske, M. H. Malek, and M. Hittnermann, "Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration," vol. 2015, 2015.
- [5] D. Procházková, I. Boušková, and N. Wilhelmová, "Antioxidant and pro-oxidant properties of flavonoids," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 4, pp. 513-523, 2011.
- [6] C. Mészáros, A. Szabó, C. Morand, C. Révész, and L. Jiménez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 737-747, 2004.
- [7] P. Sunkireddy, S. N. Jha, J. R. Kanwar, and S. C. Yadav, "Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cancer," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 112, pp. 554-62, Dec. 2013.
- [8] A. L. Gomez, J. A. Lopez, A. Rodriguez, J. Fortiz, I. R. Martínez, A. Apolizar, and L. F. Enriquez, "Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación," *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 137-143, 2016.
- [9] P. Baret, A. Septentrio-Malabre, M. Rigoulet, C. Lesfèvre D'Hellecourt, M. Priant, M. P. Gonthier, and A. Devin, "Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 1, pp. 167-174, 2013.
- [10] J. Rodrigo-García, L. A. De la Rosa, B. Herrera-Duenez, A. G. González-Barrios, G. A. González-Aguilar, S. Ruiz-Cruz, and E. Alvarez-Parrilla, "Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en Ciudad Juárez, México Polyphenol and antioxidant capacity quantification in," *Encrucijada*, vol. V, no. May 2011, pp. 67-75, 2016.
- [11] Y. E. Lopez, J. Fantinelli, L. F. González-Arbeláez, B. Rojas, J. I. Rias, G. Schinella, and M. Susana, "Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of Vaccinium meridionale Swartz during ischemia-reperfusion in rats," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, pp. 1-10, 2013.
- [12] E. Szliska and W. Kral, "Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, 2013.
- [13] M. R. Mirano-Jimenez, F. Trujillo-Esquível, M. a. Gallegos-Carosa, E. Reynoso-Camacho, R. F. González-Laredo, J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, and M. Ramos-Gomez, "Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 80, pp. 144-153, 2015.
- [14] F. a Van Dorsten, S. Peters, G. Gross, V. G. Reidan, M. Klinkenberg, R. C. H. De Vos, E. Vaughan, J. P. M. Van, S. Possemiers, T. Van De Wiele, and D. M. Jacobs, "Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent Gut Microbial Metabolism of Polyphenols from Black Tea and Red Wine / Grape Juice Is Source-Specific and Colon-Region Dependent," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 45, pp. 11331-11343, 2012.
- [15] K. Zapata, F. B. Cortes, and H. A. Rojano, "Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium azaca*)," *Dif. Tecnol.*, vol. 24, no. 5, pp. 103-112, 2013.
- [16] L. A. M. Grah, C. Chen, C. Liske, A. T. Curtis, and M. Esselen, "Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkanybenzene methylxanthine suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells," *J. Nutr. Metab.*, vol. 2013, 2013.
- [17] K. Hentze, E. H. Jeffery, J. W. Finley, A. Kong, K. J. Hentze, E. H. Je, L. L. F., and X. G. Lei, "Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry," no. November 2015, pp. 6837-6846, 2011.
- [18] I. Palacios, M. Lozano, C. Moro, M. D'Amigo, M. A. Rostagno, J. A. Martínez, A. García-Lafuente, E.

- Gaillanin, and A. Vilares, "Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms," *Food Chem.*, vol. 128, no. 3, pp. 674–678, 2011.
- [19] N. Balasundren, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
- [20] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Cruzier, "Dietary Polyphenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, 2013.
- [21] B. Zhang, J. Cai, C.-Q. Duan, M. Reeves, and F. He, "A Review of Polyphenolics in Oak Woods," *Am. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 6978–7014, 2015.
- [22] J. Gonçalves, C. L. Silva, P. C. Castillo, and J. S. Câmara, "An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines," *Microchem. J.*, vol. 106, pp. 129–138, 2013.
- [23] C. G. da Rosa, C. D. Borges, R. C. Zambiasi, J. K. Rutz, S. R. da Luz, F. D. Krause, E. V. Beversutti, and M. R. Nunes, "Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*)," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 58, no. 2, pp. 527–533, Oct. 2014.
- [24] I. C. W. Arts and P. C. H. Hallman, "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, p. 317S–335S, 2005.
- [25] W. Rontay and V. Orsat, "Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 2, pp. 409–424, 2012.
- [26] V. I. P. I. Ignat, I. Volf, "A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables," *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 3, no. 3, pp. 1033–1036, 2011.
- [27] E. de Rijcke, P. Out, W. M. a Niessen, F. Ariese, C. Gonijer, and U. a T. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 31–63, Apr. 2006.
- [28] A. Cruzier, D. Del Rio, and M. N. Clifford, "Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds," *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 6, pp. 446–467, 2010.
- [29] D. Prakash, G. Upadhyay, P. Pospisangulim, and C. Gupta, "Antioxidant and free radical scavenging activities of some fruits," *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 8, no. January, pp. 1109–1116, 2011.
- [30] J. M. Dimitric Markovic, B. Pejin, D. Milenkovic, D. Arsic, N. Begovic, M. Mejovic, and Z. S. Markovic, "Antiradical activity of delphinidin, pelargonidin and malvin towards hydroxyl and nitric oxide radicals: The energy requirements calculations as a prediction of the possible antiradical mechanisms," *Food Chem.*, vol. 218, pp. 440–446, 2017.
- [31] I. D. Silva, J. Gaspar, G. Gomes, A. S. Rodrigues, A. Laines, and J. Raefi, "Chemical features of flavonoids affecting their genotoxicity: Potential implications in their use as therapeutical agents," vol. 124, pp. 29–51, 2000.
- [32] H.-H. Geh, E. Khairudin, N. a Sokiran, M. N. Normah, and S. N. Baharun, "Metabolite profiling reveals temperature effects on the VOCs and flavonoids of different plant populations," *Plant Biol (Stuttg.)*, vol. 18, pp. 1–10, 2015.
- [33] F. Chizzini, N. Nisiali, A. Bellachione, A. Versari, and C. Riponi, "Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 60, no. 2, pp. 977–984, 2015.
- [34] S. Philipov and T. Doncheva, "Alkaloids Derived from Ornithine: Tropic Alkaloids," *Nat. Prod.*, no. January 2013, pp. 343–358, 2013.
- [35] C. H. Ji and N. Dakota, "Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources," *Nova*, pp. 159–209, 2001.
- [36] T. Steszenovic, P. N. Diaf, and M. Garcia-Perex, "Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass," *Curr. Nutr. Food Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 264–285, Nov. 2009.
- [37] P. Liu, *Composition of Hawthorn (Crataegus spp.) Fruits and leaves and emblic leafflower (Phyllanthus emblica) fruits*, 2012.
- [38] P. Arapitsas, "Hydrolyzable tannin analysis in food," *Food Chem.*, vol. 135, no. 3, pp. 1708–17, Dec. 2012.
- [39] M. Atanacković, A. Petrović, S. Jović, L. G. -Bukarica, M. Burač, and I. Crejić, "Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines," *Food Chem.*, vol. 131, no. 2, pp. 513–518, 2012.
- [40] P. Garselle, C. Cerletti, G. Guglielmini, P. Pignatelli, G. de Gaetano, and F. Violi, "Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: An update," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 22, no. 3, pp. 201–211, 2011.
- [41] L. Vincenzo, "Phenolic Compounds: Introduction," in *Natural Products*, no. Julio, K. G. Ramawat and J. M. Mérillon, Eds. 2013, pp. 1543–1580.

- [42] C. D. Stalikas, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, 2007.
- [43] E. T. Benković, T. Grobar, D. Žigon, U. Svagger, D. Janež, S. Krefl, and B. Strukelj, "Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity," *Jed. Crops Prod.*, vol. 52, pp. 23–28, 2014.
- [44] T. M. T. Avelar, A. S. Storch, L. A. Castro, G. V. M. M. Azevedo, L. Ferraz, and P. F. Lopes, "Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?," no. August, pp. 231–239, 2015.
- [45] C. López-Abarón and A. Denicola, "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays," *Anal. Chim. Acta*, vol. 763, pp. 1–10, 2013.
- [46] L. C. Corrales and M. M. Muñoz-Ariza, "Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno," *Nov. - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, vol. 10, no. 18, pp. 213–225, 2012.
- [47] N. Auberval, S. Dal, W. Hietiger, E. Seyfritz, J. Pelusa, C. Müller, M. Zhao, E. Marchiani, M. Pinget, N. Jesuidhofer, E. Maillard, V. Schini-Kerth, and S. Sigrist, "Oxidative Stress Type Influences the Properties of Antioxidants Containing Polyphenols in RINm5F Beta Cells," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.
- [48] A. Septembre-Malaterre, G. Stanislas, E. Douragna, and M.-P. Gonthier, "Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Reunion French Island," *Food Chem.*, vol. 212, pp. 235–233, 2016.
- [49] D. Pradal, P. Vanchel, S. Descassin, P. Dhmlster, and K. Dimitrov, "Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 32, pp. 137–146, 2016.
- [50] C. Angeloni, T. Maraldi, D. Milenkovic, and D. Vazouza, "Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology 2014," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, pp. 2–4, 2015.
- [51] M.-E. Garcia-Pérez, M. Rayer, A. Douque-Jaramalez, P. N. Dsouf, T. Stevanovic, and R. Pouliot, "Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes," *J. Ethnopharmacol.*, 2010.
- [52] M. Da Silva Moreira, C. E. Schmitt, G. A. Bela, J. Gasparotto, R. C. Bortolin, K. S. Muresco, L. Bittencourt, A. Zanotto-Filho, D. P. Gelain, and J. C. F. Moreira, "Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 32, pp. 181–188, 2016.
- [53] S. Rajasankaran, T. Sindhu, D. Durgapriya, D. Septhia, P. Raghavendran, and V. K. Gopalakrishnan, "Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of Melingo medicinal by In-vitro Assays," *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 310–316, 2011.
- [54] S. H. Choi, J. B. Ahn, N. Kazanietz, C. E. Levin, and M. Friedson, "Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 12, pp. 6594–6604, 2011.
- [55] H. Willeman, P. Hamer, A. Fertia, N. Voedts, N. Doikal, J. F. Goossens, and J. L. Hilbert, "A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs," *Sci. World J.*, vol. 2014, pp. 1–11, 2014.
- [56] a. Piazam, U. Vrhavsek, D. Muresco, F. Martini, F. Mandaj, and M. Nardini, "Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: Synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 50, pp. 12312–12323, 2012.
- [57] F. B. Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, "Metabolic Conversion of Dietary Flavonoids Alters their Anti-inflammatory and Antioxidant Properties," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 454–463, 2012.
- [58] M. H. H. Roby, M. A. Sachan, K. A.-H. Selim, and K. I. Khalef, "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts," *Jed. Crops Prod.*, vol. 43, pp. 827–831, May 2013.
- [59] F. Abderrahim, E. Huanatico, R. Segura, S. Arribas, M. C. Gonzalez, and L. Camdezo-Hoyos, "Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano," *Food Chem.*, vol. 183, pp. 83–90, 2015.
- [60] I. M. C. Brighente, M. Dias, L. G. Verdi, and M. G. Prisolatti, "Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species," *Pharm. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 156–161, 2007.
- [61] M. Ali and B. H. Abbasi, "Diazotization-induced changes in biomass parameters, total phenolic content, and antioxidant activity in callus cultures of *Artemisia absinthium* L.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2363–2376, 2014.
- [62] M. S. Yogendra Kumar, R. J. Tigrude, D. T. Maheshwari, A. Bansal, and K. Misra, "Antioxidant and

- antimicrobial properties of phenolic rich fraction of *Sesuvium portulacastrum* (Hippophae rhamnoides L.) leaves in vitro," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 3443–50, Dec. 2013.
- [63] H. Alimi, N. Hfaiedh, Z. Bouamri, M. Sakly, and K. Ben Rhouma, "Evaluation of antioxidant and anticarcinogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis flowers extract in rats," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 32, no. 3, pp. 406–16, Nov. 2011.
- [64] Y. Yilmaz and R. T. Toledo, "Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 1, pp. 41–48, 2006.
- [65] P. S. Sellemuth, M. Mafune, D. Sivakumar, and P. Seoudy, "Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 12, pp. 3004–31, Sep. 2013.
- [66] V. Krasulytė, P. R. Venisatras, A. Pakalnikas, L. Cesarienė, and R. Deubaris, "Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes," *Food Chem.*, vol. 188, pp. 583–590, 2015.
- [67] J. Oszmianski and A. Wojdylo, "Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices," *Environ. Food Res. Technol.*, vol. 228, no. 4, pp. 623–631, 2009.
- [68] P. N. Dionf, T. Stevanovic, and Y. Boutin, "The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 30, no. 2, pp. 297–303, Sep. 2009.
- [69] S. A. O. Santos, J. J. Vilaverde, C. S. R. Freire, M. R. M. Domingues, C. P. Neto, and A. J. D. Silvestre, "Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis* s. *E. urograndis*) and *E. resinosa* bark extracts," *Ind. Crops Prod.*, vol. 39, pp. 120–127, Sep. 2012.
- [70] J. Sanchez-Burgos, "Antioxidant, antimicrobial, antiprotease and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species," *Ind. Crops Prod.*, vol. 47, pp. 1–10, 2013.
- [71] D. Silitrengla, S. Salvaringla, and U. Ş. Hayat, "Evaluation of antioxidative, protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity, and cytotoxic activities of three different *Quercus* species," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 2, pp. 141–6, Feb. 2012.
- [72] S. A. O. Santos, P. C. R. O. Pinto, A. J. D. Silvestre, and C. P. Neto, "Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L.," *Ind. Crops Prod.*, vol. 31, no. 3, pp. 531–526, May 2010.
- [73] J. A. Gallegos-Infante, N. E. Rocha-Guzmán, R. F. González-Laredo, L. Medina-Torres, C. A. Gómez-Albapa, L. A. Ordoñez-Martínez, C. E. Martínez-Sánchez, B. Hernández-Santos, and J. Rodríguez-Ramírez, "Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying," *Food Bioproc.*, vol. 2, pp. 31–38, Jan. 2013.
- [74] M. Rosales-Castro, E. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, M. J. Rivas-Arreola, and J. J. Karchesy, "Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS," *Hefeweisung*, vol. 66, no. 5, pp. 577–584, Jan. 2012.
- [75] N. E. Rocha-Guzmán, J. E. Medina-medrano, A. Gallegos-infante, M. Ramos-g, and S. M. Gomez, "Chemical Evaluation, Antioxidant Capacity, and Consumer Acceptance of Several Oak Infusions," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 2, 2012.
- [76] R. Ramirez-Huerta and N. E. Soto Ruiz, "Estudios Pre-clínicos y Clínicos," *Cópiavis*, pp. 1–20, 2013.
- [77] R. Gómez and R. Mías, "Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados," *Rev. CENIC Ciencias Biol.*, vol. 38, no. 3, pp. 204–208, 2007.
- [78] S. Parasuraman, "Toxicological screening," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 2, no. 2, pp. 74–79, 2011.
- [79] T. I. Ramos, "Contexto actual de los estudios preclínicos," *Dep. ciencias la vida y la Agric.*, vol. 1, no. 3, pp. 103–105, 2015.
- [80] OECD/OCDE, "Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method," *OECD Guidel. Test. Chem.*, no. December, pp. 1–14, 2001.
- [81] OECD/OCDE, "Nemototoxicity Study in Rodents," no. July, pp. 1–15, 1997.
- [82] D. F. Arencibia-Arreola, L. A. Rosario-Fernández, Y. Lopez-Peria, M. Pazñas-Medina, J. F. Infante-Bouzaac, D. Diaz-Rivero, and J. L. Prieto-Diaz, "Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda," *Rev. Toxicol. en Línea*, pp. 1–15, 2003.
- [83] OCDE, "Preliminary Draft Updated Test Guideline 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents; Updated With," *OCDE Guidel. Test. Chem.*, pp. 1–11, 2006.
- [84] H. Kandařevá and S. Letařšvová, "Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods," *Intoxicap. Toxicol.*, vol. 4, no. 3, pp. 107–113, 2011.

- [83] I. Ercan, "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance," *Adv. Res.*, vol. 16, no. 11, pp. 317-333, 1998.
- [86] E. V. A. G. Cruz, "Compuestos fenólicos," vol. 23, pp. 80-84, 2004.
- [87] R. V. Soto, M. Endicott, M. Kuhn, M. J. Vardi Star, A. O. Carballo, P. Praciado-Ruizal, J. A. González, and I. R. Espinoza-Rivera, "Cuidados en chrysanthemum hidropónico orgánico y su capacidad hipoglucémica, calidad nutricional y toxicidad." *Cuidados chrysanthemum orgánico hidropónico: and its hypoglycemic capacity, nutritional quality and toxicity.* *Rev. Ictes. Ciencias Agrícolas Mezahuetepocol Near Palacio Anate.*, vol. 6, no. 110, pp. 815-825, 2015.
- [88] K. D. Barrios, Y. H. Sánchez, N. V. Pérez, and O. P. Villalba, "Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae)," *Rev. Cuba. Plantes Med.*, vol. 17, no. 4, pp. 368-379, 2012.
- [89] E. A. Plaza González, "Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceae colombianas," *Rev. Cuba. Plantes Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 182-199, 2015.
- [90] E. Plaza-González, "Tamizaje fitoquímico preliminar , evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceae colombianas Preliminary phytochemical screening , antioxidant , and toxic activity evaluation of six species of colombian Ericaceae," *Rev. Cuba. Plantes Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 182-199, 2015.
- [91] E. M. Poma, F. R. Requía, and G. C. Gordillo, "Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Artemisa mexicana* L. (Compositae) de Cuzco," *Chec. Ibero.*, vol. 14, no. 2, pp. 29-33, 2011.
- [92] E. Rodríguez Amado, A. Lafontada Prado, and L. Pérez Roubín, "Fitos de *Psidium guajava* L.," *Rev. Cuba. Rese.*, vol. 47, no. 1, pp. 127-135, 2013.

11.1. Artículo de investigación “Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus scytophylla* Bark”



Article

Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus Laurina*, *Quercus Crassifolia*, and *Quercus Scytophylla* Bark

Eréndira Valencia-Avilés ¹, Martha Estrella García-Pérez ², Ma. Guadalupe Garnica-Romo ³, Juan de Dios Figueroa-Cárdenas ⁴, Esperanza Meléndez-Herrera ⁵, Rafael Salgado-Garciglia ⁶, and Héctor E. Martínez-Flores ^{2*}

- ¹ Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán CP 58030, Mexico; evalencia@umich.mx
 - ² Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Trintanztan 173, Col. Matamoros, Morelia, Michoacán CP 58240, Mexico; margar@liva.ca
 - ³ Facultad de Ingeniería Civil, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán CP 58030, Mexico; ggarnica@umich.mx
 - ⁴ Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Libramiento Norponiente 2000, Fraccionamiento Realde Juriquilla, Querétaro, Qro CP 76230, Mexico; jfigueroa@investar.mx
 - ⁵ Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida San Juanito Iticuaró SN, Morelia, Michoacán CP 58330, Mexico; emelendez@umich.mx
 - ⁶ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán CP 58030, Mexico; ralsgado@umich.mx
- * Correspondence: hmartinez@umich.mx; Tel: +52-(443)-314-2152

Received: 5 May 2018; Accepted: 19 June 2018; Published: 26 June 2018



Abstract: The objective of this work was to determine the concentration of total phenols, total flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins present in crude extracts of *Quercus laurina*, *Q. crassifolia*, and *Q. scytophylla* bark. They were extracted by ethanol (90%) maceration and hot water. The antioxidant capacity was determined by the ability to capture OH•, O₂•⁻, ROO•, H₂O₂, NO•, and HClO. The hot water crude extract of *Q. crassifolia* was chosen to be concentrated and purified due to its higher extraction yield (20.04%), concentration of phenol compounds (747 mg gallic acid equivalent (GAE)/g, 25.4 mg quercetin equivalent (QE)/g, 235 mg ChAE/g, 25.7 mg chlorogenic acid equivalents (ChAE)/g), and antioxidant capacity (expressed as half maximal effective concentration (EC₅₀, µg/mL): OH• = 918, O₂•⁻ = 80.5, ROO• = 577, H₂O₂ = 597, NO• ≥ 4000, HClO = 740). In a second stage, *Q. crassifolia* extracted with hot water was treated with ethyl acetate, concentrating the phenol compounds (860 mg GAE/g, 43.6 mg QE/g, 362 ChAE/g, 9.4 cyanidin chloride equivalents (CChE)/g) and improving the scavenging capacity (OH• = 467, O₂•⁻ = 58.1, ROO• = 716, H₂O₂ = 22.0, NO• ≥ 4000, HClO = 106). *Q. crassifolia* had the highest polyphenolic concentration and the better capacity for scavenging reactive species, being a favorable candidate to be considered in the development of new products.

Keywords: *Quercus*; oak bark; scavenging ability; polyphenols

1. Introduction

The genus *Quercus*, common name oak, belongs to the Fagaceae family. Oak is one of the most profitable economic woods used in the cooperage industry [1]; even the bark is utilized as stoppers. However, up to 25% of the bark has no application or is consumed as fuel [2]. The bark

is then considered as waste, with scarce utilization, and sometimes the improvised ways of storage, elimination, or distribution can become an ecological and economic problem to be solved [3].

Some studies [4–6], reported that oak bark contains high concentrations of polyphenols. Structurally, phenolic compounds comprise an aromatic ring, bearing one or more hydroxyl substituents, and range from simple molecules to highly complex polymerized compounds [7]. More than 8000 phenolic structures are currently known, including phenolic acids (derivatives of benzoic acid and cinnamic acid), flavonoids, tannins (hydrolyzable and condensed), stilbenes, and lignans, among others [8]. In plant tissues, they are mainly present attached to sugars, although occasionally they are found as aglycones [9].

Since polyphenols are capable of scavenging reactive species, such as superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl ($\bullet OH$), nitric oxide ($NO\bullet$), and allyl peroxy radicals ($ROO\bullet$), they are linked to the prevention of various diseases, by acting as antioxidants through electron-donating mechanisms [10]. Polyphenols have different types of pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative, and hypolipidemic, and they also regulate redox potentials, metabolic disorders, and apoptosis [11].

Most research about the phenolic content and antioxidant properties of oak has been done on European and Asiatic species, mainly using leaves [12], twigs [13], acorns [14], and bark [15], and has shown that oak bark contains the highest concentration of total phenols, including tannins, proanthocyanidins, and flavonoids with strong anti-radical properties [4,5,15].

Although Mexico is considered one of the most important countries regarding the diversity of oaks, with 150 species reported [16], and the traditional use of the bark in Mexican ethnic groups has been to treat different illnesses, like stomach ache, burns, infections, pain, etc. [17], the scientific information about Mexican oak species is scarce. Bark extract from *Q. sideroxyta* was determined to have a high concentration of total phenols, proanthocyanidins, and flavonoids, as well as strong antioxidant activity [3]. The chemical composition of sapwood, heartwood, and bark of the Mexican species *Q. laurina* and *Q. crassifolia*, was described, concluding that bark extract content for *Q. crassifolia* and *Q. laurina* was higher in comparison to other hardwood bark [6].

Bark oak polyphenols have been used for the development of functional foods, such as, the use of oak wood during the elaboration of barrels in the aging winemaking process, that contributes to increasing the polyphenol content of wines, due to the extraction of these compounds from oak wood [18]. Moreover, the preparation of drinks based on toasted acorn [19], honeydew honey of *Q. pyrenaica* [20], and infusions of oak leaves [21], show that oak is a good source of phenolic compounds, which can be extracted and used in the formulation of new functional products.

Oak bark from Mexican species represents an area of great interest for research, because it is a potential source of natural antioxidants [22]. The objective of this study was to determine the presence and amount of different groups of polyphenols in extracts from oak species *Quercus crassifolia*, *Quercus laurina*, and *Quercus scytophylla*, as well as their antioxidant capacity. We used two extraction methods, maceration with ethanol solution (90%) and extraction with hot water. Also, we selected the oak (*Q. crassifolia*), which showed both the highest polyphenol yield and highest antioxidant capacity in the extracts to be purified with ethyl acetate, to obtain an extract rich in polyphenol compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material

Bark of *Q. crassifolia*, *Q. laurina*, and *Q. scytophylla* was collected in a forestry plantation located in Ciudad Hidalgo, Michoacán, México. The three oak species were chosen due to their importance for the forestry industry in Michoacán. The leaves, flowers, and acorn were botanically identified by Pablo Cuevas Reyes, expert in forest botany of the Biology Faculty, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), and Emmanuel Pérez Calix, botanist of the “Institute of Ecology” in Patzcuaro, Michoacán. The bark was washed, cut into rectangles of about 5 × 5 cm, and dried at

40 °C for 48 h. The bark was milled using a Thomas Digital ED-5 Wiley® cutting mill and sieved with # 40 mesh (400 µm).

2.2. Polyphenol Crude Extracts

2.2.1. Extraction by Maceration

The crude extraction of phenolic compounds was done by maceration [23]. Twenty grams of powder bark was added to 200 mL of a 90% ethanol solution, and agitated at 220 rpm for 24 h at 22 °C. The extract was filtered using Whatman#42 paper, and the solids were washed with 200 mL of 90% ethanol. The crude extract was evaporated and then the solid residue was lyophilized (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco®, Kansas City, MO, USA) and stored in amber bottles at 4 °C.

2.2.2. Extraction by Hot Water

Fifty grams of powder bark was used for the extraction with water (2 x 500 mL) under reflux for 1 h. The aqueous extract was filtered with Whatman 42 filter paper, lyophilized, and stored in dark bottles at 4 °C [23].

2.3. Crude Extract Composition

Total phenol, flavonoid, hydroxycinnamic acid, and proanthocyanidin content were determined in the crude extracts using spectrophotometric techniques. The results were compared with the commercial extract Oligopin® (Nutri-Dyn, Maple Plain, MN, USA), recognized for its antioxidant properties, as mentioned [24]. Total phenol content was determined following the method proposed by Scallert et al. (1989), using a gallic acid calibration curve, and the absorbance was measured at 750 nm and the results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g of dried extract [25]. The flavonoid content was determined at 415 nm with the method of Brighente et al. (2007), using a calibration curve with quercetin used as standard. The results were expressed as mg of quercetin equivalent (QE)/g of dried extract [26]. The hydroxycinnamic acid content was determined by comparison with a calibration curve using chlorogenic acid as a standard, and the absorbance of the test was measured at 525 nm, according to the method described in the European Pharmacopoeia [27], while the results were expressed as mg of chlorogenic acid equivalents (ChAE)/g of dried extract. Proanthocyanidin content was determined at 550 nm, using cyanidin chloride as standard by the methodology proposed by Porter et al. (1996) [28]. The results were expressed as mg of cyanidin chloride equivalents (ChCE)/g of dried extract.

2.4. Antioxidant Capacity of Crude Extracts

The antioxidant capacity of oak bark crude extracts was determined by spectrophotometric methods, considering the ability of extracts to capture oxidizing species of biological relevance. The percentage inhibition for hydrogen peroxide, nitric oxide, hypochlorous acid, superoxide, and hydroxyl was calculated using Equation (1), as reported by Garcia-Pérez et al. (2010) [29]:

$$\% \text{Scavenging} = 100 \left\{ \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \right\}, \quad (1)$$

where A_0 is the absorbance of the mixture without the extract, A_1 is the absorbance of the mixture with the extract, and A_2 is the absorbance of the extract.

Equation (2) was used to determine the percentage of peroxyl radical scavenging [29]:

$$\% \text{Scavenging} = 100 \left[1 - \frac{A_{10} - A_{1f}}{A_{10} - A_{1f}} \right], \quad (2)$$

where, A_{e0} is the absorbance of the mixture without 2,2-diazobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), A_{c0} is the control absorbance (absorbance of the mixture without extract or AAPH), A_{ef} is the absorbance of the mixture with extract and AAPH, and A_{cf} is the absorbance of the mixture without the extract.

In all cases, the effective concentration (EC_{50}) was calculated, defined as the amount of extract required until reduced by 50% of the concentration of the reactive species. The antioxidant capacity of extracts was compared to that of Oligopin[®] and turmeric Terana[®] (Terana S.A., Ciudad de México, México) taken as positive controls. All analyses were done in triplicate.

2.4.1. Superoxide Anion Radical ($O_2^{\bullet-}$) Scavenging Activity

The ability of the extracts to capture superoxide radicals ($O_2^{\bullet-}$) was measured [30], using one milliliter of nitroblue tetrazolium [100 μ M] mixed with 1 mL of Nicotinamide adenine dinucleotide NADH [468 μ M] and 1 mL of extract. The reaction was initiated with 150 μ L of phenazine methosulfate. The solution was incubated at 30 °C for 30 min, and the absorbance of the solutions was measured [30].

2.4.2. Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Scavenging Activity

The capability of extracts to scavenge H_2O_2 reactive species was calculated following the procedure described by Kuch et al. (1989). In test tubes, 1.7 mL of the extract solution, in concentrations between 0.5 and 1500 μ g/mL, plus 300 μ L of H_2O_2 solution (40 mM) was added, and maintained at 22 °C for 3 min. The absorbance was measured at 230 nm [31].

2.4.3. Hydroxyl Radical (OH^{\bullet}) Scavenging Activity

The antiradical activity of the extracts against hydroxyl radicals was determined as reported by Smirnov & Cumbes (1989). One milliliter of the extract solution was added to dimethyl sulfoxide at different concentrations (ranging from 100 to 2000 μ g/mL), 300 μ L $FeSO_4$ (8 mM), and 250 μ L of H_2O_2 (20 mM). The reaction was initiated by addition of 1 mL of salicylic acid solution (3 mM), and then was incubated for 30 min at 30 °C. After that, 450 μ L of distilled water was added, and the mixture was centrifuged for 10 min at 3500 rpm, the supernatant recovered and the absorbance measured at a wavelength of 510 nm [32].

2.4.4. Nitric Oxide Radical (NO^{\bullet}) Scavenging Activity

The nitric oxide radical scavenging activity was analyzed according to the method indicated by Steejayan & Rao (1997) where 0.5 mL aliquot of extract between 100 and 2500 μ g/mL was mixed with 0.5 mL of 10 mM sodium nitroprusside, and placed in a water bath at 37 °C for 2.5 h. After that, the samples were maintained at 22 °C for 20 min, then 1 mL of Griess reagent was added; the mixture was kept for 40 min at 22 °C, and maintained for 20 min in the dark. The absorbance was measured at 548 nm [33].

2.4.5. Peroxyl Radical (ROO^{\bullet}) Scavenging Activity

The ability to capture peroxyl radicals (ROO^{\bullet}) was determined by using the pyrogallol red (1.5 mL) as a target oxidized molecule and AAPH (25 μ L, 600 mM) as a peroxyl radical generator like López-Alarcón & Lissi (2005). A 150 μ L aliquot of extract was added at concentrations between 100 μ g/mL and 1500 μ g/mL. The oxidized pyrogallol red was measured at 540 nm [34].

2.4.6. Hypochlorous Acid (HClO) Scavenging Activity

The capacity to scavenge hypochlorous acid was measured using the methodology described by Arouma & Halliwell (1987) with some modifications. One milliliter of the extract, between 100 and 2500 μ g/mL, was mixed with 1 mL of HClO (14.3 mM) in phosphate-buffered saline (PBS). The mixture

was incubated at 37 °C for 15 min. Then, 222.22 µL of catalase (400 U) was added, and the mixture was incubated for 15 min at 37 °C. The absorbance was measured at 240 nm [35].

2.5. Liquid-Liquid Purification of the Most Antioxidant Extract Selected: Composition and Antioxidant Capacity of the Purified Extract

The crude extract of *Q. crassifolia* was chosen to be purified and concentrated, because it was shown to have the best extraction yield, higher polyphenol concentration, and better capacity to scavenge reactive species. A liquid-liquid extraction was done as follows [7]. Six grams of lyophilized extract was suspended in 100 mL of water and filtered with a Gooch crucible. The solution was defatted with hexane (5 × 100 mL), and then the polyphenols were concentrated with ethyl acetate (5 × 100 mL). This solvent was evaporated, resuspended in water and lyophilized. The percentage extraction as well as the total phenol, total flavonoid, hydroxycinnamic acid, and proanthocyanidin content was determined for the purified extract. Also, the antioxidant capacity of the extract to scavenge different reactive species (hydrogen peroxide, nitric oxide, hypochlorous acid, as well as hydroxyl, superoxide, and peroxy radicals) was analyzed.

2.6. Statistical Analysis

The experimental results were expressed as mean ± standard error (SE) of three replicates. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$), and means separated by Duncan's test. Spearman's correlation test was used for correlations ($p < 0.05$). Student's *t*-test was used to analyze differences in content of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the crude and purified extract. Statistical analysis was done using STATISTICA 7.0 software (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, USA) [36].

3. Results and Discussion

3.1. Yields and Chemical Composition of Crude Extracts from *Quercus* sp.

The extraction yields of the crude extracts obtained by the two extraction methods for the three different *Quercus* sp. are shown in Table 1. There were no significant differences ($p < 0.05$) between the extraction method using hot water compared to the maceration method for *Q. laurina* and *Q. scytophylla*. Extract from *Q. crassifolia* using hot water had the highest extraction yield, 20.0% w/w dry bark. These differences can be explained by the different polarity of the compounds present in the species of *Quercus* sp.

Table 1. Extraction yields of crude and purified extracts from Mexican oak species obtained by hot water and maceration methods.

Extract	Extraction Method	% Extraction Yield (w/w Dry Bark) [†]
<i>Quercus crassifolia</i>	Hot water	20.0 ± 7.7 ^{a*}
Purified <i>Quercus crassifolia</i>	Hot water	2.7 ± 0.3
<i>Quercus crassifolia</i>	Maceration	11.0 ± 1.0 ^{b,c}
<i>Quercus laurina</i>	Hot water	14.2 ± 0.2 ^b
<i>Quercus laurina</i>	Maceration	13.6 ± 0.1 ^b
<i>Quercus scytophylla</i>	Hot water	6.8 ± 1.9 ^{c,d}
<i>Quercus scytophylla</i>	Maceration	4.4 ± 0.2 ^d

[†] % (w/w dry bark). Means with different letters (a, b, c, d) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA, followed by Duncan's test). Means with * in the same column are different at $p < 0.05$ (Student's *t*-test, comparing crude and purified *Q. crassifolia* hot water extracts).

The total phenol, flavonoid, hydroxycinnamic acid, and proanthocyanidin content is shown in Table 2. The concentration of total phenols followed the order: *Q. laurina* exposed to the maceration method (756 mg GAE/g), *Q. crassifolia* exposed to the hot water method (746 mg GAE/g) and

Q. crassifolia exposed to the maceration method (694 GAE/g). There were no significant differences ($p < 0.05$) between treatments, and values were similar to those obtained for the Oligopin® sample (735 mg GAE/g). For total flavonoid content, extraction with hot water led to the highest total flavonoid content in *Q. crassifolia* (25.4 mg QE/g), four times higher than the Oligopin® value (6.4 mg QE/g). The highest value for proanthocyanidin compounds was observed in the *Q. crassifolia* extract obtained by maceration (53.5 mg CChE/g), significantly different ($p < 0.05$) from the other treatments and lower than that obtained for Oligopin® (69.2 mg CChE/g). The best extraction yields for hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins were obtained when the maceration method was used. Our results are in agreement with those results described by Garcia-Pérez et al. (2010), where the relationship between the extracts made both by maceration and with hot water was studied in different barks of Canadian wood species.

Table 2. Total phenol, total flavonoid, total hydroxycinnamic acid, and proanthocyanidin content of Mexican *Quercus* species extracts obtained by hot water and maceration methods.

Extract	Total Phenols (mg GAE/g)	Total Flavonoids (mg QE/g)	Hydroxycinnamic Acids (mg ChAE/g)	Proanthocyanidins (mg CChE/g)
<i>Q. crassifolia</i> hotwater	747 ± 41 ^a	25.4 ± 0.6 ^a	231 ± 2 ^a	25.7 ± 1.3 ^d
Purified <i>Q. crassifolia</i> hotwater	860 ± 6 ^a	43.6 ± 0.3 ^a	362 ± 13 ^a	9.4 ± 0.3
<i>Q. crassifolia</i> maceration	695 ± 62 ^a	14.0 ± 0.3 ^d	169 ± 3 ^b	53.5 ± 1.0 ^b
<i>Q. laevis</i> hotwater	474 ± 44 ^b	24.1 ± 1.1 ^b	133 ± 4 ^a	14.2 ± 0.4 ^a
<i>Q. laevis</i> maceration	756 ± 17 ^a	13.7 ± 0.2 ^a	145 ± 17 ^a	24.3 ± 1.8 ^d
<i>Q. scalyphyla</i> hotwater	329 ± 38 ^c	24.1 ± 0.5 ^b	113 ± 3 ^a	12.6 ± 2.3 ^a
<i>Q. scalyphyla</i> maceration	521 ± 40 ^b	12.9 ± 0.3 ^c	173 ± 13 ^a	44.4 ± 3.8 ^a
Oligopin®	735 ± 31 ^a	6.4 ± 0.2 ^f	337 ± 28 ^a	69.2 ± 0.8 ^a

Means with different letters (^{a, b, c, d, e, f}) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA, followed by Duncan's test). GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents; ChAE, chlorogenic acid equivalents; CChE, cyanidin chloride equivalents. Means with * in the same column are different at $p < 0.05$ (Student's *t*-test, comparing crude and purified *Q. crassifolia* hotwater extracts).

In agreement with those results described by Garcia-Pérez et al. (2010) and Naima et al. (2015), in the first one, compared the relationship between maceration and hot water extraction for different barks of Canadian wood species. In another investigation, Naima et al. (2015), showed that the increase of the extract temperature improves the yield of polyphenols and hydrolyzable tannins extracted with hot water from *Acacia mollissima* bark [29,37].

The lower content of hydroxycinnamic acids and proanthocyanidins in Michoacán oak species compared to the commercial extract Oligopin® could be due to analysis of the extracts in crude form, which must contain highly polar compounds (e.g., sugars), non-selectively extracted using these extraction methods, unlike the extract Oligopin®, which represents the ethyl acetate fraction of the aqueous extract of French maritime pine bark.

For this reason, we decided to purify the extract obtained by the hot water method for *Q. crassifolia*, the species with the highest solids yield. This purification was done with ethyl acetate. The results showed that the fraction purified with ethyl acetate had the highest values for total phenols (860 mg GAE/g), flavonoids (43.6 mg QE/g), and hydroxycinnamic acids (362 mg ChAE/g) compared to the other species (Table 2), regardless of the extraction method used. Even greater values were obtained than for the commercial extract Oligopin®. Only the proanthocyanidin value was lower in the purified *Q. crassifolia* ethyl acetate extract compared to all other species, regardless of the method used.

3.2. Antioxidant Capacity of Crude Extracts from *Quercus* sp.

The antioxidant capacity values of crude extracts of the oak species obtained by maceration and hot water, as well as the Oligopin® and Terana® turmeric, considering their ability to capture species of biological relevance, such as hydroxyl, superoxide and peroxy radicals, hydrogen peroxide, nitric oxide, and hypochlorous acid, is shown in Table 3.

Table 3. Free radical scavenging of *Quercus* sp. bark hot water and ethanolic extracts.

Extract	OH• EC ₅₀ (µg/mL)	O ₂ • ⁻ EC ₅₀ (µg/mL)	ROO• EC ₅₀ (µg/mL)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (µg/mL)	NO• EC ₅₀ (µg/mL)	HClO EC ₅₀ (µg/mL)
<i>Q. crassifolia</i> hot water	918 ± 9 ^{a*}	80.5 ± 0.7 ^{a*}	377 ± 40 ^a	337 ± 162 ^{b*}	>4000 ^{a*}	740 ± 54 ^{b*}
Purified <i>Q. crassifolia</i> hot water	467 ± 50	58.1 ± 1.6	717 ± 9 ^a	22.0 ± 1.8	>4000 ^a	108 ± 25
<i>Q. crassifolia</i> maceration	2084 ± 198 ^b	40.9 ± 16.4 ^a	3747 ± 87 ^a	603 ± 122 ^b	673 ± 49 ^b	1276 ± 40 ^a
<i>Q. laurina</i> hot water	1257 ± 75 ^a	629 ± 9 ^a	582 ± 15 ^a	727 ± 57 ^b	>4000 ^a	774 ± 192 ^b
<i>Q. laurina</i> maceration	>4000 ^a	3253 ± 917 ^b	622 ± 48 ^a	579 ± 116 ^b	149 ± 17 ^d	387 ± 86 ^c
<i>Q. scytophylla</i> hot water	1865 ± 295 ^b	>4000 ^a	390 ± 160 ^d	1102 ± 49 ^a	>4000 ^a	866 ± 183 ^b
<i>Q. scytophylla</i> maceration	>4000 ^a	406 ± 135 ^d	836 ± 28 ^b	1080 ± 166 ^a	661 ± 177 ^a	933 ± 212 ^b
Oligopin®	1271 ± 72 ^c	104 ± 8 ^a	563 ± 23 ^c	174 ± 10 ^c	>4000 ^a	1310 ± 114 ^a
Terana® turmeric					53.8 ± 39.0 ^d	

Means with different letters (^a, ^b, ^c, ^d, ^e) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA, followed by Duncan's test). OH•; O₂•⁻; ROO•; H₂O₂; NO•; HClO. Means with * in the same column are different at $p < 0.05$ (Student's *t*-test, comparing crude and purified *Q. crassifolia* hot water extracts). EC₅₀: half maximal effective concentration.

This chemical characterization provides information on the chemical reactivity of the phenolic crude extracts for different free radicals and reactive species. The EC₅₀ values showed that *Q. crassifolia* extracts, obtained both by maceration and hot water, had the best ability to capture superoxide anions (40.9 and 80.5 µg/mL, respectively), while *Q. crassifolia* extracted with hot water showed the best ability to capture hydroxyl radicals (918 µg/mL), better even than Oligopin® (1271 µg/mL). *Q. scytophylla* extracted with hot water had the best ability to capture peroxy radicals (390 µg/mL), followed by *Q. crassifolia* (577 µg/mL) and *Q. laurina* extracted with hot water (582 µg/mL), which had similar values to Oligopin® (563 µg/mL).

However, *Q. scytophylla* extracts showed a lower ability to capture other reactive species compared to the other extracts. No differences in ability to capture H₂O₂ were found for *Q. crassifolia* extracted with hot water, *Q. crassifolia* by maceration, *Q. laurina* with hot water, and *Q. laurina* by maceration ($p < 0.05$).

The ability of the extracts to capture nitric oxide was evaluated at the same time with Terana® turmeric extract (Terana S.A.) obtained from dried rhizomes of *Curcuma longa*, a material of golden color, used worldwide as a food additive. Some studies have been done in recent years related to the biological activity of curcumin, including its antioxidant, antifungal, antitumor, anti-inflammatory, and antibacterial properties, attributed to its high ability to capture nitric oxide [38]. The turmeric extract showed the best ability to capture nitric oxide (53.8 µg/mL), followed by *Q. laurina* extracted by maceration (149 µg/mL).

As for the ability to inhibit hypochlorous acid, *Q. laurina* extracted by maceration had the best antioxidant capacity (387 µg/mL), followed by *Q. crassifolia* (740 µg/mL), and *Q. laurina* extracted with hot water (774 µg/mL).

As we can see, the overall results highlighted that the extracts of *Q. crassifolia* obtained with hot water and *Q. laurina* by maceration had the highest efficiency to capture the different radicals; however, *Q. crassifolia* had a higher extraction yield (Table 1).

To identify association of the distinct kinds of polyphenolic content with antioxidant activity, a Spearman correlation analysis was performed (Table 4). The capacity to capture superoxide radicals was related to both hydroxycinnamic acid ($r = -0.829$, $p = 0.001$) and total phenolic ($r = -0.567$, $p = 0.004$) compounds. These results are in agreement with those reported by Natić et al. (2015), who found that the polyphenols present in mulberry fruits grown in Vojvodina possess high antioxidant-antiradical activity, acting as potent superoxide anion radical scavengers; the predominant phenolic acids were protocatechuic acid and ferulic acid, showing high positive correlation with their ability to scavenge superoxide anion radicals [39].

Table 4. Spearman coefficient for correlation between the scavenging capacity of the reactive species and the phenolic compound content.

	ROO•	O ₂ • ⁻	OH•	H ₂ O ₂	NO•	HClO
Total phenols	0.298	-0.567 *	-0.441 *	-0.821 *	-0.070	-0.411
Total flavonoids	-0.005	-0.223	-0.631 *	-0.119	0.511 *	-0.532 *
Total hydroxycinnamic acids	0.403	-0.829 *	-0.545 *	-0.835 *	0.186	0.023
Proanthocyanidins	-0.261	-0.245	0.324	-0.056	-0.331	0.687 *

* Correlations are significant at $p < 0.050$.

The flavonoid ($r = -0.631$, $p = 0.001$) and total phenol ($r = -0.441$, $p = 0.035$) content in the extracts correlated with the ability to capture hydroxyl radicals, as found in the *Matricaria pubescens* extracts [40]; their results revealed significant correlation between the phenolic and flavonoid compound content and antioxidant activity assessed by hydroxyl radical scavenging capacity.

The hydrogen peroxide radical scavenging activity was more strongly associated with total phenols ($r = -0.821$, $p = 0.002$) than hydroxycinnamic acids ($r = -0.545$, $p = 0.007$). The ability of Canadian wood species extracts to scavenge H₂O₂ was also associated with total phenol content [29].

The concentration of total flavonoids and the proanthocyanidin content correlated with their ability to capture hypochlorous acid, $r = -0.532$ ($p = 0.009$) and $r = 0.687$ ($p = 0.0002$), respectively. Also demonstrated, was a high association between flavonoid compounds and antioxidant activity in extracts from buckwheat hulls and flour [41]. In our study, total flavonoid concentration was correlated with the ability to capture nitric oxide ($r = 0.511$, $p = 0.013$). That means that a high concentration of both proanthocyanidins and total flavonoids shows a greater ability to capture hypochlorous acid and nitric oxide.

3.3. Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Purified *Q. crassifolia* Extract

As previously mentioned, the *Q. crassifolia* extract obtained by the hot water method was, in turn, subjected to a subsequent extraction with ethyl acetate. This extract, from now on called purified, was analyzed to determine the content of its diverse groups of phenolic compounds and their antioxidant capacity, as shown in Tables 2 and 3. The extraction yield of the purified *Q. crassifolia* decreased considerably compared to the extraction yield of crude extract of *Q. crassifolia* using the hot water method. This is reasonable because we concentrated the compounds, obtaining only the fraction corresponding to those compounds that are soluble in ethyl acetate.

A higher concentration of total phenols, total flavonoids and hydroxycinnamic acids was observed in the purified *Q. crassifolia* extract compared to crude extract of *Q. crassifolia* obtained using the hot water method (Table 2); however, the purified extract showed a lower proanthocyanidin content, consistent with the study done by Quettier-Deleu et al. (2000) [41], which also described a higher total phenol content and lower proanthocyanidin content in an ethyl acetate extract of *Picea mariana* bark compared to the aqueous fraction extract. This result can be explained if we consider that the aqueous

fraction, which is discarded during the purification step, contains mainly polymeric proanthocyanidins, whereas the ethyl acetate fraction is mainly composed of oligomeric proanthocyanidins. Notably, it has been shown that oligomeric proanthocyanidins, due to their lower molecular weight, possess greater biological activity than polymeric compounds. In fact, these latter, because of their large size, are unable to cross biological membranes, and therefore, cannot interfere with the signaling pathways related to disease pathogenesis [42].

The purified extract had improved ability to capture hydroxyl radicals, superoxide anions, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid, while for peroxy radicals, the purified extract had an increased EC_{50} value compared to crude extracts. This may be due to loss in the aqueous fraction of compounds that may be related to the ability to capture peroxy radicals, such as polymeric proanthocyanidins, hydrolyzable tannins and lignans, among others, which had not been determined in this work.

In general, the purified extract had a better antioxidant capacity compared to the aqueous extract of *Q. crassifolia*. With regard to nitric oxide radicals, neither crude nor purified extracts, at concentrations less than 4000 mg/mL, had ability to capture the nitrogen reactive species.

4. Conclusions

In this research, a high concentration of total phenols was found in the *Quercus* sp. bark crude extracts, including different classes of phenolic compounds, like flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins, confirming that the Mexican species oak barks analyzed in this work are a good source of phenolic compounds.

There were no differences in the content of total phenols or hydroxycinnamic acids between purified extract of *Q. crassifolia* and Oligopin[®], and actually, for concentration of flavonoids, the purified extract of *Q. crassifolia* had a higher concentration. Regarding the antioxidant capacity, the purified extract showed, in general, better antioxidant characteristics than Oligopin[®], being a good candidate to be considered in the development of new products with high antioxidant activity, however, further studies are necessary to determine the chemical composition of the extract, as well as the toxicological profile, in order to have a better understanding about its possible applications.

Author Contributions: H.E.M.-F. and M.E.G.-P. conceived and designed the experiments, E.V.-A. performed the experiments, M.G.G.-R., J.d.D.P.-C., R.S.-G. and E.M.-H. discuss and analyzed some of the data obtained during the experiments. All authors revised the paper and approved the final manuscript.

Acknowledgments: The authors wish to thank CONACYT for the Ph.D. scholarship of Eréndira Valencia Avilés. This project was partially supported with equipment UV/Vis spectrophotometer acquired through "Redes Temáticas de Colaboración Académica, Tercer año aprobado en la convocatoria 2011 (Marzo 2015), PRODEP, Red Materiales Nanoestructurados, Proyecto "Investigación y Desarrollo de Conductores Transparentes".

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Castro-Vázquez, I.; Alañón, M.E.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Pérez-Cosello, M.S.; Laureano, O. Evaluation of Portuguese and Spanish *Quercus pyrenaica* and *Castanea sativa* species used in cooperage as natural source of phenolic compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *22P*, 367–375. [[CrossRef](#)]
2. Aroso, I.M.; Fernandes, E.M.; Pires, R.A.; Mano, J.F.; Reis, R.L. Cork extractives exhibit thermo-oxidative protection properties in polypropylene-cork composites and as direct additives for polypropylene. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *116*, 45–52. [[CrossRef](#)]
3. Rosales-Castro, M.; González-Lanedo, R.F.; Rocha-Guzmán, N.E.; Gallegos-Infante, J.A.; Rivas-Arreola, M.J.; Kanchev, J.J. Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyfa* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung* **2012**, *66*, 577–584. [[CrossRef](#)]
4. Sraka, Z.; Franiczek, R. Antiradical and Antimicrobial Activity of Extracts Obtained from Plant Raw Materials. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2008**, *17*, 275–283.

5. Driédz, P.; Pyszynska, K. Assessment of polyphenol content and antioxidant activity of oak bark extracts. *Eur. J. Wood Wood Prod.* **2018**, *7*, 793–795. [[CrossRef](#)]
6. Ruiz-Aquino, E.; González-Peña, M.M.; Valdez-Hernández, J.I.; Revilla, U.S.; Romero-Manzanares, A. Chemical Characterization and Fuel Properties of Wood and Bark of Two Oaks from Oaxaca, Mexico. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *65*, 90–95. [[CrossRef](#)]
7. Stevanovic, Y.; Djouf, P.N.; Garcia-Perez, M.E. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2009**, *5*, 264–295. [[CrossRef](#)]
8. Garrido, J.; Borges, F. Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1844–1858. [[CrossRef](#)]
9. Duda-Chodak, A. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J. Physiol. Pharmacol.* **2012**, *63*, 497–503. [[PubMed](#)]
10. Lü, J.-M.; Lin, P.H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 840–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Upadhyay, S.; Dixit, M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 504253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. He, Y.-Q.; Ma, Z.-Y.; Zhang, J.; Du, B.-Z.; Yao, B.-H. Antioxidant activity of the chemical constituents from the leaves of *Quercus macrocarpa*. *Chem. Nat. Compd.* **2011**, *47*, 472–473. [[CrossRef](#)]
13. Popovic, B.M.; Štajner, D.; Zakeri, R.; Orlovi, S.; Galic, Z. Antioxidant Characterization of Oak Extracts Combining Spectrophotometric Assays and Chemometrics. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 134656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Custodio, L.; Patarra, J.; Albericio, F.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Romana, A. Extracts from *Quercus sp.* acorns exhibit *in vitro* neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *45*, 114–120. [[CrossRef](#)]
15. Sibretoglu, D.; Subancuoğlu, S.; Harput, U.Ş. Evaluation of antioxidative, protective effect against H₂O₂ induced cytotoxicity, and cytotoxic activities of three different *Quercus* species. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 141–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vázquez, L.M.; Valencia, A.S.; Nixon, K.C. Notes on red oaks (*Quercus* sect. *Lobatae*) in eastern Mexico, with description of a new species, *Quercus hirtifolia*. *Brittonia* **2004**, *56*, 136–142. [[CrossRef](#)]
17. Sánchez-Burgos, J.A.; Ramírez-Mateos, M.V.; Larrosa, M.M.; Gallegos-Infante, J.A.; González-Laredo, R.E.; Medina-Yanes, I.; Rocha-Guzmán, N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *42*, 57–62. [[CrossRef](#)]
18. Alañón, M.E.; Castro-Vázquez, L.; Diaz-Maroto, M.C.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gordon, M.H.; Pérez-Cuello, M.S. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1584–1590. [[CrossRef](#)]
19. Rakić, S.; Povanović, D.; Tešević, V.; Simić, M.; Makić, R. Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *J. Food Eng.* **2006**, *74*, 416–423. [[CrossRef](#)]
20. Rodríguez-Flores, S.M.; Escuredo, O.; Seijo, C.M. Assessment of Physicochemical and Antioxidant Characteristics of *Quercus pyrenaica* Honeydew Honeys. *Food Chem.* **2015**, *166*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Moreno-Jiménez, M.R.; Trujillo-Esquivel, F.; Gallegos-Corona, M.A.; Reynoso-Camacho, R.; González-Laredo, R.F.; Gallegos-Infante, J.A.; Rocha-Guzmán, N.E.; Ramos-Gómez, M. Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *80*, 144–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. McCune, L.M.; Johns, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82*, 197–205. [[CrossRef](#)]
23. Djouf, P.N.; Stevanovic, Y.; Cloutier, A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pinus maritima* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem.* **2009**, *113*, 897–902. [[CrossRef](#)]
24. Pousard, S.; Pires-Abeu, A.; Dialla, R.; Dupuy, J.-W.; Dargelos, E. A Natural Antioxidant Pine Bark Extract, Oligopin(R), Regulates the Stress Chaperone HSP70 in Human Skeletal Muscle Cells: A Proteomics Approach. *Phyther. Res.* **2013**, *27*, 1529–1535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Scalbert, A.; Monties, B.; Janin, G. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1324–1329. [[CrossRef](#)]
26. Brighente, I.M.C.; Dias, M.; Verdi, L.G.; Pizzolatti, M.G. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharm. Biol.* **2007**, *45*, 156–161. [[CrossRef](#)]
27. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 4th ed.; European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care: Strasbourg, France, 2002; pp. 331–332.
28. Poitev, L.J.; Hrstich, L.N.; Chan, B.G. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry* **1986**, *26*, 223–230. [[CrossRef](#)]
29. Garcia-Pérez, M.-E.; Royer, M.; Duque-Mendez, A.; Drouot, P.N.; Stovanovic, Y.; Pouliot, R. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *132*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Nishikimi, M.; Rao, A.N.; Yagi, K. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 849–854. [[CrossRef](#)]
31. Ruch, R.J.; Cheng, S.; Klauing, J.E. Prevention of Cytotoxicity and Inhibition of Intercellular Communication by Antioxidant Catechins Isolated from Chinese Green Tea. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 1003–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Smirnoff, N.; Cumbes, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1057–1060. [[CrossRef](#)]
33. Rao, M.N.A. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 105–107. [[CrossRef](#)]
34. López-Alarcón, C.; Lissi, E. Interaction of pyrogallol red with peroxyl radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 729–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aruoma, O.I.; Halliwell, B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Biochem. J.* **1987**, *248*, 973–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. StatSoft, STATISTICA. 2007. Available online: <http://statistica.io> (accessed on 22 June 2018).
37. Naima, R.; Oumam, M.; Hannache, H.; Seshou, A.; Charriet, B.; Pizzi, A.; Charriet, E.; Boublouy, F. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *70*, 245–252. [[CrossRef](#)]
38. Ammon, H.P.; Wahl, M.A. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Phyto Med.* **1991**, *57*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Natić, M.M.; Dabić, D.Č.; Papeti, A.; Fotirić, M.M.; Ogrjanov, A.V.; Ljubojević, M.; Yešić, Ž.L. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chem.* **2015**, *171*, 128–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Metrouh-Anaç H.; Duarte, C.M.M.; Maiza, E. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *67*, 249–256. [[CrossRef](#)]
41. Quattier-Delva, C.; Gossier, B.; Vasseur, J.; Dine, Y.; Brunet, C.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J.C.; Bailloul, F.; Trotin, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 35–42. [[CrossRef](#)]
42. Zhao, C.-F.; Lei, D.J.; Hao Song, G.; Zhang, H.; Xu, H.; Yu, L.J. Characterisation of water-soluble proanthocyanidins of *Pyracantha fortuneana* fruit and their improvement in cell bioavailable antioxidant activity of quercetin. *Food Chem.* **2015**, *169*, 484–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



11.2. Artículo de investigación “Investigation of the Antibacterial Activity and Subacute Toxicity of *Quercus crassifolia* Polyphenolic Bark Extract for its Potential Use in Functional Foods”

APTARA	JFDS	jfs14652	Dispatch: May 9, 2019	CE:
Journal	MSP No.	No. of pages: 11	PE: Tom O'Brien	

Investigation of the Antibacterial Activity and Subacute Toxicity of a *Quercus crassifolia* Polyphenolic Bark Extract for its Potential Use in Functional Foods

Eréndira Valencia-Avilés, Héctor-Eduardo Martínez-Flores , Manuel García-Pérez, Esperanza Meléndez-Herrera, and Martha-Estrella García-Pérez 

Now Horizons in Food Research

Abstract: Oak wood is used in barrels for wine aging. During aging, polyphenols are transferred from the barrels to the liquid. Although the bioactivity of oak polyphenols in wines has been extensively studied, no investigation exists on their toxicological properties, which limits their use as functional safe ingredients for other products. In this work, the chemical composition of a polyphenolic extract of *Quercus crassifolia* bark (QCBe) was studied by GC-MS. Its antibacterial properties on probiotic and pathogenic bacteria and its subacute-oral toxicity were determined as a way to understand the potential impact from its addition to fermented food as a functional ingredient. QCBe shows a selective inhibition of *Escherichia coli* compared with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. According to the toxicity evaluation, the subacute no-observed-adverse-effect-level was achieved at 11 mg/kg bw/day, whereas the subacute lowest-observed-adverse-effect-level for kidney damage was at 33 mg/kg bw/day. These results suggest that, given the fact an adverse effect was observed after subacute administration of this extract, further longer term toxicological studies are needed to provide sufficient safety evidence for its use in humans.

Keywords: antibacterial, polyphenols, *Quercus crassifolia*, toxicity

Practical Application: Mexico's yogurt market is growing which creates opportunities for the development of some yogurt products as functional foods. As a first step to evaluate its potential use in yogurt formulation, the antibacterial effect of a *Quercus crassifolia* polyphenolic extract (QCBe) on probiotic bacteria and its subacute-oral toxicity in rats were studied. A low inhibition on probiotic bacteria growth was observed after QCBe addition to *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* cultures. Exposure to QCBe for a subacute duration resulted in renal injury in rats at dosages greater than or equal to 33 mg/kg/bw/day. This adverse effect indicates the importance of performing further long-term toxicological assessments prior to the addition of QCBe to a food like yogurt, which is regularly eaten by consumers.

Introduction

Since ancient times, polyphenols from oak (*Quercus* sp) have been consumed in fermented foods (Alonso & Northcote, 2009). Oak wood is the main material in the elaboration of barrels used in the aging of vinegars and spirits, such as tequila, whiskey, rum, cognac, and red wine. During this process, polar compounds, such as polysaccharides, coumarins, carotenoids, and mainly polyphenols, are transferred from the barrel wood to the liquid (Marchal, Pons, Lavigne, & Duboundieu, 2013). This transfer is thought to contribute to the sensorial quality and to the health benefits

associated with consumption of the resulting products. Significant information about the antioxidant character and bioactivity of oak polyphenols in wines is available in the literature. Indeed, evidence suggests that these molecules play an active role in lowering the incidence of diseases, which are related to oxidative stress (Stevanovic, Diouf, & García-Pérez, 2009).

In Mexico, oak is the second most important forestry resource and is mostly used for handicrafts, fire wood, and charcoal manufacture (Ruiz-Aquino, González-Peña, Valdez-Hernández, Revilla, & Romero-Manzanares, 2015). This industry generates a great amount of waste biomass with great potential for valorization (Stevanovic et al., 2009). In a previous work, it was determined that a purified extract from a Mexican oak (*Quercus crassifolia* bark, QCBe) was a good source of polyphenols (860.39 ± 5.68 mg GAE/g). Additionally, this extract showed a higher free radical scavenging ability *in vitro* toward reactive species of biological importance (hydroxyl and peroxyl radical and the superoxide anion) than Oligupin[®], a commercial polyphenolic extract widely used in nutraceutical products (Valencia-Avilés et al., 2018).

Some studies have shown that the consumption of polyphenols combined with probiotic bacteria, such as *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, may present nutritional benefits,

JFDS-2018-1210 Submitted 8/6/2018, Accepted 4/17/2019. Author Valencia-Avilés is with Programa Inst. de Doctorado en Ciencias Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Author Martínez-Flores is with Facultad de Química Farmacobiología, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Author García-Pérez is with Biological Systems Engineering Dept., Washington State Univ., Pullman, WA, U.S.A. Author Meléndez-Herrera is with Inst. de Investigaciones sobre Recursos Naturales, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Author García-Pérez is with Inst. de Investigaciones Químico-Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. Direct inquiries to author García-Pérez (E-mail: mgarcia@live.mx).

12. REFERENCIAS

- A.O.A.C. 2000. Métodos Oficiales de Análisis. (A. de Q. A. Oficiales, Ed.). USA.
- AACC. 2000. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods. 10th edition. Editado por la American Association of Cereal Chemists. Minneapolis, MN, USA.
- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., ... Suleria, H. A. R. 2017. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>.
- Acosta-Estrada, B., Gutiérrez-Urbe, J., Serna-Saldívar, S. O. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Aehle, E., Müller, U., Eklund, P. C., Willför, S. M., Sippl, W., Dräger, B. 2011. Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, 72(18), 2396–2405. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.08.013>.
- Aguilar, Á. D. S. 2012. Efecto del proceso de extrusión sobre las propiedades funcionales de la cáscara de tamarindo (*Tamarindus indica L.*), Tesis de Maestría. Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 122.
- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gordon, M. H., Pérez-Coello, M. S. 2011. Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chemistry*, 129(4), 1584–1590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.013>.
- Almoosawi, S., Fyfe, L., Ho, C., Al-Dujaili, E. 2010. The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition*, 103(6), 842–850. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992431>
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Obaidat, M. M., Ereifej, K., Alhamad, M. N., Mhaidat, N., ... Ayadi, W. 2015. Probiotics in Milk as Functional Food: Characterization and Nutraceutical Properties of Extracted Phenolics and Peptides from Fermented Skimmed Milk Inoculated with Royal Jelly. *Journal of Food Safety*, 35(4), 509–522. <https://doi.org/10.1111/jfs.12201>
- Aluko, R. E. 2012. *Functional Foods and Nutraceuticals*. London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3480-1>.

- Anand, P., Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R., Tekmal, R. R. 2010. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 79:330-338.
- Araneda, C., Valenzuela, F. 2009. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Ciencia Ahora*, 22:9-19.
- Arapitsas, P. 2012. Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135(3), 1708–1717. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>
- Arcila-Quinceno, V. H., Conde-Cotes, C. A., Nieto-Pico, J. E., García-Prada, F. H. 2009. Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar / UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares. *Revista Spei Domus*, 6(12), 45–51.
- Arencibia-Arrebola, D. F., Rosario-Fernández, L. A., López-Feria, Y., Fariñas-Medina, M., Infante-Bourzac, J. F., Díaz-Rivero, D., Prieto-Díaz, J. L. 2003. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. *Revista de Toxicología En Línea*, 1, 1–15. Retrieved from <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>
- Arizaga, S., Martínez- Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M., Bello-González, M. Á. 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. (D. de P. del INE, Ed.). México, D-F.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B. 1987. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *The Biochemical Journal*, 248(3), 973–976.
- Auberval, N., Dal, S., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peluso, J., Muller, C., ... Sigrist, S. 2015. Oxidative Stress Type Influences the Properties of Antioxidants Containing Polyphenols in RINm5F Beta Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 859048. <https://doi.org/10.1155/2015/859048>
- Augustin, M. A., Hemar, Y. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38: 902-912.
- Avelar, T. M. T., Storch, A. S., Castro, L. A., Azevedo, G. V. M. M., Ferraz, L., Lopes, P. F. 2015. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved?, (August), 231–239.

- Babaknejad, N., Moshtaghie, A. A., Nayeri, H., Hani, M., Bahrami, S. 2016. Protective Role of Zinc and Magnesium against Cadmium Nephrotoxicity in Male Wistar Rats. *Biological Trace Element Research*, 174(1), 112–120. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0671-x>.
- Badui Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos*. 4^o ed. Pearson Addison Wesley. México. Pp. 92-93. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Bajaj, B. K., Claes, I. J. J., Lebeer, S. 2015. Functional Mechanisms of Probiotics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 321–327. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.4.321-327>.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I. 2017. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>.
- Barbosa, C., Vega, M. 2000. *Deshidratación de alimentos*. Ed. Acriba, S. A. Zaragoza. España.
- Barras, A., Mezzetti, A., Richard, A., Lazzaroni, S., Roux, S., Melnyk, P. 2009. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 379:270-277.
- Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Lucchina, L. A, Prutkin, J., Fast, K. 1998. PROP (6-n-propylthiouracil) supertasters and the saltiness of NaCl. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 793–796. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10660.x>
- Bell, Z. W., Canale, R. E., Bloomer, R. J. (2011). A dual investigation of the effect of dietary supplementation with licorice flavonoid oil on anthropometric and biochemical markers of health and adiposity. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-29>
- Beltrán, M. 2013. *Alimentos Funcionales: preparación de un producto lácteo enriquecido con resveratrol*. Universidad de Oviedo.
- Bentivegna, S. S., Whitney, K. M. 2002. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1731–1743. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00155-2).
- Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., Gadhi, C. A. 2007. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 426–429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.032>.

- Berrougui, H., Ikhlef, S., Khalil, A. 2015. Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/208062>.
- Bianco, M.A., Handaji, A., Savolainen, H. 1998. Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. Science of the Total Environment, 222:123-126.
- Blanco, P. 2015. Caracterización de bacterias de *Streptococcus thermophilus* aisladas de leche cruda bovina, ovina y caprina. Universidad de la República de Uruguay.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT – Food Science and Technology, 28:25–30.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., Pizzolatti, M. G. 2007. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. Pharmaceutical Biology, 45(2), 156–161. <https://doi.org/10.1080/13880200601113131>.
- Calabresi, L. 2004. An ω -3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. Metabolism Clinical And Experimental, 53(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.09.007>.
- Calvo, P., Castaño, Á. L., Lozano, M., González-Gómez, D. 2012. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. Food Research International, 45(1), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.036>.
- Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M., González-Gómez, D. 2010. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. Eur. J. Lipid Sci. Technol, 112:852–858.
- Carling, D., Thornton, C., Woods, A., Sanders, M. J. 2012. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? The Biochemical Journal, 445(1), 11–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20120546>.
- Carnicé, R. T. 2006. Probióticos . Concepto y mecanismos de acción, 4(1), 30–41.

- Castellotea, C., Castell, M. 2005. Yogur y modulación del sistema inmunitario. LXVIII N. ° 1.564 Pp. 1547-1555.
- Cerdán, T. G., Rodríguez Mozaz, S., Ancín Azpilicueta, C. 2002. Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Research International*, 35(7), 603–610. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00151-X).
- Chai, W. M., Huang, Q., Lin, M. Z., Ou-Yang, C., Huang, W. Y., Wang, Y. X., ... Feng, H. L. 2018. Condensed Tannins from Longan Bark as Inhibitor of Tyrosinase: Structure, Activity, and Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(4), 908–917. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05481>.
- Chan, C. Y., Wei, L., Castro-Muñozledo, F., Koo, W. L. 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks 3T3-L1 adipose conversion by inhibition of cell proliferation and suppression of adipose phenotype expression. *Life Sciences*, 89(21–22), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.006>.
- Chan, D. C., Watts, G. F., Barrett, P. H. R., Beilin, L. J., Redgrave, T. G., Mori, T. A. 2002. Regulatory Effects of HMG CoA Reductase Inhibitor and Fish Oils on Apolipoprotein B-100 Kinetics in Insulin-Resistant Obese Male Subjects With Dyslipidemia. *Atherosclerosis Supplements*, 3(2), 87. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(02\)80105-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(02)80105-2).
- Chavalit, T., Rojvirat, P., Muangsawat, S., Jitrapakdee, S. 2013. Hepatocyte nuclear factor 4 α regulates the expression of the murine pyruvate carboxylase gene through the HNF4-specific binding motif in its proximal promoter. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(10), 987–999. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.05.001>.
- Choi, M. Y., Chai, C., Park, J. H., Lim, J., Lee, J., Kwon, S. W. 2011. Effects of storage period and heat treatment on phenolics compound composition in dried *Citrus peels* (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC-DAD analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54: 638-645.
- Claudia, P. 2013. Acorn bread: A traditional food of the past in Sardinia (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14(3 SUPPL), S71–S74. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.11.012>.
- Clydesdale, F. M. 1997. A Proposal for the Establishment of Scientific Criteria for Health Claims for Functional Foods. *Nutrition Reviews*, 55(12), 413–422.
- Conde, E., & Cadahı, E. E. al. 1998. Polyphenolic Composition of *Quercus suber* Cork from Different Spanish Provenances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3166–3171.

- Córdova, K. 2013. Adsorción de proteína en hidrogeles de alginato pectina. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Covas, M.I., Miró-Casas, E., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M., Gimeno, E., Marrugat, J., Torre, D. L. R. 2003. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 29(5–6), 203–206.
- Covas, M. I., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., F. Zunft, H.-J., Kiesewetter, H., ... Marrugat, J. 2013. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), 333. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-5-200609050-00006>.
- Creus, E. V. A. G. 2004. Compuestos fenólicos. *Ambito Farmacéutico Nutrición*, 23(6), 80–84.
- Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M. N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>.
- Cuevas-Reyes, P., Vaca-Sánchez, S. M., González-Rodríguez, A., Maldonado-López, Y., Fernandes G. W. 2016. Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biologicas*, 18(1), 10–20.
- Curren, R. D., Harbell, J. W. 2002. Ocular safety : A silent (in vitro) success story, 69–74.
- D’Andrea, G. 2010. Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81(7), 724–736. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.011>.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>.
- Dávalos, V. M. 2014. Nanoencapsulación de riboflavina en matrices poliméricas biodegradables empleando la técnica de secado por aspersión.
- Davidson, M. H. 2006. Mechanisms for the Hypotriglyceridemic Effect of Marine Omega-3 Fatty Acids. *The American Journal of Cardiology*, 98(4), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.12.024>.
- Davies, K. M., Schwinn, K. E., Gould, K. S. 2016. Anthocyanins. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2, 355–363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00229-X>.
- De Simon, B.F., Cadahia, E., Jalocha, J. 2003. Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 7671-7678.

- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Ramos, Ó. L. 2017. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010>.
- Dedrie, M., Jacquet, N., Bombeck, P.-L., Hébert, J., Richel, A. 2015. Oak barks as raw materials for the extraction of polyphenols for the chemical and pharmaceutical sectors: A regional case study. *Industrial Crops and Products*, 70, 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.071>.
- Dehkharghanian, M., Lacroix, M., Vijayalakshmi, M.A. 2009. Antioxidant properties of green tea polyphenols encapsulated in caseinate beads. *Dairy Sci. Technol.*, 89:485–499.
- Del Rio, Daniele, Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>.
- Deladino, L., Anbinder, P.S., Navarro, A.S., Martino, M.N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71: 126–134.
- Delgado, M. 2015. Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entre Textos*, 21(7), 1–12.
- Desai, K. G. H., Park, H. J. 2005. Recent developments in micro- encapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23: 1361-1394.
- Diaz, L. 2015. Características del producto- leche fermentada.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., Boutin, Y. 2009a. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.05.008>.
- Diouf, P. N., Stevanovic, T., Cloutier, A. 2009b. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, 113(4), 897–902. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.016>.
- Dominguez, A. 2012. “Microencapsulación de *Lactobacillus casei* ATCC334 utilizando mezclas de almidón de amaranto modificado y maltodextrina como material de pared, mediante secado por aspersión y su viabilidad en la leche en polvo.” Universidad Veracruzana.

- Dorato, M. A., Engelhardt, J. A. 2005. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues, and definition(s). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42(3), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.05.004>.
- Drózdź, P., Pyrzynska, K. 2018. Assessment of polyphenol content and antioxidant activity of oak bark extracts. *European Journal of Wood and Wood Products*, 76(2), 793–795. <https://doi.org/10.1007/s00107-017-1280-x>.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P. 2015. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition*, 325–341. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0852-y>.
- Dutra, F., Romero, A., Trelles, P., Arruti, F., Ferres, J., Quinteros, C. 2014. Spontaneous and experimental poisoning by *Quercus robur* (English oak) in bovine in Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 50, 34–48.
- Endo, J., Arita, M. 2016. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Cardiology*. Japanese College of Cardiology. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.08.002>
- Ersus, S., Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009>.
- Escorza, Q., Angélica, M., Salinas, C., Víctor, J. 2009. La Capacidad Antioxidante Total. Bases Y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México*, 28, 89–101.
- Espinosa, M.J. 2007. Evaluación sensorial de los alimentos. Ministerio de Educación Universitaria. Editorial Universitaria. Cuba. Pp.116.
- Falcão, H. M., Oliveira, M. T., Mergulhão, A. C., Silva, M. V., Santos, M. G. 2013. Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. *Scientia Horticulturae*, 150, 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.021>.
- Fan, Y., Duan, W., Luo, Y., Song, L., Chen, J., Xie, Y., Hou, L. 2015. Preparative separation and purification of two flavanols from *Smilax china* L. using high-speed counter-current chromatography. *European Food Research and Technology*, 240(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2304-y>.

- Fang, Z., Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>.
- FAO. 2008. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición. <https://doi.org/978-92-5-3067336>.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (Cordoba, Argentina: Food and Agriculture organization of the United Nations and World Health Organization).
- Fathi, M., Martín, Á., McClements, D. J. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 39(1), 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>.
- FDA. 2017. Medical Foods Guidance Documents and Regulatory Information.
- Fenili, D., Brown, M., Rappaport, R., McLaurin, J. A. 2007. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *Journal of Molecular Medicine*, 85(6), 603–611. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0156-7>.
- Ferguson, P. J., Kurowska, E., Freeman, D. J., Chambers, A. F., Koropatnick, D. J., Al, F. E. T. 2004. A Flavonoid Fraction from Cranberry Extract Inhibits Proliferation of Human Tumor Cell Lines. *The Journal of Nutrition*, 134(6), 1529–1535.
- Flaoyen, A., Handeland, K., Arnemo, J. M., Vikoren, T. 1999. Toxicity testing of leaves from oak (*Quercus robur*) harvested in Aust-Agder county, Norway. *Veterinary Research Communications*, 23(5), 317–321. Retrieved from <http://www.wkap.nl/art.pdf?issn=0165-7380&volume=23&page=317%5Cnhttp://www.wkap.nl/journalhome.htm/0165-7380>.
- Flink, J., Karel, M. 1972. Mechanisms of retention of organic volatiles in freeze-dried systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 7(2), 199–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb01655.x>.
- Fortin, J., Desplancke, C. 2001. Guía de selección y entrenamiento de un panel de catadores (Edit. Acri). España.
- Frémont, L., Belguendouz, L., Delpal, S. 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*, 64(26), 2511–2521.

- Fridrich, D., Glabasnia, A., Fritz, J. 2008. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56:3010-3015.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M., Ordonnaud, C., Peyrat, M., Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Food Engineering*, 75:27-35.
- Gad, S. C. 2007. *Preclinical Development Handbook: Toxicology*. Preclinical Development Handbook: Toxicology. New Jersey: Wiley-Interscience. <https://doi.org/10.1002/9780470249055>.
- Galleano, M., Calabro, V., Prince, P. D., Litterio, M. C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M. a., ... Fraga, C. G. 2012. Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 87–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06511.x>.
- Gómez, R., Más, R. 2007. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3), 204–208. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=31131140&lang=es&site=ehost-live>.
- Gao, Y., Wang, X. H., Yang, H. P., Chen, H. P. 2012. Characterization of products from hydrothermal treatments of cellulose. *Energy*, 42(1), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.03.023>.
- García-Pérez, M. E., Allaey, I., Rusu, D., Pouliot, R., Janezic, T. S., Poubelle, P. E. 2014. *Picea mariana* polyphenolic extract inhibits proinflammatory mediators produced by TNF- α -activated psoriatic keratinocytes: Impact on NF- κ B pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.034>.
- García-Pérez, M., Royer, M., Herbette, G., Desjardins, Y., Pouliot, R., Stevanovic, T. 2012. *Picea mariana* bark : A new source of trans -resveratrol and other bioactive polyphenols, 135, 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.050>.
- García-Pérez, M.E., Alfonso-Castillo, A., Lores, O. F., Batista-Duharte, A., Lemus-Rodríguez, Z., Fong Lores, O. 2018. Toxicological evaluation of an aqueous suspension from leaves and stems of *Petiveria alliacea* L (Phytolaccaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, (September).
- García-Pérez, M.E., Royer, M., Duque-fernandez, A., Diouf, P. N., Stevanovic, T., Pouliot, R. 2010. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.030>.

- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50:213-224.
- Gibson, G., Probert, H., Van L., Rastall, J., Roberfroid, M. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17:259-275.
- Giknis, M. L. A., Clifford, C. B. 2008. Clinical Laboratory Parameters For Cr1 : WI (Han) Rats.
- Gil, H., Sánchez, M. 2010. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Ed. Médica Panamericana. Madrid. Pp. 271-275.
- González, G. A., González, A. F., Álvarez, E., García, H. S., Vallejo, B. 2014. Los alimentos funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos. (G. G.A., González, A.F., González, B., Vallejo, E. Álvarez, H.S., Ed.) (Primera ed). México: AGT Editor, S. A.
- Goodman, J. I. 1998. The traditional toxicologic paradigm is correct: dose influences mechanism. *Environ Health Perspect*, 106(Suppl 1), 285–288.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>.
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Merillon, J. ., Al, E. 2012. Secondary Metabolites and Plant Defence. *Biological Control*, (5), 109–138. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0>.
- Gu, B., Linehan, B., Tseng, Y. C. 2015. Optimization of the Büchi B-90 spray drying process using central composite design for preparation of solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 491(1–2), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.006>.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R. L. 2002. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4852–4860. <https://doi.org/10.1021/jf020214v>.
- Guevara-Bretón, N. A., Jiménez-Munguía, T. 2008. Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. Universidad de las Américas.
- Guinee, T.P., Mullins, C.G., Reville, W.J. Cotter, M. P. 1995. Physical properties of stirred curd unsweetened yoghurts stabilised with different dairy ingredients. *Milchwissenschaft*, 50, 196–200
- Gülçin, İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210–218. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2009.07.002>

- Hager, C. L., Ghannoum, M. A. 2017. The mycobiome: Role in health and disease, and as a potential probiotic target in gastrointestinal disease. *Digestive and Liver Disease*, 49(11), 1171–1176. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.08.025>
- Hamilton, P. B., Garlich, J. D. 1971. Aflatoxin as a possible cause of fatty liver syndrome in laying hens. *Poultry Science*, 50(3), 800–804. <https://doi.org/10.3382/ps.0500800>.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V, Peralta, R. M. 2012. Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>.
- Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M. 2011. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chemistry*, 124(4), 1589–1594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.021>.
- Hasler, C., Brown, A. 2009. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023>.
- Hernández, Alicia, Alfaro I., A. R. 2003. *Microbiología industrial (EUNED)*.
- Hervé-du-Penhoat, C., Michon, V. M. ., Peng, S., Viriot, C., Scalbert, A., Gagec, D. 1991. Structural Elucidation of New Dimeric Ellagitannins from *Quercus robur* L. Roburins A-E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 1653–1660.
- Hong, Y. H., Varanasi, U. S., Yang, W., Leff, T. 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27495–27501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304112200>.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Cornu, K. A. Le, ... Cassidy, A. 2008. Flavonoids , flavonoid-rich foods , and cardiovascular risk : a meta-analysis of randomized controlled trials 1 , 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38–50. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.105072.1>.
- Horiba, I. 2017. *A guidebook to particle size analysis*. Irvine, CA.
- Hsu, T. F., Kusumoto, A., Abe, K., Hosoda, K., Kiso, Y., Wang, M. F., Yamamoto, S. 2006. Polyphenol-enriched oolong tea increases fecal lipid excretion. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(11), 1330–1336. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602464>.

- Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., Su, M. J. 2000. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 47(3), 549–555.
- Hutchison, C.L., Mulley, R.C., Wiklund, E., Flesch J.S. 2010. Consumer evaluation of venison sensory quality: effects of sex, body condition score and carcass suspension method. *Meat Science*, 86:311-316.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1824–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- Iminjan, M., Amat, N., Li, X. H., Upur, H., Ahmat, D., He, B. 2014. Investigation into the Toxicity of Traditional Uyghur Medicine *Quercus infectoria* Galls Water Extract. *PLoS ONE*, 9(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090756>
- Innis, S. M. 2007. Fatty acids and early human development. *Early Human Development*, 83(12), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.09.004>
- Inoue, K., Yamaai, T., & Kitada, Y. 1992. Parasympathetic postganglionic nerve fibers in the fungi form *papillae* of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Research*, 596(1–2), 299–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1467991>
- ISO 7889:2003. Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count technique at 37 °C (2009).
- Jain, A. K., Sethi, N. 1991. Chromosomal Aberrations in Cultured Induced and Sister Chromatid Exchanges Human Lymphocytes by Epigallocatechingallate. *Cytologia*, 56(4800), 539–542.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V, Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... Pezzuto, J. M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), 218–220.
- Jones, O., Decker, E. A., McClements, D. J. 2010. Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.001>
- José-Luna, L. A., Espinosa-Montalvo, L., Rendón-Aguilar, B. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 72, 107–117.
- Kallio, H., Lassila, M., Järvenpää, E., Haraldsson, G. G., Jonsdottir, S., Yang, B. 2009. Inositols and methylinositols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Journal of Chromatography B*:

- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 877(14–15), 1426–1432. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.027>.
- Kandárová, H., Letašiová, S. 2011. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 107–113. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0018-6>
- Karagül-Yüceer, Y., Drake, M. 2013. Sensory Analysis of Yogurt. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks, Second Edition*, (October), 353–367. <https://doi.org/10.1002/9781118481301.ch16>.
- Karonen, M., Pulkkinen, P., Sinkkonen, J., Salminen, J., Pihlaja, K., Roslin, T. 2004. Seasonal Variation in the Content of Hydrolyzable Tannins, Flavonoid Glycosides, and Proanthocyanidins in Oak Leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30(9), 1693–1711. <https://doi.org/10.1023/b:joec.0000042396.40756.b7>.
- Kaur, N., Singh, D. P. 2017. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, 112, 167–187. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.01.033>.
- Kemp, S.E., Hollowood, T., Hort J. 2009. *Sensory evaluation. A practical handbook*. This edition first published 2009. Wiley black-well. Singapur. Pp. 196.
- Khandelwal, S., Audipi, S.A., Ghugre, P. 2010. Polyphenols and tannins in Indian pulses: effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*, 43: 526-530.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.-L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>.
- Kleemann, C., Selmer, I., Smirnova, I., Kulozik, U. 2018. Tailor made protein based aerogel particles from egg white protein, whey protein isolate and sodium caseinate: Influence of the preceding hydrogel characteristics. *Food Hydrocolloids*, 83 (December 2017), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.021>.
- Knab, A. M., Shanely, R. A., Jin, F., Austin, M. D., Sha, W., Nieman, D. C. 2011. Quercetin with vitamin C and niacin does not affect body mass or composition. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(3), 331–338. <https://doi.org/10.1139/h11-015>.
- Kosaraju, S. L., D'ath, L., Lawrence, A. 2006. Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64(2), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.027>.

- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Hafiz, A. M. M., Hafeza, A. B., Rao, S. R. M. 2009a. Study on retention of bioactive components of *Morinda citrifolia* L. using spray-drying. *Journal of Applied Sciences*, 9(17), 3092–3097. <https://doi.org/10.3923/jas.2009.3092.3097>.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Mohan Rao, S.R., Nithyanand, R.R. 2009b. Optimal Operating Conditions of Spray Dried Noni Fruit Extract using κ -carrageenan as Adjuvant. . *Journal of Applied Sciences*, 9: 3062–3067.
- Kyriakoudi, A., Tsimidou, M. Z. 2018. Properties of encapsulated saffron extracts in maltodextrin using the Büchi B-90 nano spray-dryer. *Food Chemistry*, 266(April), 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.038>
- Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M., Jouppila, K. 2008. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11251–11261.
- Lambert, J. D., Sang, S., Yang, C. S. 2007. Possible controversy over dietary polyphenols: Benefits vs risks. *Chemical Research in Toxicology*, 20(4), 583–585. <https://doi.org/10.1021/tx7000515>
- Lampila, P., Lieshout, M. Van, Gremmen, B., Lähteenmäki, L. 2009. Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. *Food Research International*, 42(1), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.002>
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products* (pp. 1543–1580). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- Lawless, T.H., Heymann, H. 2010. *Sensory evaluation of food, principles and practices*. Kluwer academic/plenum publishers. United States of America. Pp. 827.
- Lee, J. H., Lee, S. Y., Kim, B., Seo, W. D., Jia, Y., Wu, C., ... Lee, S.-J. 2015. Barley sprout extract containing policosanols and polyphenols regulate AMPK, SREBP2 and ACAT2 activity and cholesterol and glucose metabolism in vitro and in vivo. *Food Research International*, 72, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.041>
- Lestin, F., Pertschy, A., Rimek, D. 2003. Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple co-morbidities. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 128:2531-2533.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., ... Zang, M. 2011. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism*, 13(4), 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>

- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., Xin, Z., Cao, L., Hu, Q. 2011. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 82: 297–301.
- Liu, J.-F., Ma, Y., Wang, Y., Du, Z.-Y., Shen, J.-K., Peng, H.-L. 2011. Reduction of lipid accumulation in HepG2 cells by luteolin is associated with activation of AMPK and mitigation of oxidative stress. *Phytotherapy Research : PTR*, 25(4), 588–596. <https://doi.org/10.1002/ptr.3305>
- Liu, R. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207–219.
- Lopetcharat, K., McDaniel, M. 2005. Sensory analysis of foods. In: *methods of analysis of food components and additives*, CRC Press, Taylor & Francis group.
- López-Alarcón, C., Lissi, E. 2005. Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities. *Free Radical Research*, 39(7), 729–736. <https://doi.org/10.1080/10715760500143452>
- Luna-José, A. de L., Montalvo-Espinasa, L., Rendón-Aguilar, B. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 72, 107–117.
- Luo, Z., Saha, A. K., Xiang, X., Ruderman, N. B. 2005. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.011>
- Ma, K., Thomason, L. A. M., McLaurin, J. A. 2012. Scyllo-Inositol, Preclinical, and Clinical Data for Alzheimer's Disease. *Advances in Pharmacology (Vol. 64)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00006-4>
- Maehre, H. K., Jensen, I. J., Elvevoll, E. O., Eilertsen, K. E. 2015. ω -3 fatty acids and cardiovascular diseases: Effects, mechanisms and dietary relevance. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms160922636>
- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3), 241–256. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00142-1)
- Malvern Instruments. 2014. The Zetasizer Nano electrokinetic modelling utilities The Zetasizer Nano software, (0), 1–8.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.

- Mancilla-Dávalos, V., Jaime-Fonseca, M. R., Yéñez-Fernández, J. 2014. Nanoencapsulación de Riboflavina en Matrices Poliméricas Biodegradables Empleando la Técnica de Secado por Aspersión. Instituto Politécnico Nacional.
- Manos, P. S., Doyle, J. J., Nixon, K. C. 1999. Phylogeny , Biogeography , and Processes of Molecular Differentiation in *Quercus* Subgenus *Quercus* (Fagaceae), 12(3), 333–349.
- Martinez-Flores, H. E., Kil, Y. 2004. Effect of high fiber products on blood lipids and lipoproteins in hamsters, 24, 85–93. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00206-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00206-9)
- Martirosyan, D. M., Singh, J. 2015. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? Functional Foods in Health and Disease, 5(6), 209–223. Retrieved from <http://www.ffhdj.com/index.php/ffhd/article/view/183/394>
- Mataix, J. 2001. Nutrición y alimentación humana. Ed. Morgón. Madrid.
- McCune, L.M., Johns, T. 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. Journal of Ethnopharmacology, 82:197-205.
- Medina, M. E., Galano, A., Trigos, Á. 2015. Theoretical study on the oxidative damage to cholesterol induced by peroxy radicals. Journal of Physical Organic Chemistry, 28(7), 504–508. <https://doi.org/10.1002/poc.3449>
- Meiselman, H. L. 1993. Critical evaluation of sensory techniques. Food Quality and Preference. 4:33-40. [https://doi.org/10.1016/0950-3293\(93\)90311-S](https://doi.org/10.1016/0950-3293(93)90311-S)
- Melo, M. G. D., Dória, G. A. A., Serafini, M. R., Araújo, A. A. S. 2012. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. Scientia Plena, 8(4), 1–6. Retrieved from <http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/view/295>
- Mennen, L. I., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., Scalbert, A. 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. The American Journal of Clinical Nutrition, 81(Suppl), 326S-329S. <https://doi.org/81/1/326S> [pii].
- Mercado, Carmen E. 2007. Los Ambitos Normativos, La Gestion De La Calidad y La Inocuidad Alimentaria: Una Vision Integral. Agroalimentaria, 2007, 119–131.
- Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M. M., Maiza, F. 2015. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. Industrial Crops and Products, 67, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.049>.

- Michael J., J., Robert A., G., Leslie G, C. 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1 SUPPL.), 343S-348S.
- Mihaylova, M. M., Shaw, R. J. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/ncb2329>.
- Miró-Casas, E., Covas, M. I., Fitó, M., Farré-Albadalejo, M., Marrugat, J., de la Torre, R. 2003. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), 186–190. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601532>.
- Mirzaei, A., Mirzaei, N. 2012. Acute and Chronic Toxicity of Iranian Jaft and Oak Fruit Component. *Research Journal Of Biological Sciences*, 7(9–12), 350–354.
- Miserez, A. R., Muller, P. Y., Barella, L., Barella, S., Staehelin, H. B., Leitersdorf, E., ... Friedlander, Y. 2002. Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 164(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00762-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00762-6).
- Moctezuma, C., Hammerbacher, A., Heil, M., Gershenzon, J. 2014. Specific Polyphenols and Tannins are Associated with Defense Against Insect Herbivores in the Tropical Oak *Quercus oleoides*. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 458–467. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0431-3>.
- Monks, T. J., & Lau, S. S. 1998. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 229–255. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.229>.
- Moon, H.-S., Chung, C.-S., Lee, H.-G., Kim, T.-G., Choi, Y.-J., Cho, C.-S. 2007. Inhibitory Effect of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells**. *Obesity*, 15(11), 2571–2582. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.309>.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- Moreno-Jimenez, M. R., Trujillo-Esquivel, F., Gallegos-Corona, M. A., Reynoso-Camacho, R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., ... Ramos-Gomez, M. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.011>.

- Moreno, F.J.L., García, D.R., Anton, F.G.M. 2011. Introducción a la fisicoquímica. Ed. Universitat de Valencia. Valencia. Pp. 65-68.
- Morton, L.W., Abu-Amsha Caccetta, R., Puddey, I.B., Croft, K.D. 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental and Pharmacology and Physiology*, 27:152–159.
- Moss, G. P. 2000. Nomenclature of lignans and neolignans. *Pure and Applied Chemistry*, 72(8), 1493–1523.
- Mulvihill, E. E., Allister, E. M., Sutherland, B. G., Telford, D. E., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., ... Huff, M. W. 2009. Naringenin Prevents Dyslipidemia, Apolipoprotein B Overproduction, and Hyperinsulinemia in LDL Receptor–Null Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 58(October), 2198–2210. <https://doi.org/10.2337/db09-0634.E.E.M>.
- Mulvihill, E. E., Assini, J. M., Sutherland, B. G., Dimattia, A. S., Khami, M., Koppes, J. B., ... Huff, M. W. 2010. Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(4), 742–748. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201095>
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* (Vol. 3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Munker, R., Hiller, E., Glass, J., Paquette, R. 2007. *Modern Hematology*. Humana Press (2nd ed.).
- Naczka, M., Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>.
- Naima, R., Oumam, M., Hannache, H., Sesbou, a., Charrier, B., Pizzi, a., Charrier – El Bouhtoury, F. 2015. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*, 70, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.016>.
- Natić, M. M., Dabić, D. Č., Papetti, A., Fotirić Akšić, M. M., Ognjanov, V., Ljubojević, M., Tešić, Ž. L. 2015. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chemistry*, 171, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.101>.

- Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M. 2001. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 39(11), 1063–1070. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00054-0).
- Nishikimi, M., Rao, A. N., Yagi, K. 1972. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3).
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. 1978. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2012-0017>.
- NMX-F-444-1983. Alimentos yogurt o leche búlgara. 1983.
- NMX-F-511-1988. Alimentos determinación de acidez en leche reconstituida. 1988.
- NOM-111-SSA1-. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos., 26—6 § 1994.
- NOM-113-SSA1-. (1994). NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. *Diario Oficial de La Federación*, 323.
- NOM-181-SCFI. Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. 2010.
- Nonaka, G., Ishimaru, K., Azuma, R., Ishimatsu, M., Nishioka, I. 1989. Tannins and Related Compounds. LXXXV. Structures of Novel C-Glycosidic Ellagitannins, Grandinin and Pterocarins A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(8), 2071–2077.
- Nori, M.P., Favaro-Trindade, C.S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J.C., Contreras Castillo, C.J. 2011. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT- Journal of Food Science and Technology*, 44: 429–435.
- Norlin, M., Andersson, U., Björkhem, I., Wikvall, K. 2000. Oxysterol 7 α -hydroxylase activity by cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7a). *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34046–34053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002663200>.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-181-SCFI-2010, yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

- OCDE. 2006. Preliminary Draft Updated Test Guideline 407 : Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents ; Updated With. OCDE Guideline for the Testing of Chemicals, 1–11.
- OECD/OCDE. 1981. “Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study,” (May).
- OECD/OCDE. 1997. Neurotoxicity Study in Rodents, (July), 1–15.
- OECD/OCDE. 2000. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment, 7(19), 1–39.
- OECD/OCDE. 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Guideline for Testing of Chemicals, 423(December), 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>
- Oliff, H. 2009. Scientific and Clinical Monograph for PYCNOGENOL®. American Botanical Council. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(96\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(96)00124-6)
- Ono, M., Fujimori, K. 2011. Antiadipogenic effect of dietary apigenin through activation of AMPK in 3T3-L1 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 13346–13352. <https://doi.org/10.1021/jf203490a>
- Oomah, B.D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:935–942.
- Orallo, F., Alvarez, E., Camiña, M., Leiro, J. M., Gómez, E., Fernández, P. 2002. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular Pharmacology*, 61(2), 294–302.
- Orozco-Alfaro, J. A., Martínez-Flores, H. E. 2017. Nanoencapsulación de compuestos polifenólicos extraídos de la hoja de *Pisidium guajava*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Pacheco, A. O., Moran, J. M., Breff, D. R., María, E., Saborít, A. 2013. Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(1), 52–59.
- Parasuraman, S. 2011. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2), 74–79. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>
- Parra-Huertas, R. A. 2010. Review Lactic Acid Bacteria: Functional Role in The Foods. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), 93–105.
- Parra, R. 2011. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Open Journal Systems*, 63(2), 5669–5684. <https://doi.org/0304-2847>.

- Pedrero, F.D.L., Pangborn R.M. 1997. Evaluación sensorial de los alimentos, métodos analíticos. Ed. Alhambra Mexicana. México. Pp. 251.
- Pedroza, R. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. In VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (Vol. 29, pp. 438–447). <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7047>.
- Pelaes Vital, A. C., Goto, P. A., Hanai, L. N., Gomes-da-Costa, S. M., de Abreu Filho, B. A., Nakamura, C. V., Matumoto-Pintro, P. T. 2015. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.003>.
- Peng, C.-H., Liu, L.-K., Chuang, C.-M., Chyau, C.-C., Huang, C.-N., Wang, C.-J. 2011. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2663–2671. <https://doi.org/10.1021/jf1043508>.
- Pérez, V., Doce, R. R., García-Pariente, C., Hervás, G., Carmen Ferreras, M., Mantecón, Á. R., Frutos, P. 2011. Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.12.015>.
- Pharmacopoeia, E. 2002. European Pharmacopoeia, Methods of analysis. In E. C. of Europe (Ed.), *European Pharmacopoeia* (4th ed., pp. 331–332). Strasbourg, France: EDQM Council of Europe.
- Pinto, P. C. R. O., Sousa, A. F., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Gandini, A., Eckerman, C., Holmbom, B. 2009. *Quercus suber* and *Betula pendula* outer barks as renewable sources of oleochemicals: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.015>.
- Poma, E. M., Requis, E. R., Gordillo, G. C. 2011. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (Guanábana) de Cuzco. *Ciencia e Investigación*, 14(2), 29–33.
- Ponce. 1946. Los Encinos en el Circuito Montañoso del Valle de México. México. D.F.
- Popa, V. I., Dumitru, M., Volf, I., Anghel, N. 2007. Lignin and polyphenols as allelochemicals. *Industrial Crops and Products*, 27, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.019>.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., Chan, B. G. 1986. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3).

- Pramfalk, C., Karlsson, E., Groop, L., Rudel, L. L., Angelin, B., Eriksson, M., Parini, P. 2009. Control of ACAT2 liver expression by HNF4 α : lesson from MODY1 patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(8), 1235–1241. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.188581>
- Prida, A., Puech, J.L. 2006. Influence of Geographical Origin and Botanical Species on the Content of Extractives in American, French, and East European Oak Woods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54:8115-8126.
- Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W., Furda, I. 1988. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 71(5), 1017–1023. <https://doi.org/10.1007/BF02444197>.
- Puupponen-Pimiä, R., Aura, A.-M., Oksman-Caldentey, K.-M., Myllärinen, P., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., & Poutanen, K. 2002. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology*, 13(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00020-1).
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., ... Trotin, F. 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1–2), 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rains, T. M., Agarwal, S., Maki, K. C. 2011. Antiobesity effects of green tea catechins: A mechanistic review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.006>
- Ramírez Herrera, R., Soto Ruíz, N. E. 2013. Estudios Pre-clínicos y Clínicos. Retrieved from <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/ESTRUCTURA DE EXPEDIENTES/11 ESTUDIOS PRE Y CLINICOS.pdf>
- Ramirez-Zermeno, R. M. 2010. Alimentos funcionales / Functional foods: Principios Y Nuevos Productos / Principles and New Products. (E. T. S. De Cv, Ed.). Editorial Trillas Sa De Cv. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=9_CgcQAACAAJ

- Ramírez, N. 2010. Alimentos Funcionales. Tesis de doctorado en Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia. 101:1-2.
- Ramos, T. I. 2016. Contexto actual de los estudios preclínicos. *Revista Bionatura*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.01.1>
- Rawson, R. B. 2003. The SREBP pathway - Insights from insigs and insects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(8), 631–640. <https://doi.org/10.1038/nrm1174>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. 2016. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Re, R., Pellegrinni, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rie-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Reis, C. P., Neufeld, R. J. 2006. Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, 2, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Reyes, C. J. 2008. Antioxidantes en los alimentos y su efecto en la salud. En: *Temas Selectos en Alimentos, Nutrición y Salud*. Editorial Morevallado. Morelia, Michoacán. México. Pp. 105.
- Rice-Evans, C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8:797–807.
- Rio, D Del, Costa, L. G., Lean, M. E. J., Crozier, A. 2010. Polyphenols and health : What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.05.015>
- Risvik, E., Poppert, R., Rogders, R. 1989. Expert systems and their application in sensory evaluation. *Food Quality and Preferences*, 1:183-184.
- Rivas-Arreola, M., Rocha-Guzmán, N., Gallegos-Infante, J., Al, E. 2010. Antioxidant Activity of Oak (*Quercus*) Leaves Infusions against Free Radicals and their Cardioprotective Potencial. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(11), 537–545.
- Robert, P., Gorená, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying.

- International Journal of Food Science and Technology, 45(7), 1386–1394.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Harte, F., Medina-Torres, L., Ochoa-Martínez, L. A., Soto-García, M. 2010. Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of *Quercus resinosa* infusions encapsulated by spray-drying. Journal of Food Science, 75(5), N57-61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01653.x>
- Rocha-Guzmán, N. E., Medina-Medrano, J. R., Gallegos-Infante, J. A., Gonzalez-Laredo, R. F., Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., ... González-Herrera, S. M. 2012. Chemical Evaluation, Antioxidant Capacity, and Consumer Acceptance of Several Oak Infusions. Journal of Food Science, 77(2). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02524.x>
- Rocha, S., Generalov, R., Pereira, M.D.C., Peres, I., Juzenas, P., Coelho, M.A.N. 2011. Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention. Nanomedicine, 6: 79–87.
- Rodríguez Amado, R., Lafourcade Prada, A., Pérez Rondón, L. 2013. Hojas de *Psidium guajava* L. Revista Cubana de Farmacia, 47(1), 127–135.
- Rojas, C. B. 2001. Fases Del Desarrollo De Un Nuevo Medicamento, 1–4.
- Romero, S. R., Rojas, C. Z., Aguilar, M. de L. E. 2002. El Género *Quercus* (Fagaceae) en el Estado de México. Annals of the Missouri Botanical Garden, 89(4), 551–593.
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Peralta-Cruz, J., Morré, J., Karchesy, J. J. 2011. Chromatographic analysis of bioactive proanthocyanidins from *Quercus durifolia* and *Quercus eduardii* barks. Acta Chromatographica, 23(3), 521–529. <https://doi.org/10.1556/AChrom.23.2011.3.12>
- Rowe, J.W., Conner, A.H. 1979. Extractives in Eastern Hardwood. In: 18 G.t.r.F. (Ed.), Madison, Wisconsin, United States.
- Ruch, R. J., Cheng, S., Klaunig, J. E. 1989. Prevention of Cytotoxicity and Inhibition of Intercellular Communication by Antioxidant Catechins Isolated from Chinese Green Tea. Carcinogenesis, 10(6), 1003–1008. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
- Ruiz Rivera, J. A., Ramírez Matheus, A. O. 2009. Elaboración de yogurt con probióticos (*Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. Revista de La Facultad de Agronomía, 26(2), 223–242.
- Rzedowski, J. 2006. Bosque de *Quercus*. In Vegetación de México (pp. 274–294).

- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177:67–80.
- Samaniego-Fernández, M. L., Sosa del Castillo, M. 2000. *Lactobacillus* spp. : Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Matanzas: Editorial Universitaria.
- Sancho, A.I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Williamson, G., Faulds, C.B. 2001. Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science*, 34:173–179.
- Santhakumar, A. B., Battino, M., Alvarez-Suarez, J. M. 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, 113(January), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022>
- Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. 1989. Tannins in Wood: Comparison of Different Estimation Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(July), 1324–1329. <https://doi.org/10.1021/jf00089a026>
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., ... Kelm, M. 2006. -Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*, 103(4), 1024–1029.
- Scott, H., Summit, N. J. 1985. Production of para-cresol Patent. United States.
- Shaffer, E. A., Romagnuolo, J. 2012. *First Principles of Gastroenterology and Hepatology*. First Principles of Gastroenterology and Hepatology (sixth).
- Shahidi, F., Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33: 501-547.
- Shanthi, C.N., Gupta, R., Mahato, A.K. 2010. Traditional and emerging applications of microspheres: A review. *International Journal of PharmTech Research*, 2: 675–681.
- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., Hüttemann, M. 2015. Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-) -Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer , Inflammation , Diabetes , and Neurodegeneration, 2015.
- Shi, H., Noriko, N. 2001. Part 3 Natural antioxidants Introducing natural antioxidants. *DNA Repair*, 147–158. <https://doi.org/10.1016/9781855736160.3.147>
- Shimizu, T. 2003. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutrition Research Reviews*, 16(02), 241–252. <https://doi.org/10.1079/nrr200363>

- Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M. 2004. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42(6), 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.02.008>
- Simón, B. F. De, Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M. 2014. Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry , chestnut , false acacia , ash and oak wood barrels, 147, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.158>
- Simopoulos, A. P. 2018. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(4), 771–771. <https://doi.org/10.1093/ajcn/54.4.771>
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Smirnoff, N., Cumbes, J. Q. 1989. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Smith, A., Giunta, B., Bickford, P.C., Fountain, M., Tan, J., Shytle, R.D. 2010. Nanolipidic particles improve the bioavailability and α -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer’s disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 389: 207–212.
- Sreejayan, Rao, M. N. A. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(1), 105–107. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06761.x>
- Stankovikj, F., McDonald, A. G., Helms, G. L., Olarte, M. V., Garcia-Perez, M. 2017. Characterization of the Water-Soluble Fraction of Woody Biomass Pyrolysis Oils. *Energy and Fuels*, 31(2), 1650–1664. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02950>
- Steinberg, G. R., Kemp, B. E. 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 1025–1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2008>
- Stelljes, M. E. 2008. Toxicology for Nontoxicologists.
- Stevanovic, T., Diouf, P. N., Garcia-Perez, M. E. 2009. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *Current Nutrition & Food Science*, 5(4), 264–295. <https://doi.org/10.2174/157340109790218067>
- Stratford, M. R. L., Ramsden, C. A., Riley, P. A. 2013. Mechanistic studies of the inactivation of tyrosinase by resorcinol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(5), 1166–1173. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.031>
- Sueth-Santiago, V., Peron Mendes-Silva, G., Decoté-Ricardo, D., & Edilson Freire De Lima, M. 2015. Curcumina, O Pó Dourado Do Açafrão-Da-Terra: Introspecções Sobre Química E Atividades Biológicas. *Química Nova*, 38(4), 538–552. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

- Szejka, M., Poplawski, T., Sarnik, J., Pawlaczyk-Graja, I., Czechowski, F., Olejnik, A. K., ... Zbikowska, H. M. 2017. Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes against γ -radiation-induced damage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.053>
- Torres, A.M.L. 2009. Los fermentos lácteos en el siglo XIX. Los sitios de Zaragoza, Enfermedad, Salud y Propaganda. 449-462.
- Tranquilino, E. 2012. “Elaboración de una bebida funcional tipo yogurt a partir de aceites vegetales, inulina y *Saccharomyces boulardii*.” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Tuyen, P. T., Khang, D. T., Ha, P. T. T., Hai, T. N., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D. 2016. Antioxidant Capacity and Phenolic Contents of Three *Quercus* Species. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 85–99. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.54.85>
- Valencia-Avilés, E., García-Pérez, M. E., Martínez-Flores, H. E., Melendez-Herrera, E., Garnica-Romo, M. G. 2017. Antioxidant and oral toxicological properties of polyphenolic extracts from bark of “*Quercus crassifolia*.” 31 St International Conference of Food Science and Technology Challenges for the 21st Century-Research to Progress Society.
- Valencia, A. 2004. Diversidad del género *Quercus* (*Fagaceae*) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 33–53.
- Valenzuela, A. B., Valenzuela, R., Sanhueza, J., Morales, G. 2014. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición*, 41(2), 198–204. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valls, J., Lampreave, M., Nadal, M., Arola, L. 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación: equipos y tecnología*. Unidad de Enología. Dpto. De Bioquímica y Biotecnología, Universidad Rovira I Virgili. P. p. 119-124.
- van Duijn, G. 2014. *Oils and Fats. Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00013-5>

- Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., Salomone, S. 2013. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(1), 15–25. <https://doi.org/10.1007/s13318-012-0112-y>
- Vivas, Y. A., Morales, A. J., Otálvaro, Á. M. 2016. Utilization of whey in the development of a refreshing beverage with natural antioxidants. *Revista Alimentos Hoy*, 24(39), 185–199. Retrieved from <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/415/344.%0A%0A>
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., ... Shen, C. L. 2014. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>
- Wang, Y., Oram, J. F. 2002. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5692–5697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109977200>
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y., Wu, J. M. 2002. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 9(1), 77–79.
- Weber, H. A., Hodges, A. E., Guthrie, J. R., O'Brien, B. M., Robaugh, D., Clark, A. P., ... Smith, C. S. 2007. Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: Grape seed and pine bark extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 148–156. <https://doi.org/10.1021/jf063150n>
- Weinbreck, F., Bodnár, M., Marco. 2010. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products?. *Food Microbiology*, 136:364-367.
- Weiss, D. J., Wardrop, J. K. 2012. *Veterinary hematology*. Wiley-Blackwell (Vol. XXXIII). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- White, B. M., Goldfarb, S., Adler, S. H., Cunney, M. B., Castle, P. P., Adler, S. H. 2001. *Acute Renal Failure: Pathophysiology and Treatment* (Vol. 4).
- WHO. 2019. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)32941-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)32941-0)
- Willför, S. M., Smeds, A. I., Holmbom, B. R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.054>
- Williams, C. M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 165–180. <https://doi.org/10.1051/animres:2000116>

- Williamson, G., Manach, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 243S-255S. <https://doi.org/81/1/230S> [pii]
- Xiong, S., Melton, L.D., Easteal, A.J., Siew, D. 2006. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6201–6208.
- Yarnes, C. T., Boecklen, W. J., Tuominen, K., Salminen, P. 2006. Defining phytochemical phenotypes : size and shape analysis of phenolic compounds in oaks (*Fagaceae*, *Quercus*) of the Chihuahuan Desert. *Canadian Journal of Botany*, 84, 1233–1248. <https://doi.org/10.1139/B06-076>
- Yu, L., Jia, L.-H., Hammer, R. E., Berge, K. E., Horton, J. D., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. 2002. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 670–680. <https://doi.org/10.1172/JCI200216001>.Introduction
- Yuji, S., Mio, N., Takaharu, S., Koichiro, K., Shimpei, S., Kazuhiko, A., ... Takahiro, M. 2014. Association between Alkaline Phosphatase and Anemia in Rural Japanese Men: The Nagasaki Islands study. *Acta Medica Nagasakiensia*, 58(4), 125–130. <https://doi.org/10069/34224>
- Zamora, V. 2011. Desarrollo de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e Inulina. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México.
- Zern, T. L., West, K. L., Fernandez, M. L. 2018. Grape Polyphenols Decrease Plasma Triglycerides and Cholesterol Accumulation in the Aorta of Ovariectomized Guinea Pigs. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2268–2272. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2268>
- Zhang, L., Mou, D., Du, Y. 2007. Procyanidins: Extraction and micro- encapsulation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 87(2), 2192–2197. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Zhang, X., Huang, K., Ye, Y. J., Shi, J. Y., Zhang, Z. F. 2015. Biomedical molecular of woody extractives of *Cunninghamia lanceolata* biomass. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 761–764.
- Zhao, C.-F., Jian Lei, D., Hao Song, G., Zhang, H., Xu, H., Yu, L.-J. 2015. Characterisation of water-soluble proanthocyanidins of *Pyracantha fortuneana* fruit and their improvement in cell bioavailable antioxidant activity of quercetin. *Food Chemistry*, 169, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.091>

13. ANEXOS

Anexo 1. Encuesta para selección de catadores.

Lugar:

Fecha:

Nombre:

Edad:

años

Email:

Teléfono

Sexo:

H

M

1.- ¿Es fumador?

Si

No

2.- ¿Ha sido fumador?

Si

No

3.- ¿Padece alguna de las siguientes enfermedades?:

Diabetes:

Si

No

Cáncer:

Si

No

Hipoglucemia:

Si

No

Alergias a alimentos

Si

No

Hipertensión

Si

No

4.- ¿Ha recibido radioterapia y/o quimioterapia?:

Si

No

5.- ¿Ha padecido o padece alguna enfermedad neurológica?

Si

¿Cuál?

No

6.- ¿Toma algún medicamento de forma crónica?

Si ¿Cuál? _____ No

7.- ¿Son medicamentos controlados?

Si ¿Cuál? _____ No

¿En qué días y horario puede asistir a realizar las pruebas?

Anexo 2. Papeleta para evaluación PROP

Prueba PROP.

Nombre: _____

Fecha: _____

Instrucciones: Limpie su boca con un sorbo de agua, sostenga el papel filtro impregnado con PROP de manera que la parte que contiene la solución, no esté en su mano. Abra su boca y coloque el papel filtro impregnado con PROP en su lengua. Cierre su boca y espere 20 s antes de registrar su respuesta sobre la sensación amarga percibida.

Coloque una línea horizontal en donde considere que corresponde la sensación amarga percibida.

A vertical scale for evaluating the PROP sensation. It consists of a vertical line with six horizontal tick marks extending to the right. The labels for each tick mark are:

- Lo más inimaginablemente fuerte
- Muy fuerte
- Fuerte
- Moderado
- Débil
- Apenas detectable

Anexo 3. Papeleta para identificación de sabores básicos

Nombre: _____

Fecha: _____

Hay seis soluciones acuosas, cinco de los sabores básicos (dulce, salado, ácido, amargo y umami) y una de agua. Pruebe las muestras de izquierda a derecha en el orden especificado abajo. Enjuague su boca con cada muestra. Identifique el sabor de cada muestra. Enjuague su boca con agua entre cada muestra y espere un minuto antes de proceder a la muestra siguiente. Anote la primera sensación que tenga y no la cambie ni vuelva a probar ninguna muestra por segunda vez.

Código de la muestra	Identidad

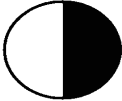



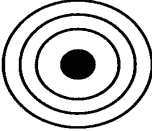


Anexo 4. Papeletas de entrenamiento para catadores.

E. SCALING EXERCISES


(To be included with each of the prescreening questionnaires)

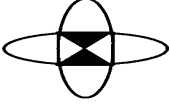
INSTRUCTIONS: MARK ON THE LINE AT THE RIGHT TO INDICATE THE PROPORTION OF THE AREA THAT IS SHADED.


EXAMPLES.

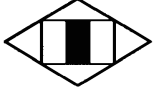
		None -----/----- All
		None -----/----- All
		None -----/----- All
1.		None ----- All
2.		None ----- All
3.		None ----- All
4.		None ----- All


Anexo 4. Continuación...


5.  None |-----| All

6.  None |-----| All

7.  None |-----| All

8.  None |-----| All

9.  None |-----| All

10.  None |-----| All

Prescreening questionnaire: scaling exercise. The answers are:

- | | |
|--------|---------|
| 1. 7/8 | 6. 1/8 |
| 2. 1/8 | 7. 3/4 |
| 3. 1/6 | 8. 1/8 |
| 4. 1/4 | 9. 1/2 |
| 5. 7/8 | 10. 1/2 |

Anexo 5. Papeleta para análisis del perfil sensorial del yogurt

Código de Producto _____

Por favor, observe, huela y coloca la muestra en tu boca. Seleccione entre la lista de términos, todos aquellos que considere describen la muestra que se le presenta.

Apariencia

Homogénea

Color blanco

Color amarillento

Sinéresis

Olor

Ácido

Dulce

Cremoso

Oxidado

Sabor/gusto intensidad global

Ácido

Dulce

Salado

Amargo

Fermentado

Cremoso

Oxidado

Textura

Espeso

Homogéneo

Suavidad

Recubrimiento bucal

—

Baboso

Astringente

