



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE
INFUSIONES DE TOJI (*Phoradendron brachystachyum*) E
INHIBICIÓN DE LIPASA PANCREÁTICA**

Por:

LN. Víctor Eduardo Zamudio Sosa

TESIS APROBADA POR

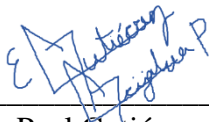
COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de


MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para la revisión de tesis de Victor Eduardo Zamudio Sosa la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.



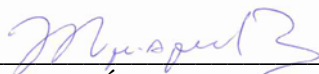
Dr. Erick Paul Gutiérrez Grijalva
Director



Dr. José Basilio Heredia
Integrante del comité de tesis



M.C. Laura Aracely Contreras Angulo
Integrante del comité de tesis




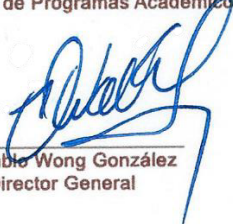
Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Bioaccesibilidad de Compuestos Fenólicos de Infusiones de Toji (*Phoradendron brachystachyum*) e Inhibición de Lipasa Pancreática” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Victor Eduardo Zamudio Sosa, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

**CENTRO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que hizo posible mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Culiacán por ser la institución donde me formé.

Al Dr. Erick Paul Gutiérrez Grijalva por aceptarme y apoyarme en cada paso de mi maestría. Por todas sus enseñanzas, por ser un ejemplo a seguir y ofrecer su apreciada amistad.

A mi comité de tesis: Dr. José Basilio Heredia, MC Laura Aracely Contreras, Dr. Miguel Ángel Angulo, por su apoyo, sus enseñanzas en clases y asesorías fuera de ellas, y por la supervisión de este proyecto de tesis.

A mis compañeros de generación y de laboratorio, en especial al MC Luis Ángel Cabanillas, MC Juan Cota, MC Alicia Elizalde, MC Luis Aurelio Montoya, por su compañerismo y la ayuda brindada. Así como al MC Alexis Emus, que, junto con la MC Laura Contreras, me apoyaron y educaron en el laboratorio.

A mi madre Margarita, la mujer que dio su vida por mí y por mis hermanos, mi ejemplo a seguir todos los días y quien me impulso para luchar por todos mis sueños. A mis hermanos María Luisa y Carlos por estar a mi lado siempre, por ser mi compañía y mi motor, y porque su felicidad es mi felicidad.

A mi familia por apoyarme en los momentos más difíciles y por celebrar los buenos momentos. A la tía Teresa, a la tía Georgina. A mi padre. A mis primos Eduardo y Sergio, por ser ejemplos a seguir.

A mis amigos, los primos Gamez. A Kevin y a la memoria de Alan. Por estar siempre ahí, por las noches de juego y las risas compartidas.

DEDICATORIA

A Karla, por la casualidad de lo mutuo y por lo vivido.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE CUADROS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Dislipidemias	14
2.1.1. Tratamientos Farmacológicos de Dislipidemias y sus Efectos Adversos.....	15
2.2. Fitoquímicos	16
2.2.1. Actividad Inhibitoria de Lipasa Pancreática de Compuestos Bioactivos	17
2.3. Muérdago (<i>Phoradendron brachystachyum</i>)	18
2.3.1. Fitoquímicos de Muérdagos.....	19
2.4. Biodisponibilidad de Fitoquímicos.....	20
2.4.1. Bioaccesibilidad de Compuestos Fitoquímicos en <i>P. brachystachyum</i>	21
3. HIPOTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo General.....	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Material Vegetal	25
5.2. Preparación de Infusiones de <i>P. brachystachyum</i>	25
5.3. Ensayos de Capacidad Antioxidante	26
5.3.1. Ensayo de Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC).....	26
5.3.2. Ensayo de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC).....	26
5.4. Ensayos de Caracterización de Compuestos Fitoquímicos	27
5.4.1. Determinación del Contenido de Fenólicos Totales	27
5.4.2. Determinación del Contenido de Flavonoides Totales	27
5.4.3. Extracción y Cuantificación de Taninos	28
5.4.4. Taninos Totales.....	28
5.4.5. Taninos Condensados	28
5.4.6. Taninos Hidrolizables	29

CONTENIDO (Continuación)

5.5. Ensayo de Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática	29
5.6. Ensayos de Bioaccesibilidad	29
5.7. Identificación y Cuantificación de Compuestos Bioactivos por UPLC-Masas.....	31
5.8. Diseño Experimental	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1. Capacidad Antioxidante de Infusiones de Toji.....	32
6.1.1. Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox Mediante la Inhibición del Radical ABTS y ORAC	32
6.2. Caracterización de Compuestos Bioactivos de Infusiones de Toji	34
6.2.1. Contenido de Fenoles Totales.....	34
6.2.2. Contenido de Flavonoides Totales.....	36
6.2.3. Contenido de Taninos Totales, Taninos Condensados y Taninos Hidrolizables.....	37
6.3. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática.....	41
6.4. Identificación y Cuantificación de Compuestos Bioactivos por UPLC	42
7. CONCLUSIONES.....	47
8. RECOMENDACIONES.....	48
9. REFERENCIAS	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Compuestos mayoritarios en tamizaje fitoquímico de hoja y tallo de <i>P. brachystachyum</i>	19
2. Compuestos fitoquímicos encontrados en extracto de acetona de <i>P. brachystachyum</i>	20
3. Composición de electrolitos y enzimas de las soluciones gastrointestinales simuladas.	30
4. Capacidad antioxidante en infusiones de toji mediante la inhibición del radical ABTS y el método ORAC antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión <i>in vitro</i>	34
5. Cuantificación de fenoles totales en infusiones de <i>P. brachystachyum</i> antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión <i>in vitro</i>	35
6. Cuantificación de flavonoides totales en infusiones de toji antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión <i>in vitro</i>	36
7. Cuantificación de taninos totales, taninos condensados y taninos hidrolizables en infusiones de toji antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión <i>in vitro</i>	39
8. Inhibición de la enzima lipasa pancreática de infusiones de <i>P. brachystachyum</i> antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión <i>in vitro</i>	42
9. Cuantificación de ácidos fenólicos presentes en infusiones de toji antes y después de la digestión gastrointestinal simulada.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Mecanismo de acción del orlistat (Lisney et al., 2007).....	16
2. Estructuras de compuestos identificados en infusiones de <i>P. brachystachyum</i>	44

RESUMEN

Las dislipidemias son un problema de salud pública en México. Los fármacos utilizados en el tratamiento de dislipidemias provocan efectos indeseados. Por ello se buscan alternativas como el uso de plantas medicinales, que han demostrado sus efectos por el contenido y acción de antioxidantes. *Phoradendron brachystachyum* es utilizada etnobotánicamente en infusiones, y se ha estudiado su contenido de antioxidantes y su capacidad inhibitoria de la enzima lipasa *in vitro*. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar el contenido de antioxidantes en infusiones de hoja, tallo y parte aérea (PA) (combinación de hoja y tallo) de *P. brachystachyum* por medio de Folin-Ciocalteu, flavonoides totales, taninos totales (TT), taninos condensados (TC) y taninos hidrolizables (TH), su capacidad antioxidante por los métodos ABTS y ORAC, identificación y cuantificación de compuestos por cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS), y el potencial inhibitorio de enzima lipasa. Se incluyeron ensayos de bioaccesibilidad evaluando infusiones sin digerir (ISD), infusiones digeridas en fase gástrica (IFG) e infusiones digeridas en fase intestinal (IFI). La mayor capacidad antioxidantes por ABTS y ORAC en ISD se encontró en hoja (40.75 μM ET/mL y 902.71 μM ET/mL, respectivamente), la mejor mantención de inhibición de ABTS se observó en PA (35.75%), mientras que en ORAC fue en tallo (27.53%). El mayor contenido de fenoles totales se encuentra en la ISD de PA (731.87 mg EAG/g) y la mayor bioaccesibilidad se registró en PA (4.43%) y tallo (4.73%). El mayor contenido de flavonoides se encontró en hoja (4.52 mg EQ/g) y en PA (4.76 mg EQ/g) y la mejor bioaccesibilidad se mantuvo en tallo (114.37%). La mayor proporción de TT se encuentra en PA (651.34 mg EC/g) y la mayor bioaccesibilidad se observó en tallo (5.45%). La ISD de PA es abundante en TC (287.14 mg EC/g), pero la mayor bioaccesibilidad se encuentra en hoja (4.17%). La mayor proporción de TH se encuentra en hoja (413.45 mg EC/g), pero es más bioaccesible en PA (7.31%). La mejor capacidad inhibitoria de lipasa fue en ISD de tallo (70.80%) y se incrementó significativamente en IFI (78.49%). Cromatográficamente se identificó al ácido ferúlico y al ácido quinico como los ácidos fenólicos más abundantes en las tres infusiones. Debido a la naturaleza polar y predominancia de los compuestos fenólicos en los extractos de *P. brachystachyum*, estos resultados muestran una posible relación del potencial de dichos metabolitos con la inhibición de la enzima lipasa.

Palabras clave: Muérdago, dislipidemias, bioaccesibilidad, lipasa, *Phoradendron brachystachyum*

ABSTRACT

Dyslipidemias are a public health problem in Mexico. Drugs used to treat dyslipidemias cause undesired effects. For this reason, alternatives such as the use of medicinal plants are sought, which have shown their effects due to the content and action of antioxidants. *Phoradendron brachystachyum* is used ethnobotanically in infusions, and its antioxidant content and its inhibitory capacity of the lipase enzyme *in vitro* have been studied. This study aimed to characterize the antioxidant content in infusions of leaf, stem and aerial part (PA) (combination of leaf and stem) of *P. brachystachyum* by means of Folin-Ciocalteu, total flavonoids, total tannins (TT), tannins condensates (TC) and hydrolyzable tannins (TH), their antioxidant capacity by ABTS and ORAC methods, identification and quantification of compounds by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS), and the inhibitory potential of lipase enzyme. Bioaccessibility tests were included evaluating undigested infusions (ISD), gastric phase digested infusions (IFG) and intestinal phase digested infusions (IFI). The highest antioxidant capacity by ABTS and ORAC in ISD was found in leaf (40.75 $\mu\text{M ET/mL}$ and 902.71 $\mu\text{M ET/mL}$, respectively), the best maintenance of ABTS inhibition was observed in PA (35.75%), while in ORAC it was on stem (27.53%). The highest content of total phenols is found in the ISD of PA (731.87 mg EAG/g) and the highest bioaccessibility was registered in PA (4.43%) and stem (4.73%). The highest content of flavonoids was found in the leaf (4.52 mg EQ/g) and in PA (4.76 mg EQ/g) and the best bioaccessibility was maintained in the stem (114.37%). The highest proportion of TT is found in PA (651.34 mg EC/g) and the highest bioaccessibility was observed in the stem (5.45%). The PA ISD is abundant in TC (287.14 mg EC/g), but the highest bioaccessibility is found in leaves (4.17%). The highest proportion of TH is found in leaves (413.45 mg EC/g), but it is more bioaccessible in PA (7.31%). The best lipase inhibitory capacity was in stem ISD (70.80%) and it was significantly increased in IFI (78.49%). Chromatographically, ferulic acid and quinic acid were identified as the most abundant phenolic acids in the three infusions. Due to the polar nature and predominance of phenolic compounds in *P. brachystachyum* extracts, these results show a possible relationship of the potential of these metabolites with the inhibition of the lipase enzyme.

Keywords: Mistletoe, dyslipidemias, bioaccessibility, lipase, *Phoradendron brachystachyum*

1. INTRODUCCIÓN

Las dislipidemias en México representan un problema grave en la salud pública, estas se caracterizan por un descontrol de lípidos y lipoproteínas en sangre (SSA, 2012). De acuerdo a un reporte del Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles (OMENT) en el 2018, las primeras tres causas de muerte en el país fueron las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, y tumores malignos, todas relacionadas con las dislipidemias (Escribano Hernandez et al., 2010). Entre los tratamientos farmacéuticos más populares contra las dislipidemias, se destaca el fármaco orlistat el cual actúa inhibiendo la enzima lipasa pancreática (Thearle et al., 2003). Sin embargo, su utilización presenta efectos no deseados, como la disminución en la absorción de vitamina E, alteraciones gastrointestinales como el tenesmo rectal o dolor abdominal, y riesgo de colelitiasis (G. Cuatrecasas, 2000). Por ello se buscan nuevas alternativas a este tratamiento. Entre las alternativas más investigadas se encuentran los antioxidantes de origen natural, que son sustancias que cuando están presentes en una baja concentración comparado con un sustrato oxidante, en un determinado medio, inhibe la oxidación del sustrato (Granato et al., 2018). Existen diversas investigaciones que indican que fitoquímicos de diversas matrices alimentarias tienen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática o directamente mejorando el perfil lipídico en estudios *in vivo*. Entre estas matrices de fitoquímicos se encuentran los muérdagos como *Phoradendron reichenbachianum*, el cual es rico en compuestos bioactivos y ha demostrado mejorar el perfil lipídico en ratas (Ramirez-Espinosa et al., 2013; Rios et al., 2012). Toji o *Phoradendron brachystachyum*, es otro muérdago con alto contenido en fitoquímicos, que ha mostrado capacidad inhibitoria de lipasa pancreática. Sin embargo, no existen estudios que comprueben la bioaccesibilidad de sus compuestos fitoquímicos. Estos estudios son relevantes pues los compuestos fitoquímicos al ser consumidos pueden transformarse, disminuir su concentración y perder su bioactividad (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar la bioaccesibilidad de compuestos fitoquímicos de *P. brachystachyum* utilizando un sistema modelo del tracto gastrointestinal, simulando la digestión en boca, estómago e intestino delgado, y cómo este proceso afecta a su potencial inhibitorio de la enzima lipasa pancreática *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Dislipidemias

Las dislipidemias pueden definirse como “un conjunto de enfermedades asintomáticas, con el común etiológico de concentraciones anormales de lípidos y lipoproteínas sanguíneas referidas a variaciones genéticas o secundarias a factores del estilo de vida”. Los marcadores bioquímicos que deben ser controlados son: colesterol total <200mg/dL, triacilglicéridos <150mg/dL, HDL >40mg/dL, LDL <100mg/dL y colesterol-no-HDL <130mg/dL (SSA, 2012). Los niveles descontrolados de lípidos en sangre se relacionan con alteraciones metabólicas como la diabetes mellitus tipo II, riesgo cardiovascular, aterosclerosis, síndrome metabólico, enfermedad coronaria, cáncer, entre otras (Escribano Hernandez et al., 2010; Galvis-Pérez, 2013; Gamboa Aboado et al., 2002).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), realizada en México en el 2018, arrojó cifras alarmantes sobre enfermedades relacionadas con las dislipidemias. Existen alrededor de 8.6 millones de personas, de 20 años o mayores, diagnosticadas con diabetes y 15.2 millones con diagnóstico de hipertensión. Además, el 19.5% de los mexicanos de 20 años o más reportaron tener parámetros de colesterol y triglicéridos altos, y se estima que el 47.7% los desconoce. También se dieron a conocer datos sobre el sobrepeso y obesidad: el 8.2% de la población de 0 a 4 años presentó sobrepeso. El 18.1% de los niños de 5 a 11 años fueron diagnosticados con sobrepeso, mientras que el 17.5% con obesidad. De los jóvenes de 12 a 19 años, el 14.6% tiene obesidad y el 23.8% sobrepeso, en adultos de 20 años o más, el 39.1% tiene sobrepeso y 36.1% obesidad. Adicionalmente, según el Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles (OMENT) en el 2018 las primeras tres causas de muerte en el país son las enfermedades del corazón, la diabetes mellitus, y tumores malignos.

2.1.1. Tratamientos Farmacológicos de Dislipidemias y sus Efectos Adversos

En el tratamiento convencional de la obesidad uno de los fármacos comúnmente administrados es el orlistat, el cual, inhibe la lipasa pancreática (Thearle et al., 2003), mejorando así el perfil lipídico, disminuyendo los niveles de c-LDL, ayudando a la disminución de peso y mejorando la presión arterial. El mecanismo de acción de orlistat se lleva a cabo en la cavidad gástrica y el lumen intestinal, con la formación de enlaces covalentes en el sitio activo de la lipasa gástrica y pancreática inhibiendo su acción sobre los triglicéridos (Figura 1) (Lisney et al., 2007). Sin embargo, el uso de este fármaco conlleva a efectos adversos no deseados, como la disminución en la absorción de vitamina E, alteraciones gastrointestinales como el tenesmo rectal o dolor abdominal, riesgo de colelitiasis e insuficiencia hepática (Alarcón-Sotelo et al., 2018; G. Cuatrecasas, 2000). Además, el uso prolongado de orlistat forma complejos de calcio y ácidos grasos libres en el intestino, se crea un estado de hiperoxaluria entérica que aumenta la absorción de oxalato en el colon, lo que provoca la formación de cristales de oxalato y nefropatía aguda (Singh et al., 2007).

Las estatinas son otro grupo de medicamentos utilizados para el mejoramiento de la hiperlipidemia. Estudios previos han encontrado que existen algunos casos donde el tratamiento con estatinas genera miopatía, diabetes o ataques hemorrágicos (Hashi et al., 2018). Por ello se han buscado alternativas que mejoren el perfil lipídico sin los efectos secundarios adversos de los fármacos.

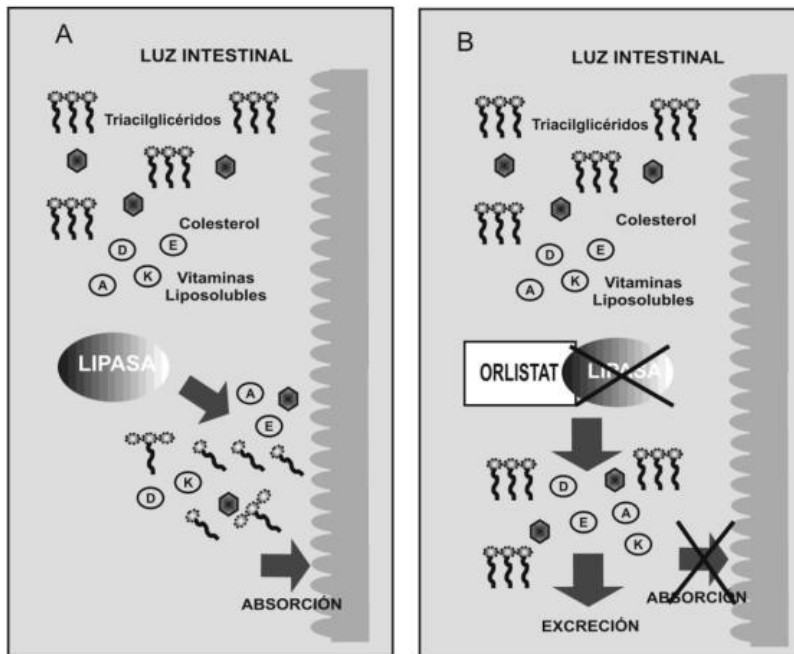


Figura 1. Mecanismo de acción del orlistat (Lisney et al., 2007)

2.2. Fitoquímicos

Entre las alternativas más investigadas para el mejoramiento de las dislipidemias se encuentra la de los antioxidantes naturales, que se definen como sustancias que, cuando están presentes en una baja concentración comparado con un sustrato oxidante, en un determinado medio, inhibe la oxidación del sustrato (Granato et al., 2018). Los fitoquímicos provienen del metabolismo secundario de las plantas, tanto de la ruta del ácido shikímico/fenilpropanoides como de la ruta del acetato/malonato (Quideau et al., 2011). En plantas, los compuestos fitoquímicos tienen funciones de pigmentación, protección contra microorganismos y depredadores, protección ante estrés biótico y saborizante (Ghasemzadeh et al., 2011). Existe una gran variedad de compuestos bioactivos, es por ello que estos se pueden agrupar de acuerdo a sus características, tanto estructurales como de origen, en terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y glicósidos (Kabera, 2014).

2.2.1. Actividad Inhibitoria de Lipasa Pancreática de Compuestos Bioactivos

Distintas investigaciones han reportado que los compuestos bioactivos contenidos en frutas o hierbas tienen actividad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática. Por ejemplo, *Morus alba* es un árbol silvestre que se encuentra en Asia, es comúnmente utilizado en la medicina popular coreana para tratar la diabetes, alta presión sanguínea y la dislipidemia. El análisis de composición de las hojas de esta planta identificó que contiene diez flavonoides, ocho benzofuranos, una chalcona y un estilbeno. Los autores sugieren que mediante la extracción optimizada de contenido de fenoles totales a 26.5 µg/g equivalentes de ácido gálico (EAG) se obtuvo el 58.5% de inhibición de la enzima lipasa pancreática *in vitro* (Jeong et al., 2015). *Camellia japonica L.* es otra planta utilizada ampliamente en la medicina popular coreana. Un análisis realizado con las hojas de *Camellia japonica*, fermentadas con *Nuruk* y comparaciones de extracciones con metanol y etanol, se identificó que el contenido de los compuestos mayoritarios fue polifenoles totales en extracción con etanol. Sin embargo, en el análisis *in vitro* de la inhibición de la enzima lipasa pancreática, el extracto con metanol tuvo un rendimiento significativamente mayor ($IC_{50} = 0.308$ mg/mL) que la extracto con etanol ($IC_{50} = 0.397$ mg/mL). los resultados obtenidos fueron menores al comparar con un control positivo hesperidina (IC_{50} de 0.032 mg/mL) (Moon et al., 2018).

En otro estudio, se analizaron las semillas de quinoa como una fuente de antioxidantes ligados con capacidad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática *in vitro*. Para ello llevó a cabo una comparación de tres distintos tipos de quinoa (blanca, roja y negra), de donde se extrajeron sus componentes por medio de hidrólisis ácida, alcalina y enzimática. Se identificaron 19 distintos compuestos bioactivos, en su mayoría ácidos fenólicos y flavonoides como ácidos hidroxicinámicos y ácidos benzoicos. La prueba *in vitro* para la inhibición de lipasa pancreática, demostró que los extractos derivados de hidrólisis alcalina son capaces inhibir a la enzima. Sin embargo, la cantidad necesaria de extracto (>200 µg/mL) para la IC_{50} es así que orlistat obtuvo mejores resultados (1.14 ng/mL) (Tang et al., 2016).

En otro caso, en el fruto de chile jalapeño se realizó estudio comparativo entre compuestos fenólicos de un extracto del mismo contra compuestos individuales presentes en el extracto de chile jalapeño (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, quercetina y capsaicina) sobre la inhibición de lipasa pancreática. Los resultados indican que la quercetina tuvo el mejor resultado, muy similar al orlistat

(que se utilizó como control positivo). Los ácidos fenólicos tuvieron una actividad inhibitoria moderada, mientras que la capsaicina y el extracto de chile jalapeño mostraron la inhibición más baja (Martinez-Gonzalez et al., 2017). Los resultados de este estudio pueden dar una perspectiva sobre que no siempre existe un efecto sinérgico en un extracto con varios compuestos bioactivos. Otro fruto que se destaca por su investigación sobre inhibición de lipasa pancreática es el proveniente de *Averrhoa carambola L.*, conocido popularmente como “fruto estrella”, es cultivado en el sureste asiático, China e India y es rico en compuestos fenólicos. En el 2017 se aislaron 11 compuestos de tipo no-flavonoide del fruto. Al someterlos a pruebas de inhibición de lipasa pancreática, obtuvieron que era inhibida solo por los compuestos 1-O-feruloil- β -D-glucosa y (+) – criptosporina (con 101.2 μ M y 114.5 μ M, respectivamente) (Xuchao Jia et al., 2017). En el 2018, otro estudio desarrollado por el mismo grupo de investigadores en fruto estrella, evaluaron el contenido de flavonoides y su identificación. Los resultados mostraron 13 diferentes flavonoides de los cuales se menciona que los compuestos (+)-epicatequina (96.4 μ M), pinobanksin 3-O- β -D-glucósido (92.1 μ M), isorhamnetin 3-O-rutinósido (78.7 μ M) y carambolasides O–Q (93.6 μ M) exhibieron una leve inhibición de la enzima lipasa pancreática (X. Jia et al., 2018).

2.3. Muérdago (*Phoradendron brachystachyum*)

Entre las diferentes matrices vegetales con potencial inhibitorio de la enzima lipasa se encuentran los muérdagos. Los muérdagos son plantas parásitas o hemiparasitarias que se unen al tallo de los árboles, compiten por agua y nutrientes e impiden su desarrollo. Cuando son abundantes sobre el árbol, pueden provocar la muerte del mismo (Alvarado RD, 2005). La especie *P. brachystachyum*, comúnmente conocida como “toji”, es un muérdago perteneciente a la familia Santalaceae. Este se encuentra ampliamente distribuida en todo México, tanto en zonas urbanas como silvestres (Lopez-Martinez et al., 2013).

El género *Phoradendron* ha sido ampliamente utilizado de manera etnobotánica en forma de infusiones. Existen reportes de que se ha utilizado para curar el dolor de estómago y trastornos digestivos como la diarrea, diabetes, hipertensión, cáncer y como inmunomodulador (Andrade Cetto et al., 2005).

2.3.1. Fitoquímicos de Muérdagos

Respecto a sus fitoquímicos, *P. brachystachyum* ha sido poco estudiado. Sin embargo, existen análisis que han demostrado su riqueza y variedad en compuestos bioactivos.

Montoya-Inzunza (2020), en nuestro equipo de trabajo, realizó ensayos de tamizaje fitoquímico sobre extractos de toji y estos identificaron como compuestos mayoritarios en extractos hidrofílicos a los taninos, flavonoides y cumarinas (Cuadro 1). En el mismo ensayo, se encontraron terpenos y saponinas en concentraciones bajas en extractos acuosos, tanto en hoja como en tallo.

Cuadro 1. Compuestos mayoritarios en tamizaje fitoquímico de hoja y tallo de *P. brachystachyum*

Constituyente	Extracto	Prueba/ Reactivo	<i>P. brachystachyum</i> Hoja	<i>P. brachystachyum</i> Tallo
Taninos	Hexano		-	-
	Metanol	Cloruro férrico	+++	+++
	Agua		+++	+++
Flavonoides	Hexano		+	-
	Metanol	Shinoda	+	+
	Agua		++	++
Cumarinas	Hexano		+	+
	Metanol	Baljet	+++	+++
	Agua		++	++

Adaptado de Montoya-Inzunza (2020)

Un análisis químico de un extracto de acetona de *P. brachystachyum* identificó 20 diferentes compuestos fitoquímicos (Cuadro 2), entre ellos se encontraron 12 triterpenos, dos hidrocarburos lineales, cuatro esteroides y dos flavonoides (Lopez-Martinez et al., 2013). *Phoradendron reichenbachianum* es otro muérdago del mismo género, que ha sido analizado en cuanto a su contenido de compuestos fitoquímicos. En su contenido destaca el ácido ursólico, ácido morónico, ácido morólico y ácido oleanólico, los cuales también se han identificado en *P. brachystachyum*. Del ácido oleanólico, encontrado en el género *Phoradendron*, se ha destacado su actividad anti-hiperlipidémica y anti-aterosclerótica (Rios et al., 2012; Somova et al., 2003). Por otro lado, un estudio realizado en ratas diabéticas utilizando ácidos morónico y morólico como tratamiento en

dosis de 50 mg/kg por 10 días mostró una reducción significativa de valores plasmáticos de colesterol total y triglicéridos, similar a la basal de un grupo de ratas normales (Ramirez-Espinosa et al., 2013). En nuestro grupo de investigación se han realizado ensayos *in vitro* con extractos metanólicos de *P. brachystachyum* sobre la actividad de lipasa pancreática. En estas pruebas se encontró que la mayor inhibición fue la ejercida por los extractos metanólicos de hoja con un IC₅₀ de 153.45 µg/mL, seguida de tallo (276.61 µg/mL) y la menor inhibición se encontró en una combinación de hoja y tallo denominada como “completa” con un IC₅₀ de 332.81 µg/mL (Montoya-Inzunza, 2020).

Cuadro 2. Compuestos fitoquímicos encontrados en extracto de acetona de *P. brachystachyum*

Grupo	Compuesto
Triterpenos	α-amirina
	β-amirina
	Aldehído oleanólico
	Ácido oleanólico
	Ácido morónico
	Ácido morólico
	Lupeol
	Lupenona
	Betulina aldehído
	Betulon aldehído
	Ácido betulínico
	Ácido betulónico
Hidrocarburos lineales	Escualeno
	Triacantanol
Esteroles	Linoleato de β-sitosterilo
	Linoleato de estigmasterilo
	Estigmasterol
	β-sitosterol
Flavonoides	Acacetina
	Acacetina 7-metil éter

Adaptado de Lopez-Martinez et al. (2013)

2.4. Biodisponibilidad de Fitoquímicos

En general, para que los compuestos ejerzan su efecto bioactivo en el cuerpo, es necesario que sean bioaccesibles y/o estén biodisponibles. La bioaccesibilidad se define como la cantidad de cualquier componente alimenticio que esté presente de manera legible en el intestino, como consecuencia de su liberación de la matriz sólida y que pueda atravesar la barrera intestinal (Palafox-Carlos et al., 2011). Por otro lado, la biodisponibilidad se define como la proporción y velocidad de compuestos bioaccesibles que se absorben y entran en el torrente sanguíneo, para que puedan distribuirse y metabolizarse o almacenarse dentro de los órganos del cuerpo (D'Archivio et al., 2010). Los ensayos de bioaccesibilidad se realizan tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que los de biodisponibilidad solo se realizan *in vivo*. Entre estos dos tipos de ensayos existe buena correlación (Brodkorb et al., 2019).

Los compuestos bioactivos pueden sufrir cambios en su paso por el tracto gastrointestinal y es necesario realizar ensayos que ayuden al análisis de la transformación de los mismos, pues esto puede afectar tanto su estructura química como su funcionalidad y por lo tanto su efecto en la salud (Goderska et al., 2008). El proceso digestivo comienza con la masticación en la boca y termina con la excreción en heces y orina, e involucra hidrólisis ácida, transporte a través del epitelio intestinal, catabolismo microbiano, transformación de fase II y deposición en los tejidos durante el viaje de los compuestos bioactivos después del consumo (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Tanto para el estudio de la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad se han desarrollado estrategias experimentales. En el caso de este proyecto, el ensayo de bioaccesibilidad utilizado fue el propuesto por INFOGEST, el cual es un protocolo estandarizado a nivel internacional, diseñado para poder comparar adecuadamente los resultados mundialmente (Brodkorb et al., 2019).

2.4.1. Bioaccesibilidad de Compuestos Fitoquímicos en *P. brachystachyum*

Actualmente no existen estudios específicos sobre la bioaccesibilidad o biodisponibilidad de compuestos fitoquímicos de *P. brachystachyum*, ni de alguna otra especie de muérdago. Sin embargo, existen algunos estudios sobre otras plantas y frutos que comparten similitudes con los fitoquímicos de esta especie. Tal es el caso de un extracto por vapor de hojas de *Morus alba*, el

cual es rico en ácido cafeoilquínico y quercetina; estos compuestos, después de una digestión *in vitro*, demuestran mantener su bioaccesibilidad en un 68.39% y 30.07%, respectivamente (Yu et al., 2019). Por otro lado, el chiltepín rojo (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*), el cual se encuentra ampliamente distribuido por todo México, es rico en compuestos fitoquímicos y que al igual que *Morus alba* comparte en común la presencia de quercetina. Un extracto de metanol/agua del fruto de chiltepín rojo mostró que al ser sometido a una digestión *in vitro* disminuía su contenido de quercetina al 18.97% (Ovando-Martínez et al., 2018). La diferencia en la bioaccesibilidad del mismo compuesto en las diferentes plantas puede deberse a la matriz alimentaria, los cambios en el método de extracción, así como el solvente utilizado.

3. HIPOTESIS

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática de las infusiones de toji disminuye durante un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la bioaccesibilidad y la capacidad inhibitoria de lipasa pancreática de compuestos fenólicos de infusiones de *P. brachystachyum* por medio de una digestión simulada *in vitro*.

4.2. Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos, taninos, y flavonoides totales de las infusiones de *P. brachystachyum* antes y después de un proceso de digestión *in vitro*.
- 2.- Evaluar la capacidad antioxidante de infusiones de *P. brachystachyum* a través de un proceso de digestión *in vitro*.
- 3.-Evaluar la capacidad de inhibición de lipasa de las infusiones de *P. brachystachyum* antes y después de un proceso de digestión *in vitro*
- 4.- Evaluar el efecto de la digestión *in vitro* sobre el contenido de los compuestos fenólicos en infusiones de *P. brachystachyum* mediante UPLC-MS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Vegetal

La muestra de *P. brachystachyum* fue recolectada en Guamúchil, Sinaloa, México (coordenadas: N 25° 44' 42 W" 108 °05' 22 "); el muérdago fue encontrado parasitando arboles de mezquite (*Prosopis juliflora*). Las plantas de muérdago y mesquite fueron identificadas en el herbario Jesús Gonzales Ortega de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, y fueron identificadas bajo las siguientes claves FA-UAS-022352 y FA-UAS-013284, respectivamente. Las partes de la planta fueron separadas en tallo, hoja y una combinación de hoja y tallo que se define como "parte aérea". Posteriormente se lavaron en agua clorada a 50 ppm y se dejaron secar a 40°C durante 48 h. Se recuperaron las muestras secas y se molieron de manera separada tallo, hoja y parte aérea en un molino de café marca Turf hasta obtener harinas, así mismo fueron pasadas a través de un tamiz de 600 µm para obtener harina más fina. Posteriormente, las harinas fueron colocadas en bolsas herméticas de plástico y se sellaron en bolsas de celofán para evitar que se humedecieran. Se tomaron 10 tallos con hojas, se pesaron y se midieron para obtener la proporción de hoja y tallo de la parte aérea, la cual, en este muestreo, resultó estar compuesta por el 71% de hoja y el 29% de tallo.

5.2. Preparación de Infusiones de *P. brachystachyum*

Para obtener los extractos se preparó una infusión, siguiendo el método reportado por Chen et al. (2015) con modificaciones. Se agregaron 50 mL de agua destilada por cada 1 g de harina de *P. brachystachyum*, para posteriormente homogenizar en una placa de agitación orbital a 80 rpm por 2 h a temperatura ambiente. Después, las muestras se colocaron a baño maría a 60 °C por 20 min. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y por último se recuperó el sobrenadante.

5.3. Ensayos de Capacidad Antioxidante

5.3.1. Ensayo de Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC)

Este ensayo se realizó de acuerdo a la metodología de [Thaipong et al. \(2006\)](#) con modificaciones. El reactivo 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato] (ABTS^{•+}) fue disuelto en agua destilada a una concentración de 7.4 mM (solución madre). El radical ABTS^{•+} se produjo mezclando la solución madre de ABTS^{•+} con persulfato de potasio 2.6 mM (1:1 v/v) e incubando la mezcla en oscuridad a temperatura ambiente por 12-16 h antes de su uso. La solución con el radical fue diluida en metanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.05 a 734 nm. Para el ensayo se mezclaron 10 μ L de extracto con 190 μ L de la solución de reacción en una microplaca, colocándose en incubación en oscuridad durante 30 min, la absorbancia se leyó en un lector de microplacas a 734 nm. Se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada concentración con la fórmula:

Inhibición del radical ABTS = ((Absorbancia del blanco - Absorbancia del extracto) / (Absorbancia del blanco)) * 100.

5.3.2. Ensayo de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó utilizando el ensayo ORAC de acuerdo a la metodología propuesta por [Huang et al. \(2002\)](#) que se basa en la disminución de fluorescencia de la fluoresceína inducida por el generador de radicales peroxil, 2,2'-azobis, 2-amidino-propano dihidrocloro (AAPH). Se tomó una alícuota de 25 μ L de cada extracto diluido con un buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.4), 25 μ L de una curva estándar de Trólox (6.25, 25, 50, 75, 100 y 125 μ L/mL) y fueron depositados en una microplaca de poliestireno de 96 pozos con paredes oscuras y fondo plano claro. Después, la placa se introdujo en el lector de microplacas a una temperatura de incubación de 37 °C, el cual dispensó 200 μ L de fluoresceína 0.96 μ M y 75 μ L de 2,2'-azobis, 2-amidino-propano dihidrocloro (AAPH) 95.8 μ M. La fluorescencia se leyó por 70 min con

intervalos de 70 s a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 580 nm. Los cálculos se realizaron utilizando la ecuación de regresión lineal de la curva estándar de Trolox y el área bajo la curva de la pérdida de fluoresceína. Los resultados son expresados en μM equivalentes de Trólox por mL de muestra ($\mu\text{M TE/mL}$).

5.4. Ensayos de Caracterización de Compuestos Fitoquímicos

5.4.1. Determinación del Contenido de Fenólicos Totales

El contenido de fenólicos totales de los extractos de toji se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron 10 μL de muestra con 230 μL de agua destilada y 10 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N en una microplaca de 96 pozos, para incubarse por 3 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 25 μL de Na_2CO_3 y se colocaron en incubación durante 2 h en oscuridad. La absorbancia fue leída a 725 nm en un lector de microplacas EPOCH Bio-tek. La cuantificación de fenólicos totales se llevó a cabo mediante una curva de ácido gálico (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 y 0.4 mg EAG/mL) y los resultados se expresan en mg equivalentes de ácido gálico por mL de infusión (mg EAG/mL infusión).

5.4.2. Determinación del Contenido de Flavonoides Totales

En una microplaca se mezclaron 10 μL de muestra con 250 μL de agua destilada, 10 μL de AlCl_3 (10% p/v) y 10 μL de acetato de potasio 1 M. Las soluciones se mantuvieron en incubación durante 30 min en oscuridad, y la absorbancia se leyó en un lector de microplacas EPOCH Biotek a 415 nm. La cuantificación de flavonoides totales se hizo utilizando una curva estándar de quercetina (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 y 0.4 mg EQ/mL) y los resultados se expresan como mg equivalentes de quercetina por mL de infusión (mg EQ/mL infusión).

5.4.3. Extracción y Cuantificación de Taninos

Para la extracción de taninos se pesaron 100 mg de PVPP en un tubo Eppendorf para añadir 1 mL de agua destilada y 1 mL de muestra de *P. brachystachyum*. La mezcla se sometió a Vortex para homogenizar y se incubó en refrigeración (4°C) durante 15 min. Se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 5 min, y posteriormente se recuperó el sobrenadante para determinar el contenido de compuestos fenólicos (compuestos no-taninos) con el ensayo de Folin-Ciocalteu.

5.4.4. Taninos Totales

La cuantificación de taninos totales (TT) se obtuvo por diferencia, con el valor de compuestos fenólicos totales, obtenido por medio del ensayo de Folin-Ciocalteu, restando el contenido de fenólicos no-taninos.

TT = Compuestos fenólicos - fenólicos no taninos

5.4.5. Taninos Condensados

Depositando 20 µL de la infusión de *P. brachystachyum* en una microplaca de 96 pozos, se añadieron 200 µL de solución de DMCA al 0.1% y se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se leyó a una absorbancia de 640 nm, se utilizó una curva de calibración estándar de catequina (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.8 y 1 mg EC/mL) y se expresó el contenido como mg equivalentes de catequina (mg EC/mL).

5.4.6. Taninos Hidrolizables

Los taninos hidrolizables (TH) se obtuvieron por diferencia, al sustraerse el contenido de taninos condensados (TC) del contenido de taninos totales (TT).

$$TH = TT - TC$$

5.5. Ensayo de Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática

Para determinar la actividad inhibitoria de lipasa pancreática se utilizó el método espectrofotométrico establecido por Worsztynowicz et al. (2014) con modificaciones. Se utilizó p-nitrofenil palmitato (pNPP) como sustrato, que fue hidrolizado mediante la acción de la lipasa. El ensayo está compuesto por 1.8 mL de buffer de fosfato de sodio a 0.05 M (pH 7.6 a una temperatura de 37 °C) que contiene colato de sodio (1.15 mg / mL) y goma arábica (0.55 mg / mL). Así mismo, se preparó orlistat como control positivo, haciendo una mezcla de 20 mg/mL de tabletas preparadas en buffer de fosfato de sodio. Se incubaron a 37 °C 0.2 mL de pNPP en isopropanol (0.01) y 0.02 mL de una infusión de toji. Posteriormente, se añadieron 0.02 mL de la solución de enzima lipasa porcina (25 mg / mL) en buffer de fosfato de sodio (0.05 M) por 30 min para iniciar la reacción colorimétrica. Se leyó el p-nitrofenol a 410 nm. La reacción de control representó el blanco (100% de actividad enzimática). Después de obtuvo el porcentaje de inhibición de cada concentración de la fórmula:

$$\text{Inhibición de Lipasa Pancreática (\%)} = ((\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia del extracto}) / (\text{Absorbancia del blanco})) * 100.$$

5.6. Ensayos de Bioaccesibilidad

Para determinar el porcentaje de bioaccesibilidad de los extractos de *P. brachystachyum* se utilizó el modelo de digestión *in vitro* propuesto por Brodkorb et al. (2019). Para realizar este ensayo se

prepararon soluciones madre (Cuadro 3), de las que se formularon las fases, oral, gástrica e intestinal, para posteriormente añadir las enzimas digestivas.

Cuadro 3. Composición de electrolitos y enzimas de las soluciones gastrointestinales simuladas.

Constituyente	Concentración (g/L)	Fase Oral (g/L) (pH 7)	Fase gástrica (g/L) (pH 3)	Fase intestinal (g/L) (pH 7)
KCl	37.3	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	3.7	0.9	0.8
NAHCO ₃ ^a	84	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	-	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06	0.5	-
HCl	-	0.09	1.3	0.7
CaCl ₂ ^b	44.1	0.025	0.005	0.04
Enzimas	-	Amilasa 75 U/MI	Pepsina 2,000 U/mL Lipasa 60 U/mL	Pancreatina 100 U/MI

Adaptado de Brodkorb et al. (2019)

Después de preparar las simulaciones de las fases oral, gástrica e intestinal, se tomaron 0.5 ml de los extractos de las partes del toji y se colocaron en tubos de 50 mL. El ensayo se inició con la simulación de la fase oral, con una duración de 5 min, agregando el líquido de la fase oral en proporción 1:1 con el extracto. Se ajustó el pH a 7 con HCl o NaCl. La muestra se incubó a 37 °C por 2 min. Se continuó con la fase gástrica, añadiendo el líquido de la fase gástrica en relación 1:1 con el volumen del líquido total que resultó en la anterior fase oral. Se ajustó el pH a 3 y se incubó a 37 °C por 2 h, verificando el pH y ajustándolo de ser necesario. Para la última fase, se adicionó el líquido de la fase intestinal en proporción 1:1 con la cantidad resultante de líquido en la fase gástrica. Se ajustó el pH a 7 y se incubó a 37 °C por 2 h, ajustando el pH cada 30 min o cada vez que fuera necesario. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min a una temperatura de 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. Una vez congeladas las digestas, se almacenaron por una hora a -69 °C. Los tubos se llevaron a liofilización bajo una

temperatura de -50 °C y presión de 0.070 mBar, en un equipo Labconco Freezone 18 (Labcon Co., Kansas, MO, USA). Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en agua destilada.

5.7. Identificación y Cuantificación de Compuestos Bioactivos por UPLC-Masas

Para la identificación, separación y cuantificación de los compuestos bioactivos en el extracto se utilizó cromatografía de líquidos-masas. El análisis se realizó en el equipo UPLC clase H (Waters Corporation, EUA) acoplado a un analizador de masas G2-XS QToF (cuadrupolo y tiempo de vuelo). La separación de ácidos fenólicos se realizó con una columna UPLC BEH C18 (1.7 μm \times 2.1 mm \times 100 mm) a 40 °C, con una solución de elución en gradiente A (agua-ácido fórmico al 0.1%) y solución B, compuesta de metanol, que se suministra a un flujo de 0.3 mL/min. La ionización de los compuestos fue hecha por electrospray (ESI). Para la identificación de compuestos se utilizó la base de datos Massbank de América del Norte (MoNA), y se utilizaron estándares de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido quínico y ácido ferúlico ([Kp et al., 2014](#); [Saxena et al., 2014](#)).

5.8. Diseño Experimental

Para el cálculo de fenoles totales, flavonoides totales, taninos totales, taninos condensados y taninos hidrolizables se utilizó un análisis estadístico de tipo ANOVA de un factor de tres niveles con bloques. El factor fue la fase en la que se encontraba la muestra y los niveles fueron la infusión sin digerir (ISD), infusión en fase gástrica (IFG) e infusión en fase intestinal (IFG). Los bloques fueron los tres tipos de infusión (hoja, tallo y parte aérea). Se utilizó una prueba de Tukey con valor de $\alpha \leq 0.05$. Para determinar la bioaccesibilidad, se utilizaron fenoles totales, flavonoides totales, taninos totales, taninos condensados y taninos hidrolizables, realizando una comparación entre las infusiones sin digerir expresándolos como el 100% contra la proporción de lo que quedó en las infusiones de fase gástrica e intestinal. La inhibición de la enzima lipasa pancreática se midió por porcentaje utilizando el blanco como referencia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Capacidad Antioxidante de Infusiones de Toji

6.1.1. Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox Mediante la Inhibición del Radical ABTS y ORAC

La capacidad antioxidante por el método TEAC está basada en la transferencia de electrones de los antioxidantes al radical ABTS^{•+} (Huang et al., 2005). Los resultados del ensayo de inhibición del radical ABTS^{•+} (Cuadro 4), muestran que en las infusiones la mayor capacidad antioxidante se encuentra en la infusión de hoja (40.75 $\mu\text{M ET/mL}$), seguida por la infusión de parte aérea (31.69 $\mu\text{M ET/mL}$) y finalmente por la de tallo (26.50 $\mu\text{M ET/mL}$). Estos resultados en el ensayo TEAC son comparables con los obtenidos por Montoya-Inzunza (2020) con el mejor resultado en hoja en la inhibición del radical ABTS. Así mismo se ha encontrado este efecto de capacidad inhibitoria del radical ABTS en hojas del muérdago *Viscum album* (Vicaş et al., 2011). Así mismo en los datos reportados por Benabderrahim et al. (2019) en tallo de muérdago amarillo (*Loranthus europaeus* Jacq.). Respecto al estudio de Montoya-Inzunza (2020) no se observó un efecto sinérgico o antagónico en la parte aérea. Además, en este análisis, el tallo fue el que tuvo el menor efecto inhibitorio y no está por encima de la parte aérea.

En cuanto a las muestras obtenidas de las fases digestivas *in vitro* (Cuadro 4), las infusiones de parte aérea y tallo mantuvieron la capacidad antioxidante en la fase gástrica (95.36% y 94.26%, respectivamente respecto a la fase sin digerir. Por otro lado, la infusión de hoja tiene una pérdida significativa desde la fase gástrica (55.73%). En las digestas recuperadas de la fase intestinal, la que mantiene una mejor inhibición del radical es la de parte aérea (35.75%), seguida por la de hoja (17.86%) y por último la de tallo (10.41%), mostrando así que la combinación denominada como parte aérea podría tener un efecto sinérgico para mantener la inhibición del radical. A diferencia del ensayo TEAC, la capacidad antioxidante por el método ORAC se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno (Huang et al., 2005). La capacidad antioxidante de infusiones de toji por este

método (Cuadro 4) es mayor que la encontrada en el ensayo TEAC. Aun así, sigue el mismo patrón anteriormente comentado en el método TEAC, siendo la infusión de hoja la de mayor capacidad (902.71 $\mu\text{M ET/mL}$), seguida por la infusión de parte aérea (747.72 $\mu\text{M ET/mL}$) y la menor capacidad se encuentra en la infusión de tallo (486.62 $\mu\text{M ET/mL}$). La capacidad antioxidante en el método ORAC, ha sido reportada anteriormente en hojas del muérdago *V. album* por Vicaş et al. (2011).

En las muestras recuperadas de fase intestinal *in vitro* (Cuadro 4) existe un descenso significativo en la capacidad antioxidante medida por el método de ORAC en comparación con la fase gástrica, siendo la infusión de tallo la que mejor mantiene su capacidad antioxidante (33.88%), seguida por la parte aérea (23.62%) y finalmente la infusión de hoja (19.64%). En las infusiones recuperadas en la fase intestinal, la de tallo es la que mantiene mejor su capacidad antioxidante (27.53%) respecto a hoja y parte aérea que mantienen capacidades similares (18.10% y 18.66%, respectivamente).

La remanente capacidad antioxidante en el ensayo ABTS posterior a las digestiones en las fases gástrica e intestinal de hoja y parte aérea, puede deberse a la cantidad de flavonoides totales que se encuentra en la última fase. Esto podría relacionarse a que los compuestos como los ácidos hidroxicinámicos tienen mayor afinidad por la donación de electrones a este radical (Surco-Laos et al., 2016). Así mismo, los cambios de pH en las fases digestivas provocan deprotonación y cambios en la estructura y por lo tanto cambia la actividad biológica de los compuestos polifenólicos, como en casos ya reportados de flavonoides y taninos condensados (Lemanska et al., 2001; Vazquez-Flores et al., 2012), cuando el pH es ácido algunos polifenoles disminuyen su capacidad antioxidante, pero cuando el pH se vuelve neutro (menor a 9 en el caso de taninos), algunos polifenoles aumentan su capacidad antioxidante (Wojtunik-Kulesza et al., 2020).

La capacidad antioxidante de las infusiones de *P. brachystachyum* (Cuadro 4) es mostrada desde las infusiones sin digerir con mejor rendimiento en el ensayo ORAC, esto indica que su actividad biológica se centra en la transferencia de átomos de hidrógeno.

Cuadro 4. Capacidad antioxidante en infusiones de toji mediante la inhibición del radical ABTS y el método ORAC antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión *in vitro*.

Parte de la Planta	Fase Digestiva	Capacidad Antioxidante por ABTS ($\mu\text{M ET/mL}$)	Capacidad antioxidante por ABTS (%)	Capacidad antioxidante por ORAC ($\mu\text{M ET/mL}$)	Capacidad antioxidante por ORAC (%)
Hoja	Infusión	40.75 \pm 1.09 ^a	100%	902.71 \pm 44.83 ^a	100%
	Gástrica	22.70 \pm 1.21 ^b	55.73%	177.31 \pm 5.41 ^b	19.64%
	Intestinal	7.28 \pm 0.33 ^c	17.86%	163.40 \pm 6.14 ^b	18.10%
Parte Aérea	Infusión	31.69 \pm 0.92 ^a	100%	747.72 \pm 5.84 ^a	100%
	Gástrica	30.22 \pm 2.46 ^a	95.36%	176.62 \pm 2.61 ^b	23.62%
	Intestinal	11.32 \pm 0.73 ^b	35.75%	139.50 \pm 7.97 ^c	18.66%
Tallo	Infusión	26.50 \pm 0.75 ^a	100%	486.62 \pm 0.75 ^a	100%
	Gástrica	24.99 \pm 1.55 ^a	94.26%	164.85 \pm 15.65 ^b	33.88%
	Intestinal	2.75 \pm 0.27 ^b	10.41%	133.99 \pm 9.34 ^c	27.53%

Datos mostrados como media \pm desviación estándar de 3 réplicas con 3 repeticiones por réplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). ET: Equivalentes de trolox.

6.2. Caracterización de Compuestos Bioactivos de Infusiones de Toji

6.2.1. Contenido de Fenoles Totales

Los resultados de contenido de fenoles totales (Cuadro 5) muestran que la mayor proporción de equivalentes de ácido gálico, con diferencias significativas, se encuentra en la infusión a base de la combinación de hoja y tallo, denominada como parte aérea (PA) (731.87 mg EAG/g), seguido por la infusión de hoja (679.51 mg EAG/g) y posteriormente la infusión de tallo (614.16 mg EAG/g). Los resultados de esta investigación son significativamente mayores con respecto a la caracterización llevada a cabo por Montoya-Inzunza (2020), en extracto metanólico de *P. brachystachyum*. La posible causa de esta diferencia es la influencia de haber sometido la muestra a estrés por calor en la preparación, pues la harina fue previamente preparada con la misma metodología y posteriormente se prepararon las infusiones, así como también el disolvente utilizado juega un papel importante en la extracción de los compuestos. Además, en el estudio realizado por Montoya-Inzunza (2020) la mayor concentración de fenoles totales se encuentra en

la hoja, seguida por la planta completa (denominada en este estudio como parte aérea) y finalmente el tallo. A diferencia de estos resultados que muestran la parte aérea con la mayor concentración de equivalente de ácido gálico, seguida por la hoja y finalmente el tallo. Estos resultados también son mayores a los reportados en *V. album* por Vicaş et al. (2011), que encontraron 83.93 mg EAG/g de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

En cuanto al efecto de la digestión simulada sobre el contenido de fenólicos totales (Cuadro 5), en la fase gástrica se observa un comportamiento similar en la pérdida significativa de fenólicos totales en los tres tipos de infusiones respecto a la infusión (sin digerir). Así mismo, en la fase intestinal la pérdida de fenoles totales es significativa respecto a la fase gástrica, pese a que la pérdida no es tan drástica respecto a la proporción perdida en la fase gástrica. Estos resultados pueden compararse con los reportados en la infusión de té verde, la cual se reporta en un 6.21% (Annunziata et al., 2018). Por otro lado, existen reportes de otras infusiones que tienen mejor bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos totales, como la de hojas de *Diospyros kaki* que reporta que mantiene una porcentaje de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu del 20% posterior a una fase intestinal utilizando una digestión *in vitro* (Martinez-Las Heras et al., 2017).

Cuadro 5. Cuantificación de fenoles totales en infusiones de *P. brachystachyum* antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión *in vitro*.

Parte de la Planta	Fase Digestiva	Fenoles totales (mg EAG/g)	Fenoles totales en digestión <i>in vitro</i> (%)
Hoja	Infusión	679.51 ± 17.13 ^a	100%
	Gástrica	55.11 ± 4.43 ^b	8.11%
	Intestinal	27.15 ± 0.61 ^c	3.99%
Parte Aérea	Infusión	731.87 ± 17.13 ^a	100%
	Gástrica	66.09 ± 6.19 ^b	9.03%
	Intestinal	32.42 ± 1.43 ^c	4.43%
Tallo	Infusión	614.16 ± 10.48 ^a	100%
	Gástrica	51.04 ± 0.43 ^b	8.31%
	Intestinal	29.07 ± 1.65 ^c	4.73%

Datos mostrados como media ± desviación estándar de 3 réplicas con 3 repeticiones por réplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). EAG: Equivalentes de ácido gálico.

6.2.2. Contenido de Flavonoides Totales

El contenido de flavonoides totales (Cuadro 6) en las infusiones de hoja y parte aérea se mantiene significativamente mejor en comparación con los resultados de la infusión de tallo. Estos resultados pueden compararse con los presentados por Montoya-Inzunza (2020), donde las variantes son que la extracción metanólica tiene un mejor rendimiento (22.67 mg EQ/g en hoja, 19.37 mg EQ/g en planta completa y 15.64 mg EQ/g en tallo) y en que en el estudio mencionado hay una mayor concentración de flavonoides en hoja. Estas diferencias pueden ser causada por las variantes en el solvente. El rendimiento obtenido en estos ensayos es menor que el reportado por Kang et al. (2016) en un extracto con agua caliente de *Korthalsella japonica* Engl., donde se encontraron 8.29 mg ER/g. A pesar del mejor rendimiento de hoja y parte aérea sobre tallo en el contenido de flavonoides totales, las tres infusiones siguen un patrón a través de la digestión (Cuadro 6), donde su punto más bajo ocurre en la fase gástrica, pero aumentando en la fase intestinal. Estos resultados pueden compararse con la disminución (alrededor del 57%) y posterior aumento de la bioaccesibilidad de flavonoides totales en la especie *Rosa rugosa* Thunb (púrpura) al final de la fase intestinal, que se reporta aproximadamente en 109% (Chen et al., 2015). Así mismo, existen reportes donde la concentración de flavonas aumenta posterior a la fase intestinal *in vitro*, respecto a su extracción inicial (Ortega et al., 2009). Por otro lado, otros estudios como el realizado por Martinez-Las Heras et al. (2017) utilizando digestiones *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de té de hojas de *Diospyros kaki* muestra un descenso en el porcentaje de flavonoides posterior a la fase intestinal que mantiene solo el 47.6% de la concentración en la extracción.

Cuadro 6. Cuantificación de flavonoides totales en infusiones de toji antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión *in vitro*.

Parte de la Planta	Fase Digestiva	Flavonoides totales (mg EQ/g)	Flavonoides totales (%)
Hoja	Infusión	4.52 ± 0.15 ^b	100%
	Gástrica	2.93 ± 0.14 ^c	64.82%
	Intestinal	5.01 ± 0.04 ^a	110.84%
Parte Aérea	Infusión	4.76 ± 0.17 ^a	100%
	Gástrica	2.72 ± 0.07 ^b	57.14%
	Intestinal	5.02 ± 0.17 ^a	105.46%

Tallo	Infusión	3.34 ± 0.14 ^b	100%
	Gástrica	1.47 ± 0.06 ^c	44.01%
	Intestinal	3.82 ± 0.14 ^a	114.37%

Datos mostrados como media ± desviación estándar de 3 réplicas con 3 repeticiones por réplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). EQ: Equivalentes de quercetina.

6.2.3. Contenido de Taninos Totales, Taninos Condensados y Taninos Hidrolizables

En la cuantificación de taninos totales (Cuadro 7) en las infusiones sin digerir, la infusión de parte aérea fue la que consiguió mayor concentración (651.34 mg EC/g) de manera significativa, seguido por la infusión de hoja (590.56 mg EC/g) y la que obtuvo una concentración menor fue la infusión de tallo (524.78 mg EC/mL). Estos resultados son mayores a los reportados por Montoya-Inzunza (2020) tanto en hoja (142.59 mg EC/g), tallo (85.71 mg EC/g) y planta completa (137.65 mg EC/g), esto puede ser debido a las diferencias en los solventes y a que en este estudio se elevó la temperatura de extracción.

En la digestión *in vitro*, la bioaccesibilidad de taninos totales (Cuadro 7) de las tres infusiones disminuyen drásticamente desde la fase gástrica. Lo misma disminución ocurre en la fase intestinal, sin encontrar diferencias significativas en las concentraciones de taninos totales entre las infusiones.

Sobre los resultados de taninos condensados en las infusiones sin digerir, la de parte aérea se mantiene con mayor concentración (287.14mg EC/g), seguida por la infusión de tallo (215.13 mg EC/g) y la infusión de hoja es la que tiene menor concentración (177.11 mg EC/g). En el reporte anterior de extracciones metanólicas de *P. brachystachyum* (Montoya-Inzunza, 2020) se muestra que la hoja y parte aérea se obtienen mayores concentraciones de taninos condensados (57.04 mg EC/g y 52.84 mg EC/g, respectivamente). Además, los resultados de taninos condensados de esta investigación son mayores a los 120 mg/g encontrados en extracciones acuosas de *Phoradendron californicum* parasitando mesquite (Assanga et al., 2020). En las tres infusiones existe un comportamiento similar en las fases digestivas *in vitro* en cuanto a la disminución de taninos condensados (Cuadro 7), sufriendo pérdidas significativas tanto en fase gástrica como intestinal.

La mayor cantidad de taninos hidrolizables fue encontrada en hoja (413.45 mg EC/g), seguida por

PA (364.20 mg EC/g) mientras que en tallo se obtuvo la menor concentración (309.65 mg EC/g), siguiendo el patrón de concentraciones reportado por Montoya-Inzunza (2020). En las digestas (Cuadro 7) las tres infusiones sufren pérdidas significativas en la fase gástrica, sin embargo, en fase intestinal se mantiene la concentración en hojas y crece en PA y tallo, pero no de manera significativa.

Los resultados generales de bioaccesibilidad de taninos totales, condensados e hidrolizables son menores a los ya reportados en digestas *in vivo*, pues se reporta una bioaccesibilidad alrededor del 40% para este tipo de compuestos (Serrano et al., 2009). Así mismo, la concentración de taninos condensados posterior a la digestión *in vitro* reportada por Campos-Vega et al. (2015) en residuos de café, tanto en las muestras de tostado medio y en las de tostado más intenso donde hubo un crecimiento especial (88% y 115%, respectivamente).

De acuerdo a lo ya reportado por nuestro grupo de investigación en extracciones hidrofílicas de *P. brachystachyum*, los taninos son el componente bioactivo mayoritario de esta matriz. Esto podría reflejarse en la cuantificación de fenoles totales pues, además de que sigue el mismo patrón, los resultados de la prueba de Folin-Ciocalteu dependen en gran medida de la cantidad de grupos -OH de los compuestos presentes (Platzer et al., 2021); condición que cumplen los taninos al ser compuestos polimerizados. Sin embargo, los estudios de nuestro grupo de investigación sugieren que hay otros compuestos como las cumarinas. Así mismo, sobre lo reportado anteriormente, es notable que hay menor concentración de taninos totales (hoja 142.59 mg EC/g, tallo 85.71 mg EC/g y planta completa 137 mg EC/g) y fenoles totales (hoja 142 mg EAG/g, tallo 73.78 mg EAG/g, planta completa 123.62 mg EAG/g) en las pruebas realizadas por Montoya-Inzunza (2020). Estas diferencias podrían ser causadas por el método de extracción de los compuestos, ya que en el reporte de Montoya-Inzunza (2020) se utilizó metanol para extraer los compuestos hidrofílicos, mientras que en este estudio se realizaron infusiones con agua, lo cual puede resultar en extractos con diferencias en el perfil de compuestos bioactivos presentes (de Hoyos-Martinez et al., 2018). Por otro lado, el calentamiento aplicado durante la elaboración de las infusiones podría ser otro factor relevante en el aumento de taninos y fenoles totales, pues se ha teorizado que el procesamiento con calor podría romper las paredes celulares y, por lo tanto, liberar los fenólicos que dan como resultado un mayor rendimiento fenólico en un extracto (Wang et al., 2007). Así mismo, la obtención de menores concentraciones de flavonoides totales en este estudio respecto al anteriormente realizado por Montoya-Inzunza (2020) podrían estar influenciadas por la

temperatura en la preparación de infusiones.

Los resultados de compuestos fenólicos totales podrían sugerir a una posible sinergia en la formación de compuestos de tipo taninos condensados (donde también se encuentra una posible sinergia) en la infusión de parte aérea, lo que sugiere un aumento en la polimerización de los compuestos de las dos partes que componen la parte aérea.

Cuadro 7. Cuantificación de taninos totales, taninos condensados y taninos hidrolizables en infusiones de toji antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión *in vitro*.

Parte de la planta	Fase digestiva	Taninos totales (mg EC/g)	Taninos totales (%)	Taninos condensados (mg EC/g)	Taninos condensados (%)	Taninos hidrolizables (mg EC/g)	Taninos hidrolizables (%)
Hoja	Infusión	590.56 ± 17.77 ^a	100%	177.11 ± 10.58 ^a	100%	413.45 ± 11.42 ^a	100%
	Gástrica	54.70 ± 0.06 ^b	9.26%	31.08 ± 0.78 ^b	17.54%	23.62 ± 0.82 ^b	5.71%
	Intestinal	26.73 ± 0.01 ^c	4.52%	7.39 ± 0.27 ^c	4.17%	19.34 ± 0.26 ^b	4.67%
Parte Aérea	Infusión	651.34 ± 18.07 ^a	100%	287.14 ± 17.56 ^a	100%	364.20 ± 13.48 ^a	100%
	Gástrica	65.72 ± 0.04 ^b	10.09%	55.42 ± 0.87 ^b	19.30%	10.30 ± 0.91 ^b	2.82%
	Intestinal	31.98 ± 0.03 ^c	4.91%	5.33 ± 0.09 ^c	1.86%	26.65 ± 0.08 ^b	7.31%
Tallo	Infusión	524.78 ± 11.22 ^a	100%	215.13 ± 11.47 ^a	100%	309.65 ± 9.71 ^a	100%
	Gástrica	50.70 ± 0.06 ^b	9.66%	42.14 ± 0.40 ^b	19.58%	8.56 ± 0.36 ^b	2.76%
	Intestinal	28.63 ± 0.01 ^c	5.45%	7.89 ± 0.20 ^c	3.66%	20.74 ± 0.21 ^b	6.69%

Datos mostrados como media ± desviación estándar de 3 réplicas con 3 repeticiones por réplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). EC: equivalentes de catequina.

Los taninos, al ser compuestos de gran peso molecular, pueden presentar decenas de grupos hidroxilos unidos a estructuras fenólicas, lo que les otorga la capacidad de formar complejos con minerales y proteínas. Las interacciones con proteínas se encuentran dadas por afinidad de los taninos hacia algunas proteínas ricas en aminoácidos como prolina, glicina, ácido glutámico y péptidos por dos interacciones importantes: puentes de hidrógeno (entre el grupo carbonilo de los péptidos y los hidrógenos del grupo hidroxilo de polifenoles) e interacción hidrofóbica (entre los aminoácidos neutros y los anillos aromáticos de los taninos) (Vazquez-Flores et al., 2012). La interacción con las proteínas digestivas ricas en prolina, por ejemplo, la amilasa presente en la fase salival del ensayo de bioaccesibilidad, podría ser un factor crucial en la pérdida de concentración de taninos condensados marcado en el proceso digestivo *in vitro*. Esto podría deberse a la formación de enlaces de hidrogeno entre los carbonilos de prolina y los grupos -OH de tipo fenol (Frazier et al., 2010).

Otro factor relevante en el descenso significativo en la concentración de fenoles totales después de la digestión simulada *in vitro* puede ser por los cambios de pH durante el proceso, pues provocan oxidación, racemización y la ya mencionada deprotonación de los compuestos bioactivos (Bermúdez-Soto et al., 2007). Así mismo, los cambios de pH entre fases podrían ser causantes del aumento de flavonoides (en las tres infusiones) y taninos hidrolizables (en infusiones de hoja y tallo) en fase intestinal. Los aumentos de flavonoides en fases intestinales también podrían ser causados por la hidrólisis de taninos condensados, pues se ha reportado que en ensayos *in vivo* las proantocianidinas son convertidas en dímeros de procianidinas B1, B2, B3 y B4, y el trímero C2 fue detectado en orina (Serrano et al., 2009). Los aumentos en las fases intestinales de taninos hidrolizables en parte aérea y tallo podrían ser causados por la hidrólisis a monómeros (como ácido elágico o ácido gálico), pues este fenómeno ya se ha reportado anteriormente en ensayos *in vivo* en intestinos de ratas (Daniel et al., 1991). En este sentido, se ha reportado que un principio básico del aumento de agentes antioxidantes posterior al proceso de digestión es la interacción con enzimas intestinales y sales biliares, pues estas facilitan la salida de compuestos bioactivos ligados a las matrices alimentarias (Martinez-Las Heras et al., 2017).

6.3. Inhibición de la Enzima Lipasa Pancreática

Los resultados de la capacidad inhibitoria de la enzima lipasa pancreática, expresada en porcentaje, se muestran en el cuadro 8. Los resultados muestran un porcentaje más elevado en la infusión de tallo (70.80%), respecto a las infusiones de hoja (63.66%) y parte aérea (64.07%). Estos resultados son comparables con los presentados por Montoya-Inzunza (2020) en extracciones metanólicas, donde existen diferencias en cuanto a que la mayor inhibición se da en la extracción de hoja. En las fases gástricas de las infusiones digeridas se muestra una disminución que no es significativa en la hoja (63.11%), mientras que en la parte aérea si es significativa (60.94%), así mismo en la infusión de tallo (54.12%), donde la disminución es mayor. En el caso de las digestas de fase intestinal, hoja y parte aérea muestran disminuciones significativas (49.65% y 51.08%, respectivamente) respecto a la fase gástrica. Sin embargo, la infusión de tallo en fase intestinal tiene un aumento significativo en el porcentaje de inhibición de la enzima lipasa (78.49%), respecto a su fase anterior y la infusión sin digerir. La tableta de orlistat (fármaco control) obtuvo una inhibición del 68.28%. Los resultados de tallo son comparables con los reportados por Gutierrez-Grijalva et al. (2019), donde *Lippia palmeri* tuvo una disminución en la inhibición de la enzima lipasa en la fase gástrica, mientras que en la fase intestinal hubo un crecimiento en la inhibición de la enzima.

Existen diversos factores que podrían influir en el aumento de la inhibición de la enzima lipasa pancreática por la infusión de tallo en fase intestinal, entre ellos diversos autores comentan que la unión e inhibición de enzimas por antioxidantes es más afín a compuestos polifenólicos de mayor tamaño como los compuestos galiolizados y complejos como los taninos, pues tienen capacidad de unirse a mayores sitios de unión dando lugar a desnaturalización alostérica, en vez de la unión en un solo sitio de la proteína o enzima. En este sentido, como se mencionó anteriormente, la composición de proteínas ricas en prolina también es un factor que facilita la interacción e inhibición enzimática, pues algunos autores señalan que la unión de antioxidantes a prolina puede darse por enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo de la prolina y los grupos fenólicos hidroxilo. Así mismo, en condiciones con mayor pH la actividad de estos compuestos aumenta y por ello es posible que aumente la inhibición enzimática en la fase duodenal respecto a la fase gástrica (Cirkovic Velickovic et al., 2018; Olivas-Aguirre et al., 2014; Quideau et al., 2011).

En este sentido, es resaltable que la efectividad de los polifenoles no está relacionada con su potencial antioxidante (Cirkovic Velickovic et al., 2018), lo que es evidente en este estudio pues, en el caso específico de la infusión de tallo, la capacidad antioxidante no aumenta en fases intestinales pero si aumenta la actividad biológica para la inhibición.

Cuadro 8. Inhibición de la enzima lipasa pancreática de infusiones de *P. brachystachyum* antes y después de las fases gástrica e intestinal en digestión *in vitro*.

Parte de la Planta	Fase Digestiva	Inhibición de Lipasa Pancreática (%)
Hoja	Infusión	63.66% ± 3.91% ^a
	Gástrica	63.11% ± 4.23% ^a
	Intestinal	49.65% ± 2.15% ^b
Parte Aérea	Infusión	64.07% ± 2.38% ^a
	Gástrica	60.94% ± 3.89% ^b
	Intestinal	51.08% ± 1.80% ^c
Tallo	Infusión	70.80% ± 3.99% ^b
	Gástrica	54.12% ± 1.27% ^c
	Intestinal	78.49% ± 4.80% ^a

Datos mostrados como porcentaje ± desviación estándar de 3 réplicas con 3 repeticiones por réplica. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

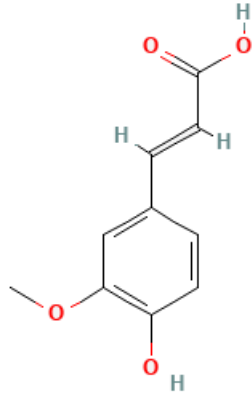
6.4. Identificación y Cuantificación de Compuestos Bioactivos por UPLC

El análisis cromatográfico realizado en las infusiones de *P. brachystachyum* muestra que se encontraron los ácidos ferúlico, quínico, gálico, p-cumárico y cafeico (Figura 2), buscados con base en estándares y comparando las curvas de espectros de la base de datos Massbank of North America. En cuanto a la composición de cada parte de la planta (Cuadro 9), tanto en la infusión de hoja como en la de parte aérea el compuesto mayoritario es el ácido ferúlico (58.12 µg/mL para hoja y 55.15 µg/mL para parte aérea), mientras que en la infusión de tallo tanto el ácido ferúlico (60.77 µg/mL) como el ácido quínico (60.24 µg/mL) son los compuestos mayoritarios. En cambio, en hoja y parte aérea, el ácido quínico es el segundo compuesto más abundante (54.98 µg/mL en hoja y 52.61 µg/mL en parte aérea). Asimismo, en las tres infusiones los ácidos fenólicos ácido

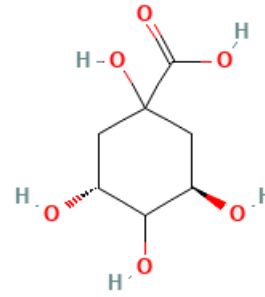
gálico, el ácido cumárico y el ácido cafeico se encuentran por debajo de los dos compuestos más abundantes. Recientemente se han identificado algunos de estos compuestos en otros muérdagos. Por ejemplo, en el muérdago europeo *Viscum album* subs. *austriacum* se identificó ácido gálico en extracciones acuosas. Así mismo, en *Phoradendron bollanum* se encontró ácido cafeico en extracciones metanólicas, y en extracciones acuosas de la misma planta se identificó epigallocatequina [(-)-Epicatequina-(2a-7) (4a-8)-epicatequina 3-O-galactósido] que es formada por la síntesis de ácido gálico. En el mismo estudio, realizado por [García-García et al. \(2021\)](#), se encontró que en ambos muérdagos la mayor parte de compuestos identificados pertenecen al grupo de ácidos hidroxicinámicos, lo que abre ventanas de oportunidad para enfocar futuras investigaciones en muérdagos.

Así mismo, el ácido gálico ha sido reportado en tallo de *Phoradendron californicum* anteriormente ([Iloki-Assanga et al., 2015](#)). En cuanto al contenido de ácido ferúlico, las tres infusiones de *P. brachystachyum* muestran mayor contenido que los 0.032 µg/mL de ácido ferúlico en té verde. Por otro lado, los 0.228 µg/mL de ácido cumárico reportados en té verde son superados por los 0.28 µg/mL en la infusión de hoja de toji, pero el contenido es menor en las infusiones de parte aérea y tallo ([Jeszka-Skowron et al., 2014](#)). El contenido de ácido quínico en las tres infusiones es mayor al reportado en té verde matcha (20.9 µg/mL) por [Cody \(2018\)](#).

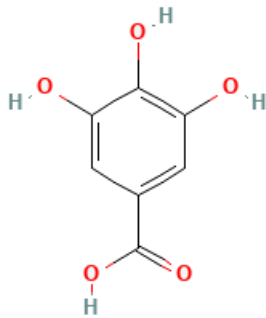
En términos de bioaccesibilidad, los compuestos analizados muestran distintos comportamientos (Cuadro 9). Tanto el ácido ferúlico como el ácido quínico y el ácido gálico siguen el mismo patrón de pérdida significativa por fase digestiva, manteniendo mayores concentraciones en la infusión digerida de parte aérea. Por su parte, el ácido cumárico muestra pérdidas significativas tanto en hoja como en tallo en la fase gástrica (25.00% y 12.50%, respectivamente), llegando a la pérdida total en la infusión de tallo en fase intestinal. Sin embargo, en la infusión digerida de parte aérea muestra un crecimiento significativo en la fase intestinal (66.66%), lo que podría indicar un efecto sinérgico de las partes hoja y tallo para este compuesto en específico. En cuanto al contenido de ácido cafeico (el compuesto minoritario encontrado en este análisis) se muestra un patrón de pérdida significativa de la concentración en cada fase digestiva evaluada, siguiendo el mismo patrón en las infusiones digeridas de hoja y parte aérea (50.00% para la fase gástrica y 0.00% para la fase intestinal), mientras que en la infusión de tallo, que muestra mayor concentración de ácido cafeico (0.04 µg/mL), la pérdida es mayor respecto a las otras infusiones digeridas (25.00% para la fase gástrica y 0.00% para la fase intestinal).



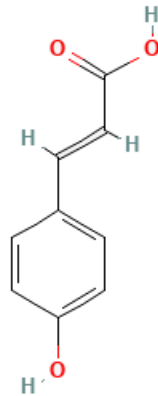
Ácido Ferúlico



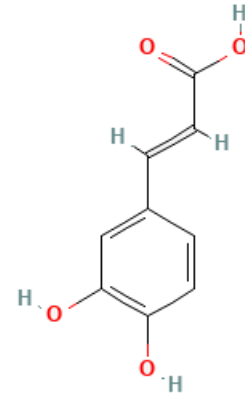
Ácido Quínico



Ácido Gálico



Ácido p-cumárico



Ácido Cafeico

Figura 2. Estructuras de compuestos identificados en infusiones de *P. brachystachyum*

Los porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos después de la digestión intestinal de ácido ferúlico son menores que el 84% reportado en zarzamora comercial (*Rubus liebmannii* Focke) (Sanchez-Velazquez et al., 2021). La bioaccesibilidad de ácido quínico en las tres infusiones es menor que el 29% reportado en infusiones de café a través de pruebas de digestión *in vitro* (López-Froilán et al., 2016). Las tres infusiones de *P. brachystachyum* obtuvieron mayor bioaccesibilidad de ácido gálico que la encontrada en té verde, elaborado con hojas de *Camellia sinensis*, a través de digestiones *in vitro*, el cual presenta 16.14% de bioaccesibilidad en fase gástrica pero se pierde totalmente posterior a la fase intestinal (Yan et al., 2018). Por su parte, la bioaccesibilidad de ácido cumárico en vino de morera negra (*Morus nigra*), la cual se encuentra alrededor del 29.09%, es mayor a la obtenida en hoja y tallo de toji, pero es menor a la obtenida en parte aérea. Así mismo,

la bioaccesibilidad de ácido cafeico en vino de morera negra se mantiene en un 28.12%, contrastando con la pérdida total en las infusiones de *P. brachystachyum* (Celep et al., 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de algunos ácidos fenólicos, no existen indicios de una posible especificidad de estos compuestos contra la enzima lipasa en las infusiones de tallo, a pesar de que compuestos como los ácidos cafeico, ferúlico y cumárico se han relacionado con el efecto supresor de hiperlipidemia (Pimpley et al., 2021). Esto debido a que sería necesario ampliar el análisis a un número más amplio de compuestos, como los mencionados en el Cuadro 2 que, si bien son de carácter lipofílico, no se descarta que existan en menor cantidad en infusiones de Toji. Así mismo, es necesario analizar la posible formación de nuevos compuestos derivados de los ya existentes, pues la interacción con los elementos que forman el proceso digestivo puede generar nuevos metabolitos (Sadeghi Ekbatan et al., 2016).

Cuadro 9. Cuantificación de ácidos fenólicos presentes en infusiones de toji antes y después de la digestión gastrointestinal simulada.

Parte de la Planta	Compuesto	Contenido por fase digestiva (µg/mL)			Bioaccesibilidad (%)	
		ISD*	IFG*	IFI*	IFG	IFI
Hoja	Ácido Ferúlico	58.12 ± 1.40 ^a	15.92 ± 0.33 ^b	4.35 ± 0.09 ^c	27.39	7.48
	Ácido Quínico	54.98 ± 1.92 ^a	23.49 ± 0.13 ^b	4.25 ± 0.07 ^c	42.72	7.73
	Ácido Gálico	9.71 ± 0.48 ^a	2.49 ± 0.34 ^b	0.36 ± 0.01 ^c	25.64	3.70
	Ácido Cumárico	0.28 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.00 ^c	25.00	17.86
	Ácido Cafeico	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	50.00	0.00
	Ácido Ferúlico	55.15 ± 1.17 ^a	19.69 ± 1.61 ^b	10.53 ± 0.40 ^c	35.70	19.10
Parte Aérea	Ácido Quínico	52.61 ± 0.49 ^a	31.24 ± 1.03 ^b	11.89 ± 0.30 ^c	59.38	22.60
	Ácido Gálico	15.28 ± 0.88 ^a	6.30 ± 0.41 ^b	0.36 ± 0.01 ^c	41.23	2.35
	Ácido Cumárico	0.18 ± 0.00 ^a	0.05 ± 0.00 ^c	0.12 ± 0.00 ^b	27.77	66.66
	Ácido Cafeico	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	50.00	0.00
	Ácido Cafeico	0.02 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	50.00	0.00

Tallo	Ácido Ferúlico	60.77 ± 0.98 ^a	15.51 ± 1.20 ^b	8.55 ± 0.37 ^c	25.52	14.07
	Ácido Quínico	60.24 ± 2.47 ^a	30.71 ± 0.79 ^b	9.53 ± 0.15 ^c	50.98	15.82
	Ácido Gálico	22.90 ± 1.05 ^a	9.82 ± 0.31 ^b	0.36 ± 0.01 ^c	42.88	1.57
	Ácido Cumárico	0.08 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	12.50	0.00
	Ácido Cafeico	0.04 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	25.00	0.00

*ISD: Infusión sin digerir, IFG: Infusión fase gástrica, IFI: Infusión fase intestinal. Datos mostrados como media ± desviación estándar de 3 réplicas (n=3). Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa por la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

7. CONCLUSIONES

El contenido de fenólicos, flavonoides y taninos totales en infusiones de *P. brachystachyum* fue afectado negativamente por la digestión gastrointestinal simulada. El contenido de taninos condensados se mantiene estable durante el proceso de la digestión *in vitro*. Por otro lado, el contenido de taninos hidrolizables disminuye significativamente después del proceso digestivo. La capacidad antioxidante de las infusiones de *P. brachystachyum* disminuyó durante el proceso digestivo *in vitro* al medirse mediante los ensayos ORAC y ABTS.

Es importante mencionar, que la inhibición de la lipasa pancreática fue mayor en las infusiones de *P. brachystachyum* elaboradas con el tallo de la planta. En las fases gástricas, las tres infusiones disminuyen de manera significativa su inhibición. En las fases intestinales, tanto hoja como parte aérea disminuyen su capacidad inhibitoria. Sin embargo, es remarcable que la digesta de fase intestinal de tallo aumenta su capacidad inhibitoria de manera significativa (78.49%) siendo mayor que la inhibición inicial en la infusión.

En el análisis cromatográfico de las infusiones de *P. brachystachyum* se identificaron 5 de los 6 compuestos analizados. En hoja y parte aérea, el compuesto que se encontró en mayor proporción fue el ácido ferúlico. Sin embargo, en tallo, tanto el ácido ferúlico como el ácido quínico fueron los compuestos mayoritarios. En cuanto a la bioaccesibilidad de estos 5 compuestos, el ácido cumárico es el que se mantiene hasta la fase intestinal. Mientras que, en tallo, el ácido ferúlico y quínico son los que se mantienen hasta esta fase.

Los resultados obtenidos de esta investigación sugieren que las infusiones de *P. brachystachyum*, sobresaliendo la infusión de tallo, tienen potencial para resistir a las condiciones de las fases digestivas y tener un potencial efecto en la inhibición de la enzima lipasa pancreática.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados de este proyecto sugieren que se continúe con los ensayos de evaluación celular del potencial bioactivo de los extractos de *P. brachystachyum*, incorporando posteriormente estudios de biodisponibilidad e inhibición de la enzima lipasa en modelos *in vivo* utilizando infusiones de tallo. Así mismo, es necesario ampliar el espectro de búsqueda de compuestos en ensayos cromatográficos para identificar el perfil de taninos y compuestos flavonoides.

9. REFERENCIAS

- Alarcón-Sotelo, A., Pedro Gómez, R., De Regules-Silva, S., José Pardinás-Llargo, M., L Rodríguez-Weber, F., & J Díaz-Greene, E. (2018). Actualidades en el tratamiento farmacológico a largo plazo de la obesidad. ¿Una opción terapéutica? *Medicina Interna de Mexico*, 34, 946-958. doi:10.24245/mim.v34i6.2022
- Alvarado RD, L. S. (2005). El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: Muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 11(1), 5-9.
- Andrade Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325-348. doi:10.1016/j.jep.2005.04.019
- Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Daliu, P., Narciso, V., . . . Novellino, E. (2018). Colon Bioaccessibility and Antioxidant Activity of White, Green and Black Tea Polyphenols Extract after In Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion. *Nutrients*, 10(11). doi:10.3390/nu10111711
- Assanga, S. B. I., Luján, L. M. L., Ruiz, J. C. G., McCarty, M. F., Cota-Arce, J. M., Espinoza, C. L. L., . . . Ángulo, D. F. (2020). Comparative analysis of phenolic content and antioxidant power between parasitic *Phoradendron californicum* (toji) and their hosts from Sonoran Desert. *Results in Chemistry*, 2. doi:10.1016/j.rechem.2020.100079
- Benabderrahim, M. A., Elfalleh, W., Sarikurkcü, C., & Sarikurkcü, R. B. (2019). Biological activities and phytochemical composition of organs from *Loranthus europaeus*. *Industrial Crops and Products*, 141. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111772
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F., & García-Conesa, M. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102, 865-874. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.025
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assuncao, R., Ballance, S., . . . Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. doi:10.1038/s41596-018-0119-1
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, in press. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.024
- Celep, E., Charehsaz, M., Akyuz, S., Acar, E. T., & Yesilada, E. (2015). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*, 78, 209-215. doi:10.1016/j.foodres.2015.10.009
- Chen, G.-L., Chen, S.-G., Xie, Y.-Q., Chen, F., Zhao, Y.-Y., Luo, C.-X., & Gao, Y.-Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259. doi:10.1016/j.jff.2015.05.028

- Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82-103. doi:10.1111/1541-4337.12320
- Cody, R. (2018). Ambient Profiling of Phenolic Content in Tea Infusions by Matrix-Assisted Ionization in Vacuum. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 29. doi:10.1007/s13361-018-1990-2
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-1342. doi:10.3390/ijms11041321
- Daniel, E., Ratnayake, S., Kinstle, T., & Stoner, G. (1991). The Effects of pH and Rat Intestinal Contents on the Liberation of Ellagic Acid from Purified and Crude Ellagitannins. *Journal of natural products*, 54, 946-952. doi:10.1021/np50076a004
- de Hoyos-Martinez, P. L., Merle, J., Labidi, J., & Charrier - El Bouhtoury, F. (2018). Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 206, 1138-1155. doi:10.1016/j.jclepro.2018.09.243
- Escribano Hernandez, A., Vega Alonso, A. T., Lozano Alonso, J. E., Alamo Sanz, R., Castrodeza Sanz, J. J., & Lleras Munoz, S. (2010). Dyslipidemia and cardiovascular risk in the adult population of Castile-Leon (Spain). *Gaceta Sanitaria*, 24(4), 282-287. doi:10.1016/j.gaceta.2010.04.004
- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 490-495. doi:10.1016/j.jpba.2009.05.035
- G. Cuatrecasas, X. F. (2000). Recomendaciones para el uso clínico de orlistat en el control de la obesidad. *Endocrinología y Nutrición*, 47, 161-164.
- Galvis-Pérez, J. B. A., Jaiberth Antonio Cardona Arias. . (2013). Prevalencia de dislipidemias en una institución prestadora de servicios de salud de Medellín. *CES Medicina*, 30, 3-13.
- Gamboa Aboado, R., & Vivas, P. (2002). Dislipidemias: nuevas alternativas terapéuticas. *Revista Medica Herediana*, 13, 105-108.
- Garcia-Garcia, J. D., Anguiano-Cabello, J. C., Arredondo-Valdes, R., Candido Del Toro, C. A., Martinez-Hernandez, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., . . . Ilyina, A. (2021). Phytochemical Characterization of *Phoradendron bollanum* and *Viscum album* subs. *austriacum* as Mexican Mistletoe Plants with Antimicrobial Activity. *Plants (Basel)*, 10(7). doi:10.3390/plants10071299
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5. doi:10.5897/JMPR11.1404
- Goderska, K., Gumienna, M., & Czarnecki, Z. (2008). Release of phenolic compounds from bean flour, bean-derived chips and black chokeberry juice and changes in their antioxidant activity during digestion in an in vitro gastrointestinal model. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58, 497-501.

- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., . . . Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem*, *264*, 471-475. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.012
- Gutierrez-Grijalva, E. P., Antunes-Ricardo, M., Acosta-Estrada, B. A., Gutierrez-Urbe, J. A., & Basilio Heredia, J. (2019). Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, *116*, 676-686. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.096
- Hashi, S., Sathiyakumar, V., Byrne, K., Elshazly, M. B., Jones, S. R., & Martin, S. S. (2018). Statin Safety: What Every Health Care Provider Needs to Know. *Current Cardiovascular Risk Reports*, *12*(1), 1. doi:10.1007/s12170-018-0565-x
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., & Prior, R. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*, 4437-4444. doi:10.1021/jf0201529
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*, 1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
- Iloki-Assanga, S. B., Lewis-Lujan, L. M., Lara-Espinoza, C. L., Gil-Salido, A. A., Fernandez-Angulo, D., Rubio-Pino, J. L., & Haines, D. D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Research Notes*, *8*, 396. doi:10.1186/s13104-015-1388-1
- Jeong, J. Y., Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Lee, J. W., Mo, E. J., . . . Lee, M. K. (2015). Pancreatic lipase inhibitory constituents from *Morus alba* leaves and optimization for extraction conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *25*(11), 2269-2274. doi:10.1016/j.bmcl.2015.04.045
- Jeszka-Skowron, M., & Zgoła-Grzeškowiak, A. (2014). Analysis of Antioxidant Activity, Chlorogenic Acid, and Rutin Content of *Camellia sinensis* Infusions Using Response Surface Methodology Optimization. *Food Analytical Methods*, *7*(10), 2033-2041. doi:10.1007/s12161-014-9847-1
- Jia, X., Xie, H., Jiang, Y., & Wei, X. (2018). Flavonoids isolated from the fresh sweet fruit of *Averrhoa carambola*, commonly known as star fruit. *Phytochemistry*, *153*, 156-162. doi:10.1016/j.phytochem.2018.06.007
- Jia, X., Yang, D., Xie, H., Jiang, Y., & Wei, X. (2017). Non-flavonoid phenolics from *Averrhoa carambola* fresh fruit. *Journal of Functional Foods*, *32*, 419-425. doi:10.1016/j.jff.2017.03.025
- Kabera, J. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology 2 (2014)*, *2*, 377-392.
- Kang, D., Park, E., Kim, J.-H., Yang, J., Kim, J., & Kim, M. (2016). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Jeju *Camellia* Mistletoe (*Korthalsella japonica* Engl.). *Journal of Life Science*, *26*, 1074-1081. doi:10.5352/JLS.2016.26.9.1074

- Kp, D. A., & Brindha, P. (2014). Ultra high performance liquid chromatography-ultraviolet-electrospray ionization-microTOF-Q II analysis of flavonoid fractions from *Jatropha tanjorensis*. *Pharmacognosy magazine*, *10*, S472-479. doi:10.4103/0973-1296.139776
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A., & Rietjens, I. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free radical biology & medicine*, *31*, 869-881. doi:10.1016/S0891-5849(01)00638-4
- Lisney, V., Moisés, R., Bermudez, V., Elliuz, L., Fernando, B., Mayela, C., . . . Anilsa, A. (2007). Tratamiento de la Obesidad: Presente, pasado y futuro. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, *26*, 20-28.
- López-Froilán, R., Ramírez-Moreno, E., Podio, N., Pérez-Rodríguez, M., Cámara, M., Baroni, V., . . . Sánchez-Mata, M. (2016). In vitro assessment of potential intestinal absorption of some phenolic families and carboxylic acids from commercial instant coffee samples. *Food & Function*, *7*. doi:10.1039/C6FO00315J
- Lopez-Martinez, S., Navarrete-Vazquez, G., Estrada-Soto, S., Leon-Rivera, I., & Rios, M. Y. (2013). Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). *Natural Product Research*, *27*(2), 130-136. doi:10.1080/14786419.2012.662646
- Martinez-Gonzalez, A. I., Alvarez-Parrilla, E., Diaz-Sanchez, A. G., de la Rosa, L. A., Nunez-Gastelum, J. A., Vazquez-Flores, A. A., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2017). In vitro Inhibition of Pancreatic Lipase by Polyphenols: A Kinetic, Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Study. *Food Technology and Biotechnology*, *55*(4), 519-530. doi:10.17113/ftb.55.04.17.5138
- Martinez-Las Heras, R., Pinazo, A., Heredia, A., & Andres, A. (2017). Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*, *214*, 478-485. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.104
- Montoya-Inzunza, L. A. (2020). Caracterización de compuestos fenolicos y potencial inhibitorio de extractos hidrofílicos de *Phoradendron brachystachyum* sobre lipasa pancreatica. (MC), CIAD
- Moon, S. H., & Kim, M. Y. (2018). Phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and antipancreatic lipase activities of fermented *Camellia japonica* L leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(5). doi:10.4314/tjpr.v17i5.22
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Lopez-Diaz, J. A., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2014). Hydrolyzable tannins; biochemistry, nutritional & analytical aspects and health effects. *Nutrición Hospitalaria*, *31*(1), 55-66. doi:10.3305/nh.2015.31.1.7699
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M. P., Macià, A., & Motilva, M. J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *Journal of agricultural and food chemistry*, *57*(13), 5743-5749. doi:10.1021/jf900591q
- Ovando-Martínez, M., Gámez-Meza, N., Molina-Domínguez, C. C., Hayano-Kanashiro, C., & Medina-Juárez, L. A. (2018). Simulated Gastrointestinal Digestion, Bioaccessibility and

Antioxidant Capacity of Polyphenols from Red Chiltepin (*Capsicum annuum* L. Var. *glabriusculum*) Grown in Northwest Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73. doi:10.1007/s11130-018-0669-y

- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6-R15. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x
- Pimpley, V. A., & Murthy, P. S. (2021). Influence of green extraction techniques on green coffee: Nutraceutical compositions, antioxidant potential and in vitro bio-accessibility of phenolics. *Food Bioscience*, 43. doi:10.1016/j.fbio.2021.101284
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). How Does the Phenol Structure Influence the Results of the Folin-Ciocalteu Assay? *Antioxidants (Basel)*, 10(5). doi:10.3390/antiox10050811
- Quideau, S., Deffieux, D., & Douat-Casassus, C. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties. Biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie*, 50, 586-621.
- Ramirez-Espinosa, J. J., Garcia-Jimenez, S., Rios, M. Y., Medina-Franco, J. L., Lopez-Vallejo, F., Webster, S. P., . . . Estrada-Soto, S. (2013). Antihyperglycemic and sub-chronic antidiabetic actions of morolic and moronic acids, in vitro and in silico inhibition of 11beta-HSD 1. *Phytomedicine*, 20(7), 571-576. doi:10.1016/j.phymed.2013.01.013
- Rios, M. Y., Lopez-Martinez, S., Lopez-Vallejo, F., Medina-Franco, J. L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., . . . Estrada-Soto, S. (2012). Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia*, 83(6), 1023-1029. doi:10.1016/j.fitote.2012.05.014
- Sadeghi Ekbatan, S., Sleno, L., Sabally, K., Khairallah, J., Azadi, B., Rodes, L., . . . Kubow, S. (2016). Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. *Food Chemistry*, 204. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.140
- Sanchez-Velazquez, O. A., Mulero, M., Cuevas-Rodriguez, E. O., Mondor, M., Arcand, Y., & Hernandez-Alvarez, A. J. (2021). In vitro gastrointestinal digestion impact on stability, bioaccessibility and antioxidant activity of polyphenols from wild and commercial blackberries (*Rubus* spp.). *Food & Function*, 12(16), 7358-7378. doi:10.1039/d1fo00986a
- Saxena, A., Gupta, A., Vittala, P., Nainar, M., Bob, M., & Kasibhatta, R. (2014). Quantification of urapidil in human plasma using ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (UPLC–MS/MS) for pharmacokinetic study in healthy indian volunteers. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 568-570.
- Serrano, J., Puupponen-Pimia, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 Suppl 2, S310-329. doi:10.1002/mnfr.200900039
- Singh, A., Sarkar, S., Gaber, L., & Perazella, M. (2007). Acute Oxalate Nephropathy Associated With Orlistat, a Gastrointestinal Lipase Inhibitor. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 49, 153-157. doi:10.1053/j.ajkd.2006.10.004

- Somova, L. O., Nadar, A., Rammanan, P., & Shode, F. O. (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*, *10*(2-3), 115-121. doi:10.1078/094471103321659807
- SSA. (2012). Guía de Práctica Clínica. In (Vol. E.78. Trastornos de metabolismo de las lipoproteínas y otras lipidemias.).
- Surco-Laos, F., Manuel, V., Loyola, E., Dueñas, M., & Santos, C. (2016). Actividad antioxidante de metabolitos de flavonoides originados por la microflora del intestino humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *82*, 29-37. doi:10.37761/rsqp.v82i1.49
- Tang, Y., Zhang, B., Li, X., Chen, P. X., Zhang, H., Liu, R., & Tsao, R. (2016). Bound Phenolics of Quinoa Seeds Released by Acid, Alkaline, and Enzymatic Treatments and Their Antioxidant and alpha-Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(8), 1712-1719. doi:10.1021/acs.jafc.5b05761
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 669-675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
- Thearle, M., & Aronne, L. J. (2003). Obesity and pharmacologic therapy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *32*(4), 1005-1024. doi:10.1016/s0889-8529(03)00066-5
- Vazquez-Flores, A., Alvarez-Parrilla, E., Ja, L.-D., Wall, A., & De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*, *6*, 84-93.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y. O., Robles-Sánchez, M., . . . González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function*, *5*(2), 189-197. doi:10.1039/C3FO60361J
- Vicaș, S., Rugină, D., & Socaciu, C. (2011). Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *78*, 693-700. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.008
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzynski, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients*, *12*(5). doi:10.3390/nu12051401
- Worsztynowicz, P., Szukalska, M., Bialas, W., Grajek, W., & Olkowicz, M. (2014). Pancreatic α -Amylase and Lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry*, *49*, 1457-1463. doi:10.1016/j.procbio.2014.06.002
- Yan, S., Shao, H., Zhou, Z., Wang, Q., Zhao, L., & Yang, X. (2018). Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during in vitro

digestion. *Journal of Functional Foods*, 42, 129-136. doi:10.1016/j.jff.2018.01.006

Yu, Y., Zhang, B., Xia, Y., Li, H., Shi, X., Wang, J., & Deng, Z. (2019). Bioaccessibility and transformation pathways of phenolic compounds in processed mulberry (*Morus alba* L.) leaves after in vitro gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 60. doi:10.1016/j.jff.2019.06.008